**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

RICARDO VINICIUS NUNES ARANTES

**Avaliação microtomográfica e histomorfométrica do
processo de reparo de defeitos ósseos em calvária de
coelhos tratados com diferentes materiais de enxerto**

**BAURU
2016**

RICARDO VINICIUS NUNES ARANTES

**Avaliação microtomográfica e histomorfométrica do
processo de reparo de defeitos ósseos em calvária de
coelhos tratados com diferentes materiais de enxerto**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

**BAURU
2016**

Arantes , Ricardo Vinicius Nunes

**Ar14a Avaliação microtomográfica e histomorfométrica do processo de reparo de defeitos ósseos em calvária de coelhos tratados com diferentes materiais de enxerto/Ricardo Vinicius Nunes Arantes – Bauru, 2016.
151 p. : il. ; 30 cm**

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

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

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

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em 17 de Junho de 2013.

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da FOB-USP

Processo nº: 020/2013

Data:17/06/2013

DEDICATÓRIA

Se cheguei mais longe, foi por estar

em pé nos ombros de gigantes...

(Isaac Newton)

*...aos amados, **Olavo, Heloisa e Fernanda;**
e aos mestres, **Dra. Tania e Dr. Rumio***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, autor e consumidor da vida; minha oração em gratidão por Seu infinito amor e cuidado. A ti toda honra e glória por mais essa conquista. Obrigado por cada momento, cada alegria, dificuldade... e principalmente por todas as pessoa que colocou em meu caminho.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rumio Taga**, um mestre em excelência; detentor genuíno da sublime arte do lecionar. Simples e sereno, de poucas palavras e gestos, capaz de transformar de sala o lugar que está. Notável pesquisador que provém do que lhe ainda é maior; seu lado humano de ser. Um sábio, dos maiores que conheci, que pouco precisou falar para me ensinar... reverencio, hoje e sempre, com imenso respeito e eterna gratidão, à ti, MESTRE RUMIO, descrevo meu sincero, MUITO OBRIGADO. NUNCA me esquecerei de cada aprendizado.

À você, **Dra. Tânia Mary Cestari**, pela imensa dedicação, notável conhecimento e amorosa atenção. Ora orienta, ora educa... o fazendo com zelo de mãe. Discípula aos moldes do mestre; como não ser exemplar!? Concede vida de projetos à artigos, com competência e qualidade tamanha. Que privilegio foi poder contigo conviver, e o melhor... aprender. O Ricardo de outrora incomparável com o de hoje és... Graças a você. Nunca terei como agradecer-te. Deus foi plenamente generoso ao colocá-la em minha vida. Que venha o futuro, e com ele muitos ensinamentos teus. Estará eternizada em meu coração. Muito Obrigado, Cestari.

E a você, **Bruno A. Viscelli**; Instrumento de Deus, provido de imenso coração; generoso e pronto a servir; sorri até sem querer e ajuda a quem precisar. Se aqui cheguei, foi por contigo caminhar e me espelhar. Muito obrigado pelos feitos teus; Agradecido será o adjetivo mais expressado por mim ao mencionar teu nome, meu grande irmão.

AGRADECIMENTOS

Aos **Profs. Dr. Carlos Alberto Vicentini** (UNESP-Bauru) e **Prof^a Dra. Irene B. Vicentini** (UNESP-Bauru), por despertarem em mim a vontade em fazer ciência, pelo exemplo profissional, e por me acompanharem nos muitos momentos de minha vida. Arelado estarão vossos nomes em qualquer nova conquista acadêmica que eu alcançar. Muito obrigado.

Aos Professores do Laboratório de Histologia, **Profa. Dra. Camila O. R. Pegoraro**, **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis** e **Prof. Dr. Gustavo P. Garlet**, por abrirem as portas deste laboratório, mostrarem se acessíveis e por contribuírem em meu aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Carlos F. dos Santos**, pelo privilegio de poder desfrutar de seus ensinamentos, que certamente transcendem o âmbito profissional. Projeta e impulsiona todos ao seu redor. Grande exemplo.

As secretárias **Vera Cruz Rufino** e **Dalva** pela dedicação e disposição demonstrada ao longos desse anos de pós graduação e por não medirem esforços para ajudar com as diversas dificuldades. Muito obrigado pelo carinho.

Aos **Profs. Alexandre Carrara** e **Alexandre Sassaki**, educadores físicos, aguerridos e dedicados; lutadores incansáveis de nossa profissão. Fazem das dependências esportivas sua “sala” de aula, promovendo muito mais que saúde e bem estar, mas sim, a vida. Obrigado por abrirem as portas dessa faculdade, pelos muitos exemplos, conselhos e risadas. Tornaram-se muito mais que notórios colegas de profissão, mas grandes amigos. Estendo também a todos os profissionais da sessão esportiva pela harmoniosa convivência e os muitos ensinamentos.

A todos **funcionários e terceirizados da FOB**, os responsáveis por concederem vida a essa instituição. Agradeço pelos muitos momentos compartilhados.

Ao **Laboratório de Histologia**, a casa de todos; acolhe quem precisa, faz-se amado por quem frequentar. Obrigado por me ensinar que competência e alegria podem caminhar juntos. Registro aqui meus sinceros agradecimentos à vocês, **Andréia Espíndola**, **Aldivina Alves**, **Ana Claudia Araujo-Pires**, **Angélica Lopes**, **Bruna Bighetti**, **Carol Rocha**, **Carol Franciscone**, **Cláudia Biguetti**, **D. Creusa**, **Elcia Silveira**, **Franco Cavalla**, **Gabriela Gennaro**, **Lourdes Chiok**, **Michelle Soriani**, **Priscila Colavite**, **Rafael Ortiz** e **Suelen Pains** e **Tamiris Vallim** pelas amizades, momentos de risadas e ciência compartilhada/desenvolvida. Em especial à vocês, **Carol Rocha** e **Suelen Pains**, pela incansável disposição, auxiliando-me durante as fases do meu doutorado. Muito obrigado.

À **Daniele Ceolin**, **Patrícia Mortágua** e **Teresa Silva**, pelo amor, carinho e cuidado gratuito. De um profissionalismo corriqueiro, com suas formalidades habituais; à mais preciosa amizade, que mesmo em meio ao trabalho, permitiram enxugar tanto lágrimas, que de uma tristeza provinha, como das inúmeras gargalhadas que de um conto ao outro rolavam. Obrigado pelo zelo, preocupação, incentivos, histórias engraçadas (foram muitas), incontáveis conversas, e claro, pelos abraços matutinos... que de tão receptivos, “ouviam-se” sem escutar uma palavra sequer, “como você é querido”. Por abraços também me expressei, porém, hoje quero fazê-lo diferente; por meio das palavras agradecer e dizer que nunca me esquecerei de vocês. Às vocês, **Dani**, **Paty** e **Tê**, o abraço mais apertado... com meu gigante muito obrigado.

Aos “pequenos” notáveis, **Ever Mena**, **Daniela Pereira**, **Nathalia Lopes** e **Paula Sanches**, que irradiam alegria e pureza. Quão belos são os vossos corações e gestos. Ensinaram-me além da ciência; foram professores sublimes da humildade, solidariedade e de um dos laços mais preciosos; a amizade. Dividiram as dores e multiplicaram as alegrias... Bem-aventurado foi Deus ao colocá-los em minha vida. Que Ele continue cuidando de vocês para que outros tenham o privilégio de serem igualmente abençoados. Muito obrigado, “pequenos”.

A vocês, **Carlos Eduardo Repeke, Renato Martins e Thiago José Dionísio**, que tornaram-se meus irmãos. Agradeço pelos muitos ensinamentos tanto na ciência como na vida. Notórios no que fazem, não se esquecem da grandeza do seu ser; Exemplos incontestáveis! Obrigado por tudo. Nunca terei palavras pra expressar o quão significativos foram e são.

Aos amigos de pós-graduação da FOB, **Fernanda Piras, Guilherme Moreira, Lucas Cambiaghi, Patrick Alves, Rodrigo Moreira e Verena Cunha**, meu muito obrigado pelos inúmeros momentos divididos e compartilhados. Em especial a você, **Lucas**. Muito obrigado pela grande amizade de todos esses anos, e pela honra de conviver com seus pais.

Aos amigos de **Futebol da FOB e UNESP-Bauru**, por proporcionar descontração e alegria. Das dádivas futebolísticas, as amizades são as melhores. Em especial aos amigos **Bruno Constantini, Diego Lorenzon, Elder Marcon, Evandro Dionizio, Fabio Frigo, Jussaro Duque, Luis Alcalde, Lucas Lorencinho, Rafael Maekawa, Roberto Braga, e Rafael Sales**.

Aos amigos **Amanda Penha, Barbara e Debora Fumes, Christiano e Mariana Catála, Leandro Siqueira, Pedro Octávio, Plinio Lopes e Tonny Peres**, pelas experiências acrescidas e momentos compartilhados. Em especial ao **Christiano e Mariana Catála** pela estimável amizade.

Aos amigos **Alanis Benitez, Ana Nakano, Andre Jimenez, Davi Tressoldi, Juliana Vieira, Rodrigo Padilha, Samuel Almeida, Vânia Rosa, Vivian Rodrigues e Wesley Belloni** pelas infindáveis risadas, momentos de descontração e amizade sincera.

Aos meus irmãos de longa data, **Adriano Nuevo, Clóvis e Cleber Correia, Eric Pablo, Eliza Carolina, Julio Robson, Luciano Caetano, Marcio Esdras, Rafael, Renato e Rodrigo Agápio, Rodrigo e Vitor Gouvea, e Thamara Cristina**, por demonstrarem que a distância é insignificante perto de tamanha fraternidade. Realmente são irmãos incondicionais.

A vocês, **Andréa Falcão, Ilana Ramalho e Thereza Pacheco**, pela graciosidade e doçura. A exuberância e beleza não resume-se apenas as praias e paisagens, mas também a vocês, seres iluminados e admirados. Muitíssimo obrigado por cada momento vivido, compartilhado. Ficarão eternizadas em meu coração. Em especial a você, **Andréa Falcão (Dedéa)**, por seu amor e cuidado sem fim. Um presente precioso vindo dos céus. Que os anos e a plena alegria nos sejam incontáveis.

As Famílias, **Bastos, Cambiaghi, Lima, Macedo, Nuevo, Porfírio e Silva** que sempre me acompanharam, adotaram e me ajudaram em minha jornada. Em especial ao **André, Cláudia, Jeziel, e Thomaz Silva**, e também a você, **Tatiana Koschelny**, responsáveis maiores pela minha vinda a Bauru, pelas vitórias nos muitos momentos difíceis e por serem amigos sempre presentes. Vocês foram e são instrumentos de Deus. Que Ele abençoe plenamente vocês.

Ao todos os meus familiares **Arantes e Nunes** que mesmo em meio a distância e dificuldades, torceram e intercederam fervorosamente pela minha vida. Em especial aos meus tios **Laercio e Miraluzia Lima** e primos **Tarciso e Laura**, pelo grande amor e carinho compartilhado para comigo.

E a vocês, meus amados: **Olavo Batista Arantes, Heloisa Nunes Lima, Fernanda Nunes Arantes**, os alicerces fundamentais do meu ser. Que a cada conquista vocês sintam-se recompensados e plenamente realizados por todo esforço. Obrigado por todo incentivo e sacrifício, abstendo-se, as vezes, dos próprios sonhos para que o os meus se tornassem realidade. Obrigado pelo amor incondicional, dedicação em minha educação e pelo exemplo de honestidade e princípios valiosos de caráter e dignidade. Obrigado por me ensinarem desde cedo a arte de dividir e compartilhar, seja no simples gesto de bondade a mais complexa forma de amor. Em nenhum dialeto haverá palavras para descrever o tamanho da gratidão e amor que tenho por vocês. Amo vocês.

Muito obrigado,

Ricardo Vinicius Nunes Arantes

AGRADECIMENTOS INSTITUICIONAIS

À Universidade de São Paulo (USP).

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP).

*À Disciplina de **Histologia do Departamento de Ciências Biológicas** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.*

*À Empresa **BAUMER – Divisão Genius** pelo fornecimento dos biomateriais Gen-Ox® Inorg e GenPhos XP® utilizados nesta pesquisa.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado.*

EPÍGRAFE

“..Abençoados somos, para o próximo abençoar..

... por isso vivemos e fazemos ciência.

Ricardo Arantes

RESUMO

Um dos grandes desafios para o tratamento de defeitos ósseos extensos na região bucomaxilofacial têm sido o desenvolvimento de um biomaterial substituto ósseo ao enxerto autólogo. No presente trabalho avaliou-se a formação óssea e a biodegradabilidade do osso desproteínizado bovino Bio-Oss® e do seu similar GenOx Inorg® e da cerâmica bifásica GenPhos® XP no processo de reparo de defeitos ósseos cranianos em coelhos, comparativamente ao osso autólogo (controle positivo) e coágulo sanguíneo (controle negativo). Foram realizados cirurgicamente defeitos bilaterais de 8-mm de diâmetro nos ossos parietais de 39 coelhos. A seguir os defeitos foram preenchidos aleatoriamente com 0,1cm³ de material ou coágulo conforme cada grupo de tratamento. Após os períodos de 4, 8 e 24 semanas os crânios foram coletados, analisados no microtomógrafo e processados histologicamente. O percentual de volume do defeito ocupado pelo material e osso neoformado foi avaliado pela microtomografia e histomorfometria, enquanto que, para a medula óssea, tegumento e tecido conjuntivo, apenas pela análise histomorfométrica. Os resultados quantitativos obtidos foram comparados estatisticamente pela ANOVA a dois critérios (período e tratamento) e teste de Tukey com $p < 0,05$. A intensidade da associação linear dos dados microtomográficos e histomorfométricos avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson, mostraram correlação moderada a forte. Nos períodos iniciais de reparo (30 e 60 dias), os defeitos tratados com Bio-Oss®, GenOx® Inorg e GenPhos® XP apresentaram manutenção do volume do material enxertado (Vvi médio de 34%) e formação óssea menor e mais imatura em relação grupo autólogo (Vvi = 22% vs. 32% no grupo autólogo). No período mais tardio (180 dias) a quantidade de formação óssea foi estatisticamente similar nos grupos Bio-Oss® (Vvi = 27%), GenOx® Inorg (Vvi = 26%) e GenPhos® XP (Vvi = 20%) porém, o GenOx® Inorg promoveu a formação de um tecido ósseo mais organizado e com maior acúmulo de biomaterial+osso+medula óssea (Vvi = 67,9%) comparado ao GenPhos® XP (Vvi = 58,9%) e Bio Oss (Vvi = 55,6%) mas, inferior ao do enxerto autólogo (Vvi = 78%). Os resultados aqui obtidos permitem concluir que o osso autólogo promove rápida formação e maturação óssea, porém não consegue promover o reestabelecimento completo da díploe removida cirurgicamente. Os materiais BioOss, GenOx® Inorg e GenPhos® XP são excelentes materiais osteocondutores levando a formação óssea em toda extensão do defeito, sendo o GenOx® Inorg o que apresenta menor grau de reabsorção e maior e melhor preenchimento do defeito.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Biomaterial, Cerâmica bifásica de Cálcio

ABSTRACT

Microtomographic and histomorphometric evaluation of bone repair in rabbit cranial defects treated with different graft materials

One major challenge for treatment of critical size defects in maxillofacial region has been the development of a substitute biomaterial to the autogenous bone grafts. In present study we evaluated the bone formation and biodegradability of deproteinized bovine bone Bio-Oss® and GenOx® Inorg, and biphasic calcium phosphate GenPhos XP® during bone repair process in rabbits cranial defects compared to autogenous bone (positive control) and blood clot (negative control). In parietal bone of 39 rabbits were made bilateral 8-mm diameter defects, which were filled randomly with 0,1cm³ material or clot as each treatment group. After periods of 4, 8 and 24 weeks skulls of animals were collected, analyzed the MicroCT scanner and histologically processed. The percentage of defect volume occupied by biomaterial and new-formed bone were assessed by histomorphometry and microtomography, while the bone marrow, connective tissue and tegument only by first analysis. The quantitative data were compared by two-way ANOVA analysis (time and treatment) and Tukey's test at p <0.05. The intensity of the linear association of MicroCT and morphometric data evaluated by the Pearson correlation coefficient, showed moderate to strong correlation. In the early repair periods (30 and 60 days), the defects treated with Bio-Oss, GenOx® Inorg and GenPhos® XP showed maintenance of the graft material volume (average Vvi of 34%) and lower and more immature bone compared autograft group (Vvi = 22% vs. 32% in the autograft group). In the later period (180 days) the amount of bone formation was statistically similar to the groups Bio-Oss® (Vvi = 27 %), GenOx® Inorg (Vvi = 26%) and GenPhos® XP (Vvi = 20%) however, the bone formation in GenOx® Inorg was more organized and with greater accumulation of particles + bone tissue + bone marrow (Vvi = 67.9%), when compared to GenPhos® XP (Vvi = 58.9%) and Bio-Oss® (Vvi = 55.6%) but lower than the autograft (Vvi = 78%). It was concluded that the autogenous bone promotes rapid bone formation and maturation, but cannot promote the complete reestablishment of diploe surgically removed. The Bio-Oss®, GenOx® Inorg and GenPhos® XP are excellent osteoconductive materials leading to bone formation in the full extent of the defects, and the GenOx® Inorg showing less absorption promotes more and better defect filling.

Keywords: Hydroxyapatite, Biomaterial, Biphasic calcium phosphate

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1</u>	- Esquema mostrando a subdivisão dos animais nos diferentes períodos experimentais	55
<u>Figura 2 A-F</u>	- Procedimentos cirúrgicos	56
<u>Figura 3</u>	- Software DataViewer utilizado para as análises bidimensionais mostrando o alinhamento coronal, transaxial e sagital.....	58
<u>Figura 4</u>	- Imagens do Software DataViewer após o alinhamento de um dos defeitos mostrando no plano coronal (A-C) e sagital (D-F) as 3 medidas obtidas para a determinação da altura da área enxertada	59
<u>Figura 5</u>	- Imagens do Software DataViewer após o alinhamento de um dos defeitos mostrando no plano coronal (A) , transaxial (B) e sagital (C) as 3 medidas obtidas para a determinação do diâmetro do defeito.....	60
<u>Figura 6</u>	- Software CTAn mostrando uma imagem bidimensional transaxial de um dos defeitos (A) e subsequente binarização para a quantificação do biomaterial (B) e do tecido ósseo neoformado (C) e os seus respectivos resultados quantitativos determinados pelo software (D e E)	61
<u>Figura 7</u>	- Determinação da área total analisada e a área total ocupada por cada constituinte no defeito pela unidade de medida PIXEL ² no programa de análise AxioVision.	63
<u>Figura 9</u>	- Grupo Coágulo	71
<u>Figura 10</u>	- Grupo Autógeno	73
<u>Figura 11</u>	- Grupo Bio-Oss[®]	75
<u>Figura 12</u>	- Grupo GenOx[®] Inorg	77
<u>Figura 13</u>	- Grupo GenPhos[®] XP	79
<u>Figura 14</u>	- Gráfico da média e desvio padrão do diâmetro do defeito (mm) na calvária dos coelhos nos diferentes grupos e períodos experimentais. (N = 5 defeitos/período)	81
<u>Figura 15</u>	- Gráfico da média e desvio padrão da altura do defeito (mm) na calvária dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais (N = 5 defeitos/período)	82

Figura 16 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume total do material (BV/VT) (%) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período.....	83
Figura 17 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume total do tecido ósseo	85
Figura 18 - Grupo Coágulo	89
Figura 19 - Grupo Autógeno	91
Figura 20 - Grupo Bio-Oss®	93
Figura 21 - Grupo GenOx® Inorg	95
Figura 22 - Grupo GenPhos®	97
Figura 23 - Fotomicrografias da calvária dos coelhos evidenciando o íntimo contato entre os materiais e o tecido ósseo neoformado (Figs. A-M)	101
Figura 24 - Fotomicrografias da calvária dos coelhos mostrando a atividade das células gigantes e macrófagos nos defeitos tratados com osso Autógeno, Bio-Oss®, GenOx® Inorg e GenPhos® XP no período 60 dias	103
Figura 25 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume do material (%) nos defeitos ósseos dos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre grupos e períodos; N=5 defeitos/grupo e período	105
Figura 26 - Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume do Tecido ósseo (%) dos defeitos nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período	107
Figura 27 - Gráfico da média e desvio padrão do percentual de Tecido Conjuntivo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período	109

Figura 28 - Gráfico da média e desvio padrão da medula óssea nos defeitos na da calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período.....	111
Figura 29 - Gráfico da média e desvio padrão do percentual de tegumento nos defeitos na calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e períodos; N=5 defeitos/grupo e período.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Média e desvio padrão da massa corporal (kg) dos animais no dia da cirurgia (MCi) e ao término de cada período experimental (MCf). Comparação entre períodos ANOVA a um critério e comparação entre a MCi e MCf pelo teste “t” pareado	67
Tabela 2	- Comparação do diâmetro dos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	82
Tabela 3	- Comparação da altura dos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	82
Tabela 4	- Comparação entre a densidade de volume total do material nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	84
Tabela 5	- Média e desvio-padrão da densidade de volume total de biomaterial (%) nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período.....	84
Tabela 6	- Comparação entre a densidade de volume total de tecido ósseo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	85
Tabela 7	- Média e desvio-padrão da densidade de volume total de tecido ósseo (%) nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento	86
Tabela 8	- Comparação entre o percentual de biomaterial nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	106

Tabela 9 - Média e desvio-padrão do percentual de material (%) nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento.....	106
Tabela 10 - Comparação entre o percentual de tecido ósseo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período.....	107
Tabela 11 - Média e desvio-padrão do percentual de tecido ósseo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período.....	107
Tabela 12 - Média e desvio-padrão do percentual de tecido ósseo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento.....	108
Tabela 13 - Comparação entre o percentual de tecido conjuntivo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	109
Tabela 14 - Média e desvio-padrão do percentual de tecido conjuntivo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período	109
Tabela 15 - Média e desvio-padrão do percentual de tecido conjuntivo nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento.....	110
Tabela 16 - Comparação entre o percentual de medula óssea nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	111

Tabela 17 -	Média e desvio-padrão do percentual de medula óssea nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período	111
Tabela 18 -	Média e desvio-padrão do percentual de medula óssea nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento	112
Tabela 19 -	Comparação entre o percentual de tegumento nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios.....	113
Tabela 20 -	Média e desvio-padrão do percentual de tegumento nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento	113
Tabela 21 -	Correlação de Pearson para as relações entre o BV/TV obtido pela análise microtomográfica (3D) e histomorfométricas (2D) para os biomateriais e para o tecido ósseo na área do defeito nos diferentes grupo experimentais (n=15).....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-TCP	<i>Beta-tricalcium phosphate</i> (fosfato beta-tricálcio)
μA	Microampère
μm	Micrômetro
®	Marca registrada
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Aai	Fração de área ocupada por determinado constituinte
ABB	<i>Anorganic bovine bone</i> (osso inorgânico bovino)
ANOVA	Análise de variância
BCP	<i>Biphasic calcium phosphate</i> (fosfato de cálcio bifásico)
BCP-S	<i>Biphasic calcium phosphate spherical</i> (fosfato de cálcio bifásico esférico)
Bio-Oss®	Matriz óssea inorgânica bovina da <i>Geistlich Pharma AG</i> (Wolhusen, Suíça)
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i> (Proteína morfogenética óssea 2)
Bonefill®	Matriz óssea inorgânica bovina da <i>Bionnovation</i> (Bauru, SP, Brasil)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
BV	<i>Bone volume</i> (volume ósseo)
BV/TV	<i>Bone volume/Total volume</i>
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP
CGM	Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho
cm	Centímetro
Df	<i>Degrees of freedom</i> (graus de liberdade)
EBR-027-500	Matriz óssea inorgânica bovina (<i>Dentsply International</i> , York, PA, USA)

ERB027	Matriz óssea inorgânica bovina (Dentsply International, York, PA, USA)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
Endobons[®]	Matriz óssea inorgânica bovina da (Merck KGaA, Merck Biomaterial, Darmstadt, Alemanha)
Enrofloxacino 2,5%	(Flotril [®] 2,5%; Intervet - Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil)
F	Valor-F estatístico; razão F
Fig	Figura
g	Grama
Gen-Ox[®] Inorg	Matriz óssea inorgânica bovina da <i>Baumer S.A.</i> (Mogi Mirim, SP, Brasil)
GenPhos XP[®]	cerâmica de fosfato de cálcio bifásica porosa da <i>Baumer S.A.</i> (Mogi Mirim, SP, Brasil)
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
i	Cada constituinte
kg	Quilograma
Keil Bonet[®]	Matriz óssea inorgânica bovina da (Braun Milsungen, Melsungen, Alemanha)
Ketamina	(Dopalen [®] AgriBrands Ltda)
kV	Quilovolt
L-SBC	<i>large-size bone ceramic</i>
MCf	Massa corporal final
MCi	Massa corporal inicial
mg	Miligrama
Micro-CT	<i>Microcomputed tomography</i> (tomografia microcomputadorizada ou microtomografia computadorizada)
mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
mm³	Milímetro cúbico
N	Número

Nutricoeelho[®]	Ração para alimentação dos coelhos (Purina do Brasil, Paulínia, SP, Brasil)
°C	Graus <i>Celsius</i>
OsteoGraf[®]	Matriz óssea inorgânica bovina da (Dentsply, EUA)
P	Loja cirúrgica inteira
p	Valor-p estatístico; nível descritivo
pi	Número de pontos sobre um determinado constituinte
Ppi	Fração de pontos pertencente a determinado constituinte
PRP	Plasma rico em plaquetas
PVP-I	Tópico: solução aquosa de polivinilpirrolidona
ROI	<i>Region of interest</i> (região de interesse)
Straumann[®] Bone Ceramic	Cerâmica de fosfato de cálcio bifásica (HA:β-TCP=60:40) do <i>Instituto Straumann AG</i> (Basel, Suíça)
Serra elétrica	Serra para cortar gesso (Oscilan [®] , São Paulo, Brasil)
Microtomógrafo	Skyscan de modelo 1176 (Skyscan, Bélgica)
Surgi Bonet[®]	Matriz óssea inorgânica bovina da (Unilab Surgibone, Mississauga, Ontario, Canadá)
TC	Tecido conjuntivo
TCP	<i>Tricalcium phosphate</i> (fosfato tricálcio)
TM	Tecido medular
TO	Tecido ósseo
TV	<i>Total volume</i> (volume total)
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
VT	Volume total
Vvi	Densidade de volume pertencente a um determinado constituinte
Xilazina	Anestésico geral (Anasedan [®] AgriBrands Ltda)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1	Grupos experimentais e materiais utilizados	53
4.2	Seleção dos Animais e randomização dos grupos experimentais.....	54
4.3	Intervenções cirúrgicas.....	55
4.4	Medicação pós-operatória	56
4.5	Coleta e fixação histológica das peças.....	57
4.6	Avaliação Microtomográfica.....	57
4.6.1	Obtenção das imagens e reconstrução digital.....	57
4.6.2	Análise bidimensionais e tridimensionais de cada calvária	57
4.6.2.1	Alinhamento e avaliação da altura e diâmetro do defeito na calvária dos coelhos (2D)	58
4.6.2.2	Análise da altura e diâmetro da região enxertada (2D)	58
4.6.2.3	Análise volumétrica (3D).....	60
4.7	Procedimento histotécnico.....	61
4.8	Análise histológica descritiva.....	62
4.9	Análise histomorfométrica	62
4.9.1	Casualização dos campos microscópicos	62
4.9.2	Avaliação da densidade de volume	63
4.10	Análise estatística.....	64
5	RESULTADOS	65
5.1	Evolução da massa corporal	67
5.2	Avaliação microtomográfica.....	68
5.2.1	Análise descritiva comparativa das imagens 2D e 3D obtidas para os diferentes grupos experimentais.....	68

5.2.2	Diâmetro e da altura dos defeitos nos diferentes grupos experimentais no programa DataViwer.....	81
5.2.3	Densidade de volume total (BV/VT) do biomaterial determinado no programa CTAn	83
5.2.4	Densidade de volume total (BV/VT) do tecido ósseo determinado no programa CTAn	84
5.3	Resultados histológicos	86
5.3.1	Avaliação da formação óssea e das células reabsortivas na superfície dos materiais/enxerto nos diferentes grupos de tratamento	99
5.4	Análise histomorfométrica	105
5.4.1	Densidade de volume dos materiais de enxerto	105
5.4.2	Densidade de volume do tecido ósseo	106
5.4.3	Densidade de volume do tecido conjuntivo	108
5.4.4	Densidade de volume da medula óssea	110
5.4.5	Densidade de volume do tegumento	112
5.6	Correlação entre os dados de BV/TV obtidos pelas análises microtomográficas e histomorfométricas	114
6	DISCUSSÃO	117
7	CONCLUSÃO.....	127
	REFERENCIAS	131
	ANEXO	149

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reparação de defeitos ósseos de tamanho crítico na região bucomaxilofacial e a sua recuperação morfofuncional ainda constituem um grande desafio para os cirurgiões que atuam nessa área (Corbella *et al.*, 2015). É sabido que traumas, tumores e doenças infecciosas ou congênitas frequentes nessas regiões comprometem as suas funções básicas, e limitam a proteção física de estruturas anatômicas importantes ali presentes (Hobar, Hunt e Antrobus, 2003; Kadota *et al.*, 2008). Assim, 6% de cerca de 1,6 milhões de enxertias ósseas realizadas anualmente nos EUA estão relacionadas ao restabelecimento das funções ósseas nas regiões craniofaciais (Petrovic *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos, diferentes materiais de enxerto ou técnicas cirúrgicas têm sido desenvolvidos e utilizados como alternativa eficaz no tratamento desses defeitos ósseos. Dentre eles destaca-se o osso autógeno, considerado o padrão ouro entre os materiais de enxerto para procedimentos de reconstrução óssea por ser o único a possuir propriedades biológicas essenciais como osteogênese, osteocondução e osteoindução, além de estar isento de quaisquer reações imunológicas (Tadic e Eppler, 2004; Issa *et al.*, 2015). No entanto, apesar dessas inegáveis vantagens biológicas, vários pesquisadores têm salientado alguns inconvenientes na sua utilização, como: necessidade de internação hospitalar e anestesia geral, riscos de complicações durante a cirurgia, maior período de convalescência, tamanho da área doadora insuficiente, maior risco de infecções na área doadora e aumento da morbidade, o que tem levado a alguns clínicos reconsiderarem a sua utilização (Sbordone *et al.*, 2009; Tovar *et al.*, 2014; Pilipchuk *et al.*, 2015).

Nesse sentido, nas últimas décadas a comunidade científica vem buscando o desenvolvimento de biomateriais ósseos substitutos alternativos com a eficiência próxima ou similar ao do enxerto autógeno, capazes de propiciar o fechamento completo de um defeito ósseo de tamanho crítico com um novo tecido com características morfofuncionais mais próximas possíveis do tecido normal (Campana *et al.*, 2014; Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos, 2015).

Desta maneira, pesquisas com a utilização de enxertos alógenos, xenógenos e materiais sintéticos osteosubstitutos ganharam força (Legeros, 1993; Fariña *et al.*, 2008; Campana *et al.*, 2014; Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos, 2015), eliminando o trauma adicional ao paciente provocado pela coleta do (Pilipchuk *et al.*, 2015).

Dentre esses materiais, o mais amplamente utilizado na atualidade é o osso xenógeno de origem bovina, designado de matriz óssea inorgânica ou osso inorgânico (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2011; Manfro *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014; Issa *et al.*, 2015). A produção do osso inorgânico bovino ocorre por meio de um processo de desproteinização de osso esponjoso bovino a altas temperaturas e de procedimentos químicos de limpeza resultando na completa eliminação das proteínas do osso e na produção de uma matriz óssea mineral predominantemente de hidroxiapatita natural, porosa e não antigênica (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011).

O osso inorgânico bovino mais utilizado e estudado é o produto comercial conhecido por Bio-Oss®, o qual possui uma literatura extensa em estudos pré-clínicos e clínicos na área da odontologia (Piattelli *et al.*, 1999; Busenlechner *et al.*, 2008; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Jensen, Schou, Svendsen, *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014; Tovar *et al.*, 2014), e é considerado hoje referência ou padrão-ouro entre os materiais de enxerto não autógeno (Araújo, Linder e Lindhe, 2009; Araújo e Lindhe, 2009; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014; Tovar *et al.*, 2014). O Bio-Oss® é um material importado de origem bovina, de custo relativamente elevado, que apresenta excelente biocompatibilidade e lenta reabsorção. A sua característica de ser constituído por uma hidroxiapatita natural com cristalinidade e composição química semelhante a da matriz inorgânica do osso humano, permite-lhe possuir uma alta capacidade osteocondutora e funcionar como um arcabouço necessário para a neoformação capilar e de tecido perivascular, a migração de células progenitoras ósseas oriundas do leito receptor e a neoformação óssea (Su-Gwan, Hak-Kyun e Sung-Chul, 2001; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2008; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011).

Outra classe de biomateriais ósseosubstitutos que tem emergido e ganhado grande destaque na literatura são a das cerâmicas sintéticas a base fosfato de cálcio

- hidroxiapatita (HA), β -fosfato tricálcio (β -TCP) ou a mistura de ambos (HA/ β -TCP). Por possuírem biocompatibilidade, bioatividade e alta capacidade osteocondutora, esses materiais permitem que o osso neoformado se integre diretamente as suas superfícies sem a interposição de qualquer outro tipo de tecido (Daculsi e Legeros, 1996; Park *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2015).

Apesar da HA e β -TCP pertencerem a esta classe, que é a mais utilizada em cirurgias reconstrutivas, atualmente as cerâmicas bifásicas de HA/ β -TCP (*biphasic calcium phosphate* – BCP) têm sido muito estudadas em ensaios pré-clínicos e clínicos, e o seu uso incentivado por promover uma melhor estabilidade e precocidade na formação óssea, quando comparadas a HA e a β -TCP isoladamente (Schwarz *et al.*, 2007; Iezzi *et al.*, 2012; Campana *et al.*, 2014; Dahlin *et al.*, 2015; Dutta *et al.*, 2015; Kitayama *et al.*, 2015). As cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP) apresentam alta bioatividade e osteocondutividade e exibem uma fase de reabsorção mais lenta ou mais estável, referente a porção HA que atua como suporte para a migração de células e deposição de matriz óssea, e uma fase de reabsorção mais rápida ou mais solúvel, a porção β -TCP, que disponibiliza maior porosidade para o crescimento vascular e ósseo (Legeros, 1993; Daculsi *et al.*, 2003; Fariña *et al.*, 2008). As propriedades biológicas das BCPs estão diretamente ligadas a relação HA/ β -TCP, mas apesar de várias relações já terem sido testadas, a proporção ótima ainda é uma incógnita na literatura (Giannoudis *et al.*, 2005; De Oliveira *et al.*, 2008; Fariña *et al.*, 2008; Lee, Loo e Rohanizadeh, 2014; Dahlin *et al.*, 2015). Vários produtos comerciais de BCPs têm sido estudados e amplamente utilizados para tratamento de diferentes tipos de lesões ósseas, mas a totalidade desses produtos é importada e de custo relativamente elevado.

Convém salientar que, embora a composição, morfologia e topografia da superfície dessas cerâmicas fornecerem uma plataforma osteocondutora para promover a formação óssea em sua superfície, o seu comportamento biológico está diretamente relacionado com suas características físicas e químicas (Reynolds, Aichelmann-Reidy e Branch-Mays, 2010; Wang *et al.*, 2013; Lee, Loo e Rohanizadeh, 2014).

Um produto de osso inorgânico bovino similar ao Bio-Oss[®] produzido no Brasil, é o comercialmente conhecido por GenOx[®] Inorg. De custo relativamente

mais acessível, o GenOx[®] Inorg apresenta também excelente biocompatibilidade, lenta reabsorção e alta propriedade osteocondutora, fornecendo um suporte favorável a integração do osso neoformado ao material (Zambuzzi *et al.*, 2005; Bernabé *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014). Os poucos estudos pré-clínicos (Cestari *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Bernabé *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014) relatam resultados promissores com o uso desse biomaterial, porém a sua real eficiência precisa ser reforçada através de um maior número de pesquisas.

Mais recentemente foi lançado no mercado um novo produto fabricado no país, a BCP porosa na proporção HA/ β -TCP 70:30 (GenPhos XP[®]), que em pesquisa inicial desenvolvida em nosso laboratório (artigo submetido a publicação) mostrou alta capacidade osteocondutora e de reparação óssea com a formação de tecido ósseo similar ao promovido pelo enxerto autógeno.

Com base no que foi apresentado, fica claro a importância da realização de novas pesquisas utilizando os produtos similares nacionais a fim de alicerçar uma literatura a seu respeito, que permita um maior número de profissionais utilizá-los em suas cirurgias e com maior certeza que os resultados esperados possam ser alcançados. Deste modo, o atual trabalho busca investigar em longo prazo em coelhos, a dinâmica do processo de reparo ósseo de defeitos cranianos de tamanho crítico tratados com as cerâmicas GenOx[®] Inorg e GenPhos XP[®] (HA/TCPp 70:30), em comparação as duas maiores referências na literatura, o Bio-Oss[®] e o enxerto autógeno, utilizando-se de avaliação histomorfométrica associada a análise 3D pela microtomografia computadorizada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesse capítulo serão apresentados os estudos mais relevantes relacionados ao tema aqui abordado, proporcionando ao leitor as informações sobre o embasamento científico que fundamentaram a realização deste experimento.

A região bucomaxilofacial é estruturalmente constituída por um esqueleto de tecido ósseo e cartilaginoso dando suporte a músculos, ligamentos, glândulas, pele e anexos e outras estruturas. Apresenta-se ricamente vascularizada e innervada por uma gama de vasos e nervos ramificados, dispostos nas diferentes regiões anatômicas da cabeça (Pagni *et al.*, 2012).

Vários fatores, especialmente as doenças periodontais (Gaetti-Jardim Júnior *et al.*, 2010), podem promover a reabsorção severa do osso alveolar na mandíbula e maxila, levando em casos extremos a perda dos elementos dentários (Hobar, Hunt e Antrobus, 2003; Hunt e Hobar, 2003; Kadota *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Farré-Guasch *et al.*, 2015).

Após exodontia, no período de 6 meses, o rebordo alveolar passa por alterações dimensionais significantes de redução na espessura e altura óssea de, respectivamente, 3,8mm e 1,24 mm (revisão sistemática de (Brägger *et al.*, 2011). Assim, segundo os autores a extração de um dente estimula os eventos de neoformação óssea no alvéolo, mas a quantidade total de tecido ósseo neoformado dificilmente alcança o nível ósseo dos dentes adjacentes, revelando que sempre há uma perda óssea nesse caso.

Nesse contexto, a perda do volume ósseo na região anterior da maxila corresponde a 25% no primeiro ano, sendo que a estimativa aumenta para 40% a 60% até o terceiro ano após a exodontia (Ashman, 2000). Já na região posterior, a perda alveolar corresponde a 50% de volume no mesmo período (Misch, 2000). Essa perda óssea na região posterior da maxila é potencializada por uma perda também na face sinusal do osso devido a um processo de pneumatização do seio maxilar, que pode atingir um grande volume, dificultando de sobremaneira a colocação de implantes dentários na região (Van Den Bergh *et al.*, 2000)

Para correção dessas deficiências e de outros defeitos ósseos extensos na região craniomaxilofacial, como, por exemplo, os decorrentes de acesso cirúrgico, ressecção de tumores ou traumas, é necessário tratamento utilizando materiais de enxerto (Ashman, 2000; Mardas *et al.*, 2011; Stavropoulos *et al.*, 2012; Corbella *et al.*, 2015).

Vários tipos de materiais de enxerto têm sido utilizados para esses tratamentos, podendo ser classificados de acordo com a sua origem em: a) autógeno – o osso é obtido de uma área extra ou intraoral do próprio paciente durante a cirurgia; b) alógeno - o osso é obtido de outro indivíduo da mesma espécie em um banco de tecidos e órgãos; c) xenógeno – o osso é obtido de outra espécie animal, mais comumente o boi; e d) aloplástico - o material de enxerto é produzido sinteticamente em laboratório.

Dentre os enxertos acima citados, o autógeno ou autoenxerto ainda é a melhor opção no tratamento regenerador de defeitos ósseos bucomaxilofaciais, sendo considerado o padrão ouro na literatura, principalmente, por ser o único a possuir concomitantemente as propriedades biológicas de osteogênese, osteocondução e osteoindução, bem como, biocompatibilidade e ausência completa de (Legeros, 2002; Sándor, Kainulainen, *et al.*, 2003; De Oliveira *et al.*, 2008; Pagni *et al.*, 2012; Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos, 2015; Farré-Guasch *et al.*, 2015; Issa *et al.*, 2015).

A osteogênese é uma característica exclusiva do enxerto autógeno, sendo definida como o crescimento ósseo derivado de células viáveis transferidas dentro do enxerto. Esses osteoblastos que se mantiveram viáveis no enxerto, além de sintetizarem a nova matriz óssea, participam ativamente da regulação da osteoclastogênese pela expressão do RANKL e OPG (Cardoso *et al.*, 2006). Uma vez enxertados, diferentes conjuntos de mediadores moleculares interagem com células residentes e circulantes no local para coordenar a cascata de reparação. Além dessa estimulação local, à medida que o osso enxertado é reabsorvido pelos osteoclastos, juntamente com o osso da parede do defeito, fatores de crescimento armazenados na matriz óssea são liberados e estimulam a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos. Esse processo de estimulação, proliferação e diferenciação celular por meio de citocinas caracteriza o que se

conhece por osteoindução (Giannoudis *et al.*, 2005). A capacidade das partículas enxertadas servirem de anteparo para a migração e diferenciação de células e deposição de matriz óssea em sua superfície, e de arcabouço para o crescimento tanto de novos vasos sanguíneos, como de novo tecido ósseo, representa a osteocondução (Carvalho *et al.*, 2002; Dimitriou *et al.*, 2011; Handa *et al.*, 2012; Delgado-Ruiz, Calvo-Guirado e Romanos, 2015)

Assim, um número significativo de trabalhos pré-clínicos tem sido publicado reportando a utilização desse tipo de enxerto em defeitos ósseos na região craniomaxilofacial (Jensen *et al.*, 2007; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Petrovic *et al.*, 2012; Stavropoulos *et al.*, 2012; Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos, 2015; Issa *et al.*, 2015).

Na área odontológica, o uso de autoenxertos tem sido mais frequentemente associado a cirurgias de reconstrução maxilar previamente a colocação de implantes dentários, regeneração periodontal e reconstrução de rebordo alveolar em fissuras palatinas congênitas (Finkemeier, 2002; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Khojasteh *et al.*, 2014). Outros defeitos, como os decorrentes de traumas graves na mandíbula, também vêm sendo reparados com o emprego de enxerto ósseo autógeno para sua reconstrução estética e funciona (Zemann *et al.*, 2007).

Sanz-Sánchez *et al.*, (2015), em uma revisão sistemática sobre cirurgias para aumento de rebordo alveolar, reportaram que o mais utilizado nesse caso é o tratamento com osso autógeno, na forma de blocos ou partículas, podendo anteceder ou ser simultâneo a colocação de implantes dentários. Segundo (Sándor, Rittenberg, *et al.*, 2003), existem basicamente duas opções de enxerto autógeno: a de osso cortical e a de osso esponjoso. No caso do enxerto esponjoso, devido seu arranjo trabecular, a neoformação e reabsorção óssea, assim como a neovascularização ocorrem a uma velocidade maior do que no enxerto cortical. Neste último, o formato compacto e denso retarda os processos de formação e reabsorção óssea, mas fornece estrutura mais rígida e resistente a forças mecânicas. Os sítios utilizados para coleta de osso autógeno podem ser intraorais como o ramo ascendente e sínfise da mandíbula, e tuberosidade maxilar ou extraorais como a crista ilíaca, calvária e tíbia, e sua escolha irá depender do tamanho e da geometria do defeito, e da quantidade e qualidade óssea necessária

(Herford e Dean, 2011).

No entanto, apesar de ser considerado o padrão ouro entre os enxertos, vários inconvenientes podem limitar o uso do enxerto autógeno, como: tamanho do defeito, escassez de tecido doador, aumento do tempo da cirurgia, procedimento mais dispendioso e morbidade significativa na área doadora associada à dor, infecção e hematoma local (De Oliveira *et al.*, 2008; Cestari *et al.*, 2009; Dimitriou *et al.*, 2011; Pilipchuk *et al.*, 2015). Além do fato da reabsorção do osso autógeno enxertado ser um processo imprevisível, podendo ser reabsorvido pelo organismo antes mesmo que a osteogênese tenha sido completada (Dimitriou *et al.*, 2011).

Desta maneira, a utilização de outros materiais de enxerto, como o osso alógeno e os biomateriais osso-substitutos derivados de osso xenógeno e os aloplásticos têm emergido como alternativa ao uso do enxerto autógeno.

Os enxertos alógenos são enxertos ósseos obtidos de cadáveres humanos, i.e, de mesma espécie do receptor, porém de genótipo diferente (Jensen e Terheyden, 2009). Deste modo, o osso é coletado em um banco licenciado de tecidos e órgãos é submetido a vários tratamentos, como: antibióticos, solventes e criodesinfecção, e algumas vezes à liofilização, desmineralização ou irradiação com o intuito de diminuir sua antigenicidade e preservar suas propriedades indutoras (Salai *et al.*, 2000; Nguyen, Morgan e Forwood, 2007; Holtzclaw *et al.*, 2008). Porém, a segurança no seu uso quanto ao risco de transmissão de doenças como hepatite e HIV, bem como de contaminação bacteriana, tem sido discutida por vários pesquisadores (Grover *et al.*, 2011).

Os enxertos xenógenos são aqueles provenientes de animais, ou seja, de indivíduos de espécies diferentes, como o boi, o porco e o cavalo (Pilipchuk *et al.*, 2015), sendo o enxerto xenógeno bovino o mais utilizado e o que possui uma maior quantidade de estudos prospectivos em humanos e experimentais em animais, avaliando aspectos estruturais, mecânicos e de formação óssea (Cordaro *et al.*, 2008; Jensen e Terheyden, 2009; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014).

O processamento do osso bovino pode resultar em dois tipos distintos de material: o orgânico e o inorgânico. O material orgânico, por ser proveniente de outra

espécie, ter antigenicidade mais pronunciada do que o enxerto alógeno, e risco de transmissão de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina ou doença da vaca louca, requer um tratamento mais rigoroso (Issa *et al.*, 2015). Atualmente o seu uso é limitado pela quase inexistente capacidade osteoindutora e a sua relativamente rápida reabsorção (Rocha *et al.*, 2011). Em contrapartida, o material inorgânico é um dos mais utilizados e estudados na atualidade. O biomaterial designado de matriz óssea inorgânica bovina ou osso inorgânico bovino é uma cerâmica natural produzida por um processo de desproteinização de osso esponjoso bovino a altas temperaturas (variando de 300 a 1000 °C) com subsequente limpeza em soluções químicas, promovendo a eliminação de toda parte orgânica do osso, resultando em um material não antigênico, formado predominantemente de HA e com a arquitetura natural do osso (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011). Quando adequadamente processado esse biomaterial é biocompatível, osteocondutor e lentamente reabsorvido (Campana *et al.*, 2014), e, por assemelhar-se ao osso humano, permite a formação óssea nas fases iniciais de reparação, facilitando a migração das células da linhagem osteogênica e a deposição do novo osso (Manfro *et al.*, 2014).

Atualmente, vários biomateriais inorgânicos derivados de osso bovino estão disponíveis no mercado, como o: Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça), GenOx® Inorg (Baumer SA, Mogi-Mirim, Brasil); Endobons® (Merck KGaA, Merck Biomaterial, Darmstadt, Alemanha), Keil Bonet® (Braun Milsungen, Melsungen, Alemanha), OsteoGraf® (Dentsply, EUA) e Surgi Bonet® (Unilab Surgibone, Mississauga, Ontario, Canadá), sendo comercializados na forma de macro e microgrânulos e blocos (Zambuzzi *et al.*, 2005).

Dentre todos os produtos acima citados, o Bio-Oss® é o biomaterial ósseo-substituto mais utilizado, com grande sucesso na clínica odontológica de todo o mundo. Está no comércio a mais de 20 anos e apresenta uma vasta literatura em estudos biológicos, pré-clínicos em animais e clínicos em humanos, sendo considerado por muitos como o “padrão ouro” dos biomateriais ósseo-substitutos em procedimentos cirúrgicos na odontologia. Suas partículas apresentam dimensões regulares com grânulos de 0,25 a 1 mm e poros com dimensões de 20 a 200µm, sendo a sua desproteinização realizada a 300 °C (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2011). A sua arquitetura porosa e características químicas de superfície devidas a sua

constituição por cristais de HA natural, permitem-lhes exibir uma alta capacidade osteocondutora, atuando como arcabouço para a neoformação de capilares e de tecido perivascular e migração de células da linhagem osteogênica do leito receptor para a superfície externa e interna das suas partículas (Su-Gwan, Hak-Kyun e Sung-Chul, 2001; Traini *et al.*, 2008). Com a osteogênese, suas partículas se incorporam a estrutura óssea recém-formada, conservando o seu volume em longo prazo.

Quanto a reabsorção do Bio-Oss® a literatura é controversa (Baldini, De Sanctis e Ferrari, 2011), alguns autores relatam que suas partículas não são reabsorvidas, sendo incorporadas ao tecido ósseo neoformado no interior dos defeitos ósseos (Ewers *et al.*, 2004; Iezzi *et al.*, 2008; Traini *et al.*, 2008), e outros relatam que passado meses do reparo, a atividade osteoclástica é observada na superfície das partículas, sugerindo uma remodelação do conjunto osso/partículas, o que de certa forma, caracteriza um processo lento de reabsorção e substituição (Berglundh e Lindhe, 1997).

Inúmeras pesquisas têm descrito resultados altamente favoráveis do Bio-Oss® em estudos pré-clínicos em calvária de coelhos (Manfro *et al.*, 2014; Tovar *et al.*, 2014), calvária de mini-porcos (Busenlechner *et al.*, 2008), alvéolos de cães (Araújo e Lindhe, 2009), mandíbula de mini-porcos (Rumpel *et al.*, 2006) e mandíbula de coelhos (Young, Sandstedt e Skoglund, 1999).

Na clínica odontológica a utilização do Bio-Oss® está amplamente associada a cirurgias de levantamento de seio maxilar (Hallman, Lundgren e Sennerby, 2001; Jensen, Schou, Stavropoulos, *et al.*, 2012; Jensen, Schou, Svendsen, *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2013; Corbella *et al.*, 2015), preservação de rebordo alveolar após exodontias (Mardas *et al.*, 2011), aumento horizontal do rebordo alveolar (HAMMERLE *et al.*, 2008), deiscências ósseas associadas a implantes (Bragger *et al.*, 2001; Hammerle e Lang, 2001) e defeitos ósseos periodontais (Stavropoulos *et al.*, 2012).

Para exemplificar o uso do Bio-Oss® na odontologia, os resultados de alguns trabalhos desenvolvidos em pacientes serão apresentados a seguir.

Assim, em estudo histológico de longo prazo de levantamento de seio maxilar em 20 pacientes tratados com Bio-oss®, Piatelli *et al.*, (1999) avaliaram biópsias

obtidas após 6, 9, 18 meses e 4 anos. As partículas de Bio-Oss® estavam na sua maior parte envoltas por osso compacto maduro, sem a presença de gap na interface Bio-Oss/osso neoformado. Aos 18 meses e 4 anos, foi possível observar osteoclastos em processo de reabsorção das partículas de biomaterial e de osso neoformado ao redor. Os resultados indicaram que o Bio-Oss® parece ser altamente biocompatível e osteocondutivo e lentamente reabsorvível, e que pode ser usado com sucesso como substituto ósseo em procedimentos de levantamento de seio maxilar.

Já Sartori et al., (2003), em estudo de levantamento de seio maxilar em humanos utilizando Bio-oss® e com biópsias realizadas após 8 meses, 2 e 10 anos, verificaram histomorfometricamente um aumento altamente significativo na formação óssea com a quantidade de tecido ósseo (incluindo os espaços medulares) de 29,8%, 69,7% e 87,7%, respectivamente, no transcorrer dos períodos, associada à lenta reabsorção do biomaterial, com as suas partículas circundadas por osso lamelar neoformado (SARTORI et al., 2003).

Mardas et al., (2011) avaliaram a BCP sintética na proporção HA/ β -TCP de 60:40 (Straumann® Bone Ceramic) comparativamente ao Bio-Oss® como grupo controle, para verificar a preservação do rebordo alveolar no tratamento de alvéolos dentais após extração em 27 pacientes.. Os resultados radiográficos mostraram que ambos os biomateriais, combinados a uma membrana de colágeno, preservaram os níveis do rebordo alveolar até 8 meses após enxertia. Clinicamente uma redução de menos de 1 mm nos níveis ósseos na face interproximal foi observada.

Um biomaterial de osso inorgânico produzido no país, que tem emergido como uma alternativa ao Bio-Oss®, é o GenOx® Inorg (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil). Este produto apresenta propriedades físico-químicas e biológicas similares ao Bio-Oss®, diferindo deste somente no maior grau de cristalinidade (Accorsi-Mendonça et al., 2011). O GenOx® Inorg apresenta: formato de partículas de 0,50–1,0mm, excelente biocompatibilidade, lenta reabsorção, alto grau de cristalinidade devido a temperatura de desproteíntização de 950-1000 °C e alta capacidade osteocondutora (Acoorsi-Mendonça et al., 2011; Cestari et al., 2009; Oliveira et al., 2008; 2014; Rocha et al., 2014). Mas, ao contrário do Bio-Oss®, a literatura ligada ao GenOx® Inorg ainda é escassa, com poucos trabalhos pré-clínicos e clínicos

atestando a sua eficácia (Cestari *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011; Bernabé *et al.*, 2012; Manfro *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2014), o que ainda dificulta a previsibilidade quanto sua aplicação.

Dentre esses trabalhos, Cestari *et al.*, (2009) em um estudo realizado na calvária de *Cavia porcellus*, mostraram que a utilização do GenOx[®] Inorg em forma de bloco em defeitos cranianos de tamanho crítico promoveu um aumento ósseo vertical 3,8 vezes maior comparado à espessura do bloco ósseo removido cirurgicamente do local para criação do defeito. A análise histológica e morfométrica mostraram que o bloco do GenOx Inorg[®] exibiu completa osseointegração com as bordas do defeito e o volume de novo tecido ósseo foi 148,5% maior comparado ao bloco ósseo removido cirurgicamente, enquanto que, nos defeitos preenchidos apenas com coágulo sanguíneo, a formação óssea ocupou apenas 21,9% do defeito. Os autores concluíram que a macro e microestrutura porosa e a alta capacidade osteocondutora do GenOx[®] Inorg favorecem a formação e o crescimento ósseo, sendo uma opção no tratamento de defeito de tamanho crítico e no ganho ósseo vertical na região craniomaxilofacial.

Em outro estudo, Rocha *et al.*, (2011) avaliaram o potencial de reparação do GenOx[®] Inorg, com ou sem uso de plasma rico em plaquetas (PRP), em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de coelhos, comparando-os aos defeitos tratados somente com coágulo sanguíneo (controle negativo). Após 4 semanas, os autores observaram histologicamente no grupo coágulo que os defeitos foram preenchidos com tecido conjuntivo fibroso próximo a região do periósteo, apresentando pouca neoformação óssea na periferia. Já nos grupos GenOx[®] Inorg, com ou sem uso do PRP, observou-se a presença moderada de células gigantes multinucleadas e neoformação óssea associada as partículas do biomaterial localizadas nas regiões periféricas e em algumas centrais, porém, sem apresentar diferença estatística em qualquer parâmetro avaliado em relação ao uso ou não do PRP. Deste modo, os autores concluíram que o GenOx[®] Inorg, com ou sem PRP, é biocompatível e osteocondutor, e atua também na manutenção do volume ósseo ganho.

Manfro *et al.*, (2014) compararam os ossos inorgânicos Bone-Fill[®], GenOx[®] Inorg e Bio-Oss[®] em calvária de coelhos com a implantação de 4 cilindros de titânio

preenchidos aleatoriamente com os biomateriais. Os 8 coelhos foram subdivididos em dois grupos, sendo 4 coelhos sacrificados após 8 semanas, e os outros após 12 semanas. A análise dos resultados mostraram maior formação óssea nos biomateriais Bio-Oss® e Bone-Fill® em relação ao GenOx® Inorg.

Nos últimos anos ganhou força o uso de outro tipo de materiais alternativos ao osso autógeno, os materiais aloplásticos, onde sobressaem as cerâmicas sintéticas de fosfato de cálcio, como hidroxiapatita (HA) e beta fosfato tricálcio (β -TCP). Essas biocerâmicas exibem biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade e, quando usadas no tratamento de defeitos ósseos, permitem a adesão, proliferação, migração e diferenciação de células da linhagem osteogênica, além da deposição de matriz óssea diretamente em sua superfície (Legeros, 2008; Zimmermann e Moghaddam, 2011).

Apesar das excelentes propriedades biológicas da HA e do β -TCP em auxiliar a reparação óssea, ambos possuem limitações no seu uso clínico, como substitutos ósseos; a HA é mais estável e resistente a força mecânica e a reabsorção por osteoclastos, permanecendo por longo tempo no defeito, o que pode limitar a quantidade de osso neoformado. Já o β -TCP é mais facilmente reabsorvido e menos estável, podendo desaparecer do defeito antes da formação óssea na quantidade necessária para o completo reparo (Yip *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, com o intuito de unir as características biológicas favoráveis da HA e β -TCP, pesquisadores desenvolveram a chamada cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (*biphasic calcium phosphate* - BCP) combinando a HA e β -TCP em proporções pré-definidas, que mostrou possuir melhor desempenho na formação óssea, do que as cerâmicas HA e β -TCP isoladamente (Ng *et al.*, 2008; Castellani *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2013; Yip *et al.*, 2015). Atualmente, as BCPs apresentam-se como os principais biomateriais estudados e empregados na reconstituição óssea por apresentar excelente biocompatibilidade e bioatividade, boa taxa de dissolução e adsorção de proteínas, e também de criar condições teciduais favoráveis ao processo de osteoindução (Daculsi *et al.*, 2003; Deville, Saiz e Tomsia, 2006; Park *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2015).

Este material é geralmente preparado por sinterização a altas temperaturas e a proporção de HA/ β -TCP é dependente de fatores tais como: deficiência de cálcio

da apatita não sinterizada, temperatura de sinterização, o tempo e o valor de pH do precursor. Assim, a sua bioatividade pode ser alterada pela manipulação dessa relação (Wang *et al.*, 2014; Dahlin *et al.*, 2015). Neste sentido, vale ressaltar que a proporção de HA/ β -TCP pode afetar a formação óssea e a taxa de biodegradação do material, deste modo, diferentes relações de HA e β -TCP têm sido alvo de estudos, mas a relação ótima ainda não foi estabelecida. O conceito da formulação das BCPs é baseado no ótimo equilíbrio entre a fase mais estável (HA) e a mais solúvel (β -TCP).

As BCPs têm sido indicadas como material substituto ao enxerto ósseo autógeno e alógeno no preenchimento de cavidades cirúrgicas ósseas na odontologia, ortopedia e traumatologia (Iezzi *et al.*, 2012; Campana *et al.*, 2014; Dahlin *et al.*, 2015; Dutta *et al.*, 2015; Kitayama *et al.*, 2015). Essas cerâmicas por serem porosas, com grande quantidade de poros interconectados, podem proporcionar a sua fixação biológica/incorporação ao leito ósseo (Daculsi *et al.*, 2003; Dahlin *et al.*, 2015).

Li *et al.*, (1997) mostraram que as BCPs são biologicamente mais ativas que HA pura, além de facilitar a nova formação óssea. Segundo os autores, esta característica do biomaterial pode estar ligada a sua propriedade de dissolução mais rápida e também a hidrólise da fase β -TCP, acompanhada pela mudança estrutural e morfológica da fase durante a hidrólise. A presença de íons de Ca^{2+} e OH^{-} , na estrutura da apatita-TCP permite que moléculas de H_2O ocupem estes sítios, podendo aumentar a estabilidade da estrutura cristalina apatita-TCP. A apatita presente nos ossos é pouco cristalina, não estequiométrica e contém água incorporada a rede cristalina, assim a apatita ligada a fase TCP pode estar mais próxima a hidroxiapatita mineral encontrada em ossos.

Em estudo pré-clínico Farina *et al.*, (2008) compararam histologicamente duas BCPs com proporções diferentes HA/ β -TCP, de 85/15 e 15/85, em alvéolos após extração de todos os pré-molares em maxilares de cães. Os resultados mostraram maior quantidade de tecido ósseo formado e em menor período de tempo com a HA/TCP (15/85), sugerindo que uma maior concentração de β -TCP serviu para melhorar a resposta osteocondutora do biomaterial, o que segundo os autores, é capaz de provocar aumento na taxa de reabsorção e bioatividade desses materiais,

representando uma vantagem para as cirurgias orais e ortopédicas.

Em outro estudo pré-clínico, Schwarz et al., (2007) avaliaram a regeneração óssea guiada após a aplicação da cerâmica bifásica Straumann® Bone Ceramic (HA/ β -TCP 60:40) ou de Bio-Oss Collagen® e cobertura com uma membrana de colágeno em defeitos tipo deiscência em cães da raça beagle. A análise histomorfométrica nas peças coletadas após 1, 4 e 9 semanas, mostraram diminuição significativa do tamanho do defeito residual, aumento do contato material-osso neoformado e aumento da área de integração entre as partículas e tecido ósseo em ambos os grupos. Os autores concluíram que a cerâmica HA/ β -TCP (60:40) e o Bio-Oss® podem prover estrutura osteocondutora equivalente para procedimentos de regeneração óssea guiada em defeitos tipo deiscência.

Recentemente, Dahlin et al., (2015) investigaram a regeneração óssea em defeitos criados cirurgicamente na mandíbula de mini-porcos tratados com: nova cerâmica bifásica de fosfato de cálcio, composto por grânulos micro estruturados de HA/ β -TCP 10:90 (Straumann AG®), fosfato de cálcio bifásico não micro estruturada de HA/ β -TCP 60:40 (Straumann AG®), e osso bovino desproteínizado (Bio-Oss®; Geistlich Biomaterials). Todos os tratamentos foram combinados com a utilização de uma membrana de colágeno como cobertura (BioGide®; Geistlich Biomaterials), durante 8 semanas. Todos os três biomateriais apresentaram aumento de volume ósseo entre 3 e 8 semanas. A cerâmica HA/ β -TCP (10:90) e o Bio-Oss® mostraram ao final de 8 semanas, maior quantidade de formação óssea em comparação a HA/ β -TCP (60:40). A HA/ β -TCP (10:90) também exibiu, em ambos os períodos avaliados, uma maior porcentagem de volume de partículas restantes do que os outros dois grupos. Os autores concluíram que os três materiais de ensaio tiveram um bom desempenho em relação a formação óssea após 8 semanas, porém, a HA/ β -TCP (10:90) mostrou quantidade significativamente maior de osso neoformado, com maior volume de enxerto remanescente em comparação aos demais grupos. Em relação ao desempenho regenerativo, os três materiais podem ser indicados para uso clínico.

Em estudos clínicos, Cordaro et al., (2008) compararam o osso inorgânico bovino (Bio-Oss®; Geistlich Biomaterials) e uma nova cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (BCP; Straumann® Bone Ceramic AG®) em 37 pacientes submetidos a

cirurgia de levantamento de seio maxilar. As análises histomorfométricas realizadas em peças coletadas após 180 e 240 dias não mostraram diferenças estatisticamente significantes na quantidade de osso mineralizado neoformado ($21,6 \pm 10,00\%$ para BCP vs. $19,8 \pm 7,90\%$ para o Bio-Oss[®]; $P=0,53$). O contato osso-enxerto foi significativamente maior para o Bio-Oss[®] ($48,2 \pm 12,9\%$ vs. $34,0 \pm 14,0\%$ para BCP), enquanto a porcentagem de material remanescente foi significativamente menor para grupo BCP ($26,6 \pm 5,2\%$ vs. $37,7 \pm 8,5\%$ para o Bio-Oss[®]; $P = 0,001$). Os autores concluíram que tanto o Bio-Oss, quanto a BCP, produziram quantidades semelhantes de osso neoformado histologicamente similares, indicando que ambos os materiais são adequados para o levantamento do seio maxilar visando a colocação de implantes dentários.

Em outro estudo, Cordaro et al., (2008) compararam o volume ósseo e processo tecidual de reparo em alvéolos de 27 pacientes preenchidos com BCP Straumann[®] BoneCeramic e com Bio-Oss[®] e recobertos com membrana de colágeno. Depois de 8 meses, durante a reabertura para coleta das biópsias e a instalação de implantes, não foram observadas diferenças nas dimensões horizontal e vertical da crista óssea residual, em ambos os grupos. A análise histológica das biópsias mostrou neoformação óssea nas suas porções apicais em contato direto com partículas de Straumann[®] Bone Ceramic e de Bio-Oss[®] e presença de tecido conjuntivo fibroso denso ao redor das partículas dos biomateriais nas suas porções coronárias. Através dos resultados obtidos, os autores concluíram que ambos os materiais apresentam capacidade semelhante de manutenção do volume ósseo alveolar.

Em outro estudo, Mardas et al., (2011) compararam o volume ósseo e processo tecidual de reparo de alvéolos de 27 pacientes preenchidos com BCP Straumann[®] BoneCeramic e com Bio-Oss[®] e recobertos com membrana de colágeno. Depois de 8 meses, durante a reabertura para coleta das biópsias e a instalação de implantes, não foram observadas diferenças nas dimensões horizontal e vertical da crista óssea residual, em ambos os grupos. A análise histológica das biópsias mostrou neoformação óssea nas suas porções apicais em contato direto com partículas de Straumann[®] BoneCeramic e de Bio-Oss[®] e presença de tecido conjuntivo fibroso denso ao redor das partículas dos biomateriais nas suas porções coronárias. Os autores concluíram que os resultados sugerem que ambos os

materiais apresentam capacidade semelhante de manutenção do volume ósseo alveolar.

Mordenfeld et al., (2014) avaliaram a BCP Straumann® BoneCeramic 60:40 e o Bio-Oss® no levantamento bilateral de seios maxilares de 11 pacientes, após 8 meses da colocação de 62 implantes Straumann SLActive. O objetivo primário do estudo foi de comparar as taxas de sobrevivência dos implantes e a perda óssea marginal, e o secundário de calcular a altura do seio elevado em diferentes pontos de tempo. Após 5 anos de carregamento funcional dos implantes com as próteses em função, a taxa de sobrevida média dos implantes foi de 93,5% (91,7% para o BCP, 91,3% para o Bio-Oss® e 100% para o osso residual); as taxas de sucesso de 83,3% e 91,3% para o BCP e Bio-Oss®, respectivamente; o nível ósseo marginal médio de $1,4 \pm 1,2$ mm para a BCP e $1,0 \pm 0,7$ mm para o Bio-Oss®, sem diferença estatística significativa entre ambos; e redução da altura do seio levantado de 6,6% para o BCP e de 5,8% para o Bio-Oss®. Os autores concluíram que o tipo de material utilizado para o aumento do assoalho do seio maxilar não teve qualquer impacto sobre a taxa de sobrevivência e nível ósseo marginal dos implantes após 5 anos de carregamento funcional e que a redução da altura do seio elevado foi mínima.

Recentemente uma versão nacional de BCP, com relação HA/ β -TCP 70:30, foi lançada no mercado. Trabalhos preliminares desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram resultados promissores quanto a sua utilização como material osteocondutor no tratamento de defeitos ósseos (CESTARI et al., 2010; Sanches et al., 2016). O trabalho de Sanches et al., (2016), utilizando a nova cerâmica em defeito de tamanho crítico (13-9cm) na base da mandíbula de coelhos durante 12 semanas, mostrou resultados favoráveis de biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução, sendo a formação óssea semelhante a aquela promovida pelo osso autógeno, com a vantagem de menor reabsorção do biomaterial ao final do período experimental.

A utilização de modelos animais para avaliação de novos biomateriais estabelecem uma ligação entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos e, consequentemente, podem ser úteis no estabelecimento de intervenções clínicas mais efetivas (Gomes e Fernandes, 2011).

Dentre os diferentes animais para teste de biomateriais ósseo-substitutos em modelo de defeito craniano, o coelho é uma espécie que se destaca por apresentar vantagens no manuseio, rápida maturidade óssea, similaridade na densidade ao osso humano, bem como, a possibilidade da criação de múltiplos defeitos, diminuindo o erro nas análises (Haddad *et al.*, 2006; Pripatnanont *et al.*, 2007; Ascherman *et al.*, 2008).

Os defeitos cranianos em animais para testes podem ser extensos e definidos como de tamanho crítico. Como definição clássica, Schmitz e Holliger (1986; 1990), consideram como defeito de tamanho crítico uma lesão extensa incapaz de reparar-se durante toda a vida do animal, com a formação de aproximadamente 10% do volume ósseo perdido. Na literatura, diferentes tamanhos e formatos são apresentados como defeitos de tamanho crítico na calvária de coelhos: quadrangulares de 10x10 mm (Gosain *et al.*, 2003; Pripatnanont, Nuntanaranont e Vongvatcharanon, 2009); retangulares de 20x10 mm (Ereno *et al.*, 2010; Humber *et al.*, 2010); circulares com diâmetro de 10 mm (Xu, Zhi-Ming e Xue-Mei, 2008); circulares com diâmetros de 6-8 mm; (Cestari *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2014) e circulares de 15 mm (Nagata *et al.*, 2009; Delgado-Ruiz, Calvo-Guirado e Romanos, 2015). (Delgado-Ruiz, Calvo-Guirado e Romanos, 2015), ao realizar uma revisão sistemática apenas com estudos relacionando defeitos de tamanho crítico em calvária de coelhos, verificaram variações no diâmetro do defeito de 6-20 mm, sendo mais comuns os defeitos centrais de 15 mm, seguido pelos bilaterais com diâmetro entre 6-8 mm localizados nos ossos parietais.

Atualmente, o uso da terminologia defeito de tamanho crítico vem sendo contestada por alguns pesquisadores por considerar que, nos muitos modelos aceitos, os testes avaliam apenas o ponto final do período experimental e não a reparação do defeito durante toda a vida do animal (revisão Delgado-Ruiz *et al.*, (2015). Desta maneira, na tentativa de padronizar e diminuir as diferenças metodológicas, Cooper *et al.*, (2010) estabeleceram o conceito de “defeito tamanho crítico”, em relação ao período experimental vigente da pesquisa. Assim, defeitos ósseos menores que 15 mm no coelho podem ser considerados defeitos de tamanho crítico dependendo do período experimental abordado, o que corresponde a períodos superiores a 12 semanas (Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos, 2015).

A avaliação do processo de regeneração de defeitos ósseos pode ser feita por método radiográfico e histológico qualitativo e/ou quantitativo. Enquanto nas radiografias só é possível verificar, com alguma restrição devido a ocorrência de superposição de imagens, o fechamento do defeito por deposição de tecido ósseo e a reabsorção do material enxertado; na análise histológica descritiva é possível realizar a avaliação do processo celular e tecidual de reparo, detalhando estruturas e células, a diferenciação das células ósseas e o local de deposição e quantidade de tecido ósseo, e a interface osso neoformado/biomaterial. Por meio da histomorfometria é possível quantificar o comprimento, altura, largura, área, volume e número de componentes de interesse no tecido (Gomes e Fernandes, 2011).

Mais recentemente métodos de processamento de imagem 3D através de microtomografia computadorizada (Micro-CT), têm sido empregados nos estudos sobre reparo ósseo, permitindo a avaliação direta de pequenas estruturas, da arquitetura microestrutural e de diferentes parâmetros quantitativos de objetos em 3-D com bastante precisão e facilidade (Efeoglu *et al.*, 2007). Deste modo, a técnica de Micro-CT surge como uma possibilidade favorável e complementar a clássica técnica histomorfométrica (Park *et al.*, 2011), o que tem condicionado atualmente, na grande maioria das pesquisas, a utilização combinada das duas técnicas de avaliação.

Outra possibilidade de estudos utilizando o MicroCT está relacionada a caracterização numérica do biomaterial (Malafaya e Reis, 2009), assim como, em casos de biomateriais porosos, a definição das dimensões e distribuição dos seus poros (Klein *et al.*, 2009) e as suas propriedades físicas de difusão, elasticidade e permeabilidade além de suas propriedades mecânicas (Knackstedt *et al.*, 2006). A associação dessas informações à capacidade de visualização do crescimento tecidual no interior do biomaterial (Knackstedt *et al.*, 2006) permite avaliar com o MicroCT se a dinâmica da osteocondução e/ou osteoindução está ocorrendo e, a partir dessas observações, planejar modificações no tamanho e/ou na geometria do biomaterial (Klein *et al.*, 2009).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Em vista das informações apresentadas na introdução e na revisão da literatura propomo-nos a avaliar o potencial osteogênico e a biodegradabilidade dos biomateriais: a matriz óssea inorgânica bovina desproteinizada a 1000°C (GenOx[®] Inorg) e a cerâmica bifásica HA/ β -TCP 70:30 (GenPhos[®] XP), no processo de reparo de defeitos ósseos cranianos em coelhos, comparativamente a matriz óssea inorgânica bovina desproteinizada a 300°C (Bio-Oss[®]), osso autógeno (controle positivo) e coágulo sanguíneo (controle negativo).

Para alcançar esses objetivos far-se-á:

- Avaliar pela microtomografia computadorizada o volume de biomaterial/enxerto autógeno e do tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos e períodos experimentais; de maneira a verificar o tipo de tratamento que promove maior formação óssea ao longo do período de 6 meses.
 - Verificar histologicamente a neoformação/remodelação e maturação óssea e a presença de medula óssea e tecido conjuntivo ou tecido mole oriundo do tegumento adjacente, nos diferentes tratamentos e períodos experimentais; de forma a estabelecer um padrão de resposta tecidual para cada tipo de tratamento; e também a funcionalidade do biomaterial na manutenção de espaço para o reestabelecimento ósseo.
 - Quantificar histomorfometricamente a densidade de volume ou percentual de volume do defeito ósseo ocupado por cada estrutura (biomaterial/enxerto, infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo, tecido ósseo e medula óssea); de modo a verificar o acúmulo/redução/manutenção das diferentes estruturas ao longo dos períodos experimentais para cada tipo de tratamento.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 20/2013), sendo aprovado em 17 de Junho de 2013 (Anexo A)

4.1 Grupos experimentais e materiais utilizados

O trabalho constituiu-se de 5 grupos experimentais conforme o tipo de tratamento utilizado:

- 1) **Grupo Bio-Oss:** Matriz óssea bovina inorgânica (Bio-Oss®; grânulos de 0,25 - 1,0 mm; lote 00120681, validade 08-2015, Geistlich-Pharma, Wolhunsen, Suíça);
 - 2) **Grupo GenOx Inorg:** Matriz óssea bovina inorgânica (GenOx® Inorg; grânulos 0,50 – 1,0 mm; validade 05-2015, com registro ANVISA nº 10345500086, Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil);
 - 3) **Grupo GenPhos XP:** Cerâmica bifásica porosa de hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcio (β -TCP) na proporção HA/ β -TCP 70:30 (GenPhos® XP; grânulos de 0,5-0,75 mm; lote 4061690 e registro ANVISA nº 10345500076, Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil);
 - 4) **Grupo Autógeno:** Osso autógeno triturado oriundo da calvária de cada coelho, utilizado como controle positivo;
 - 5) **Grupo Coágulo:** coágulo sanguíneo removido do próprio animal por punção sanguínea, utilizado como controle negativo.
-
-

4.2 Seleção dos Animais e randomização dos grupos experimentais

Para realizar o estudo foram utilizados 39 coelhos adultos (*Oryctolagus cuniculus*), linhagem *New Zealand White*, machos, com massa corporal de 3,5-4,0 kg e idade aproximadamente de 150 dias, obtidos do Setor de Cunicultura da Fazenda Lageado localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Os animais após um período de quarentena no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP para verificação das condições de saúde e de ganho de peso foram colocados e mantidos durante todo o período experimental, em gaiolas de aço individualizadas, em boas condições ambientais de alimentação, temperatura, higiene e iluminação. Durante a quarentena e todo período experimental a alimentação foi à base de ração sólida para coelhos (Nutricoeelho[®], Purina do Brasil, Paulínia, SP, Brasil), suplementada com dieta verde e água *ad libitum*.

Nos crânios dos 39 coelhos foram realizados cirurgicamente um total de 78 defeitos ósseos, divididos em períodos experimentais de 30, 60 e 180 dias de tratamento e cada período em 5 grupos (5 defeitos/grupo) e tratados, respectivamente, com: 1) 0,1 cm³ de Bio-Oss[®] (Grupo Bio-Oss[®]); 2) 0,1 cm³ de GenOx[®] Inorg (Grupo GenOx[®] Inorg); 3) 0,1 cm³ de GenPhos[®] XP (Grupo GenPhos[®] XP) ; 4) 0,1 cm³ de osso autógeno (Grupo Autógeno); e 5) 0,1 cm³ de coágulo sanguíneo (Grupo Coágulo) – veja Figura 1. Em três animais, um para cada período, um dos defeitos não foi tratado para uniformização da amostra em 5 defeitos/grupo.

Figura 1 - Esquema mostrando a subdivisão dos animais nos diferentes períodos experimentais: 1) total de 39 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos adultos, com peso entre 3,5-4,5kg; 2) defeitos transósseos bilaterais de 8 mm realizados nos ossos parietais da calvária dos 39 coelhos, perfazendo 78 defeitos, tratados com os diferentes materiais estudados; 3) animais subdivididos nos períodos de 30, 60 e 180 dias (n=13 cada), sendo 5 defeitos/grupo de tratamento. Em três animais, um para cada período, um dos defeitos não foi tratado para uniformização da amostra.

4.3 Intervenções cirúrgicas

As cirurgias foram realizadas com os animais sob anestesia geral induzida por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Anasedan® AgriBrands Ltda) na dose de 10 mg/kg e após 10 minutos, de cloridrato de ketamina (Dopalen® AgriBrands Ltda) na dose de 50 mg/kg (Figura 2), conforme especificações do *The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC–RabbitFormulary, 2010)*.

Após a tricotomia na região do osso frontal e antissepsia com solução aquosa de polivinilpirrolidona (PVP-I tópico), uma incisão em meia lua de 4 cm foi realizada no tegumento (Fig. 2A). Em seguida, o periósteo foi descolado (Fig. 2B) e levantado expondo a superfície dos ossos parietais (Fig. 2C), e com auxílio de uma broca

trefina de 8 mm de diâmetro (Fig. 2D), sob irrigação constante com solução salina estéril, foram confeccionados dois defeitos transósseos bilaterais nos ossos parietais do crânio (Fig. 2E). Em seguida, cada defeito foi preenchido conforme o tratamento proposto no estudo (Fig. 2G e H), o retalho recolocado na sua posição original e suturado (Fig. 2I) com linha de seda preta 4-0 (Fio de Sutura Seda, 4-0 – Ethicon® - Johnson e Johnson®, Brasil).

Figura 2 A-F - Procedimentos cirúrgicos: **A)** Visão panorâmica da incisão em formato de meia lua no tegumento que reveste o crânio; **B)** descolamento do periósteo; **C)** exposição da cortical óssea; **D)** realização do defeito utilizando uma broca trefina com 8 mm de diâmetro; **E e F)** perfuração para obtenção do defeito bilateral e remoção dos blocos ósseos com exposição dura-máter; **G e H)** preenchimento dos defeitos com os diferentes materiais; **I)** retalho recolocado em sua posição original e suturado com fio de seda preta 4-0.

4.4 Medicação pós-operatória

Após a cirurgia foi aplicado, por via intramuscular 10 mg/kg do antibiótico Enrofloxacino 2,5% (Flotril® 2,5%; Intervet - Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) a cada 24/24 horas durante 7 dias; e 3 mg/kg de peso de anti-inflamatório ketoprofeno (Ketofen® 1%®, Merial, Brasil) de 12/12 horas por 3 dias conforme o sugerido por *The Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC, 2010).

Durantes os 3 primeiros dias pós-cirúrgicos foi aplicado topicamente rifamicina SV sódica (Rifocina® Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.) sobre a ferida cirúrgica e após sete dias os pontos foram removidos.

4.5 Coleta e fixação histológica das peças

Após os períodos de 30, 60 e 180 dias (13 animais/período), os coelhos foram submetidos à eutanásia pelo método de sobre dose de anestésico geral (dose tripla) indicado no item 4.3. Em seguida a região do dos defeitos de cada animal foi cuidadosamente removida com uma serra elétrica para gesso (Oscilan®, São Paulo, Brasil) e fixada em solução de formalina 10% em tampão fosfato pH 7,2 por uma semana, e posteriormente, destinada ao exame no microtomógrafo.

4.6 Avaliação Microtomográfica

4.6.1 Obtenção das imagens e reconstrução digital

As peças foram submetidas a uma varredura de feixe de raios-X no microtomógrafo computadorizado Skyscan de modelo 1176 (Skyscan, Bélgica) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. A fonte de feixe raios X (Cone-Beam) foi operada a 80 kV e a 300 uA. Foi utilizado um filtro de Cu + Al e a amostra foi rotacionada a 180°, com um “*rotation step*” de 0,5°, gerando um tempo de aquisição de 15 minutos por amostra. Utilizando o (pacote de Softwares 64Bits270213, Bruker, Bélgica) foi utilizado o programa NRecon para a reconstrução das imagens tridimensionais da região de interesse, repetindo-se o mesmo padrão de reconstrução em todas as amostras.

4.6.2 Análise bidimensionais e tridimensionais de cada calvária

As nomenclaturas, símbolos e unidades foram utilizados conforme recomendado pelo *Histomorphometry Nomenclature Committee of the American Society for Bone and Mineral Research* (Dempster *et al.*, 2012).

4.6.2.1 Alinhamento e avaliação da altura e diâmetro do defeito na calvária dos coelhos (2D)

Para a realização das análises 2D e 3D foi necessário realizar o alinhamento de cada defeito nos planos coronal, transaxial e sagital utilizando o software bidimensional DataViewer 1.4.3.1 (SkyScan, Bélgica) (Fig. 3).

Figura 3: Software DataViewer utilizado para as análises bidimensionais mostrando o alinhamento coronal, transaxial e sagital.

4.6.2.2 Análise da altura e diâmetro da região enxertada (2D)

Após o alinhamento dos defeitos nos três planos foi determinado no programa DataViewer 1.4.3.1 a altura média do defeito tratado (Fig. 4), calculando-se a média das 3 medidas (duas nas extremidades laterais e uma na região central do defeito) obtidas nos planos coronal e sagital. O diâmetro médio do defeito (Fig. 5) foi

calculado pela distância entre um lado e o outro da borda do defeito (facilmente visualizada nas imagens), passando pelo ponto central.

Figura 4: Imagens do Software DataViewer após o alinhamento de um dos defeitos mostrando no plano coronal (A-C) e sagital (D-F) as 3 medidas obtidas para a determinação da altura da área enxertada

Figura 5: Imagens do Software DataViewer após o alinhamento de um dos defeitos mostrando no plano coronal (A), transaxial (B) e sagital (C) as 3 medidas obtidas para a determinação do diâmetro do defeito.

4.6.2.3 Análise volumétrica (3D)

A área de interesse (*ROI*) foi delimitada nas imagens alinhadas no plano coronal, utilizando o software CTAn 1.10.1.0 (SkyScan, Bélgica), tomando-se como base o diâmetro médio (8,2 mm) e altura mínima obtida entre as amostras (1,3 mm), para quantificação das estruturas. Posteriormente, a binarização das imagens (i.e, a separação das fases biomaterial e osso neoformado) foi realizada, e a seguir, o volume de cada fase determinado conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6: Software CTAn mostrando uma imagem bidimensional transaxial de um dos defeitos (A) e subsequente binarização para a quantificação do biomaterial (B) e do tecido ósseo neoformado (C) e os seus respectivos resultados quantitativos determinados pelo software (D e E)

4.7 Procedimento histotécnico

Após serem examinadas no MicroCT, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e submetidas a desmineralização 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, com trocas semanais da solução, por um período aproximado de 40 dias. Após a desmineralização as peças foram desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina processada Histosec-

Merck[®]. Cortes alternados de 5 μm de espessura (com espaçamento de 100 μm) foram obtidos e corados pela hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

4.8 Análise histológica descritiva

Os cortes histológicos foram examinados em um microscópio binocular Axioskop 2 (Carl Zeiss), sendo avaliada(o): a) presença de infiltrado inflamatório, b) formação de tecido ósseo e conjuntivo ao redor das partículas enxertadas; c) presença de células reabsortivas na superfície do material enxertado; e d) grau de maturidade do tecido ósseo formado. As fotomicrografias foram obtidas no microscópio Olympus BX-50 (Olympus[®] Corporation, Tóquio, Japão) com câmera fotográfica Olympus DP-71 acoplada e software Image-Pro Plus[®] 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, EUA).

4.9 Análise histomorfométrica

4.9.1 Casualização dos campos microscópicos

Todos os métodos estereológicos são baseados em princípios geométricos e estatísticos, derivados da probabilidade que as imagens da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto chave na aplicação desses métodos está na casualização das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste, sem que haja vício na amostragem. Assim, é necessário a aplicação de procedimentos de casualização nos vários estágios do experimento. Para tanto, na atual pesquisa, de cada peça histológica foram obtidas 6 lâminas contendo 3 cortes semi-seriados cada uma. Por meio de sorteio foram selecionados 3 lâminas e de cada lâmina foram avaliados 3 cortes para cada defeito. Nos cortes os campos histológicos foram escolhidos por amostragem sistemática (Weibel, 1969).

4.9.2 Avaliação da densidade de volume

A densidade de volume (VVi) é definida como a fração de volume ocupada por um determinado constituinte (enxerto, infiltrado inflamatório tecido conjuntivo, tecido ósseo e medula óssea) do todo (defeito com o enxerto + tecido reacional), e pode ser obtida em cortes histológicos como fração de área ou seja $VVi = A Ai$ (veja Weibel, 1969). Assim, a avaliação da densidade de volume seguiu o protocolo descrito abaixo. Após a captura das imagens abrangendo todo o defeito utilizando a objetiva de 4X e armazenamento em TIFF foi realizado a reconstrução de todo o defeito no programa Adobe Photoshop CS6. Em seguida, todo o defeito foi avaliado no programa de análise de imagem AxioVision, onde foi determinado a área total analisada (A) e a área ocupada por cada constituinte no defeito (Ai) pela unidade de medida PIXEL. A densidade de volume (VVi) de cada tipo de estrutura foi calculada pela relação: $VVi = A Ai = Ai/A.100$ (Weibel, 1969) (Figura 7).

Figura 7: Determinação da área total analisada e a área total ocupada por cada constituinte no defeito pela unidade de medida PIXEL² no programa de análise AxioVision.

4.10 Análise estatística

Os dados quantitativos de MCI e MCf foram analisados ao teste “t” pareado. Os dados microtomográficos e histomorfométricos após serem verificados se aderiam a normalidade (teste de Hartley, Cochran e Bartlett), foram comparados entre grupos e períodos experimentais, pela análise de variância (ANOVA) a dois critérios (período e tratamento), e as médias contrastadas pelo teste de Tukey. Para avaliarmos a ocorrência entre os dados microtomográficos e histomorfométricos da densidade de volume do biomaterial e do tecido ósseo na área do defeito submetemos os dados numéricos a correlação de Pearson. Todos os testes foram efetuados utilizando o software Statistica (Version 10.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Evolução da massa corporal

Os procedimentos cirúrgicos foram tecnicamente fáceis quanto a acessibilidade da área cirúrgica e a realização dos defeitos, bem como, ao seu preenchimento com os diferentes materiais ósseo-substitutos. O tempo médio entre a anestesia e a sutura foi de 40 minutos por animal. O quadro pós-cirúrgico de todos os animais foi satisfatório, com manutenção da massa corporal e sem intercorrências clínicas (febre, prostração, edema ou abertura da sutura), sendo os pontos cirúrgicos removidos no 7º dia pós-cirúrgico, indicando que os procedimentos e biomateriais utilizados foram adequados e bem aceitos pelo organismo.

A massa corporal dos coelhos no dia da cirurgia (MCi) e ao término de cada período experimental (MCf), assim como os resultados da análise estatística estão apresentados na **Tabela 1**. A análise dos dados mostrou que as MCis foram similares entre si para todos os períodos experimentais, valendo em média $4,0 \pm 0,33\text{kg}$. As MCfs não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação as MCis indicando a manutenção da massa corporal ao longo do tempo.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da **massa corporal (kg)** dos animais no dia da cirurgia (MCi) e ao término de cada período experimental (MCf). Comparação entre períodos ANOVA a um critério e comparação entre a MCi e MCf pelo teste “t” pareado

Período Experimental	MCi (kg)	MCf (kg)	Teste “t” pareado “p”
30 dias	$3,8 \pm 0,26$	$3,9 \pm 0,40$	0,227286
60 dias	$3,9 \pm 0,35$	$4,1 \pm 0,37$	0,083816
180 dias	$4,0 \pm 0,31$	$4,1 \pm 0,29$	0,151291
Anova “p”	0,272327	0,078772	

13 animais/período

5.2 Avaliação microtomográfica

5.2.1 Análise descritiva comparativa das imagens 2D e 3D obtidas para os diferentes grupos experimentais

A análise descritiva das imagens microtomográficas (**Figuras 8-12 A-M**) foi realizada nos planos em 3D (**visão superior – VS, visão inferior – VI**) e em 2D (**visão dos cortes transaxial e coronal**), com intuito de analisar a evolução do reparo nos diferentes planos e períodos estudados, buscando verificar o desempenho e manutenção do enxerto/biomaterial e a formação óssea.

Em todos os defeitos avaliados, a formação óssea ocorreu de maneira centrípeta, das bordas em direção ao centro do defeito, com uma formação mais expressiva de tecido ósseo na região da dura-máter (**VI > VS**) em contato com a borda do defeito, que ao longo do tempo passa a ocupar parte do espaço do defeito no grupo Coágulo (**Fig. 9**) ou os espaços entre as partículas do enxerto/biomaterial nos demais grupos (**Figs. 10-13**).

No **grupo Coágulo (Fig. 9)** ocorreu inicialmente em todos os defeitos o crescimento da sua borda em forma de um bloco ósseo direcionado para a região central. Ao longo dos períodos esse crescimento ósseo se afunilou restringindo-se a região da dura-máter, como pode ser observado nas Figuras 3D e 2D. Embora tenha ocorrido contínuo aumento da formação óssea ao longo de 180 dias, em nenhum caso ocorreu o completo fechamento do defeito (seta amarela) e a espessura do osso formado ficou restrita a menos de 1/3 do bloco ósseo original removido cirurgicamente.

No **grupo Autógeno (Fig. 10)** aos 30 dias, a zona do reparo estava preenchida por muitas partículas de enxerto entremeadas a finas trabéculas ósseas. Ao longo do tempo as trabéculas aumentaram significativamente a espessura, tornando-se mais evidentes, enquanto que as partículas de enxerto mostravam acentuada redução em sua quantidade (seta amarela). Aos **180 dias**, os defeitos exibiam espessamento das trabéculas ósseas neoformadas e pequenas e raras partículas de osso autógeno e, algumas regiões não preenchidas com tecido ósseo indicando que o defeito, nesse caso, tinha sido parcialmente reparado.

No **grupo Bio-Oss® (Fig. 11)** no período inicial de 30 dias, toda área defeito apresentava-se preenchido por partículas de Bio-Oss, permitindo a formação óssea em sua superfície e o aparecimento de trabéculas ósseas, junto da região da dura-máter e da borda do defeito (visão 3D-VI). Nos períodos subsequentes, ocorreu aumento na quantidade de tecido ósseo como no período anterior, porém as partículas de Bio-Oss, muito evidentes aos 30-60 dias, aos 180 dias mostraram redução na sua quantidade. Em algumas áreas dos defeitos havia ausência de biomaterial e tecido ósseo com esse tratamento (seta amarela).

No **grupo GenOx® Inorg (Fig. 12)** aos 30 dias, o defeito apresentava-se totalmente preenchido por partículas de biomaterial e por osso neoformado próximo das bordas do defeito e da região da dura-máter (visão 3D-VI). Nos períodos subsequentes, as partículas GenOx® Inorg continuavam a preencher toda a área defeito, fornecendo suporte para o crescimento ósseo. No entanto, aos 180 dias, ao contrário do que ocorreu com o Bio-Oss®, o padrão morfológico dos períodos antecedentes se manteve, com os defeitos preenchidos por partículas do GenOx® Inorg e evidentes trabéculas ósseas em íntimo contato com as partículas localizadas principalmente na região da dura-máter.

No **grupo GenPhos® XP (Fig 13)**, o quadro do reparo apresentava-se similar ao observado com o GenOx® Inorg. Assim, durante todo período experimental, observou-se que número e volume das partículas do biomaterial não se modificaram e o tecido ósseo aumentou gradativamente nas bordas do defeito e na região da dura-máter (visão 3D-VI), nos vários períodos, com a formação de trabéculas ósseas envolvendo as partículas. Aos **180 dias**, todo defeito estava preenchido pelas partículas do GenPhos® XP em íntimo contato com o tecido ósseo.

Figura 9 – Grupo Coágulo. Imagens microtomográficas em 3D (visão superior - VS e visão inferior - VI) e em 2D (cortes - transaxial e coronal) apresentando a evolução do reparo ósseo dos defeitos tratados nos períodos de **30 (A-D)**, **60 (E-H)** e **180 dias (I-M)**. Veja: aos **30 dias**, o defeito com grande formação de tecido ósseo (seta azul) na borda e pequenas ilhas ósseas mais centrais, ambas na região da dura-máter; aos **60 dias**, o defeito com densa formação de tecido ósseo (seta azul) na borda, que se afunila em direção a sua região central sem ocorrer união óssea (seta verde); e aos **180 dias**, formação óssea na borda do defeito mais densa e madura, porém sem conseguir ocupar as regiões mais centrais (denotando falhas ósseas, seta amarela), podendo ser considerado um defeito crítico.

Figura 10- Grupo Autógeno. Imagens microtomográficas em 3D (visão superior - VS e visão inferior - VI) e em 2D (cortes - transaxial e coronal) apresentam a evolução do reparo dos defeitos tratados com enxerto **Autógeno** nos períodos de **30 (A-D)**, **60 (E-H)** e **180 dias (I-M)**. Observar: aos **30 dias**, o defeito predominantemente preenchido por partículas do enxerto (seta vermelha) e por finas trabéculas de tecido ósseo neoformado (seta azul); aos **60 dias**, o defeito com redução das partículas do enxerto (seta vermelha) e aumento das trabéculas ósseas (seta azul); e aos **180 dias**, o defeito com pequenas e raras partículas de osso autógeno e espessamento das trabéculas ósseas neoformada. Algumas regiões do defeito não apresentam preenchimento por tecido ósseo indicando que o defeito foi parcialmente reparado (seta amarela).

Figura 11– Grupo Bio-Oss[®]. Imagens microtomográficas em 3D (visão superior - VS e visão inferior - VI) e em 2D (cortes - transaxial e coronal) apresentam a evolução do reparo ósseo dos defeitos tratados com **Bio-Oss[®]** nos períodos de **30 (A-D)**, **60 (E-H)** e **180 dias (I-M)**. Veja: aos **30 dias**, o defeito predominantemente preenchido por partículas de Bio-Oss (seta vermelha), e a formação óssea localizada próxima da borda do defeito sendo mais expressiva na região próxima a dura-máter (visão 3D-VI) e envolvendo as partículas do Bio-Oss[®]; aos **60 dias**, a manutenção das partículas do biomaterial e seu envolvimento por tecido ósseo neoformado similar ao observado no período anterior; e aos **180 dias**, pequena redução das partículas de Bio-Oss[®] que passam a preencher parcialmente o defeito e se mostram envoltas por tecido ósseo principalmente na região próxima a dura-máter (visão 3D-VI). Notar ausência de biomaterial e tecido ósseo (seta amarela) em algumas regiões do defeito.

Figura 12– Grupo GenOx[®] Inorg. Imagens microtomográficas em 3D (visão superior - VS e visão inferior - VI) e em 2D (cortes - transaxial e coronal) apresentam a evolução do reparo ósseo dos defeitos tratados com GenOx[®] Inorg nos períodos de **30 (A-D)**, **60 (E-H)** e **180 dias (I-M)**. Observar: aos **30 dias**, o defeito predominantemente preenchido por densas partículas do GenOx[®] Inorg (seta vermelha) e a formação óssea localizada próxima a borda do defeito sendo mais expressiva na região próxima a dura-máter (visão 3D-VI) e envolvendo as partículas do biomaterial; aos **60 dias**, o defeito com a manutenção das partículas do biomaterial e o aumento da formação óssea ao redor das partículas principalmente na região da dura-máter (visão 3d-VI), comparado ao período anterior; e aos **180 dias**, toda região do defeito preenchida pelas partículas do GenOx[®] Inorg envolvidas por tecido ósseo.

Figura 13—Grupo GenPhos[®] XP. Imagens microtomográficas em 3D (visão superior - VS e visão inferior - VI) e em 2D (cortes - transaxial e coronal) apresentam a evolução do reparo ósseo dos defeitos tratados com GenPhos[®] XP nos períodos de **30 (A-D)**, **60 (E-H)** e **180 dias (I-M)**. Similarmente ao observado com o GenOx[®] Inorg, veja: aos **30 dias**, o defeito predominantemente preenchido por densas partículas do GenPhos[®] XP (seta vermelha) e a formação óssea localizada próxima a borda do defeito sendo mais expressiva na região próxima a dura-máter (visão 3D-VI) e envolvendo as partículas do GenPhos[®] XP; aos **60 dias**, o defeito com a manutenção das partículas do biomaterial e aumento da formação óssea ao redor das partículas, principalmente na região da dura-máter (visão 3D-VI), comparado ao período anterior; e aos **180 dias**, toda região do defeito preenchida pelas partículas do GenPhos[®] XP envoltas por tecido ósseo.

5.2.2 Diâmetro e da altura dos defeitos nos diferentes grupos experimentais no programa DataViwer

Os resultados de diâmetro e altura dos defeitos estão apresentados, respectivamente, nas **figuras 14 e 15**, e as respectivas análises estatísticas nas **tabelas 2 e 3**. A análise dos resultados mostraram que o diâmetro e altura dos defeitos preenchidos com osso autógeno, Bio-Oss®, GenOx® Inorg e GenPhos® XP foram similares entre grupos e períodos experimentais e similares ao das medidas obtidas para os ossos cranianos adjacentes a área do defeito, indicando que todos os defeitos tinham o mesmo tamanho e que foram preenchidos com um volume de biomaterial/enxerto equivalente ao do bloco ósseo removido. Assim, o diâmetro médio realizado com a trefina foi de 8,2 mm e a altura tanto do tecido ósseo removido quanto da área preenchida, foi de 1,9 mm.

Figura 14: Gráfico da média e desvio padrão do **diâmetro do defeito (mm)** na calvária dos coelhos nos diferentes grupos e períodos experimentais. (N = 5 defeitos/período)

Tabela 2 – Comparação do **diâmetro dos defeitos** na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	11,093	2	0,319504
Tratamento	1,2	4	0,243523
Período x Tratamento	1,4	8	0,104105

Figura 15: Gráfico da média e desvio padrão da **altura do defeito (mm)** na calvária dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais (N = 5 defeitos/período)

Tabela 3 – Comparação da **altura** dos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	2,125	2	0,128286
Tratamento	0,394	4	0,812067
Período x Tratamento	1,062	8	0,401460

5.2.3 Densidade de volume total (BV/VT) do biomaterial determinado no programa CTAn

Vale ressaltar que não foi possível quantificar o volume do enxerto autólogo pelo MicroCT, pelo fato da radiopacidade das suas partículas ser idêntica ao tecido ósseo neoformado no local, sendo assim, foram determinados apenas os volumes do Bio-Oss®, GenPhos® XP e GenOx® Inorg.

Os resultados obtidos de densidade de volume total do biomaterial estão apresentados graficamente na **figura 16** e as análises estatísticas nas **tabelas 4 e 5**. A análise da figura e das tabelas mostraram que o volume dos biomateriais nos defeitos cranianos não apresentou interação entre período e tratamento, sendo observadas diferenças estatisticamente significantes somente quanto ao período experimental avaliado. Aos 30 e 60 dias, as densidades de volume dos biomateriais mantiveram-se estáveis (média de 33,3%) reduzindo 0,25 vezes aos 180 dias (25,0%).

Figura 16 –Gráfico da média e desvio padrão da **densidade de volume total do material (BV/VT)** (%) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Símbolos diferentes p<0,05 entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período

Tabela 4 Comparação entre a **densidade de volume total do material nos defeitos** na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	10,823	2	0,000209
Tratamento	2,489	2	0,097133
Período x Tratamento	1,279	4	0,296435

Tabela 5 – Média e desvio-padrão da **densidade de volume total de biomaterial (%)** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período.

Densidade de volume total de biomaterial (%)		
30 dias	60 dias	180 dias
31,3 ± 6,50*	35,4 ± 5,64*	25,0 ± 7,50#

Símbolos diferentes p<0,05.

5.2.4 Densidade de volume total (BV/VT) do tecido ósseo determinado no programa CTAn

Como mencionado anteriormente, na técnica utilizada não foi possível distinguir o enxerto autógeno do tecido ósseo neoformado devido à similaridade de radiopacidade entre ambos, sendo quantificados em conjunto como tecido ósseo.

Os resultados de densidade de volume total do tecido ósseo encontram-se na **figura 17** e as correspondentes análises estatísticas nas **tabelas 6 e 7**. A ANOVA a dois critérios (período vs. material) na **tabela 6** mostrou a ocorrência de interação entre período e tratamento. O contraste das médias pelo teste de Tukey (**Tabela 7**) demonstrou que o volume de tecido ósseo nos defeitos tratados com Bio-Oss, GenPhos® XP e Coágulo foram similares entre grupos e períodos sendo em média de 39,3%. O volume de tecido ósseo no grupo autógeno foi maior aos 30 dias (67,2%) comparativamente a todos os demais grupos e reduziu 0,33 vezes aos 180 dias (45,0%) sendo similares aos demais grupos. Graficamente, a média do volume

de tecido ósseo no grupo GenOx[®] Inorg foi maior em relação aos grupos Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP e Coágulo, mas essa diferença só foi estatisticamente significativa no período de 60 dias.

Figura 17 – Gráfico da média e desvio padrão da **densidade de volume total do tecido ósseo (%)** nos diferentes grupos e períodos experimentais. No grupo autólogo os dados referem-se as partículas do enxerto + novo tecido ósseo. Letras diferentes $p < 0,05$ entre período e tratamento; $N=5$ defeitos/grupo e período.

Tabela 6 – Comparação entre a **densidade de volume total de tecido ósseo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	3,464	2	0,037683
Tratamento	18,767	4	0,000000
Período x Tratamento	2,369	8	0,027472

Tabela 7 – Média e desvio-padrão da **densidade de volume total de tecido ósseo (%)** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento

Período em dias	Densidade de volume total de Tecido Ósseo (%)				
	Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno	Coágulo
30	37,0±10,85 ^a	35,9±4,85 ^a	44,7± 3,89 ^{a,c}	67,2±16,11 ^b	39,9±9,31 ^a
60	34,5±6,52 ^a	42,1±2,34 ^a	53,1±3,80 ^{b,c}	58,9±10,00 ^{b,c}	35,5±1,96 ^a
180	33,2±9,18 ^a	35,2±9,60 ^a	45,2±4,68 ^a	45,0±6,10 ^a	39,5±9,59 ^a

Letras diferentes p<0,05.

5.3 Resultados histológicos

As imagens histológicas representativas dos defeitos tratados com Coágulo, osso Autógeno, Bio-Oss®, GenPhos® XP e GenOx® Inorg nos diferentes períodos experimentais estão apresentadas nas figuras 18 a 22.

Assim como foi descrito na análise microtomográfica, histologicamente o reparo dos defeitos preenchidos com esses materiais ocorreu centripetamente, ou seja, a neoformação óssea fez-se a partir da borda e da superfície da dura-máter em direção ao centro do defeito. Em todos os períodos e tratamentos os biomateriais apresentaram-se biocompatíveis oferecendo suporte para a deposição do novo tecido ósseo por osteocondução, sem apresentar nenhuma reação imunológica.

No grupo **Coágulo (Fig. 18)** todos os defeitos apresentaram o reparo ósseo comprometido, tanto no reestabelecimento da altura devido ao colapso do tegumento para dentro do defeito, como no contorno do osso neoformado que se mostrou irregular e falho ao longo da superfície da dura-máter.

No grupo **Autógeno (Fig. 19A-C)** aos **30 dias (Fig. 19A)**, os defeitos estavam preenchidas por grandes partículas de osso autógeno circundadas por tecido ósseo imaturo composto por finas trabéculas, com alguns espaços intertrabeculares já preenchidos por medula óssea e outras por tecido conjuntivo. Neste período, tanto osteoblastos ativos, quanto osteoclastos estavam presentes, tanto na superfície do

tecido ósseo neoformado quanto no do enxerto, indicando intenso processo de formação e remodelação óssea. Aos **60 dias (Fig. 19B)**, as partículas de osso autógeno mostravam-se menores em relação ao período anterior e envoltas por trabéculas ósseas mais maduras em relação ao período anterior e os espaços entre elas ocupados quase que totalmente por medula óssea. Osteoblastos ativos e osteoclastos estavam presentes, porém em menor número em relação ao período anterior. Aos **180 dias (Fig. 19C)**, pequenos fragmentos de osso autógeno estavam presentes aprisionados no interior das trabéculas ósseas, já menos numerosas, mais espessas e de arranjo lamelar. Todos os defeitos exibiram falhas ósseas preenchidas por tecido conjuntivo ou adiposo, principalmente na região tegumentar, o que indicou que esse tratamento não foi capaz de restabelecer integralmente a estrutura óssea perdida até o período de 180 dias.

No grupo **Bio-Oss® (Fig. 20A-C)** aos 30 dias (**Fig. 20A**), todos os defeitos mostraram preenchidos por grande quantidade de partículas de biomaterial de tamanho variado, formato irregular e com raros poros. A formação óssea ocorreu na borda do defeito em direção ao centro envolvendo as partículas do biomaterial. Na região central do defeito, os espaços entre as partículas estavam ocupadas por tecido conjuntivo ricamente celular e vascularizado. **Aos 60 dias (Fig. 20B)**, o padrão de reparo ósseo manteve-se similar ao período anterior, mas com maior formação/acúmulo de tecido ósseo. Em todos os casos, o crescimento ósseo ocorreu por osteocondução a partir da borda do defeito e sobre a superfície das partículas de Bio-Oss®. **Aos 180 dias (Fig. 20C)**, em 4 defeitos ocorreu diminuição no número e tamanho das partículas do Bio-Oss indicando a sua reabsorção no longo prazo. Nestes casos, a formação óssea se mostrou densa e lamelar, mas irregular, com a formação de pequenos blocos ou ilhas ósseas separadas por tecido mole (conjuntivo e adiposo) oriundo dos tecidos adjacentes, principalmente da região tegumentar. Em apenas um caso, as partículas foram pouco reabsorvidas e a formação óssea foi mais uniforme e ao redor das partículas.

No grupo **GenOx® Inorg (Fig. 21A-C)** aos 30 dias (**Fig. 21A**), similarmente ao grupo Bio-Oss®, todos os defeitos mostraram-se preenchidos por grande quantidade de partículas de GenOx® Inorg com formato irregular, raros poros e de tamanho maior do que o do Bio-Oss®. A neoformação óssea ocorreu também da borda em direção ao centro do defeito, com a matriz óssea envolvendo as partículas do

biomaterial. Porém, a formação óssea na superfície da dura-máter, nesse caso, foi comparativamente maior ao do Bio-Oss®. Na região central do defeito os espaços entre as partículas estavam ocupadas por tecido conjuntivo ricamente celular e vascularizado. Aos **60 dias (Fig. 21A)**, a quantidade de partículas do biomaterial não havia se modificado em relação ao período anterior, e um maior volume de tecido ósseo tinha acumulado, tanto na borda do defeito, como na superfície da dura-máter, preenchendo os espaços entre as partículas. Aos **180 dias (Fig. 21C)** diferentemente do observado no grupo Bio-Oss®, em três casos a manutenção do número de partículas do GenOx® Inorg favoreceu a preservação dos espaços para o contínuo crescimento ósseo e medular, principalmente na região da dura-máter. Em dois casos, embora não tenha sido observado alteração na quantidade de GenOx® Inorg, pequenas áreas de descontinuidade foram observadas no tecido ósseo, preenchidas por tecido conjuntivo fibroso/adiposo, tanto na região da dura-máter como na tegumentar.

No grupo **GenPhos® XP (Fig. 22A-C)**, similarmente ao ocorrido no grupo GenOx® Inorg, as partículas do material praticamente não sofreram reabsorção ao longo dos 180 dias. Aos **30 dias (Fig. 22A)**, em todos os defeitos, a formação óssea ocorreu a partir da borda do defeito em direção a região central, caminhando na superfície da dura-máter, apoiada na superfície das partículas de GenPhos® XP e invadindo suas concavidades e poros. Os demais espaços entre as partículas estavam preenchidos por um tecido conjuntivo frouxo ricamente celular e vascularizado. Aos **60 dias (Fig. 22B)**, o quadro histológico mostrou-se similar ao do período anterior, porém com maior acúmulo de tecido ósseo já com arranjo mais denso e lamelar. Praticamente toda superfície das partículas localizadas próximos a região da dura-máter estava recoberta, e as suas concavidades e poros preenchidas, por tecido ósseo e as localizadas próximo ao tegumento envoltas e preenchidas por tecido conjuntivo. Aos **180 dias (Fig. 22C)**, dois defeitos exibiram redução no número de partículas em relação ao período anterior e mostraram formação de uma densa tábua óssea na região da dura-máter com características da original, porém com espessura menor. Nos demais três casos, a quantidade de partículas assemelhava-se ao observado nos períodos anteriores, porém a formação óssea foi descontínua, com algumas áreas preenchidas por tecido conjuntivo fibroso ou adiposo, tanto na região da dura-máter como na tegumentar.

Figura 18 – Grupo Coágulo. Fotomicrografias de defeitos na calvária de coelho tratadas com coágulo sanguíneo nos períodos de **30, 60 e 180 dias**: **A, C e E**) aspecto panorâmico da calvária mostrando altura e conformação comprometida pelo tipo de tratamento. Veja: aos **30 dias**, a área do defeito preenchida predominantemente por tecido tegumentar com pequenas áreas de tecido ósseo neoformado nas bordas do defeito, e por tecido conjuntivo frouxo rico em células e vascularizado na região mais central; e nos períodos de **60 e 180 dias**, o defeito ainda preenchido por grande quantidade de tecido tegumentar e também por finas trabéculas ósseas, que em alguns casos, conduziram o fechamento parcial do defeito, porém, sem recuperação de sua altura. Borda do defeito (linha pontilhada). Objetiva de 2x. **B, D e F**). Detalhes da figura anterior mostrando o reparo ósseo comprometido pelo colapso do tegumento (TA) sobre as pequenas trabéculas ósseas (asterisco) entremeadas por tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 10x e 40x. HE

Figura 19 – Grupo Autógeno. Fotomicrografias mostrando a evolução de defeitos na calvária de coelhos tratados com osso **Autógeno**, nos períodos de **30, 60 e 180 dias**: **A, C e E**) aspecto panorâmico da calvária exibindo a integridade e o contorno irregular do defeito decorrentes do processo de reabsorção das partículas do enxerto (A), juntamente com a remodelação óssea (seta preta) observada na borda (linha pontilhada) e em regiões dispersas do defeito. Entre as trabéculas ósseas notar a evolução da formação da medula óssea (M). Objetiva de 2x. **B, D e F**). Detalhes da figura anterior mostrando as partículas de osso autógeno (A) envoltas por tecido ósseo (asterisco) e os espaços entre elas preenchidos por tecido medular (TM). Objetivas de 10x e 40x. HE

Figura 20 – Grupo Bio-Oss®. Fotomicrografias mostrando a evolução de defeitos na calvária de coelhos tratados com **Bio-Oss®**, nos períodos de **30, 60 e 180 dias**: **A, C e E**) aspecto panorâmico da calvária exibindo a integridade e alteração do contorno do defeito com áreas de reabsorção e remodelação. Notar gradativa reabsorção do biomaterial (BO) e aumento do tecido ósseo (asterisco) nas bordas do defeito (linha pontilhadas) e na superfície dos biomateriais localizados em áreas mais centrais do defeito. Veja em contato com as partículas o tecido conjuntivo (TC) o tecido medular (M) dispersos entre tecido ósseo/partículas. Objetiva de 2x. **B, D e F**) Detalhes da figura anterior mostrando as partículas de Bio-Oss® envoltas por tecido ósseo (asterisco) e os espaços entre elas preenchidos por tecido medular (TM) e/ou tecido conjuntivo (TC). Notar também algumas áreas com colapso do tegumento (TA). Objetivas de 10x e 40x. HE

Figura 21 – Grupo GenOx[®] Inorg. Fotomicrografias mostrando a evolução de defeitos na calvária de coelhos tratados com **GenOx[®] Inorg**, nos períodos de **30, 60 e 180 dias**: **A, C e E)** aspecto panorâmico da calvária exibindo pouca alteração no contorno do defeito ao longo dos períodos. Notar pequena variação em relação as partículas de GenOx[®] Inorg (IN), sendo estas, envoltas por tecido conjuntivo (TC), áreas de medula (M) e por tecido ósseo em sua superfície (asterisco). Borda do defeito (linha pontilhada). Objetiva de 2x. **B, D e F).** Detalhes da figura anterior mostrando as partículas de GenOx[®] Inorg envoltas por tecido ósseo (asterisco) e os espaços entre elas preenchidos por tecido medular (TM) e/ou tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 10x e 40x. HE

Figura 22 – Grupo GenPhos[®] XP. Fotomicrografias mostrando a evolução de defeitos na calvária de coelhos tratados com GenPhos[®] XP, nos períodos de 30, 60 e 180 dias: **A, C e E)** aspecto panorâmico da calvária exibindo pouca alteração no contorno do defeito ao longo dos períodos. Notar pequena variação em relação a reabsorção do biomaterial GenPhos[®] XP (HA), sendo este envolto por tecido conjuntivo (TC), pequenas áreas de medula (M) e por tecido ósseo (asterisco) na superfície e poros das partículas localizadas nas bordas e áreas centrais do defeito. Bordas do defeito (linha pontilhada). Objetiva de 2x. **B, D e F).** Detalhes da figura anterior mostrando as partículas de GenPhos[®] XP envoltas por tecido ósseo (asterisco) e os espaços entre elas preenchido por tecido medular (TM) e/ou tecido conjuntivo (TC) e pequenas áreas de tegumento (TA). Objetivas de 10x e 40x. HE

5.3.1 Avaliação da formação óssea e das células reabsortivas na superfície dos materiais/enxerto nos diferentes grupos de tratamento

As imagens histológicas representativas da formação óssea e das células reabsortivas presentes na superfície dos materiais/enxerto nos defeitos tratados com osso Autógeno, Bio-Oss[®], GenOx[®] Inorg e GenPhos[®] XP estão apresentadas nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

As partículas do enxerto autógeno (Figura 23A-C) apresentaram inúmeras lacunas osteocíticas vazias ou contendo restos celulares provavelmente em decorrência da apoptose dos osteócitos por consequência da rompimento da comunicação das células a matriz óssea adjacente. Nas fotomicrografias de maior aumento, notou-se tecido ósseo neoformado com osteócitos aprisionados a matriz óssea em contato íntimo com a superfície das partículas do enxerto. No grupo Bio-Oss[®] (Figura 23 D-F), GenOx[®] Inorg (Figura 23 G-I) e GenPhos[®] XP (Figura J-M) observou-se que o tecido ósseo envolvia praticamente todas as faces das partículas dos biomateriais. Nos aumentos maiores, observou-se formação óssea em contato íntimo a superfície das partículas e também ilhas de tecido ósseo localizados nos poros e concavidades, sendo mais evidentes na superfície das partículas de GenPhos[®] XP em relação ao GenOx[®] Inorg e Bio-Oss[®].

Durante os períodos de 30 e 60 dias vários osteoclastos estavam presentes tanto na superfície do osso autógeno/tecido ósseo quanto na superfície dos biomateriais, indicando que a reabsorção ocorria concomitantemente (Figs. 24A-M). Nas fotomicrografias do grupo autógeno (Figs. A-C), o processo de reabsorção por células gigantes e macrófagos eram evidentes, ocorrendo conjuntamente nas partículas do enxerto e do tecido ósseo. Já nos grupos Bio-Oss[®] (Figs. D-F), GenOx[®] Inorg (Figs. G-I) e GenPhos[®] XP, as células reabsortivas ocupavam a superfície das partículas do biomaterial associadas principalmente ao tecido conjuntivo adjacente. No entanto, estas diferiam-se em relação ao formato e aparência, sendo no Bio-Oss[®] mais volumosas em relação as do grupo GenPhos[®] XP, que apresentavam-se em maior quantidade, e também as do grupo GenOx[®] Inorg (Figs. G-I), que exibiam-se em menor quantidade e tamanho em relação aos demais materiais.

Figura 23 . Fotomicrografias da calvária dos coelhos evidenciando o íntimo contato entre os materiais e o tecido ósseo neoformado (Figs. A-M). No grupo Autógeno (A-M) observa-se na nas partículas do material (A) a ausência de osteócitos nas lacunas osteocíticas (seta azul) do enxerto autólogo decorrente da apoptose por consequência da rompimento da comunicação das células a matriz adjacente. Notar na superfície das partículas formação óssea (asterisco) com osteócitos aprisionados nas lacunas da matriz óssea (seta verde) em íntimo contato (seta preta). Notar. Nos grupos Bio-Oss® (Figs. D-F), GenOx® Inorg (Figs. G-I) e GenPhos® XP (Figs. J-M) observar formação óssea (asterisco) em íntimo contato com as partículas dos materiais (seta preta). Observar no GenPhos® XP (XP) maior quantidade de poros e concavidades preenchidas por tecido ósseo, raramente observadas no GenOx® Inorg (IN) e Bio-Oss® (BO). Objetiva 10x e 40x. Hematoxilina e Eosina (HE).

Figura 24 . Fotomicrografias da calvária dos coelhos mostrando a atividade das células gigantes e macrófagos nos defeitos tratados com osso Autógeno, Bio-Oss®, GenOx® Inorg e GenPhos® XP no período 60 dias. Veja: No grupo Autógeno (Figs. A-C) o processo de reabsorção conjunta do enxerto (linha pontilhada) e do osso neoformado (asterisco) pelas macrófagos e células gigantes (seta azul). Diferentemente do osso Autógeno, nos grupos tratados com os materiais (Figs. D-M), notar macrófagos e células gigantes (seta azul) associado ao tecido conjuntivo (TC) e em contato direto com a superfície dos materiais. No grupo Bio-Oss® (D-F), as células reabsortivas (seta azul) apresentam-se em menor quantidade, porém em tamanho variado em relação ao grupo GenPhos® XP (Figs J-M). Já no GenOx® Inorg (G-I), estas aparecem em menor quantidade e tamanho em relação ao Bio-Oss® e GenPhos® XP. IN = GenOx® Inorg; XP = GenPhos® XP; BO = Bio-Oss®. Objetiva 10x e 40x. Hematoxilina e Eosina (HE).

5.4 Análise histomorfométrica

5.4.1 Densidade de volume dos materiais de enxerto

Os resultados de densidade de volume dos materiais de enxerto estão apresentados no **gráfico 25** e das análises estatísticas nas **tabelas 8 e 9**. A análise dos resultados pela ANOVA a 2 critérios (**Tabela 8**) demonstrou interação entre período x tratamento para os grupos **Bio-Oss®**, **GenPhos® XP**, **GenOx® Inorg** e **Autógeno**. O teste de Tukey para comparação das médias (**Tabela 9 e Gráfico 19**) mostrou que aos 30 dias, a densidade de volume de Bio-Oss®, GenPhos® XP e GenOx® Inorg foram similares entre si, valendo em média de 34%, enquanto que a Vvi do grupo Autógeno foi de 22%. Entre 30 e 180 dias, a densidade de volume dos biomateriais GenPhos® XP e GenOx® Inorg mantiveram-se constante, enquanto que a do Bio-Oss® e do osso autógeno reduziram 47% e 51% vezes respectivamente, passando a ocupar em média, respectivamente, 17,8% e 10,7% do defeito, ao final de 180 dias.

Figura 25. Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume do **material (%)** nos defeitos ósseos dos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes p<0,05 entre grupos e períodos; N=5 defeitos/grupo e período

Tabela 8 – Comparação entre o **percentual de biomaterial nos defeitos** na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	19,120	2	0,000000
Tratamento	59,491	3	0,000001
Período x Tratamento	4,494	6	0,001092

Tabela 9 – Média e desvio-padrão do **percentual de material (%)** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento

Período em dias	Densidade de biomaterial (%) (Período x tratamento)			
	Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno
30	34,1 ± 3,04 ^a	36,0 ± 8,47 ^a	31,9 ± 3,89 ^a	22,0 ± 5,45 ^{b,c}
60	30,1 ± 1,35 ^{a,b}	37,3 ± 5,55 ^a	37,0 ± 3,96 ^a	13,5 ± 1,03 ^{c,d}
180	17,8 ± 3,51 ^d	30,1 ± 5,57 ^{a,b}	32,7 ± 2,35 ^a	10,7 ± 3,19 ^d

(Letras diferentes p<0,05).

5.4.2 Densidade de volume do tecido ósseo

Os resultados de densidade de volume do tecido ósseo neoformado estão apresentados no **gráfico da figura 26** e as análises estatísticas nas **tabelas 10, 11 e 12**. A análise dos resultados estatísticos para os grupos **Bio-Oss[®]**, **GenPhos[®] XP**, **GenOx[®] Inorg**, **Autógeno** e **Coágulo** não demonstraram interação entre período e tratamento, apenas diferenças quanto ao período e o tratamento isoladamente. Com relação ao período, a densidade de volume média de tecido ósseo neoformado foi de 21,0% aos 30 dias aumentando para 26,3% do defeito aos 180 dias. Com relação ao tratamento, a densidade de volume de osso neoformado ao longo do período experimental foi similar nos grupos Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg e Coágulo, valendo em média de 22,6%, enquanto que no grupo tratado com osso autógeno foi 29,5% ou seja, 0,30 vezes maior.

Figura 26. Gráfico da média e desvio padrão da densidade de volume do **Tecido ósseo (%)** dos defeitos nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; $N = 5$ defeitos/grupo e período

Tabela 10 – Comparação entre o **percentual de tecido ósseo nos defeitos** na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	6,065	2	0,000000
Tratamento	5,778	4	0,003992
Período x Tratamento	1,109	8	0,370174

Tabela 11 – Média e desvio-padrão do **percentual de tecido ósseo nos defeitos** na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período.

Densidade de Tecido Ósseo (%) (Período)		
30 dias	60 dias	180 dias
21,0 ± 6,53*	24,8 ± 6,98 [#]	26,3 ± 4,91 ^{&}

Símbolos diferentes $p < 0,05$.

Tabela 12 – Média e desvio-padrão do **percentual de tecido ósseo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento.

Densidade de Tecido Ósseo (%) (Tratamento)				
Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno	Coágulo
22,8 ± 6,32 ^a	20,1 ± 2,95 ^a	23,6 ± 5,14 ^a	29,5 ± 7,94 ^b	24,1 ± 6,04 ^a

Letras diferentes p<0,05

5.4.3 Densidade de volume do tecido conjuntivo

Os resultados de densidade de volume do tecido conjuntivo estão apresentados no gráfico **da figura 27** e das análises estatísticas nas **tabelas 13, 14 e 15**. A análise dos resultados estatísticos das tabelas e do gráfico sobre a densidade de volume (%) **de tecido conjuntivo** dos defeitos tratados com **Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg, Autógeno e Coágulo** não demonstraram interação quando comparado período e tratamento, diferenças foram observadas apenas quanto ao período e o tratamento isoladamente. Com relação ao período, a densidade de volume do tecido conjuntivo diminuiu gradativamente em média de 0,43 vezes, passando de 33,2% aos 30 dias para 18,9% aos 180 dias. Nos grupos Autógeno e Coágulo (média de 16,4%) a densidade de volume do tecido conjuntivo foi 0,50 vezes menor comparativamente aos grupos Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg (média de 32,9%), que não apresentaram diferenças entre eles.

Figura 27. Gráfico da média e desvio padrão do percentual de **Tecido Conjuntivo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e símbolos diferentes $p < 0,05$ entre períodos; $N=5$ defeitos/grupo e período

Tabela 13 – Comparação entre o **percentual de tecido conjuntivo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	25,614	2	0,000000
Tratamento	25,272	4	0,000000
Período x Tratamento	1,531	8	0,165832

Tabela 14 – Média e desvio-padrão do **percentual de tecido conjuntivo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período

Densidade de Tecido Conjuntivo (%) (Período)		
30 dias	60 dias	180 dias
$33,2 \pm 11,92^*$	$27,0 \pm 10,29^{\#}$	$18,9 \pm 10,64^{\&}$

Símbolos diferentes $p < 0,05$.

Tabela 15 – Média e desvio-padrão do **percentual de tecido conjuntivo** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes materiais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento

Densidade de Tecido Conjuntivo (%) (Tratamento)				
Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno	Coágulo
33,8 ± 8,70 ^a	33,3 ± 6,51 ^a	31,8 ± 8,02 ^a	14,3 ± 15,0 ^b	18,63 ± 5,83 ^b

(Letras diferentes p<0,05).

5.4.4 Densidade de volume da medula óssea

Os resultados de densidade de volume da medula óssea estão apresentados no gráfico da **figura 28** e as análises estatísticas nas **tabelas 16, 17 e 18**. A análise dos resultados estatísticos das **tabelas** e do gráfico sobre a densidade de volume (%) **de tecido conjuntivo** dos defeitos tratados com **Bio-Oss[®]**, **GenPhos[®] XP**, **GenOx[®] Inorg**, **Autógeno** e **Coágulo** não demonstraram interação entre período e tratamento, apenas diferenças quanto ao período e o tratamento isoladamente. Como relação ao período, a medula óssea apresentou crescimento gradativo de 0,65 vezes, passando de 9,5% aos 30 dias, para 16,0% aos 180 dias. Já em relação ao tratamento, não houve diferenças significantes entre os grupos Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, Gen-Ox[®] Inorg e coágulo (média de 7,75%), mas em relação ao grupo Autógeno (32,3%) foi 3,16 vezes menor.

Figura 28. Gráfico da média e desvio padrão da **medula óssea** nos defeitos na da calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes p<0,05 entre tratamento e símbolos diferentes p<0,05 entre períodos; N=5 defeitos/grupo e período

Tabela 16 – Comparação entre o **percentual de medula óssea** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	10,01	2	0,000177
Tratamento	70,26	4	0,000000
Período x Tratamento	1,41	8	0,207251

Tabela 17 – Média e desvio-padrão do **percentual de medula óssea** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para período

Densidade de Medula Óssea (%) (Período)		
30 dias	60 dias	180 dias
9,5 ± 8,31*	12,3 ± 11,54*	16,0 ± 13,63 [#]

Símbolos diferentes p<0,05.

Tabela 18 – Média e desvio-padrão do **percentual de medula óssea** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para tratamento

Densidade de Medula Óssea (Tratamento)				
Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno	Coágulo
7,3 ± 3,93 ^a	6,4 ± 2,11 ^a	6,6 ± 3,81 ^a	32,3 ± 11,24 ^b	10,7 ± 3,44 ^a

Letras diferentes p<0,05.

5.4.5 Densidade de volume do tegumento

Os resultados de densidade de volume do tegumento estão apresentados no gráfico da **figura 29** e as análises estatísticas nas **tabelas 18 e 19**. A análise dos resultados estatísticos das **tabelas** e do gráfico sobre a densidade de volume (%) **de tecido conjuntivo** dos defeitos tratados com **Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg, Autógeno e Coágulo**

A análise dos resultados obtidos para ANOVA a 2 critérios (**tabelas 19**) quanto a densidade de volume (%) do tegumento nos grupos **Bio-Oss[®], GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg e Autógeno** demonstraram interação entre período x tratamento. O teste de Tukey para comparação das médias (**Tabela 20**) e do **gráfico 23** mostram que, a densidade de volume do tegumento nos grupos GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg não apresentaram diferenças significativas entre períodos, sendo em média de apenas 4,79%. A densidade de volume do tegumento nos grupos Bio-Oss[®] e Autógeno foi similar ao do GenPhos[®] XP, GenOx[®] Inorg entre 30 e 60 dias, porém foi 0,54 vezes maior aos 180 dias. No grupo coágulo durante todo período experimental a densidade de volume do tegumento se manteve constante (média de 46,41%) e foi em média 7,04 vezes maior comparado aos demais grupos.

Figura 29. Gráfico da média e desvio padrão do **percentual de tegumento** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos (mm) nos diferentes grupos e períodos experimentais. Letras diferentes $p < 0,05$ entre tratamento e períodos; $N=5$ defeitos/grupo e período

Tabela 19 – Comparação entre o **percentual de tegumento** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais pela ANOVA a dois critérios

Variáveis	ANOVA		
	F	Df	P
Período	18,901	2	0,000000
Tratamento	149,10	4	0,000000
Período x Tratamento	3,511	8	0,002171

Tabela 20 – Média e desvio-padrão do **percentual de tegumento** nos defeitos na calvária dos animais preenchidos com os diferentes biomateriais nos diferentes períodos experimentais avaliados. Teste Tukey aplicado para a interação entre período e tratamento

Período em dias	Densidade de tegumento (%) (período e tratamento)				
	Bio-Oss	GenPhos XP	GenOx Inorg	Autógeno	Coágulo
30	$2,68 \pm 1,68^a$	$3,46 \pm 2,60^a$	$1,70 \pm 1,20^a$	$0,26 \pm 0,35^a$	$48,36 \pm 5,29^b$
60	$3,12 \pm 1,42^a$	$3,33 \pm 1,79^a$	$2,32 \pm 1,66^a$	$5,99 \pm 3,17^{a,d}$	$46,06 \pm 4,79^b$
180	$19,76 \pm 6,79^c$	$10,15 \pm 5,91^{a,c}$	$7,82 \pm 5,70^{a,c}$	$18,57 \pm 14,95^{cd}$	$44,83 \pm 8,19^b$

Letras diferentes $p < 0,05$.

5.6 Correlação entre os dados de BV/TV obtidos pelas análises microtomográficas e histomorfométricas

Em teoria da probabilidade e estatística, correlação, também chamada de coeficiente de correlação, indica a força e a direção do relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias. Assim, na Tabela 21 sumariza os resultados obtidos na correlação de Pearson quanto aos dados obtidos para o BV/TV nos dois métodos de avaliação microtomográfico (3D) e histomorfométrico (2D).

Tanto os dados obtidos para BV/TV do biomaterial e/ou Tecido ósseo mostra moderada a forte correlação entre os dados microtomográficos e histomorfométricos quando se trata dos defeitos preenchidos com os biomateriais GenOx[®] Inorg e GenPhos[®] XP devido a facilidade durante a binarização sendo facilmente distinguido o tecido ósseo do biomaterial. Com relação ao osso autógeno, não é possível distinguir o osso do enxerto sendo avaliados os dois conjuntamente nas análises microtomográficas, enquanto que, na histomorfométrica são facilmente distinguíveis. Porém, ao avaliarmos o conjunto nos dois métodos mostra uma forte correlação entre eles. Forte correlação entre os métodos foi observada quando avaliamos apenas os defeitos preenchidos pelo coágulo. Porém, os dados obtidos para o Bio-Oss[®], as dificuldades obtidas durante a binarização os dados foram conflitantes exibindo uma fraca correlação entre os dados microtomográficos e histomorfométricos. Porém quando os valores de Biomaterial e osso são avaliados juntos a correlação passa a ser forte entre as metodologias.

Tabela 21. Correlação de Pearson para as relações entre o BV/TV obtido pela análise microtomográfica (3D) e histomorfométricas (2D) para os biomateriais e para o tecido ósseo na área do defeito nos diferentes grupo experimentais (n=15).

Parâmetros	Correlação de Pearson para o BV/TV (3D-microtomografia x 2D-Histomorfometria)			
	r	R ²	p	Interpretação da correlação
Biomaterial				
Bio-Oss [®]	0,4560	0,2079	0,0438	Fraca
GenPhos XP [®]	0,7426	0,5515	0,0008	Forte
GenOx Inorg [®]	0,7954	0,6327	0,0002	Forte
Tecido Osseo				
Bio-Oss [®]	0,4979	0,2479	0,0295	Fraca
GenPhos XP [®]	0,6936	0,4811	0,0021	Moderada
GenOx Inorg [®]	0,6008	0,3609	0,0089	Moderada
Defeito	0,8459	0,7156	0,0001	Forte
Autogeno (Osso formado + enxerto)	0,7673	0,5888	0,0004	Forte
BioOss[®] + Tecido ósseo	0,8748	0,7652	0,0001	Forte

* 0.9 para mais ou para menos indica uma correlação muito forte.

0.7 a 0.9 positivo ou negativo indica uma correlação forte.

0.5 a 0.7 positivo ou negativo indica uma correlação moderada.

0.3 a 0.5 positivo ou negativo indica uma correlação fraca.

0 a 0.3 positivo ou negativo indica uma correlação desprezível.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No atual trabalho buscou-se avaliar a formação de tecido ósseo e a reabsorção dos materiais de enxerto na área do defeito utilizando a microtomografia computadorizada 3D com padronização desde o método de captura e de reconstrução, até a forma de avaliação, para que os dados quantitativos fossem viáveis e comparáveis aos obtidos pela clássica técnica histomorfométrica. Embora a análise microtomográfica mostre ser menos invasiva e de mais rápida aplicação, ela não permite a visualização de alguns fatos altamente relevantes no processo de reparo ósseo como os eventos celulares e teciduais que ocorrem localmente frente ao material implantado. Outro fator limitante da técnica refere-se a sua incapacidade de distinguir materiais com densidade próxima ou similar ao do tecido ósseo neoformado. No entanto, ela permite uma visão mais ampla em 3D de todo o defeito facilitando a detecção de regiões com falhas ósseas e a distribuição tanto do material de enxerto, como do tecido ósseo no defeito.

No presente trabalho a utilização da microtomografia associada à avaliação histomorfométrica baseou-se nos estudos de Efeoglu et al. (2007), Yeom et al., (2008) Park et al., (2011) de reparo ósseo em calvária de coelhos. Embora a microtomografia ainda seja uma técnica relativamente nova, o grande número de estudos publicados tem mostrado correlação de moderada a alta entre os dados coletados por ambas as técnicas. Na atual pesquisa, ao longo de todos os períodos avaliados, foi possível observar estatística e graficamente semelhanças entre as densidades de volume (BV/VT) dos materiais de enxerto e de osso neoformado, obtidos tanto com a microtomografia, como com a histomorfometria, com exceção para o Bio-Oss®. Nesse sentido, cumpre ressaltar que a densidade de volume para os biomateriais GenPhos® XP e GenOx® Inorg aqui obtidas por ambas as técnicas, apresentou forte correlação com coeficientes de correlação de Pearson $r > 0,75$, enquanto que para a formação óssea, a correlação foi de moderada a forte com r variando entre 0,60 a 0,85 (segundo a classificação de Mukaka, (2012) na área médica, ver tabela 20). Com relação ao Bio-Oss® devido sua densidade radiográfica ser próxima ao do tecido ósseo natural do coelho, a identificação e separação de ambos pelo software CTAn 1.10.1.0 ou seja a binarização (veja item 4.6.2.3) foi

dificultada, resultando em fraca correlação das densidades de volume de ambos obtidas por ambas as técnicas, porém as densidades do conjunto Bio-Oss®+osso mostrou forte correlação ($r=0,8748$) entre as técnicas.

O modelo de defeitos circularer bilaterais de 8 mm nos ossos parietais na calvária de coelhos mostraram microtomográfica e histomorfometricamente que quanto tratados apenas com coágulo sanguíneo (Grupo Coágulo), não sofreram fechamento completo, sendo preenchidos ao final de 180 dias somente por uma fina tábua óssea na superfície da dura-máter com menos de 1/3 da espessura da tábua óssea original, ocupando ao redor de 42,3% do volume dos defeitos. Assim, os defeitos bilaterais de 8 mm de diâmetro na calvária de coelhos não tiveram capacidade de reparar-se espontaneamente apenas com coágulo sanguíneo decorridos 180 dias, podendo ser considerados, segundo definições de Delgado-Ruiz, Calvo Guirado e Romanos (2015) como de tamanho crítico.

Neste caso, a análise histológica mostrou que essa ausência de fechamento nos defeitos ocorreu em decorrência da rápida reabsorção do coágulo sanguíneo já nos primeiros dias, permitindo o colapso/invasão do tegumento adjacente que passou a ocupar 48,3% do espaço dos defeitos aos 30 dias, não alterando ao longo de todo período experimental, o que impediu fisicamente a evolução do reparo ósseo, principalmente na área central dos defeitos, onde foi observada uma fina camada de tecido conjuntivo, que ao longo do tempo foi substituída por trabéculas ósseas restritas a borda e a região da dura-máter. Resultados similares foram descritos nos trabalhos de Cestari et al., (2009), (Pripatnanont, Nuntanaranont e Vongvatcharanon (2009); Sohn et al., (2010) Rocha et al., (2011), Tovar et al., (2014) e Delgado-Ruiz et al., (2015).

Diferentemente do que foi apresentando no grupo coágulo, a utilização de materiais de preenchimento - osso autógeno, GenOx® Inorg, GenPhos® XP e Bio-Oss® – impediu inicialmente o colapso do tegumento e permitiu maior manutenção da área do defeito para a formação óssea. Embora a quantidade relativa de tecido ósseo aos 180 dias nos defeitos tratados com esses materiais tenham sido similares aos do grupo coágulo, nesses casos a formação óssea ocorreu ao longo de todo o defeito ocupando os espaços entre as partículas do material ou substituindo o material reabsorvido, promovendo um melhor reparo/fechamento dos defeitos.

Como já era esperado, o enxerto autógeno foi o material que promoveu uma melhor reparação óssea nos períodos iniciais de 30 e 60 dias, com maior quantidade e qualidade na formação óssea ao redor das partículas de enxerto. Histomorfometricamente, a formação óssea atingiu o pico aos 60 dias com 32% do volume dos defeitos preenchido por tecido ósseo neoformado. Concomitantemente, intensa atividade osteoclástica foi observada, tanto na superfície do enxerto, quanto do tecido ósseo neoformado, o que levou a uma acentuada e crescente redução no volume enxertado e uma rápida reorganização/remodelação do tecido ósseo neoformado, com a formação de densas trabéculas ósseas de arranjo lamelar com os espaços intertrabeculares preenchidos por grande quantidade de medula óssea (34% do volume dos defeitos).

Diferentemente do osso autógeno, os materiais Bio-Oss[®], GenOx[®] Inorg e GenPhos[®] XP entre 30 e 60 dias, não reduziram o seu volume implantado (ocupando ao redor de 34% do volume dos defeitos) e mostraram uma formação óssea menor e mais imatura em relação ao grupo autógeno (média de volume ocupado dos defeitos de 22% vs. 32% no grupo autógeno) com pouca formação de medula óssea (média de volume ocupado dos defeitos de 5% vs. 34% grupo autógeno), ficando ambas restritas a borda dos defeitos e a superfície da duramáter. Nesse sentido, convém salientar que outros estudos também haviam verificado maior formação óssea com o tratamento de defeitos ósseos com enxerto autógeno em relação ao osso desproteinizado bovino e outros materiais ósseo-substitutos em calvária de coelhos (Pripatnanont *et al.*, 2007; Pripatnanont, Nuntanaranont e Vongvatcharanon, 2009; Klüppel *et al.*, 2013), calvária de ratos (Nagata *et al.*, 2010) e mandíbula de minipigs (Jensen *et al.*, 2007; Jensen e Terheyden, 2009). Segundo, Jensen *et al.*, (2006) o tratamento de defeitos em mandíbula de minipigs com o Bio-Oss[®] e β -TCP desacelera a formação óssea na fase inicial (2 a 4 semanas) em comparação ao enxerto autógeno, e acelera o processo a seguir, chegando ao final de 8 semanas, a um volume de tecido ósseo próximo e superior, respectivamente, ao conseguido com o osso autógeno.

Embora alguns estudos em defeitos na calvária de coelhos mostrem que o uso de osso inorgânico bovino combinado ao osso autógeno em proporções apropriadas é capaz de promover uma maior formação óssea quanto da utilização de cada material isoladamente, sua aplicação no levantamento de seio maxilar

mostra outra vantagem significativa nessa associação, pois impede/retarda significativamente a perda volumétrica no seio levantado provocado pela atuação das forças sinusais, sugerindo uma maior manutenção do volume ósseo com materiais lentamente reabsorvíveis. Neste sentido, Jensen, Schou, Svendsen (2012) em levantamento de seios maxilares de minipigs observaram que o volume da área enxertada com osso autógeno da crista ilíaca e da mandíbula reduz significativamente após 12 semanas de tratamento, porém, esse volume é melhor preservado após a adição de Bio-Oss® e a redução volumétrica é significativamente influenciado pela relação de Bio-Oss/osso autógeno, ou seja, maior quantidade de Bio-Oss menor perda volumétrica. Assim, após 12 semanas, a média de redução do volume do enxerto foi de 65% no grupo autógeno, 38% no grupo autógeno + Bio-Oss® (3:1), 23% no grupo autógeno + Bio-Oss® (1:1), 16% no grupo autógeno + Bio-Oss® (1:3) e apenas 6% no grupo Bio-Oss.

Cumprе destacar que apesar da comercialização do GenOx Inorg e do GenPhos® XP, ainda não existem relatos na literatura referentes ao comportamento biológico destes biomateriais comparados ao Bio-Oss e ao osso autógeno. Os poucos artigos publicados reportam ótima capacidade osteocondutora, boa bioatividade e lenta reabsorção, tanto para o GenOx Inorg (Cestari *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2014), como para a GenPhos XP (Cestari *et al.*, 2010; Sanches *et al.*, 2016). Segundo estudo de Yang *et al.*, (2014) em calvária de coelhos, as cerâmicas bifásicas com conteúdos de HA e β -TCP de 60/40 e 20/80 exibem padrão similar de formação óssea e biodegradação após 8 semanas. Por outro lado, para Yip *et al.*, (2015) a quantidade de osso neoformado e de material residual nos defeitos associados às cerâmicas bifásicas 60/40 e 10/90 são comparáveis ao do osso bovino desproteinizado após 6 meses de reparo.

Como observado com o osso autógeno, a formação óssea ocorreu sobre a superfície das partículas das cerâmicas, englobando-as total ou parcialmente como pode ser observado na Figura 28 A-C. Porém, a superfície do material GenPhos® XP (partículas de 0,5 a 0,75 mm) devido sua conformação estrutural, mostrou-se maior entrelaçamento ou travamento ósseo em decorrência das suas macro-concavidades e macro-poros. Já, o Bio-Oss® (partículas de 0,25 a 1,0 mm) devido à predominância de partículas menores que 0,5 mm praticamente não apresentava macroporosidades, enquanto que no GenOx® Inorg (partículas de 0,5 a 1,0 mm) com

partículas maiores, a frequência de macroporos era mais evidente (Fig. 28 D-M). Assim, comparativamente, o GenPhos[®] XP apresentou um maior entrelaçamento entre o osso e o material, sugerindo a criação de uma estrutura mais resistente a forças externas, que poderá ser um diferencial de suma importância, por exemplo, nos casos de colocação de carga sobre implantes.

Apesar de alguns autores relatarem a importância da temperatura de processamento para produção do osso inorgânico na sua resposta biológica, o BioOss[®], uma HA-carbonatada processada a 300°C e o GenOx[®] Inorg, uma HA sinterizada a 900°C, exibiram formação óssea similar, de 27% e 26%, respectivamente, e também de preservação do volume de ambas aos 30- 60 dias, alterando significativamente aos 180 dias, sugerindo que a resposta biológica de um dado material tem que estar associado ao período de avaliação. A esse respeito, convém ressaltar o estudo de Tovar et al., (2014), que avaliaram em calvária de coelhos quatro tipos de osso desproteínizado xenogênico produzidos com diferentes processamentos térmicos, sendo dois recém desenvolvidos, o Dentsply EBR-027-500 e ERB027 (Dentsply International, York, PA, USA), ricos em microporosos aumentando a sua área de superfície, e dois comerciais, o Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma AG, Switzerland), também apresentando alta porosidade e superfície de área e o OsteoGraft[®] (Dentsply International, York, PA), com menor grau de porosidade e superfície de área. Os autores verificaram microtomográfica e histomorfometricamente após 8 semanas, que não houve diferenças significativas quanto a formação óssea em relação ao tipo de material enxertado. Porém, eles relatam uma tendência de maior formação óssea com os materiais EBR em relação aos comerciais BioOss[®] e Osteograft[®], associada a uma maior média de degradação dos primeiros, sugerindo uma influência do processamento do biomaterial na formação e remodelação óssea.

Um fator importante nesse tipo de estudo é o período de avaliação. Neste sentido, Sohn et al. (2010) avaliaram o processo de reparo de defeitos de diferentes tamanhos em calvária de coelhos e verificaram que a maior remodelação do osso neoformado nesses animais, ocorre no início da 8ª semana. Assim, segundo os autores, o período de 2-4 semanas refere-se ao período inicial de reparo, onde a estabilidade do material e as reações teciduais seriam avaliadas, enquanto que, os períodos superiores 8 semanas referem-se a fase tardia de reparo onde a

incorporação óssea, reabsorção dos materiais, remodelação óssea e a quantidade de regeneração óssea seriam avaliadas.

Assim, ao comparar os resultados nos defeitos do grupo autógeno, aqui obtidos nos períodos iniciais (30-60 dias) ao mais tardio (180 dias), observou-se uma drástica redução no volume do enxerto (de 24% para 11%) e a finalização do processo de reparo com formação de um tecido ósseo maduro/lamelar de arranjo trabecular com raras áreas de reabsorção por osteoclastos e grande quantidade de medula óssea (Vvi de 29%). Porém, ao final do período, as características morfológicas da díploe original não foi re-estabelecida ocorrendo extensas falhas ósseas, tanto na cortical óssea externa, quanto na epidural, que estavam preenchidas por tecido mole dos tecidos adjacentes (ocupando 18,5% do volume dos defeitos). Diante desse quadro, verificou-se que o processo de reparo com osso autógeno foi comprometido, ocorrendo apenas à reparação parcial do defeito. Várias pesquisas salientam a importância da reabsorção do enxerto autógeno durante reparo do defeito ósseo, principalmente quando este se faz mais rapidamente que a reposição óssea, podendo levar nesse caso, a uma grande perda de massa óssea devido à reabsorção conjunta do enxerto e do osso neoformado ((Traini *et al.*, 2008; Jensen e Terheyden, 2009). No presente trabalho, isto pode ser observado na figura 29 e nos resultados quantitativos microtomográficos de BV/TV do conjunto enxerto + osso novo que reduziram significativamente passando de 67% aos 30 dias para 45% aos 180 dias.

Similarmente, no grupo Bio-Oss[®], na maioria dos defeitos analisados, ficou evidente a reabsorção de suas partículas que passaram a ocupar 17% do volume dos defeitos, permitindo a invasão do tecido mole adjacente ao defeito em proporção similar ao observado no grupo Autógeno. Vale ressaltar que a degradação/reabsorção do Bio-Oss ainda é assunto controverso na literatura (Baldini, De Sanctis e Ferrari, 2011), sendo que alguns autores relatam a ocorrência de reabsorção de suas partículas (Ewers *et al.*, 2004; Traini *et al.*, 2007; Iezzi *et al.*, 2008; Traini *et al.*, 2008), enquanto outros relatam um processo muito lento ou ausência de reabsorção e substituição por tecido ósseo (Berglundh e Lindhe, 1997).

Contrariamente ao observado no grupo Bio-Oss, nos grupos GenPhos[®] XP e GenOx[®] Inorg, na maioria dos defeitos analisados, o volume ocupado pelos de

materiais enxertados foi preservado. Deste modo, eles permitiram que a conformação e altura dos defeitos permanecessem constantes e próximas daquelas da tábua óssea original, reduzindo a invasão dos tecidos moles adjacentes, principalmente nos defeitos tratados com GenOx[®] Inorg. Nestes grupos tanto macrófagos isoladamente, quanto células gigantes multinucleadas (CGM) de vários tamanhos estavam presentes na superfície das partículas, porém eram menos numerosas e as últimas, mais volumosas no grupo GenOx comparado ao Bio-Oss[®], enquanto que, no grupo GenPhos a quantidade de ambas era maior em relação ao GenOx[®] e Bio-Oss[®], mas as CGMs eram predominantemente menores como pode ser observado na Figura 29.

Estudo *in vitro* sobre o comportamento das células osteoclásticas em diferentes biomateriais, demonstrou que os osteoclastos são capazes de proliferar na superfície de ossos inorgânicos bovinos não sinterizados como o Bio-Oss[®] e produzir lacunas de reabsorção, porém em menor número e com anormalidades no formato das lacunas, quando comparado com o osso bovino nativo (Taylor *et al.*, 2002). Neste mesmo trabalho, a atividade osteoclástica foi menos pronunciada nos ossos inorgânicos bovinos sinterizados e praticamente ausente nas HAs sintéticas sugerindo a importância das características físico-químicas do material na ativação e degradação por células reabsorptivas. Segundo Miron Bosshardt (2016) as células da linhagem dos monócitos/macrófagos são as primeiras a entrarem em contato com o material implantado e a diferenciarem em M1 e M2 ou em seguida fusionarem em osteoclastos ou CGMs. A recente descoberta de macrófagos osteal (OsteoMac) residentes no tecido ósseo e associado a formação e remodelação óssea, sugerem que as CGMs presentes ao redor dos biomateriais e anteriormente relacionados a rejeição do material enxertado, estejam implicados com a cura e regeneração tecidual com expressão de marcadores de M2, tenham um papel fundamental no reparo.

Por outro lado, alguns pesquisadores sugerem que a resposta do material é influenciada pelo tipo de microambiente ósseo na qual se encontra, ou seja, as partículas localizadas na periferia dos defeitos que têm maior micro-movimentação sofrem encapsulamento fibroso e reabsorção, enquanto que as mais internas são envoltas por novo tecido ósseo e lentamente reabsorvidas (Phillips e Rahn, 1988; Rothamel *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2015). Isto explicaria a ausência de degradação

do Bio-Oss no tratamento de defeitos ósseos mandibulares protegidos com a membrana ePTFE observada por Jensen et al (2009). Neste caso, a utilização da membrana pode ter isolado as partículas da influência do meio externo e evitando a micromovimentação. Em outro artigo, Jensen et al (2015) ainda sugerem que diferenças quanto a adsorção das proteínas no material de dentro e fora do compartimento ósseo pode influenciar nos tipos celulares que são atraídos para a superfície do Bio-Oss[®]. Mas, segundo os autores estudos futuros são necessários para avaliar as diferenças quanto ao microambiente ósseo e não ósseo, aos quais as partículas estão propensas.

Curiosamente, nos materiais Bio-Oss e GenOx[®] Inorg a presença das CGMs estava associada ao tecido conjuntivo entre as partículas, enquanto que no GenPhos XP algumas estavam associadas ou adjacentes a formação óssea conforme demonstra a figura 29. Embora, a formação óssea tenha sido similar nos grupos Bio-Oss[®] (27%), GenOx[®] Inorg (26%) e GenPhos[®] XP (20%) aos 180 dias, o GenOx Inorg mostrou formação de um tecido ósseo mais organizado e mais favorável ao preenchimento do defeito, sendo que o acúmulo de biomaterial+osso+medula foi de 67,9% para o GenOx[®] Inorg, 58,9% para GenPhos[®] XP e 55,6% para o Bio-Oss[®], enquanto que, no enxerto autógeno foi de 78%.

Diante do aqui discutido, fica evidente que tanto o GenOx[®] Inorg como a GenPhos[®] XP, ambos de lenta reabsorção, tem capacidade de reparo ósseo equivalente ao dos padrões enxerto autógeno e Bio-Oss[®], no modelo aqui utilizado, sugerindo que podem ser usados como materiais nos procedimentos cirúrgicos na região bucomaxilofacial, porém novos estudos devem ser realizados para fundamentar ainda mais a sua indicação para utilização clínica.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em vista dos resultados aqui obtidos foi possível constatar e/ou concluir que:

- 1) os defeitos ósseos bilaterais de 8 mm de diâmetro nos ossos parietais em crânios de coelhos podem ser considerados como defeitos de tamanho crítico para o período de 24 semanas;
 - 2) primeiramente os materiais de enxerto osso autógeno, Gen-Ox, GenPhos XP e Bio-Oss agem impedindo o colapso/invasão do defeito pelo tegumento, permitindo uma maior manutenção da área do defeito para a formação óssea;
 - 3) o enxerto autógeno promove maior formação óssea nos períodos iniciais de reparo em comparação aos biomateriais ósseo-substitutos, mas ao final do período de 180 dias a quantidade de tecido ósseo acumulado nos defeitos foi similar entre o grupo autógeno e os grupos Gen-Ox[®] Inorg, GenPhos[®] XP e Bio-Oss[®];
 - 4) a biodegradabilidade das partículas enxertadas/implantadas foi diferente entre os materiais de enxerto, sendo menor para o GenOx[®] Inorg e GenPhos[®] XP em relação ao osso autógeno e Bio-Oss[®] ao longo de 180 dias;
 - 5) as células gigantes multinucleadas (CGMs) presentes na superfície dos biomateriais variaram em tamanho e número em comparação ao enxerto autógeno, indicando que as características físico-químicas da superfície do material influenciam na adesão, ativação e perfis de citocinas/quimiocinas derivados de macrófagos ativados e CGMs; e,
 - 6) no modelo experimental utilizado, a estabilidade na altura do tecido reparado, a capacidade osteocondutiva e a formação/maturação óssea ao longo do tempo, conseguida com a utilização do Gen-Ox[®] Inorg e GenPhos[®] XP, comparável a promovida pelo Bio-Oss[®] e osso autógeno, sugere que ambos podem ser considerados como alternativas para cirurgias bucomaxilofaciais.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERENCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2008 Jan-Mar 2008. ISSN 1807-3107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425238> >.

_____. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 4, p. 997-1004, Apr 2011. ISSN 1573-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21424598> >.

ARAÚJO, M.; LINDER, E.; LINDHE, J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 1, p. 1-6, Jan 2009. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126101> >.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 5, p. 433-40, May 2009. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522974> >.

ASCHERMAN, J. A. et al. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 4, p. 1131-5, Jul 2008. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650747> >.

ASHMAN, A. Postextraction ridge preservation using a synthetic alloplast. **Implant Dent**, v. 9, n. 2, p. 168-76, 2000. ISSN 1056-6163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307396> >.

BALDINI, N.; DE SANCTIS, M.; FERRARI, M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. **Dent Mater**, v. 27, n. 1, p. 61-70, Jan 2011. ISSN 0109-5641.

BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 8, n. 2, p. 117-24, Apr 1997. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

BERNABÉ, 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 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443591> >.

BRÄGGER, U. et al. Biological and technical complications and failures with fixed partial dentures (FPD) on implants and teeth after four to five years of function. **Clin Oral Implants Res**, v. 12, n. 1, p. 26-34, Feb 2001. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

BRÄGGER, U. et al. Complication and failure rates of fixed dental prostheses in patients treated for periodontal disease. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 1, p. 70-7, Jan 2011. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21158932> >.

BUSENLECHNER, D. et al. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. **Biomaterials**, v. 29, n. 22, p. 3195-200, Aug 2008. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18455786> >.

CAMPANA, V. et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **J Mater Sci Mater Med**, v. 25, n. 10, p. 2445-61, Oct 2014. ISSN 1573-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865980> >.

CARDOSO, A. K. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 128-37, 2006. ISSN 1422-6421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409738> >.

CARVALHO, D. C. et al. [Non-pharmacological treatments in the stimulation of osteogenesis]. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 5, p. 647-54, Oct 2002. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471393> >.

CASTELLANI, C. et al. Biphasic calcium phosphate ceramics in small bone defects: potential influence of carrier substances and bone marrow on bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 12, p. 1367-74, Dec 2009. ISSN 1600-0501 (Electronic)0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070742> >.

CESTARI, T. M. et al. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 4, p. 340-50, Apr 2009. ISSN 0905-7161.

CESTARI, T. M. et al., Análise histomorfométrica comparativa da formação óssea em

defeitos perenes tratados com diferentes cerâmicas versus enxerto autógeno.. In: **6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials**, 2010, Gramado, RS. Programação e Resumos (ID: 00330-00002), 2010. p. 182-182.

COOPER, G. M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plast Reconstr Surg**, v. 125, n. 6, p. 1685-92, Jun 2010. ISSN 1529-4242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20517092> >.

CORBELLA, S. et al. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, Oct 2015. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26452326> >.

CORDARO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 796-803, Aug 2008. ISSN 0905-7161.

DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 3, p. 195-200, Mar 2003. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348464> >.

DACULSI, G.; LEGEROS, J. P. Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest. **J Biomed Mater Res**, v. 31, n. 4, p. 495-501, Aug 1996. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836846> >.

DAHLIN, C. et al. Bone tissue modelling and remodelling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate materials presenting different microporosity. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 7, p. 814-22, Jul 2015. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24593049> >.

DE OLIVEIRA, R. C. et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 749-54, Aug 2008. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720554> >.

DELGADO-RUIZ, R. A.; CALVO GUIRADO, J. L.; ROMANOS, G. E. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. **Clin Oral Implants Res**, May 2015. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25996344> >.

DELGADO-RUIZ, R. A.; CALVO-GUIRADO, J. L.; ROMANOS, G. E. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 8, p. 915-30, Aug 2015. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766503> >.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 1, p. 2-17, Jan 2013. ISSN 1523-4681 (Electronic) 0884-0431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197339> >.

DEVILLE, S.; SAIZ, E.; TOMSIA, A. P. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 32, p. 5480-9, Nov 2006. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Med**, v. 9, p. 66, 2011. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21627784> >.

DUTTA, S. R. et al. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. **Ir J Med Sci**, v. 184, n. 1, p. 101-6, Mar 2015. ISSN 1863-4362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428698> >.

EFEUGLU, C. et al. Quantitative morphometric evaluation of critical size experimental bone defects by microcomputed tomography. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 3, p. 203-7, Apr 2007. ISSN 0266-4356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854508> >.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v. 95, n. 3, p. 932-9, Dec 2010. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845492> >.

EWERS, R. et al. Histologic findings at augmented bone areas supplied with two different bone substitute materials combined with sinus floor lifting. Report of one case. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 1, p. 96-100, Feb 2004. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

FARIÑA, N. M. et al. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. **J Mater Sci Mater Med**, v. 19, n. 4, p. 1565-73, Apr 2008. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299963> >.

FARRÉ-GUASCH, E. et al. Application of Additive Manufacturing in Oral and Maxillofacial Surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 12, p. 2408-18, Dec 2015. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25966454> >.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-A, n. 3, p. 454-64, Mar 2002. ISSN 0021-9355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886919> >.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. et al. Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 4, p. 1056-64, Oct 2010. ISSN 1517-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031586> >.

GIANNOUDIS, P. V. et al. Tricortical bone graft for primary reconstruction of comminuted distal humerus fractures. **J Orthop Trauma**, v. 19, n. 10, p. 741-3, 2005 Nov-Dec 2005. ISSN 0890-5339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314723> >.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Lab Anim**, v. 45, n. 1, p. 14-24, Jan 2011. ISSN 1758-1117. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156759> >.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. **Plast Reconstr Surg**, v. 112, n. 2, p. 515-27, Aug 2003. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900610> >.

GROVER, V. et al. Bone allografts: a review of safety and efficacy. **Indian J Dent Res**, v. 22, n. 3, p. 496, May-Jun 2011. ISSN 0970-9290.

HADDAD, A. J. et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 5, p. 926-34, Sep 2006. ISSN 1049-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17003622> >.

HALLMAN, M.; LUNDGREN, S.; SENNERBY, L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. **Clin**

Implant Dent Relat Res, v. 3, n. 2, p. 87-96, 2001. ISSN 1523-0899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472655> >.

HAMMERLE, C. H.; LANG, N. P. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. **Clin Oral Implants Res**, v. 12, n. 1, p. 9-18, Feb 2001. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

HANDA, T. et al. The effect of an octacalcium phosphate co-precipitated gelatin composite on the repair of critical-sized rat calvarial defects. **Acta Biomater**, v. 8, n. 3, p. 1190-200, Mar 2012. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198138> >.

HERFORD, A. S.; DEAN, J. S. Complications in bone grafting. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 23, n. 3, p. 433-42, Aug 2011. ISSN 1042-3699.

HOBAR, P. C.; HUNT, J. A.; ANTROBUS, S. Assessment of the effects on growth of porous hydroxyapatite granule cranioplasty in the immature guinea pig craniofacial skeleton. **Plast Reconstr Surg**, v. 111, n. 5, p. 1667-75; discussion 1676-9, Apr 2003. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655213> >.

HOLTZCLAW, D. et al. The safety of bone allografts used in dentistry: a review. **J Am Dent Assoc**, v. 139, n. 9, p. 1192-9, Sep 2008. ISSN 0002-8177 (Print) 0002-8177.

HUMBER, C. C. et al. Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 372-84, Mar 2010. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060340> >.

HUNT, J. A.; HOBAR, P. C. Common craniofacial anomalies: conditions of craniofacial atrophy/hypoplasia and neoplasia. **Plast Reconstr Surg**, v. 111, n. 4, p. 1497-508; quiz 1509-10, Apr 2003. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618611> >.

IACUC, I. A. C. A. U. C. Rabbit Formulary. University of California, San Francisco, 2010. Disponível em: < <http://www.iacuc.ucsf.edu/proc/awRbtFrm.asp> >.

IEZZI, G. et al. Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. **Clin Oral Implants**

Res, v. 23, n. 12, p. 1369-76, Dec 2012. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092377> >.

_____. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. **J Periodontol**, v. 79, n. 1, p. 192-8, Jan 2008. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

ISSA, J. P. et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clin Oral Implants Res**, Aug 2015. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260954> >.

JENSEN, S. S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 3, p. 237-43, Jun 2006. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

_____. Osteoclast-like cells on deproteinized bovine bone mineral and biphasic calcium phosphate: light and transmission electron microscopical observations. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 8, p. 859-64, Aug 2015. ISSN 0905-7161.

JENSEN, S. S.; TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24 Suppl, p. 218-36, 2009. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885447> >.

JENSEN, S. S. et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 6, p. 752-60, Dec 2007. ISSN 0905-7161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888014> >.

JENSEN, T. et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 1, p. 114-20, Jan 2012. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000958> >.

_____. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs.

Clin Oral Implants Res, v. 23, n. 8, p. 902-10, Aug 2012. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044477> >.

KADOTA, C. et al. Comparison of food mixing ability among mandibulectomy patients. **J Oral Rehabil**, v. 35, n. 6, p. 408-14, Jun 2008. ISSN 1365-2842. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422514> >.

KHOJASTEH, A. et al. Onlay bone augmentation and bilateral open sinus lifting with simultaneous implant placement in a cherubic patient. **J Craniofac Surg**, v. 25, n. 2, p. e193-6, 2014. ISSN 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24621770> >.

KITAYAMA, S. et al. Regeneration of rabbit calvarial defects using biphasic calcium phosphate and a strontium hydroxyapatite-containing collagen membrane. **Clin Oral Implants Res**, Apr 27 2015. ISSN 0905-7161.

KLEIN, M. et al. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 1, p. 67-74, Jan 2009. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126109> >.

KLÜPPEL, 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 1536-3732. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851743> >.

KNACKSTEDT, M. A. et al. Structure and properties of clinical coralline implants measured via 3D imaging and analysis. **Biomaterials**, v. 27, n. 13, p. 2776-86, May 2006. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612.

LAMBERT, F. et al. A comparison of three calcium phosphate-based space fillers in sinus elevation: a study in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 2, p. 393-402, Mar-Apr 2013. ISSN 1942-4434 (Electronic) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527340> >.

LEE, W. H.; LOO, C. Y.; ROHANIZADEH, R. A review of chemical surface modification of bioceramics: effects on protein adsorption and cellular response. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 122, p. 823-34, Oct 2014. ISSN 1873-4367. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092582> >.

LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clin Mater**, v. 14, n. 1, p. 65-88, 1993. ISSN 0267-6605. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10171998>>.

_____. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, n. 395, p. 81-98, Feb 2002. ISSN 0009-921X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937868>>.

_____. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chem Rev**, v. 108, n. 11, p. 4742-53, Nov 2008. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006399>>.

LI, Y.; ZHANG, X.; DE GROOT, K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 18, n. 10, p. 737-41, May 1997. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612.

MALAFAYA, P. B.; REIS, R. L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. **Acta Biomater**, v. 5, n. 2, p. 644-60, Feb 2009. ISSN 1878-7568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951857>>.

MANFRO, R. et al. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 13, n. 4, p. 464-70, Dec 2014. ISSN 0972-8279. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225012>>.

MARDAS, N. et al. Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 4, p. 416-23, Apr 2011. ISSN 1600-0501. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561483>>.

MIRON, R. J.; BOSSHARDT, D. D. OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. **Biomaterials**, v. 82, p. 1-19, Mar 2016. ISSN 0142-9612.

MISCH, C. M. Use of the mandibular ramus as a donor site for onlay bone grafting. **J Oral Implantol**, v. 26, n. 1, p. 42-9, 2000. ISSN 0160-6972 (Print) 0160-6972.

MORDENFELD, A. et al. A randomized and controlled clinical trial of two different compositions of deproteinized bovine bone and autogenous bone used for lateral ridge augmentation. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 3, p. 310-20, Mar 2014. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23551390> >.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Med J**, v. 24, n. 3, p. 69-71, Sep 2012. ISSN 1995-7270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638278> >.

NAGATA, M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339-45, Aug 2009. ISSN 1873-2763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410024> >.

NAGATA, M. J. et al. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Orthop Res**, v. 28, n. 4, p. 468-73, Apr 2010. ISSN 0736-0266.

NG, A. M. et al. Differential osteogenic activity of osteoprogenitor cells on HA and TCP/HA scaffold of tissue engineered bone. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, n. 2, p. 301-12, May 2008. ISSN 1552-4965 (Electronic) 1549-3296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688285> >.

NGUYEN, H.; MORGAN, D. A.; FORWOOD, M. R. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? **Cell Tissue Bank**, v. 8, n. 2, p. 81-91, 2007. ISSN 1389-9333 (Print) 1389-9333.

PAGNI, G. et al. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. **Int J Dent**, v. 2012, p. 151030, 2012. ISSN 1687-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737169> >.

PARK, K. S. et al. Hemorrhagic iliopsoas bursitis complicating well-functioning ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty. **J Arthroplasty**, v. 24, n. 5, p. 826.e1-5, Aug 2009. ISSN 1532-8406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701239> >.

PARK, S. Y. et al. The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects. **J Periodontal Implant Sci**, v. 41, n. 5, p. 218-

26, Oct 2011. ISSN 2093-2286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087412> >.

PETROVIC, V. et al. Craniofacial bone tissue engineering. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 3, p. e1-9, Sep 2012. ISSN 2212-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22862985> >.

PHILLIPS, J. H.; RAHN, B. A. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. **Plast Reconstr Surg**, v. 82, n. 5, p. 872-7, Nov 1988. ISSN 0032-1052 (Print) 0032-1052.

PIATTELLI, M. et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 14, n. 6, p. 835-40, 1999 Nov-Dec 1999. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612920> >.

PILIPCHUK, S. P. et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. **Dent Mater**, v. 31, n. 4, p. 317-38, Apr 2015. ISSN 1879-0097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701146> >.

PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 4, p. 356-62, Apr 2009. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278833> >.

PRIPATNANONT, P. et al. Osteoconductive effects of 3 heat-treated hydroxyapatites in rabbit calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 12, p. 2418-24, Dec 2007. ISSN 1531-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022463> >.

REYNOLDS, M. A.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; BRANCH-MAYS, G. L. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. **Dent Clin North Am**, v. 54, n. 1, p. 55-71, Jan 2010. ISSN 1558-0512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103472> >.

ROCHA, C. A. et al. Sintered anorganic bone graft increases autocrine expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 during repair of critical-size bone defects. **J Mol Histol**, v. 45, n. 4, p. 447-61, Aug 2014. ISSN 1567-2387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482159> >.

ROCHA, F. S. et al. Bovine anorganic bone graft associated with platelet-rich plasma: histologic analysis in rabbit calvaria. **J Oral Implantol**, v. 37, n. 5, p. 511-8, Oct 2011. ISSN 0160-6972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553125> >.

ROTHAMEL, D. et al. Vertical ridge augmentation using xenogenous bone blocks: a histomorphometric study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 2, p. 243-50, Mar-Apr 2009. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786.

RUMPEL, E. et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 65, n. 1, p. 43-8, Feb 2006. ISSN 0015-5659 (Print) 0015-5659.

SALAI, M. et al. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. **Cell Tissue Bank**, v. 1, n. 1, p. 69-73, 2000. ISSN 1389-9333.

SANZ-SANCHEZ, I. et al. Clinical efficacy of immediate implant loading protocols compared to conventional loading depending on the type of the restoration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 8, p. 964-82, Aug 2015. ISSN 0905-7161.

SARTORI, S. et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, n. 3, p. 369-72, Jun 2003. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161.

SBORDONE, L. et al. Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 4, p. 695-703, Jul-Aug 2009. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786.

SCHMITT, C. M. et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 5, p. 576-85, May 2013. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324456> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084153> >.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat (Basel)**, v. 138, n. 3, p. 185-92, 1990. ISSN 0001-5180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2389661> >.

SCHWARZ, F. et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 12, p. 1198-206, Dec 2007. ISSN 0901-5027 (Print) 0901-5027.

SOHN, J. Y. et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. **J Periodontal Implant Sci**, v. 40, n. 4, p. 180-7, Aug 2010. ISSN 2093-2286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20827327> >.

STAVROPOULOS, A. et al. Histological evaluation of healing after transalveolar maxillary sinus augmentation with bioglass and autogenous bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 1, p. 125-31, Jan 2012. ISSN 1600-0501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21504477> >.

SU-GWAN, K.; HAK-KYUN, K.; SUNG-CHUL, L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 29, n. 5, p. 282-8, Oct 2001. ISSN 1010-5182. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673923> >.

SANCHES, P. S. et al., Osteoinductive porous biphasic calcium phosphate ceramic as an alternative to autogenous bone grafting in the treatment of critical-size mandibular bone defects. **Clin Oral Invest**. 2016. No prelo

SÂNDOR, G. K. et al. Preservation of ridge dimensions following grafting with coral granules of 48 post-traumatic and post-extraction dento-alveolar defects. **Dent Traumatol**, v. 19, n. 4, p. 221-7, Aug 2003. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12848717> >.

_____. Clinical success in harvesting autogenous bone using a minimally invasive trephine. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n. 2, p. 164-8, Feb 2003. ISSN 0278-2391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618991> >.

TADIC, D.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 987-94, Mar 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615163> >.

TAYLOR, J. C. et al. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 3, p. 321-30, 2002 May-Jun 2002. ISSN 0882-2786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074446> >.

TOVAR, N. et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 2, p. 251-60, Feb 2014. ISSN 1399-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948358> >.

TRAINI, T. et al. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. **J Periodontol**, v. 79, n. 7, p. 1232-40, Jul 2008. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

_____. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. **J Periodontol**, v. 78, n. 5, p. 955-61, May 2007. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

VAN DEN BERGH, J. P. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 9, p. 627-36, Sep 2000. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

WANG, G. et al. CAD/CAM and rapid prototyped titanium for reconstruction of ramus defect and condylar fracture caused by mandibular reduction. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 3, p. 356-61, Mar 2012. ISSN 2212-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22676828> >.

WANG, J. et al. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice. **J Biomed Mater Res A**, Feb 4 2014. ISSN 1549-3296.

_____. Dynamic competitive adsorption of bone-related proteins on calcium phosphate ceramic particles with different phase composition and microstructure. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 101, n. 6, p. 1069-77, Aug 2013. ISSN 1552-4981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23559460> >.

WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopy cytology. **Int Rev Cytol**, v. 26, p. 235-302, 1969.

XU, L.; ZHI-MING, Y.; XUE-MEI, L. An experimental study of bioderived bone to repair bone defects as a scaffold of tissue engineering. **Int Surg**, v. 93, n. 6, p. 377-80, 2008 Nov-Dec 2008. ISSN 0020-8868. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085049> >.

YANG, C. et al. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 102, n. 1, p. 80-8, Jan 2014. ISSN 1552-4973.

YEOM, H. et al. Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 2, p. 446-52, Mar 2008. ISSN 1049-2275 (Print) 1049-2275.

YIP, I. et al. Defect healing with various bone substitutes. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 5, p. 606-14, May 2015. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24702244> >.

YOUNG, C.; SANDSTEDT, P.; SKOGLUND, A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 14, n. 1, p. 72-6, Jan-Feb 1999. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Microscopic analysis of porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 4, p. 382-6, Dec 2005. ISSN 1678-7757. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865224> >.

ZEMANN, W. et al. Sagittal growth of the facial skeleton of 6-year-old children with a complete unilateral cleft of lip, alveolus and palate treated with two different protocols. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 35, n. 8, p. 343-9, Dec 2007. ISSN 1010-5182 (Print) 1010-5182.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S16-21, Sep 2011. ISSN 1879-0267 (Electronic)

0020-1383 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889142> >.

ANEXO

Anexo A: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 20/2013).

<p>Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p>Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais</p>
<p>CEEPA-Proc. N° 020/2013</p> <p>Bauru, 23 de junho de 2013.</p>		
<p>Senhor Professor,</p> <p>O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado Avaliação por microtomografia de raio-X e histomorfométrica do processo de reparo de defeitos ósseos em calvária de coelhos tratados com diferentes biomateriais, de autoria de Ricardo Vinicius Nunes Arantes, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia 17 de junho de 2013.</p> <p>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.</p> <p>Atenciosamente,</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <p>Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício</p> </div>		
<p>Prof. Dr. Rumio Taga Docente do Departamento de Ciências Biológicas</p>		
<hr style="width: 80%; margin: auto;"/> <p>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</p>		