**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

CELINA ANTONIO PRATA

**AVALIAÇÃO DA OSTEOGÊNESE EM DEFEITOS ÓSSEOS COM
UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA: UMA
COMPARAÇÃO ENTRE OSSO AUTÓGENO, SUBSTITUTO ÓSSEO E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

**Ribeirão Preto
2010**

CELINA ANTONIO PRATA

**AVALIAÇÃO DA OSTEOGÊNESE EM DEFEITOS ÓSSEOS COM
UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA: UMA
COMPARAÇÃO ENTRE OSSO AUTÓGENO, SUBSTITUTO ÓSSEO E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Odontologia. Área
de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Brentegani

**Ribeirão Preto
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Prata, Celina Antonio

Avaliação da osteogênese em defeitos ósseos com utilização da engenharia tecidual óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células-tronco mesenquimais. Ribeirão Preto, 2010.

118 p.: il. ; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Brentegani, Luiz Guilherme.

1. Reparação óssea alveolar. 2. Implante. 3. Enxerto.
4. Osso bovino. 5. Osso autógeno. 6. Células-tronco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Celina Antonio Prata

Avaliação da osteogênese em defeitos ósseos com utilização da engenharia tecidual óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células-tronco mesenquimais.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área
de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof.(a)Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof.(a)Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicatória

*Ao meu filho, **Lucas**, sempre compreensivo com meu trabalho. Você é o meu maior orgulho e a maior razão da minha vida.*

Agradecimento Especial

Agradecimento Especial

*Ao **Prof. Dr. Luiz Guilherme Brentegani**, por todos esses oito anos de convivência agradável no mestrado e doutorado. Com o senhor realmente aprendi a fazer pesquisa com ética e clareza e a ensinar com prazer. Esses ensinamentos transformaram minha vida e me trouxeram crescimento pessoal e profissional.*

Agradecimentos

Agradecimentos

A minha mãe **Maria Madalena Antonio Cardoso** e seu marido **José Carlos Cardoso**, sempre meus incentivadores, pelo amor e carinho.

Ao meu pai **Venceslau Mendonça Prata** e sua esposa **Cesarina Maciel Prata**, por estarem sempre prontos a me ajudar.

A minha irmã **Marina Antonio Prata**, pela ajuda neste trabalho ,incentivo, amizade e cumplicidade.

Às minhas queridas tias **Walmiria Antonio Ribeiro de Mendonça** e **Wilma Antonio de Oliveira Pereira**, por estarem sempre presentes e vibrantes com minhas conquistas.

Ao meu marido **Mario Sergio Amorim dos Santos**, companheiro dedicado e amigo leal. Amo você.

À **Profa. Dra. Suzie Aparecida de Lacerda**, pela fundamental colaboração e ensinamentos em diversas fases desta pesquisa, além do apoio em congressos e no projeto PAE.

À **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato do Prado**, pela elaboração das células-tronco desta pesquisa e por estar, desde o mestrado, sempre pronta a ensinar e esclarecer minhas dúvidas.

Aos amigos e técnicos do laboratório de histopatologia: **Edna Aparecida dos Santos Moraes**, **Gilberto André e Silva**, **Antonio de Campos** e **Adriana de Mattos Gonçalves da Silva**, pela paciência, dedicação e ensinamentos durante todo o período de desenvolvimento de nosso trabalho.

Às secretárias da pós-graduação, **Isabel Cristina C. Galiano Sola** e **Regiane Cristina Moi Saciolotto**, por serem sempre muito prestativas e compreensivas.

Às secretárias do departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia **Rosângela A. da Silva e Filomena Lelli Placciti**, pela educação e amizade que demonstram em seu trabalho.

À **Regiane de Cássia Tirado Damasceno**, pelo apoio e por tantos favores que me concedeu, sempre com tanta disponibilidade. Sempre achei inacreditável a sua paciência com os pós-graduandos.

À amiga **Carla Moreto Santos**, pela cumplicidade e apoio de sempre. Você sempre foi uma referência para mim.

Ao colega **Rander Moreira Macedo** pela parceria em vários momentos dessa pesquisa.

Aos Departamentos **de Materiais Dentários e Prótese e de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia** que estiveram de portas abertas para que eu pudesse chegar ao final desta jornada.

Aos amigos do grupo de pacientes especiais da Faculdade de Odontologia de Barretos: **Alex Tadeu Martins, Alexandre Miranda Pereira, Fabiano de Sant'Ana dos Santos, Fabio Luiz F. Scannavino, Nilce Samecima Kawaji, Priscila de Oliveira Pereira e Rogério Ferreira da Silva**, pela confiança, incentivo e amizade fundamental na minha vida.

A **Rosangela de Carvalho Goulart**, pela amizade tão prazerosa e estimulante.

Às minhas funcionárias **Luany e Natália**, tão importantes na administração do meu cotidiano.

Resumo

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

Resumo

O tecido ósseo possui potencial regenerativo e capacidade em restaurar completamente sua estrutura e função original. Há situações em que o organismo não consegue por si só, a reparação desejada dos defeitos ósseos. Vários métodos são propostos para a reparação de defeitos ósseos, entre eles, o uso de diferentes tipos de enxertos os quais demonstram capacidade em promover a formação óssea. Por muitos anos o osso autógeno foi considerado a referência padrão como enxerto ósseo, devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico. Entretanto, por este material apresentar limitações, estimulou-se a pesquisa para um substituto ósseo ideal para o enxerto ósseo autogênico. O advento de um novo biomaterial xenogênico, como o osso bovino, que se comporta como promotor de reparação e é portador de fatores de indução óssea parece representar o futuro da reconstrução de defeitos ósseos. Mas pelo pequeno potencial de regeneração óssea produzida pelos enxertos alógenos e xenógenos, os pesquisadores tem utilizado a bioengenharia tecidual óssea para reconstrução de defeitos ósseos. Diante destas informações, este estudo teve como objetivo quantificar histomorfometricamente a reparação óssea após o enxerto de uma associação de osso autógeno e/ou osso bovino composto (Gen-Mix) associados a células- tronco mesenquimais em defeitos ósseos produzidos pela extração dental de ratos. 108 ratos foram separados em 6 grupos : Controle (c) - o defeito ósseo foi preenchido só por sangue; Osso autógeno (oa) - o defeito ósseo foi preenchido por sangue e osso autógeno; Gen-Mix (G-mix) – o defeito ósseo foi preenchido por osso bovino composto (osso medular e cortical), liofilizado, desproteínizado, desmineralizado com aglutinante de colágeno bovino, na forma de grânulos de 0,25 a 1.0 mm (Gen-Mix, Baumer, Mogi Mirim, SP, Brasil); Célula-tronco (ctr)–o defeito ósseo foi preenchido por sangue e células- tronco obtidas da medula óssea; Osso autógeno + células-tronco (oa+ctr)- o defeito foi preenchido pela associação destes dois compostos; Gen-Mix + células-tronco (G-mix+ctr)- o defeito foi preenchido pela associação dos dois produtos. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 21 e 42 dias pós-cirurgia (n=6 por grupo) e as amostras teciduais foram processadas para a obtenção de secções finas (5 µ) e coradas com HE. Através de um sistema de análise de imagens se estimou a fração de volume do osso trabecular (%) nas vizinhanças do enxerto no interior do alvéolo. Os resultados histológicos mostraram que os materiais enxertados apresentaram uma osteointegração progressiva e sem reação de corpo estranho. A histometria revelou que o grupo enxertado com G-mix sozinho ou associado as célula- tronco produziu menor formação de osso, ao passo que, o osso autógeno sozinho ou associado às células-tronco foi superior em volume de tecido ósseo em relação aos demais grupos. Conclui-se que o osso autógeno e o Gen-mix isoladamente ou associados às célula- tronco foram biologicamente compatíveis desenvolvendo osteointegração progressiva e que o osso autógeno foi superior no processo de reparação do defeito ósseo. Estes resultados ainda sugerem que a associação das células-tronco aos enxertos ósseos acelerou a neoformação óssea, principalmente quando associadas ao osso autógeno.

Palavras-chave: reparação óssea alveolar, implante, enxerto, osso bovino, osso autógeno, células-tronco.

A*bstract*

PRATA, C.A. **Evaluation of osteogenesis in bone defects using bone tissue engineered: a comparison among autogenous bone, bone substitute and mesenchymal stem cells**. 2010. 118 p. Thesis (Doctoral) Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

Abstract

Bone tissue has a regenerative potential as well as a capacity to fully restore its original structure and function. There are situations in which the body cannot repair in a proper way bone defects by itself. Several methods are proposed for repairing bone defects, among them there is the use of different types of grafts that demonstrates the capacity to promote bone formation. For many years, autogenous bone was considered the standard reference as bone grafts, due to its biological advantages and osteogenic potential. However, due to these material limitations, an ideal bone substitute research was encouraged for an autogenous bone graft. The advent of new xenogenic biomaterials, such as bovine bone, that behaves as a repair promoter and also has an induction bone factors, seems to represent the future reconstruction of bone defects. Researchers have used the bioengineered bone tissue for reconstruction of bone defects, due to the short potential produced by xenogeneic and allogenic grafts for bone regeneration. As the previous information show, this study aimed to quantify the histomorphometric bone healing after grafting a combination of autogenous bone and / or bovine bone composite (Gen-Mix) associated with mesenchymal stem cells in bone defects produced by tooth extraction in rats. 108 rats were divided into 6 groups: control (c) - the bone defect was filled only by blood, autogenous bone (oa) - the bone defect was filled with blood and autogenous bone graft; Gen-Mix (G-mix) – bone defect were filled by bovine bone composite (marrow and cortical bone), lyophilized, deproteinized, demineralized with bovine collagen binder, in form of 0.25 to 1.0 mm granules (Gen-Mix, Baumer, Mogi Mirim, SP, Brazil); stem cells (ctr), the bone defect was filled with blood and stem cells obtained from bone marrow, autogenous bone + stem cells (oa + ctr) - the defect was filled by the association of these two compounds; Gen-Mix + stem cells (G-mix + ctr) - the defect was filled by the association of both products. The animals were sacrificed at 7, 21 and 42 days post-surgery (n = 6 per group) and tissue samples were processed to obtain thin sections (5 μ) and stained with HE. The fraction of trabecular bone volume (%) in the vicinity of the graft inside the alveoli was estimated through an image analysis system. Histological findings showed that the grafted material has a progressive osseointegration and no foreign body reaction. The histometric analysis revealed that the group grafted with G-mix alone or associated with stem cells produced less bone formation, while the autogenous bone alone or associated with stem cells was higher in volume of bone tissue in relation to other groups. We conclude that autogenous bone and Gen-mix alone or associated with stem cells are biologically compatible developing progressive osseointegration and the autogenous bone graft was superior in the bone defect repair process. These results also suggested that the association of stem cells to bone grafts accelerated the bone formation, especially when combined with autogenous bone.

Keywords: alveolar bony repair, implant, graft, bovine bone, autogenous bone, mesenchymal stem cells.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. REPARAÇÃO ÓSSEA.....	22
2.2. OSSO AUTÓGENO	29
2.3. OSSO BOVINO	37
2.4. CÉLULAS-TRONCO	44
3. PROPOSIÇÃO	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. ANIMAIS UTILIZADOS.....	53
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	53
4.3. CULTURA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATOS.....	54
4.4. EXTRAÇÃO DENTÁRIA.....	56
4.5. IMPLANTE DO MATERIAL	57
4.6. SACRIFÍCIO E COLETA DE MATERIAL	59
4.7. PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO	59
4.8. ANÁLISE HISTOMÉTRICA DOS ALVÉOLOS	60
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	64
5.1.1. 7 DIAS	64
5.1.2. 21 DIAS	65
5.1.3. 42 DIAS	66
5.2. RESULTADOS HISTOMÉTRICOS	72
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO	118

1. Introdução

1. Introdução

O tecido ósseo, o principal componente do esqueleto, tem a função de proteger e suportar os órgãos vitais pela sua dureza e resistência. Sua capacidade para ser restaurado está relacionada à ação dos fatores de crescimento sobre as células-tronco e o papel desempenhado pelas forças mecânicas que estimulam a remodelação óssea. Entretanto quando ocorre alguma mudança na estrutura óssea, seja por trauma, patologias ou por procedimento cirúrgico, os enxertos são frequentemente requeridos para o tratamento corretivo (CARNEIRO et al., 2005).

Vários métodos são propostos para a regeneração de defeitos ósseos, entre eles, o uso de diferentes tipos de enxertos, os quais demonstram capacidade em promover a formação óssea. Entretanto, muitos deles não são ideais e muitos não serão substituídos por osso durante muitos anos, se é que serão (BOYNE, 1997; SY, 2002).

O enxerto de osso autógeno é um dos procedimentos cirúrgicos utilizados diante da necessidade de reconstrução de defeitos ósseos. Enquanto o emprego de enxertos autógenos mostra vantagens em relação às demais técnicas no que se refere à biocompatibilidade e ao potencial regenerador ósseo (BOYNE, 1999), a experiência clínica e trabalhos experimentais mostram limitações quanto ao ganho efetivo de volume ósseo ao longo do tempo, especialmente com os enxertos “onlay” (SALATA et al. 2002). Tais dificuldades têm levado muitos autores a concentrar seus estudos em fatores que possam influenciar a sobrevivência e a manutenção volumétrica dos enxertos autógenos em longo prazo (ALBERIUS et al. 1996; STEVENSON et al. 1996; ALBERIUS & GORDH 1998; OZAKI & BUCHMAN 1998).

Por muitos anos o osso autógeno de locais intra e extra-orais foi considerado a referência padrão como enxerto ósseo (para uma revisão ver HJØRTING-

HANSEN, 2002), devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico (SANADA et al., 2003), atuando por osteoindução e osteocondução (ELLIES, 1992), promovendo estímulo e aposição de tecido ósseo a partir do osso já existente, atuando como modelo para a neoformação óssea (MANSO & LANG, 1997). Entretanto, por este material apresentar limitações que incluem inadequado volume ósseo, morbidade do local doador, deformidade, desconforto, susceptibilidade a infecção e ocorrência de reabsorção progressiva contínua (BOYNE et al., 2002; PARIKH, 2002; JOSHI & KOSTAKIS, 2004; DYER, 2004), estimulou-se a pesquisa para um substituto ósseo ideal para o enxerto ósseo autogênico.

O advento de um novo biomaterial xenogênico, como o osso bovino, que se comporta como promotor de reparação e portador de fatores de indução óssea parece representar o futuro da reconstrução de defeitos ósseos. O papel de portador de fatores de indução óssea pode ser potencialmente desempenhado pelo osso bovino tanto medular, cortical, macro ou microgranular, desproteinizado ou desmineralizado. Além de suprir como estrutura suporte e condução óssea, ele pode também providenciar um alto conteúdo de cálcio e fósforo (DAMIEN et al., 1995; SCIADINI et al., 1997).

Confirmando outros estudos (ORSINI et al., 2005; CARDAROPOLI et al., 2005), Calixto et al. em 2007 demonstraram que o uso de osso bovino em reparo alveolar de ratos, retarda a formação óssea, apesar da biocompatibilidade do material. Vários estudos clínicos e experimentais das décadas de 50 e 60 recomendam enxertos com osso inorgânico para defeitos ósseos orais e craniofaciais. Esse material, entretanto, tem demonstrado induzir uma intensa e persistente reação inflamatória no alvéolo de ratos após extração dentária, consequentemente atrasando a reparação alveolar (OKAMOTO et al., 1994; OKAMOTO et al., 1999)

Devido às limitações do osso autógeno (BOYNE et al., 2002; PARIKH, 2002; JOSHI & KOSTAKIS, 2004; DYER, 2004) e do pequeno potencial de regeneração óssea produzida pelos enxertos alógenos e xenógenos (KRZYMANSKI et al., 1997), os pesquisadores tem utilizado a bioengenharia tecidual óssea para reconstrução de defeitos ósseos (MacARTHUR , et al., 2004). Demonstrou-se que a aplicação de células osteogênicas em defeitos produz aumento na formação de osso nos implantes (ABUKAWA, et al., 2004).

A medula óssea adulta contém células-tronco mesenquimais que são consideradas multipotentes e que podem se replicar como células indiferenciadas e que possuem potencial para se diferenciarem em linhagens de tecido mesenquimal, incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão, músculo e estroma medular, ultimamente tem recebido ampla atenção devido a sua utilidade potencial na aplicação da bioengenharia tecidual (PITTINGER et al., 1999; OWEN & FRIEDENSTEIN, 1998; WANG et al., 2003). Embora existam na literatura relatos demonstrando que as células- tronco mesenquimais podem ser usadas sozinhas na reparação do tecido ósseo (OWEN & FRIEDENSTEIN, 1998; KADIYALA et al., 1997), outros entretanto acreditam que células isoladas não podem formar novo tecido sozinha, pois dependem de uma ancoragem e requerem um ambiente específico que inclui a presença de um material para agir como um suporte para ocorrer o crescimento (ORBAN et al., 2002; HODDE, 2002; YAMADA et al., 2004).

Considerando ser a osteogênese o resultado da ação dos osteoblastos, acredita-se que a bioengenharia tecidual óssea construída pelos osteoblastos e osso autógeno ou osso bovino composto (osso medular e cortical), possa ser um enxerto ósseo ideal com referência à osteogênese, osteoindução e osteocondução.

2. *Revisão da Literatura*

2. Revisão da Literatura

2.1. REPARAÇÃO ÓSSEA

Os estudos da reparação óssea que se segue à extração dental, realizados em humanos e em diferentes espécies animais, descrevem a sequência de alterações celulares e tissulares, bem como a cronologia do processo, que culmina com o completo preenchimento do alvéolo dental por tecido ósseo neoformado.

Em 1960, Amler et al. descreveram a reparação alveolar através de estudos feitos com biópsias de feridas de extração dental humanas, como um processo que pode ser dividido nas seguintes fases: 1) logo após a exodontia ocorre a formação do coágulo; 2) em seguida ocorre a substituição do coágulo por tecido de granulação; 3) este tecido de granulação é substituído por tecido conjuntivo; 4) ocorre então a formação de um tecido osteóide, principalmente no ápice do alvéolo e depois, em toda extensão do alvéolo, partindo do ápice para região cervical; 5) amadurecimento da matriz óssea e 6) epitelização da ferida cirúrgica.

Okamoto e Russo em 1973 descreveram a reparação alveolar em ratos durante 21 dias. Dividiram o processo em 3 fases distintas (período de formação de coágulo e proliferação de células, período de formação de tecido conjuntivo e período de ossificação) que representam em essência as mencionadas no trabalho de Amler. Os autores descreveram que, ao final de 21 dias o alvéolo está completamente preenchido com tecido ósseo.

Em 1987, Carvalho e Okamoto acrescentaram, ainda com finalidade didática, uma 4ª fase à reparação alveolar. Esta fase representa, para os autores, a fase de maturação do tecido conjuntivo que acontece antes da fase de ossificação.

A diferenciação celular que acontece dentro do alvéolo durante o processo de reparação óssea após exodontias, foi estudada por Lin et al. em 1994. O estudo concluiu que a maioria dos fibroblastos que migram para o coágulo sanguíneo forma tecido conjuntivo denso e se diferenciam em osteoblastos, são originados do ligamento periodontal remanescente. Fatores de crescimento (PDGF e TGF- β) presentes no coágulo sanguíneo são considerados responsáveis pela diferenciação. Apenas uma pequena parcela dos osteoblastos são originados dos fibroblastos vindos do endósteo e do suprimento vascular periapical.

Lamano-Carvalho et al. (1997b), em análise histométrica, observaram a cronologia da reparação alveolar em ratos após exodontia. Seus resultados mostraram que a neoformação óssea continua após 21 dias da extração dental, tempo considerado como final do processo. Nos resultados, até a 6ª semana (42 dias) ainda ocorre formação de tecido ósseo no terço cervical do alvéolo.

Jahangiri et al., (1998), Devlin e Sloan (2002), mostraram que os novos fibroblastos produzidos pela diferenciação das células progenitoras e mitoses de fibroblastos pré-existentes, sobre a influência de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas(PDGF), sintetizam uma delicada matriz que associada à formação de novos capilares caracterizam o tecido de granulação. Este tecido conjuntivo imaturo que se forma a partir das margens do alvéolo em direção ao centro é gradualmente substituído por um tecido conjuntivo maduro e mais tarde por trabéculas ósseas neoformadas na mesma direção centrípeta.

A reparação alveolar tem sido investigada em numerosas condições experimentais, no sentido de observar possíveis fatores, locais ou sistêmicos, que possam interferir com o processo, acelerando-o ou retardando-o. É provável, no entanto que a maioria das observações sejam passíveis de questionamento, pois se

em alguns trabalhos realizou-se uma análise quantitativa mais precisa, na grande maioria efetuou-se apenas a observação histológica dos alvéolos em processo de reparação.

Segundo Magalhães et al. (1982), a irregularidade no contorno e altura do alvéolo e a fratura da tábua óssea ou de cristas alveolares durante a exodontia, atrasam a reparação normal.

Para Carvalho e Okamoto (1987), a laceração da gengiva, o diâmetro aumentado do alvéolo, a permanência de fragmentos ósseos sem nutrição, resíduos radiculares e de corpos estranhos no interior do alvéolo, retardam o processo de reparação normal. Além disso, cuidados com a curetagem, irrigação e suturas devem ser tomados, pois estes procedimentos, quando não bem realizados, podem alterar a cicatrização alveolar. Estes autores ainda chamam atenção para as condições periodontais prévias e às infecções, como alveolites, que também são prejudiciais no pós-operatório.

Em 1994, Okamoto et al., avaliaram a importância da permanência do coágulo no interior do alvéolo. No estudo, um grupo de animais teve as bordas do alvéolo suturadas logo após a exodontia, e em outro grupo o coágulo foi removido após 6 a 8 minutos da cirurgia. Houve um profundo atraso na cicatrização no 2º grupo e, embora um novo coágulo tenha sido formado, este não era organizado. Desta forma, concluíram que a qualidade, constituição, manutenção e retração do coágulo são fatores que regulam a formação de tecido conjuntivo durante a reparação alveolar.

Os implantes intra-alveolares, utilizados com a finalidade de coibir hemorragias pós-extração, debelar infecções pós-operatórias, prevenir ou corrigir defeitos ósseos periodontais, manter o contorno do rebordo alveolar ou substituir

tecidos perdidos durante procedimentos cirúrgicos, podem provocar reações inflamatórias persistentes que retardam a reparação ou acontece uma boa aceitação do organismo como está descrito nos trabalhos que se seguem.

Numa revisão realizada por Carvalho e Okamoto, (1978) verificou-se que a maioria dos implantes atrasa o processo de reparação. A justificativa empregada é a de que a presença de qualquer material estranho no interior do alvéolo perturbaria a organização do coágulo e provocaria distúrbios na neoformação tecidual, atrasando a cronologia da reparação.

O material pode se comportar como agente irritante, sendo reconhecido como corpo estranho, por isso o organismo tenta eliminá-lo. Isso ocorre também devido à maior irrigação sanguínea das estruturas da cavidade bucal, o que determina maior defesa local e reações mais severas contra corpos estranhos (CARVALHO & OKAMOTO, 1987).

Apesar disso, numerosos trabalhos foram desenvolvidos com a aplicação (implante/enxerto) local de materiais na busca de um material que promova formação óssea em tempo curto. Estes materiais são chamados de biomateriais, e podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substância farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecido e órgãos (WILLIAMS, 1987).

Os implantes de hidroxiapatita, e de fosfato de tricálcico foram testados por Rosa et al. (1994) em estudo histométrico e os resultados mostraram que houve formação de uma menor quantidade de osso durante todos os períodos de estudo. Portanto os implantes, apesar de biocompatíveis, retardaram o processo de reparação alveolar.

O cimento de ionômero de vidro, material restaurador, foi também avaliado histológica e histometricamente como implante intra-alveolar, em ratos, imediatamente após a exodontia. Brentegani et al. (1996) descreveram que a presença dos grânulos de ionômero de vidro no terço cervical levou a um pequeno atraso na formação óssea apenas na primeira semana. As outras regiões do alvéolo, ao contrário, tiveram uma tendência de apresentar grande quantidade de osso trabecular a partir da terceira semana. Desta forma foi concluído que o material não atrasou o processo de reparação, favorecendo a neoformação óssea. Em outro trabalho Brentegani et al. (1997), comprovou que o material, além de biocompatível, foi progressivamente incorporado ao osso.

Lamano-Carvalho et al. (1997a) avaliaram os efeitos do implante imediato de uma resina de poliuretano (*Ricinus communis*) na cronologia da reparação alveolar em ratos. Apesar da biocompatibilidade do material, houve uma alteração no processo de reparação, com atraso na neoformação óssea nos terços médio e apical.

Em 1997 Alves-Rezende e Okamoto testaram o Tissucol, um material adesivo de fibrina, em alvéolos dentais de ratos submetidos ao estresse. O material foi considerado biocompatível agindo como um agente hemostático efetivo e não interferindo na formação de tecido conjuntivo e ósseo.

Zerbo et al. (2001) demonstraram que o uso de grânulos de fosfato tricálcico permitiu a formação de novo tecido ósseo em defeitos alveolares. Sugerindo que o fosfato tricálcico tenha tido ação osteocondutora, isto é, guiando células osteogênicas a partir de um tecido ósseo pré-existente. Além disso, neste mesmo estudo observou-se a formação de osso dentro dos poros das partículas da biocerâmica.

Bombonato-Prado et al., (2004) avaliou qualitativa e quantitativamente através de microscopia de luz e eletrônica de varredura, os efeitos de uma bebida alcoólica na reparação alveolar, comparando, nesta situação, a ação de uma biocerâmica de fosfato de cálcio (Osteosynt) na neoformação óssea. Teve como conclusão que a utilização da biocerâmica minimiza os efeitos deletérios do álcool sobre a reparação alveolar. Balabanian et al., (2005), avaliaram a implantação do látex, na forma de grânulos e gel associado ao colágeno, no interior do alvéolo de ratos, nos períodos de 7, 21 e 42 dias, . Os autores concluíram que o látex é um material biologicamente biocompatível, desenvolvendo uma osteointegração progressiva, estimulando a angiogênese e acelerando a neoformação óssea nos primeiros 7 dias da reparação óssea.

Avaliou-se o comportamento do enxerto de composto ósseo de rícino (C.O.R.) em alvéolos dentais e sua eficácia na manutenção do rebordo alveolar em ratos (CASTRO 2006). O C.O.R. é um material aloplástico de origem vegetal derivado do óleo de mamona, cuja fórmula molecular tem mostrado certa compatibilidade com tecidos vivos e propriedades osteocondutivas. As análises radiográficas e histológicas realizadas pelo autor mostraram que este composto, quando implantado em alvéolos dentais de ratos, é capaz de manter as dimensões do rebordo alveolar, ao passo que nos animais controle as dimensões alveolares não foram mantidas.

Em 2007, Calixto et al., estudaram o enxerto em alvéolos dentais de proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), associadas a um carreador de hidroxiapatita microgranular e colágeno bovino. As BMPs são proteínas consideradas capazes de promover a osteoindução, ou seja, a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, e estes produzirem o tecido ósseo. Seus resultados mostraram que, o reparo ósseo alveolar nos ratos implantados e nos ratos controles

seguiu o padrão normal descrito na literatura, e que o material utilizado não acelerou a cicatrização óssea.

Srisubut et al.,(2007), analisaram o reparo ósseo em defeitos provocados no ângulo da mandíbula de ratos, usando uma mistura de vidro bioativo e alendronato. O alendronato, um medicamento da classe dos bifosfonados, tem como principal função diminuir a atividade osteoclástica e conseqüentemente a reabsorção óssea, e o vidro bioativo um substituo ósseo com propriedades osteocondutivas. A análise histológica 4 semanas após a cirurgia mostrou que, o grupo experimental tinha significativamente maior quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado ao grupo controle.

Em 2007, Coneglian avaliou em alvéolos dentais de Ratos a neoformação óssea após a implantação de sulfato de cálcio di-hidratado e da hidroxiapatita BTCP GenPhos. A análise microscópica qualitativa e quantitativa 7, 15 e 30 dias após os procedimentos cirúrgicos mostraram que a evolução do processo de reparo alveolar nos grupos implantados com biomateriais ocorreu de forma semelhante ao grupo controle.

Garcia (2007) avaliou comparativamente, os fenômenos evolutivos do processo de reparo em alvéolos de ratos preenchidos com osso medular bovino inorgânico e hidroxiapatita BTCP densa. Os resultados qualitativos e quantitativos mostraram que a hidroxiapatita BTCP densa apresenta características satisfatórias como biomaterial osteocondutor e osteopreenchedor, e quando comparada ao osso bovino inorgânico, os dois materiais obtiveram o mesmo desempenho no processo de reparo alveolar.

Wu et. al em 2008, analisaram os efeitos da sinvastatina, um medicamento anti-hipercolesterolemia, associado com um carreador de ácido polilático-glicólico

(PLGA), implantados em alvéolos dentais de ratos. Os resultados mostram que a altura relativa do rebordo alveolar residual e a densidade mineral óssea foram significativamente maiores no grupo experimental quando comparado aos controles. Histologicamente a associação PLGA-sinvastatina mostrou uma maior quantidade de ilhas de tecido ósseo neoformado quando analisado em 4 semanas pós-cirúrgico.

De Coster et al. (2009) avaliaram histologicamente a reparação alveolar em humanos com a utilização de um compósito poroso a base de hidroxiapatita e fosfato tricálcico (BoneCeramic R). As biópsias foram feitas durante os procedimentos para os implantes depois de 6 a 74 semanas da extração dental. Com os resultados os autores concluíram que o uso de BoneCeramic R interferiu negativamente com os processos de cicatrização normal do alvéolo, levando a uma menor formação de tecido ósseo.

Pessoa et al. (2009) avaliaram em macacos, histológica e histometricamente, o processo de reparação óssea em áreas centrais de alvéolos dentais logo após extração, que foram preenchidos com plasma rico em plaquetas (PRP). As amostras para avaliação histológica e histométrica foram obtidos em 30, 90, 120 e 180 intervalos de dias. Os autores concluíram que houve uma melhora na reparação óssea com a utilização de plasma rico em plaquetas em alvéolos.

2.2. OSSO AUTÓGENO

A enxertia de tecido ósseo é um procedimento muito antigo. O primeiro registro do uso deste tipo de enxerto é datado de 1968, quando esta técnica era utilizada a fim de solucionar problemas relacionados à má cicatrização óssea como a não consolidação de fraturas, a consolidação óssea tardia, as pseudo-artroses

congenitas, os defeitos ósseos pós-traumatismos, as infecções e os tumores (CHAPMAN; RODRIGO, 2001).

Block e Kent (1985) compararam o uso de hidroxiapatita sozinha com uma combinação com osso autógeno para aumento de rebordo em cães. Ao final de 16 semanas concluíram que o uso combinado de hidroxiapatitas e osso autógeno mostrou uma formação de osso em toda a área contribuindo para aumento do rebordo.

Pelos resultados obtidos por Burchardt (1987) os enxertos de osso poroso mostram uma revascularização rápida, mas seu trabeculado é mais facilmente reabsorvido, prejudicando a manutenção da forma e volume do enxerto. Por outro lado, esta reabsorção permite que logo ocorra uma substituição por osso. Já o enxerto de osso compacto persiste por muitos anos e mostra regiões necróticas.

Frame et al. (1987) avaliaram o uso de hidroxiapatitas (porosa ou não) sozinhas e em combinação com osso autógeno e gesso paris. Verificaram ao final de 24 semanas, que a associação osso autógeno/hidroxiapatitas não produziu aumento de osso.

Em 1989, Wada et al., em seu estudo avaliaram as respostas reparativas em defeitos ósseos em furcas de terceiros e quartos molares em cães, utilizando três materiais: osso autógeno, osso bovino desmineralizado liofilizado e fosfato tricálcico (TCO- β). Concluíram que, apesar de todos os materiais terem sido bem aceitos, os defeitos preenchidos com osso autógeno mostraram uma regeneração significativamente mais pronunciada do que a dos outros materiais.

Observações de Ellies (1992) de que o osso autógeno possui ações osteoindutora e osteocondutora, o consagraram até hoje como uma referência padrão como material de enxerto ósseo, agindo inicialmente preenchendo o espaço

vazio no defeito, enquanto prossegue o ciclo osteoclástico, em seguida os osteoblastos iniciam o processo de formação óssea.

Nishibori et al. (1994) relataram os resultados de dois casos clínicos de aumento de assoalho de seio, um com osso autógeno da crista ilíaca, e outro com osso bovino desmineralizado liofilizado (DFDB). As observações sugeriram que o osso autógeno produz osso em quantidade e qualidade adequada para os locais de implantes, enquanto que o enxerto com DFDB não fica completamente remodelado pelo osso do hospedeiro e produz osso em quantidade e qualidade insuficiente para os locais de implantes.

Um trabalho feito por Triplett e Schow (1996), descrevendo técnicas para aumentar contorno e altura de processo alveolar em desdentados, analisou o uso de enxerto de osso autógeno para colocação simultânea ou secundária de implantes osteointegrados. Os autores concluíram que os enxertos de osso autógeno podem ser usados com segurança para promover habilidade na colocação de implantes.

Para Gross (1997) o osso autógeno apresenta as características ideais para um substituto ósseo que são: livre de transmissão de doenças, biocompatibilidade, radiopacidade, microporosidade, estimular a indução óssea, reabsorver em período comparativo ao da formação óssea, ser substituído por tecido ósseo, fácil de ser obtido e manipulado, agir como matriz ou veículo para outros materiais e ter baixo custo.

Contendo em sua matriz inorgânica, osteócitos, osteoclastos, osteoblastos e proteínas osteogênica, o osso autógeno apresenta potencial para osteogênese quando usado como enxerto para melhorar ou corrigir defeitos ósseos (BLOCK; KENT, 1997).

Becker et al. (1998) se propuseram em comparar a reparação alveolar em 8 pacientes após a implantação de osso bovino, osso bovino desmineralizado liofilizado (DFDBA), osso autógeno ou proteínas morfogenéticas de osso humano em um veículo de osteocalceína/osteonectina (hBMP/NCP). Os resultados indicaram que os enxertos xenogênicos e autógeno não contribuíram para uma melhor cicatrização dos alvéolos dentais.

Sabendo que os enxertos de osso autógeno podem ser de osso poroso ou compacto, Merckx et al. (1999a) compararam a resposta destes dois tipos com osso bovino mineral reabsorvível (RBM) em defeitos ósseos em seios maxilares de cabras. Com a avaliação histológica, após 24 semanas, foi concluído que os dois tipos de osso foram aceitos e incorporados da mesma maneira nos defeitos ósseos. Já em relação ao RBM, a conclusão foi que este material foi somente osteocondutivo. Os mesmos autores (1999b), alguns meses depois, no mesmo ano, usaram os enxertos de osso poroso ou compacto, em forma de fragmentos e de blocos. A mesma metodologia foi usada e os resultados, após 24 semanas, mostraram que o osso poroso, em fragmentos ou em blocos, é o material de escolha para tratamento de defeitos em áreas maxilofaciais onde não haja necessidade de forças mecânicas. Já o osso compacto em fragmentos não é confiável o suficiente para ser usado como um enxerto ósseo solitário nestas condições. Segundo os autores, o ideal seria sua utilização em blocos.

Um estudo em cães feito por Hockers et al. (1999), testou o efeito de uma membrana reabsorvível suportada por enxertos xenógenos ou autógenos na reparação óssea dentro de defeitos ósseos ao redor de implantes. Os resultados mostraram que a membrana reabsorvível promoveu maior formação óssea quando em conjunto com os enxertos.

Orsini et al., em 2001, testaram e compararam o uso de duas combinações de materiais para tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais: osso autógeno com sulfato de cálcio e osso autógeno com membrana reabsorvível. Concluíram que as duas terapias foram compatíveis nos resultados, levando a um aumento da formação de tecido ósseo.

Donos et al. (2002) também avaliaram a utilização de membranas não reabsorvíveis em combinação com osso cortical autógeno. Dos resultados concluiu-se que o volume do enxerto de osso autógeno pode ser mantido com a cobertura de uma membrana, quando esta estiver apropriadamente adaptada e coberta com mucosa durante a cicatrização.

Já Tadjoeidin et al., em 2002, compararam o osso autógeno com um vidro bioativo (BG) na capacidade em promover aumento de osso no assoalho do seio maxilar em humanos. Os resultados sugeriram que a mistura de BG (80-90%) com osso autógeno (10-20%) foi efetiva na reparação óssea para aumento do assoalho de seio, em um período de 6 meses, enquanto que somente com osso autógeno foram necessários 12 meses para a cicatrização se completar.

Kiyokawa et al. (2002), avaliaram a recuperação da função mastigatória em pacientes com periodontite avançada, usando seus próprios dentes e enxertos com osso poroso da crista ilíaca para regeneração de osso alveolar. Dentes foram reimplantados associados ao enxerto de osso autógeno. Após 2 anos e 8 meses de observação, os autores verificaram formação de osso alveolar sem reabsorção do osso neoformado ou radicular.

Cochran et al. (2003) associando osso autógeno e emdogain em defeitos ósseos de 1 a 6 mm criados ao lado de dentes na mandíbula de macacos, observaram depois de 2 meses, formação óssea e de cemento. Concluíram que a

associação dos dois materiais foi mais efetiva na reparação do que o emdogain sozinho.

Um estudo feito em 2005 por Kim et al., comparou o uso de osso autógeno e um biomaterial reabsorvível a base de carbonato de cálcio em defeitos intra-ósseos periodontais em cães. O objetivo foi avaliar histologicamente, a reparação dos tecidos periodontais, com foco em reabsorções radiculares e anquilose, após a implantação dos materiais. Concluíram que ambos não promovem reabsorções ou anquilose, mas que, apesar disso, o potencial osteogênico do osso autógeno é limitado.

Silva et al. (2005) estudando a reparação de defeitos ósseos em ratos usaram a hidroxiapatita em forma de discos porosos, em comparação ao osso autógeno. Os resultados histológicos e radiográficos após 2,4,8 e 24 semanas mostraram que, os defeitos preenchidos com osso autógeno ou com a biocerâmica mostraram volumes similares de tecido ósseo neoformado.

Busenlechner et al. (2005), estudaram o potencial de membranas de reabsorção lenta (PTLM), em combinação com enxertos de osso autógeno e osso bovino desproteinizado (DBBM), na reparação óssea em macacos. Defeitos ósseos na mandíbula receberam osso autógeno somente (ABB), ABB+PTLM e DBBM+PTLM. Nove meses após, os resultados mostraram que nos locais desprotegidos de membrana ocorreram reabsorções.

Jardini et al. (2005) analisaram histomorfometricamente o comportamento do enxerto de osso autógeno coberto ou não por membrana de e-PTFE. O bloco ósseo para enxerto foi retirado da calvária e fixado na cortical do ângulo da mandíbula em ratos, e os mesmos foram cobertos ou não pela membrana. Os resultados mostraram que no grupo desprotegido de membrana houve perda óssea da ordem

de 24% durante o processo de cicatrização, e que o volume inicial do enxerto diminuiu com o passar do tempo. Em contraste, no grupo protegido pela membrana houve um ganho de tecido ósseo de aproximadamente 55%, mostrando que o volume total de osso neoformado foi maior que o enxerto no período inicial.

Zijderveld et al. em 2005 estudou em humanos o uso do osso autógeno comparado ao fosfato tricálcio $-\beta$ em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Os autores concluíram que o enxerto de osso autógeno ainda é o padrão ouro na substituição e reconstrução óssea, mas que o uso limitado do fosfato tricálcio- β mostrou ser um procedimento clinicamente seguro nestas cirurgias.

Silva et al. em 2005, analisaram o reparo de defeitos ósseos no crânio de ratos com o uso de enxerto ósseo autógeno e cerâmica de fosfato de cálcio. Três defeitos foram produzidos na calvária e preenchidos com osso autógeno, cerâmica de fosfato de cálcio e apenas o coágulo sanguíneo, em seguida os animais foram sacrificados em 1, 2, 4 e 24 semanas após a cirurgia para análise radiográfica e em microscópio de luz. Os autores concluir que a cerâmica de fosfato de cálcio usada neste experimento foi tão efetiva quanto o osso autógeno na reparação dos defeitos, mas que o uso das mesmas clinicamente deve ser cauteloso, pois as cerâmicas podem apresentar baixa resistência mecânica.

No ano seguinte Silva e Camilli (2006) estudaram o uso do osso autógeno associado ao laser de baixa potência em defeitos na calvária de ratos. Os resultados mostraram estimulação da osteogênese durante os períodos iniciais do processo cicatricial e que a magnitude do reparo ósseo foi dependente da dose irradiada.

Prata et al.(2007) avaliaram histológica e histometricamente, o comportamento do reparo ósseo alveolar, utilizando como material de enxerto intra-alveolar osso autógeno e proteínas derivadas da matriz do esmalte. Os resultados

evidenciaram que os fragmentos de osso autógeno desenvolveram progressiva osteointegração e não sofreram reação de corpo estranho. E que a fração de volume de osso trabecular adjacente ao enxerto, foi de 10 a 15% maior no grupo enxertado com a associação quando comparado com o grupo que recebeu apenas o osso autógeno.

Neste mesmo ano (2007), Melo investigou a influência do osso autógeno particulado retirado da crista ilíaca no processo de reparo ósseo alveolar em ratos. Com os dados obtidos o autor concluiu que o osso autógeno não promoveu um aumento estatisticamente significante na neoformação óssea em alvéolos dentais de ratos.

A capacidade de integração e reparação óssea dos enxertos de osso autógeno em ratas com deficiência estrogênica foi estudada por Luize et al. em 2008. Após um período de 30 dias da castração dos animais, um enxerto ósseo autógeno tendo como área doadora a calota craniana foi retirado e fixado ao ângulo mandibular. Os animais foram sacrificados em 7, 14 e 28 dias após o procedimento de enxertia para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que em 28 dias o enxerto do grupo controle estava aparentemente integrado à mandíbula, enquanto no grupo de ratas castradas a interface enxerto-sítio receptor estava parcialmente preenchida por tecido ósseo neoformado com áreas de tecido conjuntivo interposicional. Os autores Concluíram que a depleção estrogênica retardou o processo de reparo ósseo dos enxertos autógenos em mandíbulas de ratas.

Bayat et al. (2009) compararam a quantidade e a qualidade da cicatrização óssea com o uso de matriz óssea e enxerto de osso autógeno em gatos. Defeitos ósseos foram obtidos com a extração dos caninos dos animais e a resposta da reparação óssea foi examinada nos períodos de 14, 28 e 56 dias após as cirurgias

(n = 4). Os resultados demonstraram que a matriz óssea foi mais efetiva que o osso autógeno.

2.3. OSSO BOVINO

A partir dos anos 50, novas técnicas foram desenvolvidas para a obtenção de apenas a porção inorgânica do osso, o assim denominado osso inorgânico.

Boyne, em 1958 verificou que o osso inorgânico pode ser utilizado para preencher defeitos decorrentes de cirurgia parodontal. Esse material foi utilizado em vários casos, como: enucleação de cistos radiculares, curetagem periapical, enucleação de cistos nasopalatinos e mesmo após extração dentária. Em todos esses casos o pós operatório foi bom, com mínimo edema e equimose, e sem evidências de qualquer resposta imunológica ao enxerto. Foi realizado controle entre 8 e 28 semanas e as características radiográficas e clínicas indicaram um bom padrão de aceitação do material por parte do organismo do paciente.

Urist em 1965 fez experimentos utilizando osso desmineralizado por diferentes ácidos. Esse material foi colocado em músculo de camundongos, ratos, coelhos e em defeitos ósseos de coelhos, cães e humanos. O uso de 0.6N HCl (ácido clorídrico) mostrou resultados impressionantes; a matriz óssea obtida com a descalcificação do osso com este ácido foi invadida por novos vasos sanguíneos e reabsorvida rapidamente, enquanto que novo osso era produzido e havia proliferação de células osteoprogenitoras. O autor concluiu que essa matriz óssea tinha a propriedade de induzir a diferenciação de células indiferenciadas em células osteoprogenitoras com a formação de novo osso.

Sanches et.al., em 1972, analisaram, histologicamente, o processo de reparo em feridas de extração dental em ratos após o implante de osso inorgânico. A

microscopia revelou que não há vantagem no emprego rotineiro de “osso inorgânico” para preenchimento dos alvéolos dentais ou lojas cirúrgicas, por que: 1) o material implantado não estimulou a osteogênese; 2) provocou reação inflamatória relativamente intensa e 3) retardou consideravelmente a cronologia do processo do reparo.

Mulliken e Glowacki (1980) implantaram osso homólogo fresco, homólogo liofilizado e desmineralizado nos defeitos criados na calvária de ratos. Foi observado um retardo na reparação óssea dos defeitos preenchidos com osso liofilizado e acelerada naqueles implantados com osso homólogo fresco e osso desmineralizado.

Hislop et.al., em 1993, utilizaram osso inorgânico (BIO-OSS) para reconstrução óssea em cirurgias maxilofaciais. Os pacientes foram divididos em quatro grupos: A- pacientes (sindrômicos) – com defeitos hipoplásicos, B- pacientes com deformidades pós-trauma, necessitando de correções, C- pacientes submetidos à cirurgia ortognática e D- pacientes com necessidade de aumento de rebordo alveolar. Os autores concluíram que o osso inorgânico BIO-OSS é eficiente em cirurgias ortognáticas, embora o aumento de rebordo alveolar tenha sido insatisfatório. Sugeriram acrescentar fragmentos de osso autógeno para um melhor resultado.

Froum et al. (1998), para a elevação do seio maxilar utilizaram o uso de Osteograft N, associado com osso autógeno ou osso bovino com o uso de membranas não reabsorvíveis de e-PTFE (politetrafluoretileno expandido). Verificaram aumento maior de osso vital neoformado quando associado com osso autógeno e com o uso da membrana e que a altura do rebordo foi mantida após dois a três anos de observação.

Ainda em 1998 Becker et al. testaram diferentes biomateriais para o preenchimento de alvéolos humanos após extração, tais como: osso autógeno, osso liofilizado desmineralizado (DFDBA), osso bovino desproteinado (BIO-OSS) e BMP humana em carreador de proteínas não colágenas. Em termos de regeneração em primeiro lugar ficou a BMP seguida pelo osso autógeno e por último, os outros materiais.

Com o propósito de avaliar a biocompatibilidade de dois biomateriais, Oliveira et al. (1999) utilizaram o osso cortical bovino (Gen-Ox, Baumer S.A.) desproteinado a 100°C e outro a 1000°C implantados em região subcutânea de ratos. As análises microscópicas mostraram uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação, contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material, semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. Pode-se concluir que o osso cortical bovino, quer desproteinado (Gen-Ox) a 100°C ou a 1000°C podem ser usados como materiais de preenchimento osteo-substituto e como potenciais carreadores das proteínas morfogenéticas do osso.

Wang e Glimcher (1999) compararam o grau de osteogênese da matriz do osso desmineralizado homólogo com o bovino, ambos implantados em tecido subcutâneo e em defeitos na calvária de ratos. Observaram que o osso homólogo no sítio ectópico formou inicialmente cartilagem e promoveu diferenciação de osteoblastos nos defeitos ósseos, evoluindo para formação de osso, porém, em maior quantidade na calvária. Por outro lado, o osso bovino, apesar de ter induzido algumas células cartilaginosas no tecido subcutâneo, foi totalmente reabsorvido, enquanto nos defeitos ósseos induziu formação de osso em grau muito menor que o homólogo.

Young et. al., em 1999, propuseram-se a avaliar o uso de osso inorgânico bovino (BIO-OSS) em defeitos na maxila e mandíbula de coelhos. Estes foram preenchidos da seguinte maneira: grupo I osso autógeno, grupo II- BIO-OSS, grupo III- osso autógeno +BIO-OSS e grupo IV- defeitos não tratados. Após 12 semanas, não ocorreu diferença na resposta tecidual entre maxila e mandíbula. O grupo tratado com osso autógeno apresentou formação de novo osso ao redor das partículas, que estavam sendo reabsorvidas por células multinucleares enquanto o BIO-OSS, não apresentou sinais de reabsorção.

Sicca et al., 2000, avaliaram comparativamente a resposta celular em tecido subcutâneo de ratos ao enxerto de osso cortical bovino desproteinado a 100°C na forma microgranular (250-1000 µm) e macrogranular (1000-2000 µm) nos períodos de 10, 20, 30 e 60 dias. A análise microscópica mostrou para os dois tipos de grânulos uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação, e que a histometria demonstrou que o osso cortical bovino desproteinado a 100°C, quer macro ou micro granular, promoveu resposta tecidual favorável, sugerindo que possa ser usado como material de preenchimento osteosubstituto e como carreador das proteínas morfogenéticas do osso.

Taga et al., em 2000, comparou o enxerto autógeno com enxerto alógeno de matriz óssea desmineralizada, em defeitos ósseos de 12mm de diâmetro em calvárias de cobaias, Os resultados sugerem que enquanto o enxerto autógeno assume parcialmente as características do tecido ósseo removido ao final de 12 semanas, o enxerto alógeno (matriz óssea desmineralizada) exibiu pequena quantidade de tecido ósseo neo-formado e grande quantidade de matriz óssea enxertada ainda em processo de reabsorção.

Em 2000, Artzi et al. avaliaram em humanos, por nove meses, alvéolos preenchidos com Bio-Oss. As análises evidenciaram completo preenchimento do alvéolo com osso neoformado em 82,3% dos casos. Concluíram que o mineral ósseo bovino é um material biocompatível e apropriado para evitar a perda óssea que ocorre após a extração, no entanto, mesmo após nove meses, as partículas ainda estavam presentes, não sendo, totalmente reabsorvidas.

Costa Filho et. al., em 2001, avaliaram os efeitos da implantação da mistura de HA bioabsorvível e osso bovino desproteinado (inorgânico) com um “pool” de BMPs e proteínas ósseas hidrofóbicas não colágenas bovinas sobre a osteogênese na medula óssea de tíbia de coelhos. Os autores concluíram que o pool de BMPs e proteínas hidrofóbicas não colágenas do osso tiveram efeito inibitório na osteogênese e que os biomateriais sem a BMP, particularmente o osso bovino desproteinado, proporcionaram um substrato favorável à formação óssea.

Em 2002, Camargo et al. avaliaram em humanos, o uso combinado de plasma rico em plaqueta, osso bovino inorgânico (BIO-OSS) e regeneração tecidual guiada em defeitos ósseos periodontais. Concluíram que, o uso combinado de plasma rico em plaquetas, osso bovino inorgânico (BIO-OSS) e regeneração tecidual guiada propiciam um efeito regenerativo adicional quando utilizado em defeitos ósseos de pacientes com periodontite severa.

A biocompatibilidade de blocos de matriz de osso bovino esponjoso desmineralizado (Gen-Ox®, Baumer S.A.) foi avaliada por Sanada et al., 2003. Implantaram um bloco cilíndrico (5 x 12 mm) desse biomaterial no músculo abdutor da coxa de 30 ratos. Foi concluído que o enxerto de matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco é biocompatível e bioabsorvível quando

implantado em tecido conjuntivo, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica.

Artzi et al., em 2004, compararam histológica e morfométricamente, o processo de reparo em defeitos ósseos produzidos em cães com dois biomateriais na forma de partículas, um xenoenxerto (osso bovino inorgânico) e um poroso aloplástico fosfato beta tricálcio (β -TCP). Os resultados demonstraram que o processo de reparo estava completo, em 24 meses com o xenoenxerto, embora as partículas enxertadas permanecessem no local. Com a β -TCP, as partículas foram completamente reabsorvidas.

Betti, em 2004, avaliou o reparo ósseo em defeitos de 6 mm de diâmetro por 8mm de profundidade em fêmures de coelhos albinos machos com matriz orgânica de osso bovino medular em bloco ou de osso cortical em microgrânulos de 0,25 a 1,0mm (Gen-Ox® – Baumer S.A). Concluiu-se que a matriz óssea desmineralizada em bloco ou microgrânulos evitou a invaginação do tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo nas fases iniciais do reparo, funcionando como osteopreenchedor.

Carneiro et al., em 2005, avaliaram microscopicamente o efeito do tamanho das partículas de matriz de osso medular bovino desmineralizado, nas formas micro e macrogranular, na reparação de defeito ósseo em fêmures de coelhos, tendo como controle o coágulo sanguíneo. Os resultados demonstraram uma reação granulomatosa tipo corpo estranho, envolvendo as partículas implantadas, sugerindo falhas na desmineralização e/ou na retirada de potenciais antigênicos durante a produção do biomaterial. Concluiu-se que o tamanho das partículas não influenciou na evolução do processo reparativo dos defeitos ósseos, e atuaram, apenas, como substâncias osteopreenchedoras.

Rumpel et al., em 2006, fizeram uma análise comparativa de dois biomateriais. O Bio-Oss® que é uma cerâmica de hidroxiapatita derivada do osso bovino esponjoso desproteinizado com granulação de 1-2 mm e o Nano-Bone® que é composto por 74% de hidroxiapatita e 24% SiO₂ (Dióxido de silício) e é fabricado em processo de solgel com granulação entre 0,6 x 2 mm, em mandíbula de miniporcós. Os resultados demonstraram uma atividade osteoclástica sobre os grânulos de ambos os materiais e estes estavam em contato direto com superfícies do osso neo-formado. A degradação de ambos os biomateriais correspondem ao processo de degradação óssea natural e sugerem a possibilidade de reabsorção completa durante a remodelação óssea.

Em 2008, Araújo et.al. avaliaram o efeito da colocação de um enxerto xenogênico em alvéolos dentais de cães sobre a neo-formação óssea. Os autores concluíram que os enxertos atrasaram a reparação alveolar e que os alvéolos controles tiveram maior quantidade de tecido ósseo.

Cordaro et al. (2009) estudaram aumento do assoalho de seio maxilar em humanos utilizando osso bovino inorgânico (ABB) e um novo fosfato de cálcio bifásico, (Straumann Bone Ceramic - BCP). Concluiu-se que após 180-240 dias tanto o ABB quanto o BCP induziram a neoformação óssea em quantidades similares, com aspecto histológico similar, indicando que ambos os materiais são adequados para o aumento do assoalho de seio maxilar para a colocação de implantes dentários.

Com o objetivo de avaliar o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) associado a uma mistura de osso autógeno e osso bovino desproteinizado (Bio-Oss®), Mooren et al. em 2010, realizaram defeitos ósseos nos osso frontais do crânio de cabras e implantaram estes materiais. Os autores concluíram que após 1, 2, 6 e 12

semanas a associação dos ossos autógenos e bovinos com o PRP não trouxe melhora para reparação óssea em nenhum dos períodos.

2.4. CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco mesenquimais foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein et al. em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F = *colony forming units – fibroblastic*). Neste estudo observou-se que transplantes heterotópicos de medula óssea eram capazes de formar osso novo a partir de células proliferativas que persistiam mesmo após a morte das células hematopoiéticas.

Em 1968, Friedenstein et al., na tentativa de conhecer as células que levaram a formação de osso novo, desenvolveram uma cultura de células mesenquimais do estroma da medula óssea e posteriormente transplantaram estas células para a cápsula renal e tecido subcutâneo de animais. Tanto na cápsula renal quanto no subcutâneo houve a formação de osso.

Os trabalhos a seguir comprovam a importância do fornecimento adicional de células-tronco em locais com formação óssea prejudicada, sendo a medula óssea o sítio mais comumente usado na obtenção destas células.

Burwell (1961) foi o primeiro a notar que o uso das células da medula óssea autógena promovia bom resultado na integração de enxertos ósseos não autógenos.

Salama e Wiessman (1978) descreveram uma série clínica, onde pacientes submetidos à ressecção de tumores ósseos benignos, à correção de perdas ósseas pós-traumatismos, a artrodeses e a correção de pseudo-artrose foram tratados com

a utilização de osso bovino liofilizado associado à medula óssea autógena. Os resultados mostraram sucesso nos 31 pacientes operados, Os autores concluem que o xenoenxerto por eles utilizado, embora sem células viáveis, serviu apenas como molde (scaffold) para as células vivas presentes na medula óssea.

A aplicação de aspirados de medula óssea autógena em artrodeses de processo espinhoso de coelhos foi estudada por Lindholm et al. (1982, 1988). Os resultados mostraram que quando comparada ao osso autógeno e a matriz óssea isoladamente a combinação da matriz óssea desmineralizada com o aspirado de células da medula óssea resultou em uma fusão vertebral mais rápida e estável.

Paley et al. em 1988 avaliou a eficácia da medula óssea na formação de calo ósseo em osteotomias na ulna de coelhos. Os autores observaram que, no grupo onde foi administrado percutaneamente o aspirado de medula óssea, houve a formação mais rápida do calo ósseo e este era de melhor qualidade que nos animais do grupo controle.

Desde então, muitos estudos vêm sendo realizados com células-tronco a fim de melhorar a osteogênese em aloenxertos ou xenoenxertos ósseos (WIENTROUB et al. 1989).

No ano de 1991, Grundel et al. associaram o aspirado de medula óssea com fosfato de cálcio bifásico cerâmico. A análise feita pelos autores mostrou a união completa de falhas ósseas na ulna de cães após a administração local dessa associação.

Utilizando cilindros porosos de hidroxiapatita/fosfato-tricálcio associados a células-tronco osteoprogenitoras derivadas da medula óssea, Kadyiala et al. em 1997 observaram regeneração óssea completa em um defeito ósseo segmentar no fêmur de ratos.

Krzymansky et al. em 1997 analisaram os efeitos da aplicação de células de aspecto fibroblastóide derivadas da medula óssea e de medula óssea fresca na reparação de defeitos ósseos em ângulo mandibular de coelhos, comparando-as ao osso autógeno e ao osso alógeno. Os autores observaram que os melhores resultados foram obtidos na associação das células da medula óssea expandidas *in vitro* associadas à medula óssea fresca. Concluíram que a medula óssea é uma boa fonte de células osteogênicas tanto para o transplante imediato quanto para a expansão *in vitro*.

Bruder et al. em 1998, analisaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea associadas a uma biocerâmica na cicatrização de defeitos ósseos segmentares em fêmures de cães. Os autores concluíram que esta terapia celular poderia ser uma alternativa ao uso do osso autógeno na reparação de amplos defeitos ósseos.

Em 2003, De Kok et al. comparam o uso de células-tronco mesenquimais autógenas e alógenas na formação óssea alveolar em cães. Matrizes de hidroxiapatita/fosfato-tricálcio foram utilizadas como carreador. Os resultados histométricos mostraram maior quantidade de osso neoformado no interior dos poros tanto das matrizes com células-tronco mesenquimais autógenas quanto nas alógenas. Os autores concluíram que as células-tronco mesenquimais autólogas e alógenas possuem a capacidade de regeneração óssea em defeitos craniofaciais.

Yamada et al. em 2004 analisaram defeitos ósseos mandibulares em cães, utilizando células-tronco mesenquimais (MSC) em associação com o plasma rico em plaquetas (PRP). Histometricamente foi mostrado que a neoformação óssea se comportou melhor com a associação (MSC/PRP) 67,3%, comparado ao osso autógeno (61,4%), ao PRP (29,2%) e ao controle (18,3%). Concluíram neste estudo

que, a associação dos biomateriais estudados possui adequada capacidade osteogênica.

A reconstrução de defeitos na região maxilofacial através do uso de osso alógeno de crista ilíaca associado a osteoblastos derivados da medula óssea foi estudada por Li e Li em 2005. Defeitos no ângulo mandibular foram reconstruídos com o osso alógeno somente e associado aos osteoblastos. Segundo os autores, este tipo de enxerto promoveu a formação óssea pelas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutivas produzidas pelas células osteoblásticas.

Marei et al. em 2005 estudaram os efeitos da células-tronco mesenquimais na preservação e regeneração do osso alveolar após extração dentária em coelhos. As células-tronco mesenquimais foram expandidas em laboratório e pré-cultivadas em um molde de ácido poli-lático/poliglicólico (PLG) para a implantação no alvéolo dental após a extração. As análises histológicas e radiográficas mostraram após 4 semanas manutenção das paredes ósseas alveolares e maior densidade de tecido ósseo no grupo PLGA/células-tronco. Os autores concluíram que esta associação se mostra promissora na cirurgia dento alveolar.

O uso da engenharia tecidual óssea utilizando células-tronco mesenquimais (MSC), cola de fibrina e plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração óssea ao redor de implantes dentários foi avaliada em cães por Ito et al. em 2006. Após a instalação dos implantes na mandíbula, os defeitos ósseos perimplantares foram tratados: apenas com fibrina (I), MSC e fibrina (II); MSC, fibrina e PRP (III) e sem tratamento (IV). A análise histológica e histomorfométrica após 8 semanas mostraram uma maior superfície de contato implante/osso da ordem de 53% no grupo III quando comparado aos grupos IV (29%), I (25%) e II (42%). Concluiu-se

que o uso da associação destes materiais pode ser uma alternativa previsível na regeneração óssea simultânea à colocação de implantes.

Neste mesmo ano (2006), Hibi et al. utilizaram clinicamente a associação de células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na reconstrução de uma fenda alveolar. A medula óssea foi obtida através de punções da crista ilíaca, processada em laboratório e diferenciada em células-tronco mesenquimais osteoprogenitoras, e em seguida associadas ao PRP e inseridas no defeito cirúrgico. Os autores observaram que após nove meses 79,1% da área enxertada possuía formação óssea adequada.

Vaz em 2006 mostrou que o centrifugado osteogênico de medula óssea favoreceu a consolidação de osteotomias experimentais em fíbulas de coelho, e promoveu uma qualidade melhor do calo ósseo.

Um estudo realizado no ano seguinte (MYLONAS et.al., 2007) investigou a combinação de um carreador polimérico termoplástico (30% w/v Pluronic F-127) para engenharia tecidual com células-tronco mesenquimais, hidroxiapatita sintética e biovidro. Os biomateriais foram testados em defeitos ósseos criados na mandíbula edêntula de cães e os resultados foram avaliados histomorfometricamente após 4 e 7 semanas de cicatrização. Os autores concluíram que o carreador não limitou a reparação óssea e que a combinação deste com os enxertos granulares levou a um aumento da formação óssea nos períodos iniciais da reparação.

Jafarian et al. em 2008 avaliaram a capacidade de regeneração óssea comparando dois tipos de carreadores para células-tronco mesenquimais em defeitos na mandíbula de cães. Os carreadores analisados foram a hidroxiapatita/fosfato-tricálcio β (HA/TCP) e o Bio-Oss esponjoso, que é um osso bovino inorgânico. Os dois materiais foram implantados no músculo masseter e em

defeitos no ângulo mandibular de cães, associado ou não às células-tronco mesenquimais osteoprogenitoras obtidas da medula óssea dos animais. A análise histomorfométrica mostrou maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos grupos que receberam as células osteoprogenitoras. Portanto os substitutos ósseos sintéticos bifásicos associados às células-tronco mesenquimais podem oferecer melhores condições de regeneração óssea que os tradicionais substitutos ósseos.

Pieri et al. (2009) testaram o efeito de células-tronco mesenquimais (MSCs) e plasma rico em plaquetas (PRP) incorporados um carreador de fluorohydroxyapatite (FHA), sobre a reparação óssea em defeitos cilíndricos confeccionados cirurgicamente em rebordos mandibulares de minipigs. Os defeitos foram aleatoriamente preenchidos com osso autógeno, FHA sozinho, PRP-FHA, ou CAM-PRP-FHA. Os resultados sugeriram que a adição de células-tronco ao PRP-FHA aumentou a formação óssea após 3 meses.

Em um estudo desenvolvido por Kim et al., em 2009, foram utilizadas células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal e da medula óssea associados à hidroxiapatita na tentativa de melhorar a reparação alveolar de defeitos ósseos periimplantares. A análise histométrica demonstrou que os defeitos ósseos que receberam as células-tronco, tanto da medula óssea quanto do ligamento periodontal, tiveram maior formação de tecido ósseo que os animais controle.

3. *Proposição*

3. Proposição

O objetivo do presente trabalho foi:

1. Avaliar qualitativamente, a biocompatibilidade e a capacidade de osteointegração de implante/enxerto de um osso bovino composto (osso medular e cortical), liofilizado, desproteinizado, desmineralizado com aglutinante de colágeno bovino, na forma de grânulos de 0,25 a 1.0 mm e de osso autógeno no interior de defeitos ósseos produzidos pela extração dentária em ratos;
2. Estudar o potencial das células-tronco mesenquimais na reparação óssea alveolar comparando seus efeitos sobre matrizes ósseas diferentes;
3. Quantificar histomorfometricamente a reparação óssea pelo enxerto de uma associação de osso autógeno e/ou osso bovino composto (Gen-Mix) e células-tronco mesenquimais nos defeitos ósseos.

4. *Materiais e Métodos*

4. Materiais e Métodos

4.1. ANIMAIS UTILIZADOS

Todos os animais desta pesquisa receberam cuidados humanos de acordo com o critério do Conselho Nacional de Pesquisa e o protocolo do estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética para uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (anexo).

Foram utilizados 108 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), pesando entre 200 a 300 gramas alimentados com ração balanceada 6042 Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo-Paraná, Brasil); composta de farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral, aminoácidos, aditivo antioxidante; água e mantidos em caixas plásticas de 40x32x17 cm em condições controladas de iluminação (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (21°C a 25°C).

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foi administrado previamente um vermífugo de uso animal, durante 3 dias, (Systamex - Shering do Brasil, São Paulo, Brasil).

Os animais foram divididos em 6 grupos:

Controle (c) – o defeito ósseo foi preenchido por sangue;

Osso autógeno (oa) – o defeito ósseo foi preenchido por sangue e osso autógeno;

Gen-Mix (G-mix) – o defeito ósseo foi preenchido por sangue e osso bovino composto (Gen-Mix, Baumer, Mogi Mirim, SP, Brasil);

Célula-tronco (ctr) – o defeito ósseo foi preenchido por sangue e células-tronco;

Osso autógeno + células-tronco (oa+ctr) – o defeito ósseo foi preenchido com osso autógeno associado a células-tronco;

Gen-Mix + células-tronco (G-mix+ctr) - defeito ósseo foi preenchido com osso bovino composto Gen-Mix associado a células-tronco.

4.3. CULTURA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATOS

As células de medula óssea de ratos foram obtidas utilizando o método descrito por MANIATOPOULOS et al. (1988) através de procedimentos realizados no Laboratório de Cultura de Células de Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 06 Ratos jovens variedade Wistar com cinco semanas de idade e pesando entre 100-120 g foram sacrificados e mergulhados em solução de álcool iodado 1%. Foi realizada anti-sepsia com clorexidina 2,5% e gaze esterilizada. Os fêmures foram removidos utilizando campos e instrumentos cirúrgicos esterilizados e armazenados em tubos de vidro de 25 ml com tampa rosqueável contendo 15 ml de meio de lavagem (α -MEM, fungizone e gentamicina, Gibco). Os fêmures foram transportados até a capela de fluxo laminar, lavados com álcool 70% e clorexidina 2,5% (1 minuto cada) em placas de Petri. Após este procedimento, foram realizadas três lavagens (remoção de excesso de tecido mole utilizando lâminas de bisturi nº 15) e uma lavagem em Meio Total Suplementado, que induz a diferenciação de células-tronco em osteoblastos (MTS- α -MEM (Gibco), soro fetal bovino (Gibco), dexametasona (Sigma), ácido ascórbico (Gibco) e β -glicerofosfato (Sigma), segundo ROSA et al. (2003), PITTENGER et al., (1999). Os meios estavam aquecidos a 37°C. Em seguida foram cortadas as epífises dos fêmures com tesoura de ponta romba e a medula óssea lavada utilizando seringa de 20 ml e agulha contendo MTS para coleta em tubos de centrifuga de 50 ml (1 tubo para cada fêmur). A

suspensão de células foi então transferida para garrafas de 75 cm² contendo 10 ml de MTS (Figura 1). As garrafas foram armazenadas em uma incubadora a 37° C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco) e contadas utilizando um hemacitômetro para implantação nos defeitos ósseos (Figura 2).

FIGURA 1: Garrafa contendo células-tronco em MTS.

FIGURA 2: Osteoblastos em cultura de 14 dias em subconfluência (100X).

4.4. EXTRAÇÃO DENTÁRIA

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,2,2-tribromoethanol, ALDRICH-Milwaukee, USA) administrado por via intraperitoneal, na dose de 25 mg/100 gramas de peso corporal. Após sindesmotomia foi extraído o incisivo superior direito com um fórceps adaptado (OKAMOTO, 1964) (Figura 3, 4 e 5). Imediatamente após a exodontia, os alvéolos foram suturados com fio mononylon 4.0 (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brazil) e os animais receberam 0,2 ml de injeção intramuscular de Pentabiótico Veterinário, em dose única (Wyeth-São Bernardo do Campo, SP, Brazil).

FIGURA 3. Instrumentos utilizados para o procedimento cirúrgico.

FIGURA 4. Sindesmotomia, luxação (A) e extração do incisivo superior direito(B).

4.5. IMPLANTE DO MATERIAL

Imediatamente após as exodontias, os animais do grupo oa tiveram o terço médio de seus alvéolos preenchidos com osso autógeno obtido da fragmentação de osso da margem do alvéolo com área = $0,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$. Subsequentemente este osso foi temporariamente imerso em solução salina em placa de Petri, antes da implantação no interior do defeito ósseo (Figura 5). Os animais do grupo G-mix receberam a implantação de osso bovino composto (osso medular e cortical), liofilizado, desproteinizado, desmineralizado com aglutinante de colágeno bovino, na forma de grânulos de 0,25 a 1.0 mm (Gen-Mix, Baumer, Mogi Mirim, SP, Brasil) (Figura 6). Estes grânulos também foram mergulhados em soro fisiológico antes de serem enxertados no alvéolo.

FIGURA 5. Instrumentos utilizados para implante/enxerto dos materiais.

FIGURA 6. Apresentação comercial do Gen-Mix.

Nos grupos tratados com células-tronco, estas foram inseridas no alvéolo dental com o auxílio de uma pipeta automática calibrada a injetar 30 μ l, o que equivale a uma quantidade de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ células em meio de cultura (Figuras 7).

Os fragmentos de osso autógeno e osso bovino granulado foram imersos em solução salina e células-tronco antes da implantação no terço médio dos alvéolos dentais dos animais dos grupos ao+ctr e G-mix+ctr, com o auxílio de uma pinça de ponta fina (osso autógeno – Figura 5) e um porta amálgama especial (osso bovino – Figura 3). Logo em seguida ao procedimento os alvéolos foram suturados para assim manter o material confinado ao defeito ósseo.

FIGURA 7: Células-tronco em meio de cultura e pipeta para implantação (A). Implantação das células-tronco no alvéolo dental (B).

4.6. SACRIFÍCIO E COLETA DE MATERIAL

Completados os períodos em estudo (1, 3 e 6 semanas – $n=6$), os animais foram sacrificados por uma sobredose do mesmo anestésico, suas mandíbulas foram separadas das maxilas, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e a maxila direita foi separada da esquerda através de uma incisão ao nível do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar; um corte com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares possibilitou a obtenção da peça com o alvéolo dentário direito.

4.7. PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

As hemi-maxilas direitas foram imersas em formol a 10% e fixadas, descalcificadas por 4 dias em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 30% (MORSE, 1945), lavadas em 24 horas em água corrente, desidratadas,

diafanizadas e incluídas em parafina e orientadas de maneira a permitir cortes longitudinais de 6 micrômetros de espessura, corados pela hematoxilina-eosina. Foram obtidos 20 cortes distanciados um do outro por um intervalo de 60 μm .

4.8. ANÁLISE HISTOMÉTRICA DOS ALVÉOLOS

Para facilitar o estudo, o alvéolo foi dividido em três terços: apical, médio e cervical. Utilizou-se para a análise quantitativa dos tecidos um microscópio Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar Germany) com uma câmera digital de vídeo Leica DFC 280 (Leica Microsystems Imagig AG, Cambridge, England) do Laboratório de Microscopia do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia de Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As imagens foram processadas por um programa Leica Owin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England) obtendo-se a fração de volume do osso trabecular (%) no interior do alvéolo.

Os cortes histológicos foram focalizados ao microscópio com objetiva de 20x e em cada alvéolo foram analisados 15 campos microscópicos (5 no terço apical, 5 no médio e 5 no cervical, mediante a utilização de uma grade colocada sobre os cortes (Figura 8).

FIGURA 8: Grade sobre as estruturas histológicas.

Essa grade consiste de um quadrado que limita a área teste, contendo 100 cruzamentos das linhas que pode ser utilizada para contar pontos, sobre uma determinada estrutura histológica. Conhecida a área coberta pela grade foi possível estimar a densidade volumétrica do tecido ósseo, nos diferentes períodos do estudo pela contagem de 1500 pontos por alvéolo analisado, correspondente ao produto de 5 campos microscópicos por terço, por 100 pontos (cruzamentos).

A fração de volume das diferentes estruturas foi estimada seguindo a fórmula da densidade volumétrica (Dv)

$$Dv = \frac{Pe}{Pt} \times 100$$

Pe = pontos na estrutura

Pt = pontos totais

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os resultados dos grupos foram realizadas pelos testes estatísticos não paramétrico de Mann-Whitney (comparações 2 a 2) e de Kruskal-Wallis (comparações múltiplas), considerando significativamente diferentes os grupos com $p \leq 0,05$ (SIEGEL, 1975).

5. Resultados

5. Resultados

5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

5.1.1. 7 DIAS

Nos cortes histológicos dos alvéolos dos animais **controles** observou-se um preenchimento parcial com tecido conjuntivo cicatricial rico em fibroblastos, capilares e osso neoformado. No interior do alvéolo visualizou-se delicadas trabéculas ósseas imaturas circundadas por osteoblastos, entremeadas com massas de coágulo em organização, principalmente no terço médio (Figura 9A).

Nos animais implantados com **células-tronco** observou-se um preenchimento do alvéolo com tecido conjuntivo cicatricial denso rico em fibroblastos com presença de capilares. No interior do defeito as trabéculas ósseas imaturas encontravam-se circundadas por osteoblastos (Figura 9B).

As avaliações histológicas demonstraram a presença do fragmento de osso implantado, que não foi reabsorvido, localizado no terço médio do alvéolo dos animais do grupo **osso autógeno** sem nenhuma reação inflamatória de corpo estranho. Na superfície do remanescente do implante observava-se deposição de osso novo circundado por um tecido conjuntivo imaturo (Figura 10A).

Foi verificada a presença do fragmento de osso implantado, localizado no terço médio do alvéolo dos animais do grupo da associação entre **células-tronco e osso autógeno** sem nenhuma reação inflamatória de corpo estranho. Ao redor do fragmento, que não apresentava sinais de reabsorção, foi possível observar osso neoformado juntamente com tecido conjuntivo fibroso cicatricial (Figura 10B).

Os alvéolos dos animais que receberam enxerto com o **osso bovino** mostraram uma maior quantidade de tecido conjuntivo, menor número de trabéculas que estavam envolvidas por um grande volume de coágulo em organização quando comparado aos animais controles. No terço médio e cervical do alvéolo foi verificada a presença do material que foi implantado. Os grânulos de osso bovino encontravam-se envolvidos por tecido conjuntivo e por poucas trabéculas ósseas (Figura 11A).

Os animais enxertados com **células-tronco e o osso bovino** apresentaram, no defeito ósseo, uma grande quantidade de tecido conjuntivo, principalmente ao redor dos grânulos de osso bovino, e trabéculas ósseas imaturas em menor quantidade que nos grupos anteriores. Em todo terço médio e cervical do alvéolo, onde havia a presença do material implantado, não foi detectada reação de corpo estranho (Figura 11B).

5.1.2. 21 DIAS

Neste período foi possível observar, nos terços apical e cervical dos alvéolos dos animais **controles**, que as trabéculas ósseas apresentavam-se espessas com grande quantidade de matriz óssea envolvida por osteoblastos e pequena quantidade de tecido conjuntivo (Figura 12A).

Nos animais que receberam enxerto somente de **células-tronco** foi possível observar, em todos os terços, aumento da espessura das trabéculas ósseas circundadas por osteoblastos, mas ainda permanecia a presença de pequena quantidade de tecido conjuntivo (Figura 12B).

No alvéolo dos animais que receberam **osso autógeno** observou-se ao redor do fragmento de osso uma maior quantidade de neoformação óssea em substituição ao tecido conjuntivo maduro existente (Figura 13A).

Na associação de **células-tronco e osso autógeno**, evidenciou-se ao redor do fragmento de osso, uma maior quantidade de osso neoformado em substituição ao tecido conjuntivo maduro (Figura 13B).

Os animais implantados com **osso bovino** apresentaram trabéculas ósseas mais espessas em todas as regiões do alvéolo, mas ainda circundadas por grande quantidade de tecido conjuntivo e massas de coágulos. Também neste período foram encontrados, no terço médio e cervical, os grânulos do material implantado, agora envolvidos por uma maior quantidade de tecido ósseo, porém ainda com um grande volume de tecido conjuntivo (Figura 14A).

Os alvéolos dos animais implantados com **células-tronco e osso bovino** apresentavam trabéculas ósseas mais espessas em todas as regiões do alvéolo, mas ainda circundadas por grande quantidade de tecido conjuntivo. No terço médio e cervical, os grânulos do material implantado, estavam envolvidos por uma quantidade maior de tecido ósseo que no período anterior (Figura 14B).

5.1.3. 42 DIAS

Nos animais **controles** o trabeculado ósseo era espesso principalmente no terço cervical do alvéolo, e foi possível observar grande quantidade de matriz óssea com pouco tecido conjuntivo (Figura 15A).

Em toda extensão do alvéolo dos animais implantados com **células-tronco** as trabéculas ósseas apresentavam-se mais espessas. No terço cervical esta observação ficou mais evidente, com grande volume de tecido ósseo e pequena quantidade de tecido conjuntivo (Figura 15B).

Nesse período os fragmentos de **osso autógeno** permaneceram sem reabsorções e circundados por tecido ósseo com trabeculado mais espesso (Figura 16A).

No grupo de **células-tronco e osso autógeno**, os fragmentos de osso continuaram sem reabsorções e, na sua periferia, o tecido ósseo apresentava-se com trabéculas mais espessas e volume maior que no período anterior (Figura 16B).

Já os animais que receberam **osso bovino** tiveram o volume de tecido ósseo aumentado, porém ainda foi possível observar grande quantidade de tecido conjuntivo entre as trabéculas ósseas. No terço médio e cervical o material implantado permaneceu envolvido por um tecido ósseo mais maduro, mas ainda com grande quantidade de tecido conjuntivo (Figura 17A).

Os defeitos preenchidos com **células-tronco** associadas a **osso bovino**, apresentavam um volume de tecido ósseo maior que no período anterior, mas ainda com presença de tecido conjuntivo entre as trabéculas ósseas. Entre o material implantado havia tecido ósseo mais maduro e uma quantidade ainda muito intensa de tecido conjuntivo fibroso (Figura 17B).

Figura 9. Corte histológico do alvéolo de ratos grupo controle (A) e implantados com células-tronco (B), **7 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, TON – tecido ósseo neoformado, CS – coágulo sanguíneo, HE, A - 250X, B – 500X.

Figura 10. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos implantados com osso Autógeno (A) e osso autógeno + células-tronco (B), **7 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OA – osso autógeno, TON – tecido ósseo neoformado, CS – coágulo sanguíneo. Seta mostra interface entre osso neoformado e implantado, HE, A- 250X, B – 125X.

Figura 11. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos grupo Gen-Mix (A) e Gen-MIX + células-tronco (B), **7 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OB – osso bovino, TON – tecido ósseo neoformado. As setas indicam a interface entre o material e o tecido vizinho, HE, A- 125X, B – 250X.

Figura 12. Corte histológico do alvéolo de ratos grupo controle (A) e implantado com células-tronco (B), **21 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, TON – tecido ósseo neoformado, HE, A - 250X, B – 500X.

Figura 13. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos implantados com osso Autógeno (A) e osso autógeno + células-tronco (B), **21 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OA – osso autógeno, TON – tecido ósseo neoformado. Seta mostra interface entre osso neoformado e implantado, HE, A- 125X, B – 250X.

Figura 14. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos grupo Gen-Mix (A) e Gen-MIX + células-tronco (B), **21 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OB – osso bovino, TON – tecido ósseo neoformado. As setas indicam a interface entre o material e o tecido vizinho, HE, A- 250X, B – 125X.

Figura 15. Corte histológico do alvéolo de ratos grupo controle (A) e implantado com células-tronco (B), **42 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, TON – tecido ósseo neoformado, HE, A - 250X, B – 250X.

Figura 16. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos implantados com osso autógeno (A) e osso autógeno + células-tronco (B), **42 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OA – osso autógeno, TON – tecido ósseo neoformado. Seta mostra interface entre osso neoformado e implantado, HE, A- 125X, B – 125X.

Figura 17. Corte histológico do terço médio do alvéolo de ratos grupo Gen-Mix (A) e Gen-MIX + células-tronco (B), **42 dias** após a extração dental. TC – tecido conjuntivo, OB – osso bovino, TON – tecido ósseo neoformado. As setas indicam a interface entre o material e o tecido vizinho, HE, A- 250X, B – 250X.

5.2. RESULTADOS HISTOMÉTRICOS

Na tabela 1 estão expressos os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de tecido ósseo em todo o alvéolo dos animais controles, implantados com osso autógeno e com Gen-Mix no período de 7, 21 e 42 dias após a extração dental.

No período de 7 dias a comparação entre os grupos controle, osso autógeno e Gen-mix mostra maior formação óssea no alvéolo dos animais implantados com osso autógeno.

Tabela 1: Média aritmética e erro padrão da média do volume percentual de tecido ósseo em todo alvéolo dos animais controles (c), implantados com osso autógeno (ao) e Gen-Mix (G-mix), nos períodos de 7, 21 e 42 dias após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney. (n=6)

Tecido Ósseo			
Período	Grupos		
	c	oa	G-mix
7	34,66 ± 1,76	45,66 ± 10,03	24,33 ± 2,02
21	57,33 ± 2,66	53,66 ± 3,52	35,66 ± 2,40
42	64,33 ± 2,02	69,66 ± 0,88	43,00 ± 3,21

A tabela 2 mostra os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de tecido ósseo em todo alvéolo dos animais implantados com células-tronco e a associação de células-tronco com osso autógeno e osso bovino (Gen-Mix) no período de 7, 21 e 42 dias após a extração dental.

Os números da tabela expressam que no período de 7 e 21 dias houve uma maior quantidade de formação óssea nos animais implantados com a associação de células-tronco e osso autógeno, quando comparados aos demais grupos.

Tabela 2: Média aritmética e erro padrão referentes ao volume percentual de tecido ósseo em todo alvéolo dos animais implantados com células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr + oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+ G-mix), nos períodos de 7, 21 e 42 dias após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney. (n=6)

Tecido Ósseo			
Período	Grupos		
	ctr	ctr + oa	ctr + G-mix
7	38,00 ± 7,50	51,33 ± 1,45	30,67 ± 1,76
21	52,33 ± 2,33	72,33 ± 0,33	39,33 ± 3,75
42	70,33 ± 2,84	76,66 ± 1,45	54,33 ± 5,04

Na figura 18 estão representados em gráfico os valores médios e os erros padrões (valores dentro dos cilindros) do volume percentual de tecido ósseo do alvéolo total dos animais dos grupos controle e implantados com osso autógeno (ao), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco e osso autógeno (ctr+ao) e células-tronco e Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **7 dias**. A figura evidencia que a associação de células-tronco e osso autógeno produziu uma maior formação óssea quando comparados aos demais grupos.

Figura 18 – Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controles (c) e implantados com osso autógeno (ao), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+ao) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **7 dias**. N=6

A tabela 3 representa a comparação entre os 6 grupos, no período de **7 dias**, e a significância estatística com a aplicação do teste de Kruskal Wallis.

Tabela 3: Comparações entre os grupos controle (c), osso autógeno (oa), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **7 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. NS - não significativo.

Grupos	7 dias
c x G-mix	ns
c x oa	1%
c x ctr	ns
c x ctr + oa	0,1%
c x ctr + G-mix	ns
G-mix x oa	0,1%
G-mix x ctr	5%
G-mix x ctr +oa	0,1%
G-mix x ctr +G-mix	ns
oa x ctr	ns
oa x ctr + oa	5%
oa x ctr + G-mix	5%
ctr x ctr + oa	1%
ctr x ctr + G-mix	ns
ctr + oa x ctr + G-mix	0,1%

A figura 19 representa os valores médios e os erros padrões (dentro dos cilindros) do volume percentual de tecido ósseo do alvéolo total dos animais dos grupos controle e implantados com osso autógeno (oa), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **21 dias**. A associação de célula-tronco + osso autógeno mostrou mais efetiva na reparação óssea em comparação aos outros grupos estudados.

Figura 19 – Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controles (c) e implantados com osso autógeno (oa), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **21 dias**. N=6.

A tabela 4 representa a comparação entre os 6 grupos, no período de **21 dias**, e a significância estatística com a aplicação do teste de Kruskal Wallis.

Tabela 4: Comparações entre os grupos controle (c), osso autógeno (oa), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **21 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Kruskal-Wallis. NS – não significativa.

Grupos	21 dias
c x G-mix	0,1%
c x oa	ns
c x ctr	5%
c x ctr + oa	0,1%
c x ctr + G-mix	0,1%
G-mix x oa	0,1%
G-mix x ctr	1%
G-mix x ctr +oa	0,1%
G-mix x ctr +G-mix	ns
oa x ctr	ns
oa x ctr + oa	0,1%
oa x ctr + G-mix	0,1%
ctr x ctr + oa	0,1%
ctr x ctr + G-mix	0,1%
ctr + oa x ctr + G-mix	0,1%

O gráfico da figura 20 representa os valores médios e os erros padrões (dentro dos cilindros) do volume percentual de tecido ósseo do alvéolo total dos animais dos grupos controle e implantados com osso autógeno (ao), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco e osso autógeno (ctr+ao) e células-tronco e Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **42 dias**.

Figura 20 – Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controles (c) e implantados com osso autógeno (ao), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+ao) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **42 dias**. N=6.

A tabela 5 representa a comparação entre os 6 grupos, no período de **42 dias**, e a significância estatística com a aplicação do teste de Kruskal Wallis.

Tabela 5: Comparações entre os grupos controle (c), osso autógeno (oa), Gen- Mix (G-mix), células-tronco (ctr), células-tronco + osso autógeno (ctr+oa) e células-tronco + Gen-Mix (ctr+G-mix) no período de **42 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Kruskal-Wallis.NS – não significante.

Grupos	42 dias
c x G-mix	0,1%
c x oa	ns
c x ctr	5%
c x ctr + oa	0,1%
c x ctr + G-mix	5%
G-mix x oa	0,1%
G-mix x ctr	0,1%
G-mix x ctr +oa	0,1%
G-mix x ctr +G-mix	ns
oa x ctr	ns
oa x ctr + oa	1%
oa x ctr + G-mix	0,1%
ctr x ctr + oa	5%
ctr x ctr + G-mix	0,1%
ctr + oa x ctr + G-mix	0,1%

6. *Discussão*

6. Discussão

A reparação tecidual é um dos fenômenos mais interessantes que ocorrem nos organismos vivos. Deve-se ter em mente que este não é um processo isolado, mas faz parte de uma série complexa de eventos biológicos. A reparação dos tecidos biológicos é considerado uma fase da reação inflamatória, de vez que não pode ser separado dos fenômenos vasculares e celulares que ocorrem em resposta a uma agressão.

O processo de reparação consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é dinâmico envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. Inclui diversos processos, como coagulação, inflamação, depósito de substâncias e síntese de matriz, a angiogênese, fibroplasia, a epitelização, a retração da lesão e remodelação (MANDELBAUM, 2003).

O início da coagulação é imediato após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. A formação do coágulo serve para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, são eles os

responsáveis pela fagocitose das bactérias (WERNER & GROSE, 2003). O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase, permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, debrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. Alta atividade fagocitária dos macrófagos é observada após trauma. Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana, seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a fagocitose e fagocitose de corpos estranhos e bactérias. Os mediadores mais freqüentes são: Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF); Fatores de Crescimento Transformadores ($TGF-\beta$ e $TGF-\alpha$); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Complementos plasma-ativados C3 e C5a (toxinas anafiláticas), eles conduzem a multiplicação das células endoteliais, produzindo novos vasos sanguíneos (angiogênese), duplicando células musculares lisas e sintetizando matriz. Muitos fatores que influem no processo de reparação tecidual são secretados pelos macrófagos, como TGFs, citocinas e interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e PDGF (MANDELBAUM, 2003; WERNER & GROSE, 2003).

Na seqüência final está a proliferação, que é o fechamento do processo com a presença do tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia e formação da matriz, que no tecido ósseo finaliza com a formação do osteóide e mineralização.

O processo de reparação de feridas de extração dental, ou processo de reparação alveolar, refere-se ao conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo, em seguida à exodontia. Tem sido estudado detalhadamente, visto que dentre os procedimentos cirúrgicos, as exodontias ocupam posição de destaque nos consultórios odontológicos (JOHANSEN, 1970).

O organismo tem como objetivo, frente a um traumatismo após a extração dental, preencher com tecido ósseo o espaço deixado no alvéolo. Este fenômeno apresenta a mesma seqüência das respostas reparativas observadas em outras regiões, com algumas particularidades locais (PERRI DE CARVALHO & OKAMOTO, 1987).

A cicatrização de uma ferida de extração dental, que é a ferida óssea mais comum na cavidade oral, é uma extensão única de tecido conjuntivo cicatricial, pois a formação de novo osso depende da deposição de cristais de hidroxiapatita ao longo das fibras colágenas em uma matriz de proteoglicanas chamada osteóide (KURITA et al., 1985). A mineralização do alvéolo dentário se dá a partir do terço apical em direção ao cervical e das paredes alveolares para o centro (SANTOS PINTO, 1964). O epitélio da mucosa gengival prolifera sobre o coágulo organizado e/ou sobre o tecido conjuntivo jovem, na tentativa de restabelecer a continuidade da cobertura epitelial do rebordo alveolar. A reparação alveolar se completa quando o alvéolo dentário apresentar-se preenchido por trabéculas ósseas espessas e espaços medulares diminutos, e a crista alveolar remodelada (ALVES & OKAMOTO, 1989).

A compreensão do processo de reparação no organismo é de grande importância na busca de materiais que possam interferir favorecendo a restauração tecidual de maneira rápida e adequada.

As horas seguintes à extração são críticas, pois qualquer distúrbio local ou sistêmico sobre o coágulo, no sentido de desorganizá-lo, pode retardar consideravelmente a reparação alveolar. A colocação de qualquer material no interior de alvéolos dentais é encarada como um distúrbio local pelo organismo podendo, portanto, resultar em atraso, mais ou menos acentuado, na cronologia do processo de reparação. Os implantes intra-alveolares normalmente perturbam a organização do coágulo e lesam o ligamento periodontal remanescente (CARVALHO & OKAMOTO, 1978).

O restabelecimento do volume ósseo pode ser obtido através de diversos materiais de implante/enxerto. Segundo Ellis III (2001), o enxerto ideal deveria ter as características estruturais de um enxerto em bloco e o potencial osteogênico de um enxerto ósseo esponjoso-medular em partículas, fornecendo altas concentrações de células osteogênicas.

São denominados biomateriais, aqueles materiais que são colocados em contato com sistemas biológicos e apresentam habilidade de interagir apropriadamente com o hospedeiro em uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987; VAN NOORT, 1994).

O objetivo na utilização dos biomateriais é a combinação de uma reparação rápida com capacidade de ser reabsorvido durante a remodelação óssea (LANGSTAFF et al., 2001) ou osseointegrado ao tecido. Os biomateriais são considerados:

Implantes quando são dispositivos destituídos de células vivas para uma permanência por um período significativo de tempo.

Enxertos quando são fragmentos de tecido com vitalidade que serão transferidos de um doador para um receptor.

Transplantes quando são órgãos ou tecidos completos que serão transferidos para restabelecer a função orgânica (PERRI de CARVALHO et al., 2004).

Os enxertos são divididos em:

Autógenos ou autólogos quando um tecido é transferido de uma posição para outra no mesmo indivíduo.

Alógenos, homógenos ou homólogos quando um tecido é transplantado de outro indivíduo da mesma espécie.

Xenógenos, heterólogos ou heterógenos quando um tecido é transplantado de espécie diferente do receptor.

Materiais aloplásticos que é um biomaterial de origem sintética ou quase totalmente sintética (CARDOSO & GONÇALVES, 2002; PERRI de CARVALHO et al., 2004).

Estes materiais ainda podem ser classificados quanto à relação que estabelecem com o tecido ósseo em: osteocondutores, osteoindutores, osteogênicos e osteopromotores.

Osteocondutores quando funcionam como um arcabouço de suporte para adesão e proliferação de células osteoblásticas que logo formarão tecido ósseo.

Osteoindutores quando estimulam as células mesenquimais a se diferenciarem em células osteogênicas.

Osteogênicos produzem formação óssea derivada de células formadoras de osso contidas nele próprio.

Osteopromotores são aqueles que se constituem em barreiras físicas (membranas) para o isolamento do local em reparação, visando à seleção de um tipo particular de células para promover a reparação, ao mesmo tempo em que

exclui células concorrentes inibitórias (MOORE et al., 2001; CARDOSO & GONÇALVES, 2002; PERRI de CARVALHO et al., 2004; CALIXTO, 2005).

Diversos materiais para implante, cada um com suas propriedades próprias, são utilizados na tentativa de acelerar a reparação óssea. Muitos destes materiais quando usados sozinhos apresentam efeitos limitados ou variáveis sobre a reparação óssea e, em alguns casos com desvantagens específicas. Por esta razão, muitos clínicos e/ou pesquisadores tem combinado materiais para encontrar uma associação que apresente maior eficiência na reparação óssea (COCHRAN et al., 2003, PRATA et al., 2007, CALIXTO et al., 2007; WU et al., 2008).

Neste trabalho avaliou-se através da histologia e histometria a reparação óssea do defeito ósseo produzido pela extração dentária utilizando como implante/enxerto uma associação do osso autógeno e osso bovino com células-tronco.

O osso autógeno é, ainda, a referência “gold standard” devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico (SANADA et al., 2003), atuando por osteoindução e osteocondução (ELLIES 1992), promovendo estímulo e aposição de tecido ósseo a partir do osso já existente, atuando como modelo para a neoformação óssea (MANSO & LANG, 1997).

Age inicialmente preenchendo o espaço vazio no defeito, enquanto prossegue o ciclo osteoclástico, em seguida os osteoblastos iniciam o processo de formação óssea (ELLIES, 1992). Manso e Lang (1997) descrevem com clareza as fases osteogênicas da reparação em um enxerto autógeno em que destaca dois importantes tempos. No primeiro, há a proliferação e diferenciação das células enxertadas com deposição de tecido osteóide e produção de trabeculado composto. Nessa fase acontece a revascularização do osso enxertado por angiogênese

periférica. Em um segundo tempo, normalmente, a partir da segunda semana, há o predomínio da diferenciação das células mesenquimais do leito receptor em osteoblastos (osteoidução). Esta fase torna-se dominante durante as próximas 4 a 5 semanas após o transplante. Ainda na segunda fase, os osteoclastos derivados dos monócitos circulantes começam a aparecer no osso enxertado, promovendo reabsorção, que, juntamente com as aposições formam um fenômeno denominado como “substituição aposicional”.

Contendo em sua matriz inorgânica, osteócitos, osteoclastos, osteoblastos e proteínas osteogênicas, o osso autógeno apresenta potencial para osteogênese quando usado como enxerto para melhorar ou corrigir defeitos ósseos (BLOCK & KENT, 1997).

Para um enxerto ser considerado favorável torna-se necessário algumas características ideais que o osso autógeno apresenta como um substituto ósseo, que são: livre de transmissão de doenças, biocompatibilidade, radiopacidade, microporosidade, estimular a indução óssea, reabsorver em período comparativo ao da formação óssea, ser substituído por tecido ósseo, fácil de ser obtido e manipulado, agir como matriz ou veículo para outros materiais e ter baixo custo (GROSS, 1997).

Nas técnicas cirúrgicas, os sítios doadores mais frequentemente usados para obtenção de enxertos de osso compacto e poroso podem ter origem extra-oral (crista ilíaca, calota craniana e tíbia) ou intra-oral (mento, tuberosidade da maxila, ramo ascendente da mandíbula e áreas desdentadas) (CARDOSO & GONÇALVES, 2002).

Segundo Khan et al. (2005) a incorporação do enxerto de osso autógeno na área receptora depende de vários fatores, como: tipo de enxerto (vascular ou

avascular), local do sítio doador, qualidade do osso transplantado e do osso receptor, preparação área receptora, doenças locais e sistêmicas e propriedades mecânicas do enxerto.

Neste trabalho, o exame histológico dos alvéolos dos animais enxertados com osso autógeno, mostrou um padrão normal de reparação, apresentando característica similar aos da literatura, incluindo aquelas do nosso laboratório (BRENTAGANI et al., 1996 e 1997; LAMANO CARVALHO et al., 1997; BOMBONATO-PRADO, 2002; CALIXTO, 2005; BALABANIAN, 2005, PRATA et al., 2007). A análise mostrou que o material enxertado é biocompatível, e foi progressivamente integrado ao osso alveolar no processo de reparação óssea.

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que o osso autógeno produziu um aumento na formação óssea em relação aos animais controles, embora com significância estatística somente no período de 7 dias (tabela 3).

Estudos documentam a capacidade do osso autógeno na reparação óssea em defeitos ósseos (ZIJDERVELD et al., 2005; LEUNG & JIN, 2003; COCHRAN et al., 2003; BLOCK & KENT 1997).

Existem vantagens na utilização de um enxerto xenogênico. A disponibilidade e baixo custo, aliados a processamentos adequados que minimizam os riscos de transmissão de infecções, tem levado empresas brasileiras, canadenses e européias a produzirem osso bovino para uso médico e odontológico (AICHELMANN-REIDY & YUKNA, 1998; SANADA et al., 2003).

O osso inorgânico de origem bovina é um material considerado osteocondutor (SICCA et al., 2000). Quando é poroso, permite que o tecido conjuntivo neo-formado penetre por esses poros, facilitando o processo de reabsorção (ZAMBUZZI et al., 2005), conforme já foi demonstrado em experimentos com períodos mais

prolongados (RUMPEL et al., 2006). Oliveira et al., em 1999, utilizaram osso bovino desproteinizado (Gen-Ox - BAUMER) em subcutâneos de ratos, e concluíram que podem ser usados como materiais de preenchimento e também como potenciais carreadores das proteínas morfogenéticas do osso. O osso bovino desmineralizado seja na forma de micro ou macro partículas, não tem, também, capacidade osteoindutora, atuando apenas como substância osteopreenhedora (CARNEIRO et al., 2005, SANADA et al., 2003).

Muitos ossos substitutos, como os ossos bovinos, requerem longos períodos para serem reabsorvidos, determinando um fluxo contínuo de células gigantes multinucleadas (TADJOEDIN et al., 2000), próximos à superfície do material ou sobre as paredes do material implantado (KURASHINA et al., 2002; CARNEIRO et al., 2005).

O enxerto xenogênico produz um crescimento ósseo lento devido a sua pobreza em células osteogênicas (KRZYMANSKI et al., 1997). Em um estudo clínico, Simon et al. (2007) utilizaram osso autógeno e osso bovino na proporção de 1:1 na técnica de regeneração óssea guiada para aumento de rebordos alveolares juntamente com a colocação de implantes. A análise histológica e histométrica foram feitas através de biópsias e os autores concluíram que a osseointegração ocorre depois de um período de pelo menos 6 meses. Em contrapartida, um outro trabalho experimental em cães, constatou que o uso de uma associação entre osso bovino e um oligopeptídeo sintético em defeitos ósseos, promoveu um aumento na formação óssea após 4 semanas do ato cirúrgico (PARK et al., 2007).

Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) é um enxerto de osso bovino inorgânico semelhante estrutural e quimicamente ao material utilizado no presente trabalho, e tem sido testado na clínica médica e odontológica desde os

anos 90 com resultados que levaram a enaltecer suas propriedades de biocompatibilidade, osseointegração e osteocondução (CARDAROPOLI et al., 2005; ORSINI et al., 2005). Alguns estudos relatam sinais de reabsorção das partículas de Bio-Oss (BERGLUNDH & LINDHE, 1997; HURZELER et al., 1997; HAMMERLE et al., 1998; YILDIRIM et al., 2000; KARABUDA et al., 2001; SARTORI et al., 2003), enquanto outros tem mencionado a sua ausência (VALENTINI et al., 1997; HALLMAN et al., 2002; MERKX et al., 2003). Tem sido descrito também a presença de osteoblastos ao redor das partículas de Bio-Oss (HURZELER et al., 1998; KARABUDA et al., 2001; MERKX et al., 2003; STAVROPOULOS et al., 2004). Outros pesquisadores não observaram a presença de osteoclastos (ARTZI et al., 2000), enquanto outros acreditam que a despeito da ausência de osteoclastos, o crescimento de osso poderia indicar uma reabsorção lenta do material (YILDIRIM et al., 2000). O potencial de reabsorção do osso bovino poderia ser confirmado pelo aumento progressivo no volume relativo de osso ao longo de um período de 10 anos (SARTORI et al., 2003).

Tanto análises clínica quanto histológica em humanos sugeriram que este seria o material ideal para preenchimento do alvéolo após extração dentária (CAUWELS & MARTENS, 1999), correção de altura de rebordo (CALLAN & ROHRER, 1993) e defeitos ósseos periodontais (MELLONIG, 2000). Em um desses trabalhos, após 20 meses de cirurgias para aumento de assoalho de seio com o uso de osso bovino, foi observado em biópsias que o material não interferiu no processo de reparação e que promoveu nova formação óssea (ORSINI et al., 2007). Stavropoulos et al. (2003), entretanto tem enfatizado que a maioria dos trabalhos clínicos são descritivos e vagos, sem um controle adequado, com conclusões imprecisas, baseadas simplesmente em dados clínicos e radiográficos.

Nesta pesquisa, a utilização de enxerto de osso bovino composto (Gen-mix), nos alvéolos dos animais causou retardo significativo na reparação alveolar como mostram as tabelas 1, 4 e 5. Apesar disso não foram observadas nenhuma reação de corpo estranho nas regiões próximas aos implantes.

Este resultado reafirma que o implante ósseo bovino não apresentou a propriedade osteoindutora sugerida por alguns relatos da literatura e, portanto deve ter atuado apenas como uma superfície osteocondutora, e corrobora as observações clínicas de Richardson et al. (1999), que compararam os efeitos do preenchimento de defeitos periodontais humanos com implantes ósseos bovino (Bio-Oss®) ou homogêneo orgânico, e mostraram que houve resultados semelhantes entre os dois grupos.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam aqueles de outros estudos utilizando osso bovino em reparo alveolar de ratos (ORSINI et al., 2005; CARDAROPOLI et al., 2005; CALIXTO et al., 2007), que observaram um retardo na formação óssea, apesar da boa biocompatibilidade do material. Alguns trabalhos, entretanto, tem demonstrado induzir uma intensa e persistente reação inflamatória no alvéolo de ratos após extração dentária, consequentemente atrasando a reparação alveolar (OKAMOTO et al., 1994; OKAMOTO et al., 1999).

Recentemente a engenharia tecidual óssea tem sido utilizada como uma estratégia para a regeneração óssea porque pode abastecer o defeito com um volume ósseo adequado e um potencial regenerativo satisfatório (YAMADA et al., 2004; ABUKAWA et al., 2004; LI & LI, 2005; ITO et al., 2006).

As células-tronco são um tipo de células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de multiplicar-se se mantendo indiferenciadas por longos períodos (tanto *in vitro* como *in vivo*), mas que diante de estímulos

específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos, ou seja, são capazes de se auto-renovarem e dar origem a células especializadas. (ZAGO & COVAS, 2006).

Em essência as células-tronco quando ativadas por algum sinal ou evento podem deixar seu estado de repouso e avançar no ciclo celular, dando origem a 2 tipos celulares diferentes, o que é conhecido como divisão celular assimétrica. Um tipo celular mantém as características da célula-mãe permanecendo indiferenciadas, repondo o *pool* de células-tronco local, propriedade esta conhecida como auto-renovação. O outro tipo celular se prolifera por divisão simétrica dando origem as células progenitoras, que têm a capacidade de se diferenciarem em células especializadas, como osteoblastos, formando tecidos maduros (ZAGO & COVAS 2006; MUSCHLER et al. 2003). As células-tronco e as células progenitoras estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos normais e são fundamentais para sua saúde, manutenção e resposta a lesões ou doenças durante a vida. De acordo com Bianco et al. (2001), estas células são a fonte de todos os tecidos novos formados pelos sistemas de reparo e remodelação e são moduladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência.

Quanto à origem as células-tronco podem ser classificadas em: embrionárias e adultas.

Nos períodos iniciais após a fecundação (4º ou 5º dia) o “embrião” (neste momento chamado blastocisto) contém uma camada externa e uma massa celular interna. As células da massa interna vão dar origem ao feto e a parte dos tecidos extrafetais (âmnio e alantóide), ao passo que a camada externa de células (trofoectoderma) vai originar alguns tecidos restritos a placenta. Estas células da

massa celular interna podem ser retiradas e cultivadas, dando origem a linhagens de células-tronco embrionárias, que têm capacidade de diferenciar-se nos diversos tecidos do adulto. A célula-tronco adulta ou somática é um tipo de célula obtida de tecidos após a fase embrionária (feto, recém-nascido, adulto). Até agora, estas células isoladas em humanos são tecido-específicas, ou seja, têm capacidade de diferenciação limitada a um único tipo de tecido ou a alguns poucos tecidos relacionados. Hoje está bem demonstrado que numerosos tecidos humanos (ou talvez todos) têm células-tronco, que constituem uma reserva da qual o organismo lança mão para repor células maduras desgastadas ou quando ocorre lesão ou remodelação dos tecidos. Assim são bem conhecidas as células-tronco de pele, da mucosa intestinal, do epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões, músculo esquelético, músculo cardíaco, sangue de placenta e de cordão umbilical, medula óssea e sangue periférico (ZAGO & COVAS, 2006).

Quanto à capacidade de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em: - Totipotentes, quando têm a capacidade de se diferenciarem em todos os tecidos do corpo humano, incluindo anexos embrionários; Pluripotentes, quando são capazes de se diferenciarem em todos os tecidos do corpo humano, exceto placenta e anexos embrionários; Oligopotentes, quando se diferenciam em apenas alguns tecidos do corpo humano; e Unipotentes, quando se diferenciam em apenas um único tipo celular (ZAGO & COVAS, 2006).

A medula óssea é o sítio doador mais usado clinicamente para a obtenção de células-tronco. Ela pode ser caracterizada como um órgão composto por dois sistemas principais que originam linhagens celulares distintas: células-tronco hematopoiéticas, que dão origem as células sanguíneas e às do sistema imune, e as

células-tronco do estroma (mesenquimais), que podem formar osso, cartilagem, gordura e tecido muscular (BIANCO 2001).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são facilmente isoladas de aspirados da medula óssea obtidos da crista ilíaca superior, da tíbia, do fêmur e da coluna vertebral lombar e torácica de humanos e de grandes mamíferos. (DIGIROLAMO et al., 1999; MURPHY et al., 2003). A partir de todas estas fontes, o procedimento de isolamento e cultura das CTM é muito semelhante, envolvendo uma fase inicial de separação das células mononucleares em gradiente de densidade, seguida do plaqueamento e incubação com meio essencial mínimo suplementado com 10% a 20% de soro bovino fetal. O potencial de expansão *in vitro* das CTM é variável, algumas preparações crescem por mais de 20 ciclos de duplicação celular sem sinais de senescência e outras não suportando mais do que a quatro ciclos. (BRUDER et al., 1997; DIGIROLAMO et al., 1999).

A diferenciação osteogênica das CTM requer a presença de indutores que incluem betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias as células mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio (ZAGO & COVAS, 2006).

Segundo Muschler e Midura em 2002, o objetivo do transplante de células-tronco mesenquimais é compensar a deficiência no número e/ou atividade das células reparadoras no local interessado, que pode ocorrer por traumatismos prévios, infecção, irradiação ou deficiência vascular. Este procedimento pode melhorar o desempenho dos enxertos osteocondutivos e osteoindutores, mesmo nos locais envolvidos por tecidos saudáveis. Deste modo, mesmo o processo cicatricial de

tecidos normais pode ser prejudicado pela baixa concentração das células-tronco mesenquimais (MUSCHLER et al. 2003).

No presente estudo, a utilização de CTM na reparação alveolar levou a um aumento significativo na formação óssea em relação aos animais controles (tabelas 4 e 5). Muitos trabalhos comprovam a importância do fornecimento adicional de células-tronco em locais com formação óssea prejudicada, sendo a medula óssea o sítio mais comumente usado na obtenção destas células (PALEY, 1988; GRUNDEL, 1991; KADYIALA, 1997; DE KOK, 2003, YAMADA et al., 2004; MAREI et al., 2005).

Vários autores acreditam que células-tronco isoladas não podem formar novo tecido sozinhas, pois dependem de uma ancoragem e requerem um ambiente específico que inclui a presença de um material para agir como um suporte para ocorrer o crescimento (ORBAN et al., 2002; HODDE, 2002; YAMADA et al., 2004). Em um trabalho experimental em camundongos, os autores concluíram que para melhorar a regeneração óssea em nível celular é importante procurar células-tronco de variedade osteoprogenitora. No estudo foi revelado que o implante de células derivadas do osso alveolar e sua matriz extracelular podem resultar em nova formação óssea. Os resultados também mostraram que este enxerto tem uma influência osteoindutiva nos tecidos circundantes, recrutando células e induzindo sua diferenciação em osteoblastos (XIAO et al., 2003). A arquitetura de suporte contribui significativamente para o desenvolvimento de funções biológicas específicas no tecido e está embasada para abastecer com uma nutrição apropriada e uma organização espacial para o crescimento celular (SHALABY & JOHNSEN, 1994; MIDDLETON & TIPTON, 1998).

Neste experimento, a associação de células-troco com o osso autógeno promoveu, com superioridade significativa em relação a todos os outros grupos, um aumento na formação de tecido ósseo. A utilização das CTMs com osso bovino mostrou resultados melhores do que quando o osso bovino foi implantado sozinho, mas não foram tão animadores quanto à associação anterior (figura 19, tabelas 4 e 5). Estes resultados são diferentes de trabalhos como o de Mylonas et al. (2007) que avaliaram o reparo alveolar em cães utilizando células-tronco mesenquimais juntamente com biovidro ou hidroxiapatita sintética num carreador polimérico termoplástico. Dos resultados, os autores concluíram que o uso de células-tronco mesenquimais colocadas num carreador juntamente com enxertos granulares promoveu um meio propício para engenharia tecidual levando a um aumento da formação óssea nos períodos iniciais da reparação no defeito ósseo.

Os resultados do presente trabalho mostraram que, no modelo experimental utilizado, o grau de interferência negativa com o reparo ósseo se deveu à combinação de fatores como quantidade relativa de material, tipo de material e fase do processo reparacional.

A comparação de relatos da literatura sobre o comportamento dos diferentes biomateriais utilizados em estudos clínicos ou experimentais é sabidamente difícil, devido às diferenças entre as espécies animais e os sítios de implantação, aos diferentes períodos e parâmetros macroscópicos, histológicos ou histométricos escolhido para análise (MERKX et al., 2003). No presente trabalho, apesar de superadas estas dificuldades pela utilização de um único modelo experimental com cronologia bem conhecida, outras surgiram associadas às características dos materiais, que tornaram o procedimento de implantação pouco preciso, uma condição que não permitiu que se fizessem todas as comparações desejáveis.

Os resultados desta pesquisa, obtidos em animais, não devem ser diretamente extrapolados para humanos, nem conduzir a uma inferência sobre o uso dos biomateriais na clínica odontológica. No entanto, eles acrescentam evidências ao fato de que, em que pese à necessidade e conveniência da utilização de biomateriais para preservação/recuperação de tecido ósseo, deve-se levar em conta que qualquer material introduzido no interior de um defeito pode atrasar a reparação, e reafirmam a necessidade de se ponderar se e em quais circunstâncias um determinado material favoreceria o resultado desejado.

7. Conclusão

7. Conclusões

Dos resultados apresentados pode-se concluir que:

- Tanto o osso autógeno implantado no terço médio do alvéolo, quanto o osso bovino mostraram uma osteointegração progressiva e sem reação de corpo estranho.
- As células osteoblásticas não proporcionaram o desenvolvimento de reações imunogênicas, massas teciduais tumorais e nem reação de corpo estranho quando implantados no alvéolo dentário.
- Houve menor formação de osso nos animais dos grupos G-mix, (isoladamente ou associado às células-tronco) principalmente nos períodos de 21 e 42 dias.
- A associação células-tronco / osso autógeno foi superior em volume de tecido ósseo em relação aos demais grupos.
- O osso autógeno e o Gen-mix isoladamente ou associados às células-tronco foram biologicamente compatíveis desenvolvendo osteointegração progressiva e que o osso autógeno foi superior no processo de reparação do defeito ósseo.
- Os resultados ainda sugerem que a associação das células-tronco aos enxertos ósseos acelerou a neoformação óssea, principalmente quando associadas ao osso autógeno.

8. Referências

8. Referências

- 1-ABUKAWA, H.; SHUN, M.; WILLIAMS, W.B.; VACANTI, J.P.; KABAN, L.B.; TROULIS, M.J. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue engineered bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 601-606, 2004.
- 2-AICHELMANN-REIDY ME, YUKNA RA. Bone replacement grafts: The bone substitutes. *Dent Clin North Am.* v. 42, p. 491-503, 1998.
- 3-ALBERIUS P, GORDH M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.** v.124, n.12, p. 1382-6, 1998.
- 4-ALBERIUS, P.; GORDH, M.; LINDBERG, L.; JOHNNELL, O. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat skull. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 104, p. 554–61, 1996.
- 5-ALVES, M.C.R.; OKAMOTO, T. Influência do estresse no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odont. UNESP**, v. 18, p. 119-130, 1989.
- 6-ALVES-REZENDE, M. C.; OKAMOTO, T. Effect of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. **Braz. Dent. J.**, v. 8, n.1, p. 13-19, 1997.
- 7-AMLER, M.H.; JOHNSON, P.L.; SALMAN, I. Histological and histochemical investigation of alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 61, p. 32-44, 1960.
- 8-ARAÚJO, M.; LINDER, E.; WENNSTRÖM, J.; LINDHE J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.** v. 28, n.2, p. 123-35, 2008.
- 9-ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. **J. Periodont.**, v. 71, n. 6, p. 1015-23, June 2000.
- 10-ARTZI, Z.; WEINREB, M.; GIVOL, N.; ROHRER, M.D.; NEMCOVSKY, C.E.; PRASAD, H.S. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of

- inorganic bovine bone and β -Tricalcium phosphate in canine: A 24-month longitudinal histologic study and morphometric. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** v. 19, n.3, p. 357-68, 2004.
- 11-BALABANIAN, C.A.C.A. **Avaliação histométrica e histológica de reparo ósseo do alvéolo dental implantado com látex natural.** 2005. 98 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2005.
- 12-BAYAT, M.; MOMEN-HERAVI, F.; MARJANI, M.; MOTAHHARY, P. A comparison of bone reconstruction following application of bone matrix gelatin and autogenous bone grafts to alveolar defects: An animal study. **J. Craniomaxillofac. Surg.** v. 10, 2009.
- 13-BECKER, W.; CLOKIE, C.; SENNERBY, L.; URIST, M.R.; BECKER, B.E. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 414-21, 1998.
- 14-BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. **Clin. Oral Implants Res.** v. 8, p. 117-124, 1997.
- 15-BETTI, L.V. **Análise microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos** 2004. 113 f. Tese (doutorado). Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, USP; 2004.
- 16-BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G.; Bone marrow stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 2001, p. 180-92, 2001.
- 17-BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxyapatite with and without autogenous bone in dogs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, p. 3-7, 1985.
- 18-BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 11, p. 1281-1286, 1997.
- 19-BOMBONATO-PRADO, K.F. **Efeito do alcoolismo no reparo alveolar de ratos após o implante de uma biocerâmica. Estudo qualitativo e quantitativo em microscopia de luz e eletrônica de varredura.** 2002. 109 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2002.

- 20-BOMBONATO-PRADO, K.F.; BRENTÉGANI, L.G.; THOMAZINI, J.A.; LACHAT, J.J.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Alcohol intake and osseointegration around implants: A histometric and scanning electron microscopy study. **Implant. Dent.**, v. 13, p. 238-44, 2004.
- 21-BOYNE, P. J. Treatment of oral bony defects in man with anorganic heterogenous bone. **Oral Surg.**, v.11, n.3, p.322-9, 1958.
- 22-BOYNE, P.J. Current developments with growth factors and bone proteins. **Dent. Implantol. Update**, v. 10, n. 4, p. 25-7, 1999.
- 23-BOYNE, P.J. **Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible. Quintessence**, 1997.
- 24-BOYNE NP, LAMBRIANIDES AL, POLLARD C. Incisional hernia through iliac crest bone graft donor sites.**ANZ. J. Surg.** v.72, n. 2, p.156-7, 2002.
- 25-BRENTÉGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Histological evaluation of the biocompatibility of a glass-ionomer cement in rat alveolus. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 137-140, 1997.
- 26-BRENTÉGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Immediate implantation of glass ionomer cement granules increases osteogenesis during rat alveolar wound healing. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 38, n. 3, p. 141-145, 1996.
- 27-BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J. Cell Biochem.**, v. 64, n. 2, p. 278-94, Feb 1997.
- 28-BRUDER, S.P.; KRAUS, K.; GOLDBERG, V.M.; KADIAYLA, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **J. Bone Joint Surg.**, v. 80A, p. 985-86, 1998.
- 29-BURCHARDT, h. Biology of bone transplantation. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 18, p. 187-96, 1987.
- 30-BURWELL, R.G. A study of homologous cancellous bone combined with autologous red marrow after transplantation to a muscular site. **J. Anat.**, v. 95, p. 613-16, 1961.

- 31-BUSENLECHNER, D.; KANTOR, M.; TANGL, S.; TEPPER, G.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; WATZEK, G. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin. Oral Implants Res.** v. 16, n. 2, p. 220-7, 2005.
- 32-CALIXTO, R.F.E. **Estudo comparativo do reparo alveolar após implante de uma mistura de BMPs bovinas, de partículas de matriz óssea bovina orgânica e inorgânica e de um vidro bioativo na cavidade de extração dental de rato.** 2005. 97 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2005.
- 33-CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTAGANI, L.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Alveolar wound healing after implantation with a pool of commercially available bovine bone morphogenetic proteins (BMPs) – A histometric study in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 1, p. 29-33, 2007.
- 34-CALLAN, D.P.; ROHRER, M.D. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report. **J Periodontol.** v. 64, p.575-582, 1993.
- 35-CAMARGO, P. M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; MADZAREVIC, M.; KENNEY, E.B. Plaquet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **J. Periodont. Res.**, v.37, n.4, p.300-6, Aug. 2002.
- 36-CARDAROPOLI G, ARAUJO M, HAYACIBARA R, SUKEKAVA F., LINDHE J. Healing of extraction sockets and surgically produced- augmented and non-augmented-defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. **J. Clin. Periodontol.** v. 32, p. 435-440, 2005.
- 37-CARDOSO, R.J.A.; GONÇALVES, A.P.N. **Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes.** São Paulo, Artes Médicas, 516p,2002.
- 38-CARNEIRO E, GARCIA RB, OLIVEIRA RC, MORAES FG, MENEZES R, LETRA A, CANOVA GC, CESTARI TM, GRANJEIRO JM. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **J. Appl. Oral**; v.13, n.2, p. 157-62, 2005.
- 39-CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia Bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica.** São Paulo: Médica Panamericana, 1987. 139 p.

- 40-CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Implantes intra-alveolares: considerações sobre estudos experimentais. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 32, n. 4, p. 273-79, 1978.
- 41-CASTRO, F.S. **Avaliação da manutenção da dimensão de rebordo alveolar após enxerto aloplástico de composto ósseo de rícino pós-extração dental em rato, estudo radiográfico e histológico.** 2006. 76 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, USP, 2006.
- 42-CAUWELS, R.G.; MARTENS, L.C. The use of anorganic bovine bone to correct a residual osseous defect after tooth extrusion: Report of case. **ASDC J. Dent. Child.** v.66, p.273-277, 1999.
- 43-COCHRAN, D.L.; JONES, A.; HEIJL, L.; MELLONIG, J.T.; SCHOOLFIELD, J.; KING, G.N. Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 9, p. 1269-81, 2003.
- 44-CONEGLIAN, P.Z.A.; **Avaliação do processo evolutivo de reparo ósseo frente ao sulfato de cálcio e à hidroxiapatita. Estudo microscópico em alvéolos dentários de ratos.** 2007. 254 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 2007.
- 45-CORDARO, L.; BOSSHARDT, D.D.; PALATTELLA, P.; RAO, W.; SERINO, G.; CHIAPASCO, M. 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, 2008.
- 46-COSTA FILHO, L.C.; TAGA, R.T.; TAGA, E.M. Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and anorganic bovine bone. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 16, n. 6, p. 799-808, 2001.
- 47-DE KOK, I.J.; SUSAN J. PETER, S.J.; ARCHAMBAULT, M.; VAN DEN BOS, C.; KADIYALA, S.; AUKHIL, I.; COOPER, L.F. Investigation of allogenic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 481–489, 2003.
- 48-DAMIEN CJ, PARSONS JR, PREWETT AB, HUISMANS F, SHORS EC, HOLMES RE. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. **J. Biomater. Appl.** v. 9, n. 3, p. 275-88, 1995.

- 49-DE COSTER, P.; BROWAEYS, H.; DE BRUYN, H. Healing of extraction sockets filled with boneceramic(R) prior to implant placement: preliminary histological findings. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, v.3., 2009.
- 50-DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction sockets. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, p. 641-45, 2002.
- 51-DIGIROLAMO, C.M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY D.G.; CLASS, R.; PROCKOP, D.J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br. J. Haematol.**, v. 107, n. 2, p. 275-8, Nov 1999.
- 52-DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Alveolar ridge augmentation by autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 13, n. 2, p. 185-91, 2002.
- 53-DYER PV. What do patients think of iliac crest graft harvesting? **Br. Dent. J.** v. 96, p.155, 2004.
- 54-ELLIES, L.G. Altered sensation following mandibular implant surgery: a retrospective study. **J. Prosthet. Dent.**, v. 68, n. 4, p. 664-671, 1992.
- 55-ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos maxilares. In: PETTERSON, L.J. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 56-FRAME, J.W.; ROUT, P.G.; BROWNE, R.M. Ridge augmentation using solid and porous hydroxyapatite particles with and without autogenous bone or plaster. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 45, p. 771-77, 1987.
- 57-FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-47, Mar 1968.
- 58-FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 16, n. 3, p. 381-90, Dec 1966.

- 59-FROUM, S. J.; TARNOW, D.P.; WALLACE, S.S.; ROHRER, M.D.; CHO, S.C. et al. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (Osteograf/N) with and without autogenous bone: A clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis- Part 2 of an ongoing prospective study. **Int. J. Periodonti. Restorat. Dent.**, v.18, n.6, p.528-43, Dec. 1998.
- 60-GARCIA, R.D.; **Estudo do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao implante de osso bovino inorgânico e de hidroxiapatita BTCP. Análise microscópica em alvéolos dentários de ratos.** 2007. 168 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 2007.
- 61-GROSS, J.S.; Bone grafting materials for dental applications: A practical guide. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 18, p. 1013-34, 1997.
- 62-GRUNDEL, R.E.; CHAPMAN, M.W.; YEE, T.; MOORE, D.C. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. **Clin. Orthop.**, v. 266, p. 244-58, 1991.
- 63-HALLMAN, M.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, S.A. Clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** v. 17, p. 635–643, 2007.
- 64-HAMMERLE, C.H.; CHIANTELLA, G.C.; KARRING, T.; LANG, N.P. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. **Clin. Oral Implants Res.** v.9, p.151–162,1998.
- 65-HIBI, H.; YAMADA, Y.; UEDA, M.; ENDO, Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, p. 551-55, 2006.
- 66-HISLOP, W. S.; FINLAY, P. M.; MOOS, K. F. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. **Brit. J. oral Maxillofac. Surg.**, v.31, n.3, p.144-53, June 1993.
- 67-HJØRTING-HANSEN, E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. **Mund Kiefer Gesichtschir**, v. 6, n. 1, p. 6-14, 2002.
- 68-HOCKERS, T.; ABENSUR, D.; VALENTINI, P.; LEGRAND, R.; HAMMERIE, C.H.F. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or

- autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 10, p. 487-98, 1999.
- 69-HODDE J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. **Tissue Eng.** v. 8, p.295, 2002.
- 70-HURZELER, M.B.; QUINONES, C.R.; KIRSCH, A .; GLOKER, C.; SCHÜPBACH, P.; STRUB, J.R.; CAFFESSE, R.G. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. **Clin. Oral Implants Res.** v.8, p.476–486,1997.
- 71-ITO, K.; YAMADA, Y.; NAIKI, T.; UEDA, M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 7, p. 579–586, 2006.
- 72-JAFARIAN, M.; ESLAMINEJAD, M.B.; KHOJASTEH, A.; ABBAS, F.M.; DEHGHAN, M.M.; HASSANIZADEH, R.; HOUSHMAND, B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 105, p. 14-24, 2008.
- 73-JAHANGIRI, L.; DEVLIN, H.; TING, K.; NISHIMURA, I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. **J. Prosthet. Dent.**, v. 80, n. 2, p. 224-37, Aug. 1998.
- 74-JARDINI, M.A.N.; DE MARCO, A.C.; LIMA, L.A.; Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 100, p. 666-73, 2005.
- 75-JOHANSEN, J.R. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. **Acta. Odontol. Scand.**, v.28, n. 4, p. 441-61, 1970.
- 76-JOSHI A, KOSTAKIS GC. An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. **Br. Dent. J.** v. 196, n. 3, p.167-71, 2004.
- 77-KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S.P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-size segmental bone defect. **Tissue Eng.**, v. 3, p. 173-85, 1997.

- 78-KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant.**, v. 6, n. 2, p. 125-34, 1997.
- 79-KARABUDA, C.; OZDEMIR, O.; TOSUN, T.; ANIL, A.; OLGAC, V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **J. Periodontol.** v.72, p. 1436–1442, 2001.
- 80-KHAN, S.N.; CAMMISA, F.P.JR.; SANDHU, H.S.; DIWAN, A.D.; GIRARDI, F.P.; LANE, J.N. The biology of bone grafting. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.
- 81-KIM, C.S.; CHOI, S.H.; CHO, K.S.; CHAI, J.K. WIKESJO, U.M.; KIM, C.K. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral-derived biomaterial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 583-89, 2005.
- 82-KIM, S.H.; KIM, K.H.; SEO, B.M.; KOO, K.T.; KIM, T.I.; SEOL, Y.J.; KU, Y.; RHYU, I.C.; CHUNG, C.P.; LEE, Y.M. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. **J. Periodontol.** v. 80, n.11, p. 1815-23, 2009.
- 83-KIYOKAWA, K.; TANAKA, S.; INOUE, Y. A new regenerative approach to oromandibular reconstruction after the resection of head and neck malignant tumors. **J. Craniofac. Surg.**, v. 13, p. 337-346, 2002.
- 84-KRZYMANSKI, G.; KALEZAK, M.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. The use of bone-marrow derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 26, p. 55-60, 1997.
- 85-KURASHINA, K.; KURITA, H.; WU, O.; OHTSUKA, A.; KOBAYASHI, H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials.** v. 23, n.2, p. 407-12, 2002.
- 86-KURITA, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKEI, T.; KAWAI, T.; HAYAKAWA, T. Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. **J. Dent. Res.**, v. 64, n. 1, p. 28-32, 1985.

- 87-LAMANO-CARVALHO, T.L.; BRENTGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz. Dent. J.**, v. 8, p. 9-12, 1997a.
- 88-LAMANO-CARVALHO, T.L.; TEÓFILO, J.M.; ARAÚJO, C.A.C.A.; BRENTGANI, L.G. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of *Ricinus communis* polyurethane resin: histometric analysis in rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 37, p. 449-52, 1997b.
- 89-LANGSTAFF, S.; SAYER, M.; SMITH, T.J.N.; PUGH, S.M. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. **Biomaterials**, v. 22, p. 135-50, 2001.
- 90-LEUNG, G; JIN, L. A combined approach of enamel matrix derivative gel and autogenous bone grafts in treatment of intrabony periodontal defects. A case report. **Prim Dent Care** v.10, n.2, p. 41-3, 2003.
- 91-LI, Z.; LI, Z.B. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **ANZ J. Surg.**, v. 75, p. 1017-21, 2005.
- 92-LIN, W.L.; MCCULLOUGH, C.A.G.; CHO, M.I. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anat. Rec.**, v. 240, p. 492-506, 1994.
- 93-LINDHOLM, T.S.; NILSON, O.S.; LINDHOLM, T.C. Extraeskeletal and intraeskeletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. **Clin. Orthop.**, V. 171, p. 251-55, 1982.
- 94-LINDHOLM, T.S.; RAGNI, P.; LINDHOLM, T.C. Response of bone marrow stromal cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. **Clin. Orthop.**, V. 230, p. 296-302, 1988.
- 95-LUIZE, D.S.; BOSCO, A.F.; BONFANTE, S.; ALMEIDA, J.M. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 23, p. 207-14, 2008.
- 96-MACARTHUR BD, PLEASE CP, TAYLOR M, OREFFO RO. Mathematical modelling of skeletal repair. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 313, n.4, p. 825-33, 2004.

- 97-MAGALHÃES, A.E.O.; OKAMOTO, T.; BARROSO, J.S. Influência da fratura da crista óssea alveolar no processo de reparo de feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 36, n. 2, p. 203-12, 1982.
- 98-MANDELBAUM, S.H. **An. Bras. Dermatol.** v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- 99-MANIATOPOLOUS, C.; SODEK, J.; MEKCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adults. **Cell Tissue Res.**, v. 254, p. 317-30, 1988.
- 100-MANSO, M.C.; LANG, R.D. Enxerto ósseo retro-molar “onlay” para restauração ideal do contorno do rebordo alveolar. **Rev. Bras. Implant.**, v. 5, n. 5, p. 7-14, 1997.
- 101-MAREI, M.K.; NOUH, S.R.; SAAD, M.M.; ISMAIL, N.S. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. **Tissue Eng.**, v. 11, n. 5/6, p. 751-67, 2005.
- 102-MELO, A. **Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos wistar preenchido com osso autógeno particulado após exodontia.** 2007. 116 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2007.
- 103-MELLONIG, J.T. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.** v. 20, p.19-29, 2000.
- 104-MERKX, M. A.; MALTHA, J. C.; FREIHOFFER, H. P.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Incorporation of three types of bone implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, v.20, n. 7, p.639-45, 1999a.
- 105-MERKX, M. A.; MALTHA, J. C.; FREIHOFFER, H. P.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Incorporation of particulated bone implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, v.20, n. 21, p.2029-35, 1999b.
- 106-MERKX, M.A.W.; MALTHA, J.C.; STOELINGA, P.J.W. Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. **Int J Oral Maxillofac Surg** . v. 32, p. 1–6, 2003.
- 107-MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as medical devices. **Med. Plast. Biomater. Mag.** v.3, p.30, 1998.

- 108-MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ. J. Surg.**, v. 71, p. 354-61, 2001.
- 109-MOOREN, R.E.; DANKERS, A.C.; MERKX, M.A.; BRONKHORST, E.M.; JANSEN, J.A.; STOELINGA, P.J. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v.1, 2010.
- 110-MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, v. 24, p. 143, 1945.
- 111-MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 12, p. 3464-74, Dec 2003.
- 112-MUSCLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitor: Practical concepts for clinical applications. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 395, p. 66-80, 2002.
- 113-MUSCLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. **J. Biomed. Biothechnol.**, v. 2003, n. 3, p. 170-93, 2003.
- 114-MYLONAS, D.; VIDAL, M.D.; DE KOK, I.J.; MORIARTY, J.; COOPER, L.F. Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds. **Journal of Prosthodontics**, v. 16, n.6, p. 421-430, 2007.
- 115-NISHIBORI, M.; BETTS, N.J.; SALAMA, H.; LISTGARTEN, M.A. Short-term healing of autogenous and allogenic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 10, p. 958- 66, 1994.
- 116-OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R.; ALVES REZENDE, M.C.; GABRIELLI, M.F. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.
- 117-OKAMOTO T, GARCIA JR, I. R.; MORI G.G.; NAKAMURA, A.S.; VIEIRA, E.H. Implante heterógeno de osso anorgânico ao nível do tecido conjuntivo subcutâneo de rato. Estudo microscópico. **Innovations J.** v. 3, p. 26-29,1999.
- 118-OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, v. 2, n. 2, p. 153-62, 1973.

- 119-OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R. Effect of deproteinization temperature on the preparation of microgranular bovine cortical bone: microscopic biochemical analysis in rat subcutaneous tissue. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v. 7, n.3/4, p. 85-93, 1999.
- 120-ORBAN JM, MARRA KO, HOLLINGER JO. Composition options for tissue engineered bone. **Tissue Eng.** v. 8, n.4, p. 529-39, 2002.
- 121-ORSINI, M.; ORSINI, G.; BENLLOCH, D.; ARANDA, J.J.; LAZARO, P.; SANZ, M.; DE LUCA, M.; PIATELLI, A. Comparison of calcium sulfate and autogenous bone graft to bioabsorbable membrane plus autogenous bone graft in the treatment of intrabony periodontal defects: a splint-mouth study. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 3, p. 296-302, 2001.
- 122-ORSINI G, TRAINI T, SCARANO A, DEGIDI M, PERROTTI V., PICCIRILLI M., PIATELLI A. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss(R) particles: A light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. **J. Biomed. Mater. Res. B. App.I Biomater.** v. 74, p.448-457, 2005.
- 123-OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal stem cells: Marrow derived osteogenic precursors. **Ciba Found. Symp.**, v. 136, p. 42-60, 1998.
- 124-OZAKI, W.; BUCHMAN, S.R. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 102, n. 2, p. 291-9, 1998.
- 125-PALEY, D. Percutaneous bone marrow grafting on fractures and bone defects and experimental study in rabbits. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 208, p. 300-12, 1988.
- 126-PARIKH SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. **Orthopedics.** v. 25, n.11, p. 1301-9, 2002.
- 127-PARK, J.B.; LEE, J.Y.; PARK, Y.J.; RHEE, S.H.; LEE, S.C.; KIM, T.I.; SEOL, Y.J.; LEE, Y.M.; KU, Y.; RHYU, I.C.; HAN, S.B.; CHUNG, C.P. Enhanced bone regeneration in beagle dogs with bovine bone mineral coated with a synthetic oligopeptide. **J Periodontol.** v. 78, n.11, p.2150-55, 2007.
- 128-PERRI de CARVALHO, A.C.; OKAMOTO, T. **Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica**, São Paulo, Panamericana, 1987.

- 129-PERRI de CARVALHO, P.S. ; PALECKIS, L. G. P. ; MORAES JÚNIOR, E. F.; PONZONI, D. Enxerto ósseo autógeno: da biologia aos acidentes e transtornos pós-operatórios. In: QUERIDO M. R. M.; GOMES Y.L.F. (Org.). **Implantes Osseointegrados - Inovando Soluções**. São Paulo, Artes Médicas Ltda, p. 15-35, 2004.
- 130-PESSOA, R.S.; OLIVEIRA, S.R.; MENEZES, H.H.; de MAGALHÃES, D. Effects of platelet-rich plasma on healing of alveolar socket: split-mouth histological and histometric evaluation in *Cebus apella* monkeys. **Indian J. Dent. Rest.**, v. 20, n. 4, p. 442-7, 2009.
- 131-PIER, I. F.; LUCARELLI, E.; CORINALDES, I. G.; FINI, M.; ALDINI, N.N.; GIARDINO, R.; DONATI, D.; MARCHETTI, C. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. **J. Oral Maxillofa. Surg.** v. 67, n.2, p. 265-72, 2009.
- 132-PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 2, 1999.
- 133-PRATA, C.A.; LACERDA, S.A.; BRENTAGANI, L.G.; Autogenous bone graft associated with enamel matrix proteins in bone repair. **Implant Dent.**, v. 16, p. 413-420, 2007.
- 134-RICHARDSON, R.B.; MELLONIG, J.T.; BRUNSVOLD, M.A.; McDONNELL, H.T.; COCHRAN, D.L. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, p. 421-428, 1999.
- 135-ROSA, A.L.; BELOTI, M.M.; VAN NOORT, R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. **Dental Materials**, v.9 n.8, p. 768-772, 2003.
- 136-ROSA, A.L.; BRENTAGANI, L.G.; GRANDINI, S.A. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate implants in dental alveolus of rats: a histometric study. **Braz. Dent. J.**, v. 6, p. 103-9, 1994.
- 137-RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRABER, V. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. **Folia Morphol.** v. 65, n. 1, p. 43-8, 2006.

- 138-SALAMA, R.; WEISSMAN, S.L.; The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. **J. Bone Joint Surg.**, v. 60, n. 1, p. 111-5, 1978.
- 139-SALATA, L.A.; RASMUSSEN, L.; KAHNBERG, K.E. Effects of a mechanical barrier on the integration of cortical onlay bone grafts placed simultaneously with endosseous implant. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 4, p. 60-68, 2002.
- 140-SANADA, J.T.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.
- 141-SANCHES, M.M.; OKAMOTO, T.; CARVALHO, A.C.P. Processo de reparo em feridas de extração dental após implante de “osso anorgânico”. Estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**. v. 1, n. 1, 83-90, 1972.
- 142-SANTOS-PINTO, R. **Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dental em cães. Estudo histológico, radiográfico e microscópio**. 1964. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
- 143-SARTOR, I. S.; SILVESTRI, M. FORNI, F.; CORNAGLIA, A.; TEPE, I. P.; CATTANEO, V. 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, p. 369–372, 2003.
- 144-SCIADINI MF, DAWSON JM, JOHNSON KD. Bovine-derived bone protein as a bone graft substitute in a canine segmental defect model. **J. Orthop. Trauma**. v. 11, n. 7, p. 496-508, 1997
- 145-SHALABY, S.W.; JOHNSON, R.A.. Synthetic absorbable polyesters. In Shalaby SW. **Biomedical Polymers: Designed-to-Degrade Systems**. New York: Hanser, p.1-34, 1994.
- 146-SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, T. L.; CESTARI, T. M.; OLIVEIRA, D. T.; BUZALAF, M. A. R.; TAGA, R.; TAGA, E. M.; GRANJEIRO, J. M.; KINA, J. R.. Efeito do tamanho da partícula na resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Avaliação microscópica e bioquímica. **Rev. FOB**, v. 8, n.1/2, p.1-10, 2000.
- 147-SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo: Mc Graw-Hill; 1975.

- 148-SILVA, R.V.; BERTRAN, C.A.; KAWACHI, E.Y.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 2, p. 281-86, mar 2007.
- 149-SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **J. Craniofac. Surg.**, v. 17, n. 2, p. 297-301, mar 2006.
- 150-SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A.; BERTRAN, C.A.; MOREIRA, N.H. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 34, n. 2, p. 178-84, 2005.
- 151-SIMION, M.; FONTANA, F.; RASPERINI, G.; MAIORANA, C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluorethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio oss). **Clin. Oral Impl. Res.**, v.18, p.620–629, 2007.
- 152-STAVROPOULOS, A.; KOSTOPOULOS, L.; NYENGAARD, J.R.; KARRING, T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): An experimental study in the rat. **J. Clin. Periodontol.** v. 30, p.636-643, 2003.
- 153-Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss or Biogran. An experimental study in the rat. *J Periodontol.* 2004; 31: 30–39
- 154-SRISUBUT, S.; TEERAKAPONG, A.;VATTRAPHODES, T.; TAWEECHASUPAPONG. Effect of local delivery of alendronato on bone formation in bioactive glass grafting in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 104, p. 11-16, 2007.
- 155-STEVENSON, S.; EMERY, S.E.; GOLDBERG, V.M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 323, p. 66-74, 1996.
- 156-SY, I.P. Alveolar ridge preservation using a bioactive glass particulate graft in extraction site defects. **Gen. Dent.**, v. 50, n. 1, p. 66-68, 2002.
- 157-TADJOEDIN, E.S.; DE LANGE, G.L. LYARUU, D.M.; KUIPER, L.; BURGER E.H. High concentration of bioactive glass material (BioGram) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. Histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 3, p. 428-36, 2002.

- 158-TAGA, R.; CESTARY, T. M.; TAGA, E. M.; TAVANO, O.; GRANJEIRO, J. M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **B. C. I.- Rev. Bras. Cirurg. Implant.**, v.7, n.26, p.37-44, abr./jun. 2000.
- 159-TRIPLETT, R.G.; SCHOW, S.R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 54, n. 4, p. 486-94, 1996.
- 160-URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893-9, 1965.
- 161-VALENTINI, P.; ABENSUR, D.; DENSARI, D.; GRAZIANI, J.N.; HAMMERLE, C.H.F. Histologic evaluation of Bio-Oss_ in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. **Clin. Oral Implants Res.** v. 9, p.59-64, 1998.
- 162-VAN NOORT, R. Clinical relevance of laboratory studies on dental materials: strength determination--a personal view. **J. Dent.** v. 22,n. 1, p. 4-8, 1994.
- 163-VAZ, C.E.S.; **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas: estudo experimental em coelhos.** 2006. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, USP, 2006.
- 164-WADA, T.; WU, C.H.; SUGITA, H.; SUGITA, N.; KATAGIRI, S.; SHIMIZU, M.; HARA, K. Autogenous, allogenic, and β -TCP grafts: comparative effectiveness in experimental bone furcation defects in dogs. **J. Oral Implantol.**, v. 15, n. 4, p. 231-36, 1989.
- 165-WANG, J.; GLIMCHER M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects:I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. **Calcif. Tiss. Int.**, v.65, n.2, p.156-65, Aug. 1999.
- 166-WANG, Y.; UEMURA, T.; DONG, J.; KOJIMA, H.; TANAKA, J.; TATEISHI, T. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. **Tissue Eng.**, v. 9, p. 1205-1214, 2003.
- 167-WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 835-70, 2003.

- 168-WILLIAMS, D.F.; Definitions in Biocompatibility. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, p. 3-5, 1986. In: CHESTER, V.K. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, Elsevier Science Publishers, London, 1987.
- 169-WU, Z.; LIU, C.; ZANG, G. The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 37, p. 170-76, 2008.
- 170-XIAO, Y.; QIAN, H.; YOUNG, W.G.; BARTOLD, P.M. Tissue Engineering for Bone Regeneration Using Differentiated Alveolar Bone Cells in Collagen Scaffolds. **Tissue Eng.**, v. 9, n. 6, p. 1167-1177, 2003.
- 171-YAMADA, Y.; UEDA, M.; NAIKI, T.; TAKAHASHI, M.; HATA, K.I.; NAGASAKA, T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 5/6, p.955-64, 2004.
- 172-YILDIRIM, M., SPIEKERMANN, H.; BIESTERFELD, S.; EDELHOFF, D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-OssR in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. **Clin. Oral Implants Res.** v. 11, p. 217-229, 2000.
- 173-YOUNG, C.; SANDSTEDT, P. S.; 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.
- 174-ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Editora Ateneu, 2006. 245 p.
- 175-ZAMBUZZI, W.F.; OLIVEIRA, R.C.; ALANIS, D.; MENEZES, R.; LETRA, A.; CESTARI, T.M. Tissue response to porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. **J Ap. Oral Scienc.** 2005.
- 176-ZERBO, I.R.; BRONCKERS, A.L.; DE LANGE, G.L.; VANBUK, G.J.; BURGER, E.H. Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. **Clin. Oral Implant. Res.**, v. 12, n. 4, p. 379-384, 2001.
- 177-ZIJDERVELD, S.A.; ZERBO, I.R.; VAN DEN BERGH, J.P.A.; SCHULTEN, E.A.J.M.; TEN BRUGGENKATE, C.M. Maxillary sinus floor augmentation using a β -tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 20, p. 432- 40, 2005.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.808.53.7), intitulado: "Avaliação da Osteogênese em Defeitos Ósseos com Utilização da Engenharia Tecidual Óssea: uma comparação entre osso autógeno, substituto ósseo e células tronco mesenquimais", de autoria de **Luiz Guilherme Brentegani**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.10.07.

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2007

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro