

HENRIQUE DUQUE DE MIRANDA CHAVES NETTO

Cirurgião-Dentista

**AVALIAÇÃO DO CARREADOR CARBOXI-METIL-CELULOSE ASSOCIADO
À MATRIZ ÓSSEA BOVINA ANORGÂNICA EM DEFEITOS NA CALOTA DE
CÃES. ANÁLISE HISTOLÓGICA E RADIOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientador: Prof. Dr. Renato Mazzonetto

Piracicaba - SP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

C398a	<p>Chaves Netto, Henrique Duque de Miranda. Avaliação do carreador carboxi-metil-celulose associado à matriz óssea bovina anorgânica em defeitos na calota de cães. Análise histológica e radiológica. / Henrique Duque de Miranda Chaves Netto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientador: Renato Mazzonetto. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Ossos – Enxerto. 2. Biomateriais. I. Mazzonetto, Renato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Evaluation of the carboximetilcelulosis carrier associated with anorganic bovine matrix used in defects made in dog's calviaria. Radiological and histological analyses

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Bone grafts. 2. Biomaterials

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Renato Mazzonetto, José Ricardo de Albergaria Barbosa, Cássio Edvard Sverzut

Data da Defesa: 20-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2009, considerou o candidato HENRIQUE DUQUE DE MIRANDA CHAVES NETTO aprovado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Renato Mazzonetto".

PROF. DR. RENATO MAZZONETTO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Cassio Edvard Sverzut".

PROF. DR. CASSIO EDVARD SVERZUT

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Jose Ricardo de Albergaria Barbosa".

PROF. DR. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

Com muito amor, sinceridade e gratidão eterna, dedico esta etapa da minha vida à minha família, exemplo de união, amor, dedicação e, acima de tudo, apoio incondicional a todas minhas escolhas e vontades. Sem vocês minha vida seria absolutamente insignificante.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por possibilitar a realização deste curso de Pós-Graduação.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida no decorrer do programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Renato Mazzone pela amizade, apoio incondicional, orientação e contribuição não somente na execução desta tese, mas em minha formação de cirurgião e docente. Tenha certeza que levarei para o resto de minha vida os conhecimentos transmitidos, assim como a forma desprendida e simples que você trata todos seus alunos.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa, pessoa simples e serena, pela amizade conquistada ao longo destes dois anos, assim como disposição incondicional em me ensinar a ler as lâminas histológicas. Você é um exemplo de serenidade a ser seguido.

Ao Professor Dr. Márcio de Moraes, pessoa dedicada em manter este programa de Pós-Graduação e transmitir seus conhecimentos. Agradeço a forma que fui recebido aqui nesta casa.

Ao Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira, pelo seu prazer em nos ensinar. Muito obrigado pela valiosa ajuda na formação acadêmica e cirúrgica.

À Professora Renata, Professor João e Professor Greison pela forma como aceitaram meu convite para participarem da minha qualificação, assim como pela maneira educada e elegante com que vocês me mostraram onde poderia melhorar este trabalho.

A todos Professores, alunos e funcionários que passaram por esta escola, ajudando-a a se desenvolver e estar neste lugar de destaque.

A todos funcionários, professores e alunos da Universidade Federal de Juiz de Fora, especialmente à Faculdade de Odontologia, por estarem sempre trabalhando em prol da formação de seus alunos, servindo-me como exemplo de como conviver bem e harmoniosamente em um meio universitário. Agradeço a forma como fui recebido por todos vocês, sempre estimulando a conquistar meu futuro profissional. Muito obrigado! Serei eternamente grato!!

Aos meus irmãos Alexandre e Leonardo, melhores amigos e confidentes, que sempre me estimulam, apóiam de maneira incondicional, estando sempre dispostos a me ajudarem de qualquer forma. Vocês são um exemplo de vida!! Me espelho em vocês!!!! Obrigado por compreenderem minha ausência em momentos importantes de suas vidas.

Aos meus Pais, Henrique e Graça, que, além de serem o norte da minha jornada, vivem cada segundo das suas vidas por mim e meus irmãos!!!! Tenho imenso orgulho de ser filhos de vocês. Nunca terei como agradecer este apoio que

vocês sempre deram a mim e aos meus irmãos. Vocês são exemplos de pessoas e pais ideais!! Amo vocês mais que tudo nesta vida!!!!

À Maria da Consolação Rocha (Bia), pela dedicação total sempre a mim e a todos lá em casa. Você é minha mãe preta. Te amo!!!!

Aos amigos que fiz por todos lugares que andei. Sem sua amizade, atenção e estímulo, minha vida seria muito mais difícil. Serei sempre grato a forma como vocês permitiram que participasse de suas vidas.

Aos meus amigos e colegas do curso de Pós-Graduação desde meu estágio aqui: Anibal, Bernardo, Fabrício, Alex, Cecília, Glaykon, Greison, Bento, Eduardo, Renato, Leandro, Fábio, Jaime, Miguel, Rafael, Érica, José, Sérgio Monteiro e Saulo pela amizade, convívio, troca de conhecimentos e, o mais importante, por aceitarem e compreenderem meu modo de ser.

Aos meus colegas de turma, Heric, Mariana e Sergio Olate, pela ajuda imprescindível, força e apoio para que eu chegasse até aqui. Vocês são meus pilares aqui em Piracicaba. Obrigado por todos segundos que vocês dispuseram para me ajudar. Conte sempre comigo!!

Às funcionárias da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP - UNICAMP, Didi, Sueli, Daiana, Angélica, Fernanda, Ricardo e Keila por tornarem viável o funcionamento do Centro Cirúrgico, assim como pela amizade e confiança conquistada durante estes anos. Sem vocês nada disso existiria!! Agradeço o carinho que vocês sempre tiveram por mim.

A todas pessoas que passaram pela minha vida, me estimulando, incentivando, ajudando a crescer e me desenvolver. Levarei todas coisas boas vividas com vocês para sempre.

As pessoas que entraram em minha vida, me ensinando a ver que existe um mundo melhor, mais simples, mais feliz, agradeço pelo simples fato de existirem. Em muito pouco tempo vocês mudaram meu jeito de ser para sempre.

Qualquer conquista, por menor que seja, é fruto da união de várias pessoas. É impossível conquistar algo por si só. Levo isso firme em minha mente. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa de minha vida. Minha sincera gratidão e respeito.

"Toda manhã em algum lugar da África, uma gazela acorda e sabe que terá de correr muito de um leão para não morrer. Toda manhã, em algum lugar da África, um leão acorda e sabe que terá de correr muito atrás de uma gazela para não morrer de fome.

Portanto, quando o sol surgir, não importa se você é leão ou uma gazela, com certeza será melhor começar a correr. O único lugar em que o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário. Não pare nunca, pois a vitória sorri somente para aqueles que não param no meio do caminho. Sucesso é conseguir o que você quer, felicidade é gostar daquilo que você conseguiu."

(autor desconhecido)

RESUMO

Os procedimentos cirúrgicos envolvendo a reabilitação da região maxilofacial freqüentemente requerem o uso de enxertos ósseos para a reconstrução de deformidades congênitas ou adquiridas, assim como para correções esqueléticas com finalidade estética. Com o objetivo de evitar a abordagem de áreas doadoras para obtenção de enxerto ósseo, os substitutos ósseos foram desenvolvidos. Visando minimizar a dificuldade de adaptação dos substitutos ósseos na área doadora, os veículos para inserção destes vêm sendo estudados. Para o presente estudo, foram utilizados 8 cães, machos, sem distinção de raça, provenientes do biotério da Unicamp. Após tricotomia e anti-sepsia com polivinilpirrolidona iodo a 10% foram realizados 4 defeitos bicorticais de 8mm de diâmetro na calota craniana de cada animal. O preenchimento das cavidades se deu do seguinte modo: Grupo I – coágulo sangüíneo, Grupo II – osso autógeno particulado, Grupo III – matriz óssea bovina anorgânica, Grupo IV - matriz óssea bovina anorgânica associada a carboxi-metil-celulose. Os períodos de sacrifício foram de 3 e 6 semanas. Através de análise descritiva radiológica e histológica, observou-se no período de 3 semanas a presença de tecido conjuntivo, vasos sangüíneos, material utilizado para preenchimento, assim como as bordas nítidas em todos defeitos. O Grupo II foi o único a apresentar regiões de aposição de novo tecido ósseo. No período de 6 semanas observou-se a presença de tecido conjuntivo, vasos sangüíneos e material utilizado para preenchimento em todos defeitos. O Grupo II foi o único que apresentou as partículas de osso autógeno utilizadas para o preenchimento em estágio de reabsorção avançado sendo também o único a não apresentar as bordas entre o defeito e osso pré-existente nítidas, no período de 6 semanas.

Desta forma observou-se que, apesar do enxerto de osso autógeno apresentar melhores resultados em termos de reparação óssea, a matriz óssea bovina anorgânica demonstrou ser biocompatível, servindo como osteocondutor, assim como que o carreador carboxi-metil-celulose influenciou de maneira negativa o processo de reparação óssea.

Palavras-chaves: substitutos ósseos; enxerto ósseo; carreadores.

ABSTRACT

Surgical procedures involving maxillofacial region frequently require bone grafting to reconstruct the congenital or acquired defects, as well to aesthetic. Meaning to avoid the donate areas to obtain grafts, the biomaterials have been developed, especially to minimize the hardness adaptation of them. This way, several vehicles to insert of these bone substitutes are been studied. To perform the present studied were used 8 dogs, males, without pedigree, from the Unicamp vivarium. After trichotomy and antisepsis with PVPI 10% were performed 4 bicortical defects having 8mm of diameter on the calvarium of each animal. The cavities were filled up thru the following way: Group I – Blood clot, Group II – particulate autogenous bone graft, Group III – anorganic bovine bone matrix, Group IV - anorganic bovine bone matrix associated with a carboxi-metil-celulosis. The sacrifice periods were 3 and 6 weeks. Thru the descriptive radiologic and histological analysis, it was observed on 3 weeks period, presence of connective tissue, blood vessels, material used for fulfillment, as well as periphery of the defects well delimited. The Group II was the only one that presented new bone aposition. On the 6 weeks sacrifice period, it was noted the presence of connective tissue, blood vessels, material used for fulfillment in all defects. The Group II was the only one that showed advanced resorption stage of the bone grafts particles used for fulfillment being, also the only one that showed periphery of the defects without limit, on the 6 weeks period.

The present work demonstrated that, despite the autogenous bone grafts lead to the best result in terms of bone defect repair, the anorganic bovine bone matrix demonstrated to be biocompatible, being osteoconductible, as well the carrier carboxi-metil-celulosis interfered negatively on the bone repair process.

Key-words: bone substitutes, bone graft, carrier.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Remodelação do tecido ósseo	4
2.2 Propriedades dos enxertos	6
2.3 Incorporação dos enxertos	7
2.4 Matriz óssea bovina anorgânica e estudos em animais	9
2.5 Veículos utilizados para inserção de biomateriais	12
3 PROPOSIÇÃO	14
4 METODOLOGIA	15
4.1 Seleção e manutenção dos animais	15
4.2 Fase cirúrgica	15
4.3 Sacrifício dos animais e obtenção do material para análise	22
4.4 Método de obtenção das radiografias	23
4.5 Método de obtenção das lâminas histológicas	23
4.6 Análise dos Resultados	24
5 RESULTADOS	26
5.1 Análise radiológica descritiva	26
5.2 Análise histológica descritiva	30
5.2.1 Período de sacrifício de 3 semanas	30
5.2.2 Período de sacrifício de 6 semanas	37
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento da implantodontia, principalmente após estudo desenvolvido por Branemark *et al.*, em 1969, associou-se estética à função nas reabilitações, aumentando a necessidade de enxertos ósseos visando a instalação adequada dos implantes, principalmente em casos de rebordos atróficos.

A perda de tecido ósseo nos maxilares encontra-se associada a manutenção ou não dos dentes. Deste modo, fatores como traumatismo, doença periodontal e patologias interferem diretamente na reabsorção do osso alveolar necessitando, em alguns casos, de técnicas para reconstrução destas áreas durante a reabilitação (Calan *et al.*, 1993).

Ao contrário da maioria dos tecidos, o osso apresenta um potencial de reparar-se praticamente sem presença de cicatriz, por meio de um processo dinâmico de remodelação, envolvendo a neoformação e reabsorção. Apesar disto, alguns destes defeitos não passam por estes processos de forma espontânea, necessitando, desta forma, de fatores que estimulem a reparação (Jensen *et al.*, 2006).

A utilização de enxertos ósseos foi primeiramente descrita por Meekeren (1668) por meio de um enxerto heterógeno em calota, apresentando resultados satisfatórios (Hjorting-Hansen *et al.*, 2002). Com o desenvolvimento das técnicas de anti-sepsia, assim como desenvolvimento de novos materiais, os enxertos ósseos se tornaram procedimentos comuns e seguros (Hjorting-Hansen *et al.*, 2002).

Dentre os tipos de enxertos ósseos pode-se destacar (Okamoto *et al.*, 1994; Lynch *et al.*, 1999):

A – Enxertos autógenos: removidos do próprio indivíduo;

B – Enxertos homógenos: removidos de espécie semelhante a do

receptor;

C – Enxertos heterógenos: removidos de espécies diferentes do receptor;

D- Materiais aloplásticos: materiais sintéticos provenientes de metais, plásticos ou cerâmicas.

Além disso, os enxertos apresentam-se de duas formas básicas: particulado ou bloco. O tipo do defeito ósseo é que irá determinar a forma de enxerto utilizada, visando assim, um posicionamento adequado do mesmo e conseqüentemente reduzir possíveis espaços entre o enxerto e o leito receptor. Porém, nem sempre estes enxertos apresentam uma inserção fácil, tornando a técnica mais difícil e, em alguns casos, imprevisíveis. Por este motivo, estudos de outras formas de apresentação destes materiais vêm sendo realizados (Vance *et al.*, 2004).

Deste modo, estudos sobre os substitutos ósseos foram desenvolvidos visando uma indicação adequada e diminuição da morbidade cirúrgica e mimetizar o osso autógeno, através das propriedades já citadas, porém não necessitando de área doadora, e com volume ilimitado e formas previamente definidas, otimizando o procedimento cirúrgico.

A matriz óssea bovina anorgânica em partículas é atualmente bastante utilizada devido ao seu conhecido potencial de osteocondução, associado ao seu baixo custo econômico. Existe no mercado basicamente três apresentações de tamanhos das partículas (Kluppel, 2007):

- Granulação fina (menor que 450 μ m)
- Granulação média (entre 450 e 750 μ m)
- Granulação grossa (750 a 1000 μ m)

A matriz óssea de granulação fina (menor que 450 μ m) apresenta uma maior eficácia, pois quanto menor for seu tamanho, mais rapidamente estas passarão pelo processo de reabsorção (Kluppel LE, 2007). Porém, um

inconveniente deste tamanho menor das partículas é a dificuldade de inserção destas ao leito receptor necessitando, desta forma, de um veículo eficaz.

Portanto, estudos com substitutos ósseos, assim como diversas formas de apresentação dos enxertos e seus veículos de inserção são fundamentais para a otimizar os procedimentos cirúrgicos de reconstrução dos maxilares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REMODELAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

A reparação óssea é um processo complexo regulado por hormônios e fatores de crescimento (Canalis *et al.*, 1988). Estudos indicaram que os dois estágios primordiais no processo de reparação óssea, isto é, a neoformação e reabsorção/ neoformação, apresentam uma regulação próxima, sendo que fatores locais influenciam de forma significativa neste processo (Schliephake, 2002). Estes fatores podem ser classificados como fatores de crescimento sintetizados por células esqueléticas, fatores de crescimento derivados isoladamente da matriz óssea, e fatores desenvolvidos por tecidos circunvizinhos à região do defeito ósseo (Canalis *et al.*, 1988).

O termo fator de crescimento é denominado a um grupo de polipeptídios que estão envolvidos na proliferação, diferenciação e morfogênese celular desde a embriogênese até a fase adulta (Schepers *et al.*, 1997).

Ossos fraturados passam por um processo de remodelação através de uma cascata de eventos, onde células mesenquimais respondem por fatores proliferativos ainda incertos, diferenciando e sintetizando matriz extracelular (Franceschi *et al.*, 2005).

Dentre estes fatores ósseos pode-se citar o fator de crescimento de origem óssea (BDGF – *Bone density growth factor*), fator de crescimento derivado da insulina (IGF – *Insuline like growth factor*), assim como os fatores de transformação óssea (TGF – *Transforming growth factor*), sendo estes fundamentais para o processo de reparação dos tecidos (Issa *et al.*, 2006).

Em extensa revisão de literatura (Schliephake, 2002) sobre os fatores de desenvolvimento ósseos observou-se que o BDGF utilizados em processos reconstrutivos apresentam resultados ainda controversos. Quando este é utilizado sob forma sistêmica, houve uma mineralização óssea

abundante, ao passo que, quando aplicados localmente nos defeitos estes apresentaram-se ineficazes (Schliepack H, 2002).

O tecido ósseo é o que apresenta uma maior concentração de TGF-*B*, sugerindo, deste modo, uma relação intensa desta com o processo de remodelação e reparação óssea (Issa *et al.*, 2006).

Quando avaliados os fatores de crescimento derivados da insulina (IGF), observou-se neoformação e estimulação do reparo ósseo, apesar de poucos estudos terem sido realizados (Seo *et al.*, 2008). O fator de crescimento TGF-*B* é uma das mais importantes citocinas que atuam na formação de diversos tecidos, sendo amplamente pesquisada em reconstruções maxilofaciais (Wang *et al.*, 2008). Apesar disto, esta apresenta resultados bastante controversos (Di Rosa, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). Estes fatores utilizados em associação com a barreira de carbonato de cálcio não estimulou a neoformação óssea, ao passo que, quando utilizadas com a proteína óssea morfogenética (BMPs), estimularam de forma positiva o processo de reparação (Canalis *et al.*, 1988).

Dentre os princípios básicos para que ocorra um processo de remodelação óssea adequados pode-se citar: fechamento primário da região em questão, angiogênese que promova um suprimento sangüíneo necessário para nutrição das células na região, assim como células mesenquimais indiferenciadas, manutenção adequada do espaço ósseo e também estabilidade do material e/ou região da ferida (Wang *et al.*, 2006).

O tecido ósseo apresenta potencial de regeneração superior a outros tecidos como o tecido mole, pois, ao contrário destes, o osso neoformado apresenta-se histologicamente idêntico ao osso pré-existente, não ocorrendo formação de cicatrizes. Em contrapartida, a velocidade deste tecido é inferior aos tecidos moles, sendo, em alguns casos necessário a utilização de materiais que auxiliem este processo de reparação (Hing *et al.*, 2007).

2.2 PROPRIEDADES DOS ENXERTOS

Os enxertos ósseos utilizados nos procedimentos reconstrutivos irão auxiliar no processo de reparação óssea. Estas características variam de acordo com o tipo de material utilizado como descrito anteriormente.

De forma geral, estes enxertos atuam através de propriedades de formação de matriz óssea: a) Osteogênese, devido à presença de células osteoblásticas que promovem a neoformação óssea; b) Osteoindução, quando a matriz do material promove quimiotaxia de células osteoprogenitoras assim como a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos; c) Osteocondução, onde o material utilizado serve como arcabouço para crescimento de células osteoprogenitoras entre as partículas do enxerto (Jensen *et al.*, 2006).

O enxerto autógeno atualmente é considerado o “*padrão ouro*” nas reconstruções, pois apresenta as propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênese, apesar de haver a necessidade de um sítio doador. Isso promove o aumento da morbidade cirúrgica, além de volume ósseo limitado (Kübler *et al.*, 2004).

Durante o processamento dos substitutos ósseos haverá remoção do componente orgânico. Deste modo, as células com potencial osteogênético estarão ausentes na matriz, restando somente as propriedades osteocondutora e osteoindutora (Lynch *et al.*, 1999).

Estudo histomorfométrico realizado em mandíbulas de coelhos para avaliar a efetividade dos enxertos de matriz óssea homogênea, concluíram que os defeitos preenchidos por estes materiais aceleraram o processo de reparação óssea quando comparado ao grupo controle por meio da osteocondução (Carvalho *et al.*, 2000). Apesar disso, estudos anteriores realizados por Mish *et al.* (1997) concluíram que este biomaterial apresenta também propriedades osteoindutoras.

Chan *et al.* (2002) avaliaram as características de um material aloplástico em fêmur de coelhos. Os defeitos ósseos foram preenchidos com diferentes materiais aloplásticos e osso autógeno. Os autores concluíram que apesar de todos defeitos terem reparados por completo, o material aloplástico não apresentou as propriedades de osteogênese e osteoindução.

2.3 INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS

Os enxertos ósseos representam um componente fundamental durante os processos de reconstruções de defeitos independente de sua etiologia. Deste modo, conhecer seus mecanismos de incorporação é vital para que este seja previsível.

Os enxertos ósseos são comumente utilizados para promover uma estrutura de suporte, assim como influenciar de forma positiva na reparação tecidual (Buser *et al.*, 1996).

O leito receptor deve ser adequado para que ocorra a reparação de forma correta, visto que a maioria das células osteoprogenitoras provêm desta região. Além disso, a maioria dos osteócitos tornam-se inviáveis após pouco tempo da remoção do enxerto (De Boever *et al.*, 2005).

Após adaptação ao leito receptor, o enxerto passa por uma série de processos para que seja incorporado. Apesar de ocorrerem de forma simultânea, os estágios de incorporação do enxerto podem ser didaticamente subdivididos em: 1) necrose parcial, 2) reação inflamatória, 3) revascularização, 4) aposição e 5) remodelamento (Tong *et al.*, 2000).

Primeiramente ocorre a formação de um hematoma na região do enxerto. Deve-se salientar que somente um pequeno número de células osteoprogenitoras continua viável ao final desta etapa, devido à angiogênese ocorrer de forma centrípeta (Bhatt *et al.*, 2007). O processo inflamatório dura por aproximadamente 7 dias. Conseqüentemente ocorre uma intensa revascularização e reorganização deste coágulo, trazendo, ao final desta

etapa, células com potencial osteogênico, osteocondutor e/ou osteoindutor. Esta etapa dura aproximadamente 14 dias (Hammerle *et al.*, 1995). Ao final desta, pode-se encontrar a região em processo de remodelação, através de células osteoblásticas, que atuam através na formação de novo osso e células osteoclásticas, atuando através da degradação do material enxertado (Tong *et al.*, 2000).

A forma de apresentação do material interfere de forma significativa neste processo de neoformação. Enxertos particulados apresentam uma penetração de células e vasos sanguíneos facilitada, tornando o processo acelerado quando comparado com enxertos em bloco, devido à sua estrutura densa e cortical que promove uma barreira física para a angiogênese (Moioli *et al.*, 2007). De forma geral, o percurso da neoformação dos vasos sanguíneos ocorre de forma centrípeta, ou seja, indo da periferia em direção ao centro do defeito. Desta forma, enxertos em bloco apresentam uma angiogênese no interior do defeito menor que os enxertos particulados (Nishimura *et al.*, 2004).

Estudos desenvolvidos por Schwarz *et al.* (2008), avaliando histoquimicamente processos reconstitutivos utilizando enxertos em bloco e particulados em cães, relataram que a forma particulada apresentou neoformação óssea significativamente superior quando comparado com a forma em bloco, sendo que fatores como as proteínas ósseas morfogenéticas influenciam positivamente este processo.

Durante a fase de remodelação do enxerto ósseo, as características mecânicas do leito receptor exercem uma influência significativa, principalmente quando forças excessivas atuam sobre o material enxertado, sendo este um dos problemas mais comuns nas reconstruções do tecido ósseo (Tong *et al.*, 2000).

Dentre os fatores que interferem de forma significativa no processo de regeneração do tecido ósseo, pode-se citar: posição inlay ou onlay, origem embriológica, forças atuantes sobre o enxerto, forma de fixação, existência ou não de perióstio e revascularização (Linka *et al.*, 2008)

Leucht *et al.* (2008) avaliando processo de reparação óssea através de enxertos de origem endocondral e intramembranosa, concluíram que estes fatores influenciam somente no tipo de osso formado, sendo o endocondral com maior porção de osso medular quando comparado ao intramembranosa.

Deste modo, a origem não é o fator primordial no processo de remodelação, mais sim o tipo de osso utilizado como enxerto.

2.4 MATRIZ ÓSSEA BOVINA ANORGÂNICA E ESTUDOS EM ANIMAIS

Dentre os diversos biomateriais existentes pode-se dizer que a matriz óssea bovina anorgânica tem sido bastante utilizada nos processos reconstrutivos, principalmente após a década de 60. Após o início da sua utilização, reações antígeno-anticorpo, isto é, reações auto-imunes passaram a ocorrer. Por este motivo, sua utilização foi praticamente abolida até meados da década de 90, quando técnicas para extração de proteínas dos fragmentos ósseos, passaram a ser executadas. Este processamento diminuiu significativamente o potencial antigênico do material em questão, evitando, deste modo reações auto-imunes por parte do hospedeiro (Basle *et al.*, 1998).

Devido ao grande número de materiais a serem pesquisados, assim como a necessidade de protocolos bem definidos para estudos em seres humanos, vários outros seres vivos vem sendo utilizados em pesquisas, principalmente na odontologia. Deste modo, estudos objetivando comparar estes modelos animais com os seres humanos foram desenvolvidos, tornando os resultados aplicáveis em seres humanos (Nunamaker, 1998). Turner (2001), comparou uma série de modelos animais com o *Homo sapiens*. O autor observou que, apesar de difícil manuseio e alto custo, os macacos *Rhesus* foram os mais semelhantes aos seres humanos, seguidos pelos cães, sendo estes animais de fácil manuseio e baixo custo.

Haas *et al.* (2002), avaliando substitutivos ósseos homogêneos e

heterógeno em procedimento cirúrgico para elevação do assoalho do seio maxilar em ovelhas observaram que ambos não apresentavam reação de antígeno-anticorpo, sendo, desta forma, materiais biocompatíveis.

Laureano Filho *et al.* (2007), avaliaram dois materiais heterógenos, polímero de mamona e matriz óssea bovina anorgânica, em procedimentos de regeneração óssea guiada. Para isto, foram utilizados 24 coelhos, submetidos a dois defeitos em suas calvárias. Os autores concluíram que ambos biomateriais apresentaram-se biocompatíveis, sendo o processo de reabsorção no polímero de mamona mais lento.

A matriz óssea bovina anorgânica vem sendo pesquisada e, de acordo com Hollinger *et al.* (1990) apresenta um potencial osteocondutivo, ajudando na neoformação óssea. Em cirurgia Buco-maxilo-facial, este material é utilizado para o preenchimento de lesões isoladas, promover um melhor contorno de uma determinada área, fenestrações em implantes e eventualmente em cirurgias de levantamento do seio maxilar (Gomes, 2002).

Apesar das técnicas para descontaminação dos biomateriais terem evoluído, ainda persistem dúvidas quanto ao potencial de infecções entre os indivíduos envolvidos (Sogal & Tofe, 1999). Wenz *et al.* (2001) discutem o mecanismo de inativação do agente responsável pela encefalopatia espongiiforme bovina ou doença de Creutzfeldt-Jakob, comumente conhecida como doença da vaca-louca. Baseados em alguns conceitos teóricos e evidência experimental, os autores concluíram que as etapas de processamento do osso fazem com que o risco de transmissão desta doença aos seres humanos seja nulo.

Deste modo, pesquisas vem sendo realizadas visando a obtenção de uma reparação óssea melhor utilizando osso bovino. Com isso, fatores de crescimento como a proteína óssea morfogenética, principalmente a numero 2, vêm sendo adicionados às partículas do biomaterial. Serra e Silva *et al.* (2006) selecionaram pacientes edentulos que apresentavam seios maxilares pneumatizados. No grupo controle foram realizados os procedimentos de

levantamento de assoalho do seio maxilar e preenchimento destes com osso autógeno particulado. No outro grupo, o preenchimento foi realizado com matriz óssea bovina anorgânica associada a proteína óssea morfogenética bovina. Após um período de 6 a 11 meses, foi instalado os implantes e feita biópsias das regiões utilizando trefinas de 2mm. Observou-se, em análise clínica, que o travamento inicial nos implantes inseridos na área enxertada pelo osso bovino apresentaram um travamento melhor quando comparados ao grupo controle, sendo, em todos os casos, possível a instalação dos implantes. Histologicamente, o tecido ósseo apresentava-se menos maturo e entremeado por uma porção de tecido conjuntivo fibroso, quando comparado ao grupo teste.

Desta forma, estudos avaliando o tamanho das partículas passaram a ser desenvolvidos. Pallesen *et al.* (2002), pesquisaram a influência do tamanho das partículas do enxerto de osso autógeno em defeitos criados na calvária de coelhos. Foram utilizados fragmentos com volume de 0.5 a 2mm³ e 10mm³ e os animais foram sacrificados e analisados após 1 e 4 semanas. A microscopia óptica revelou que naqueles defeitos em que foi utilizada a granulação menor ocorreu maior neoformação óssea. Observaram também que ao término dos 28 dias, os fragmentos ósseos menores foram substituídos por osso neoformado de forma mais intensa do que observado para os fragmentos maiores.

Posteriormente, Coradazzi , em 2003, avaliou o processo de reparação óssea em defeitos de 7mm criados em tíbia de coelhos quando fazia uso de enxerto autógeno na forma particulada ou na forma obtida por meio de coletor ósseo associado ao aspirador cirúrgico, sendo as partículas fornecidas pelo enxerto triturado maiores quando comparadas as do coletor ósseo. Os animais foram sacrificados em intervalos de 7, 15 e 30 dias, sendo que a análise histológica e histomorfométrica revelou não haver diferença significativa entre os dois grupos, porém, a neoformação óssea foi significativamente maior do que observado no grupo controle (coágulo sangüíneo).

Outro estudo realizado por Kluppel (2007), através de 4 defeitos

em calotas de coelhos, avaliou a influência do tamanho das partículas da matriz óssea bovina anorgânica no processo de reparação óssea. Os defeitos foram preenchidos com osso autógeno triturado (grupo controle); matriz óssea bovina anorgânica de granulação grossa; matriz óssea bovina anorgânica de granulação média ou matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 15, 30 e 60 dias. Segundo o autor, as partículas menores influenciaram de forma positiva, sendo que a matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina proporcionou um melhor padrão de reparo ósseo quando comparada às granulações média e grossa.

2.5 VEÍCULOS UTILIZADOS PARA INSERÇÃO DE BIOMATERIAIS E ENXERTOS ÓSSEOS NA FORMA PARTICULADA:

Veículos ou carreadores são materiais utilizados para auxiliar na adaptação dos enxertos autógenos ou substitutos ósseos na forma particulada ao leito receptor (Boyne *et al.*, 2005).

Dentre as vantagens da utilização dos substitutos ósseos pode-se constatar uma menor morbidade cirúrgica, assim como volume ilimitado (Ruhaimi, 2001). Apesar disto, estes materiais necessitam de um carreador para serem inseridos no leito receptor. Idealmente, um material que venha a ser empregado junto com os substitutos ósseos deve ser biocompatível, apresentar potencial aglutinante satisfatório e influenciar de forma positiva os processos de osteocondução e osteoindução (Dupoirieux *et al.*, 1994).

Desta forma, estudos sobre estes veículos tem sido desenvolvidos visando melhor inserção destas matérias na área receptora (Santa-Comba *et al.*, 2000; Vance *et al.*, 2004).

Dentre os materiais que auxiliam na inserção dos biomateriais pode-se destacar o soro fisiológico 0,9%, comumente utilizado para irrigação durante procedimento cirúrgicos. Dentre suas vantagens pode-se citar o potencial

aglutinante, principalmente em casos de enxertos particulados, além de serem inertes (Kübler *et al.*, 2004).

Vance *et al.* (2004), avaliaram materiais aloplástico e heterógeno associados a diferentes carreadores em 24 seres humanos. Sua metodologia foi baseada em dois grupos: Grupo teste, com aglutinante em forma de pasta composta por carboxi-metil-celulose e sulfato de cálcio, associados com osso aloplástico desmineralizado em uma proporção de 50:50 e, o Grupo controle, composto por matriz óssea bovina anorgânica desmineralizada, associadas a membrana de colágeno. Após trefinagem do local, previamente a inserção dos implantes, os autores concluíram que o grupo teste apresentou um menor volume ósseo, porém o osso presente apresentava uma vitalidade superior quando comparado ao grupo controle. Deste modo, a carboxi-metil-celulose favoreceu, segundo os autores, de forma positiva, pois sua consistência porosa facilitou o crescimento de vasos sangüíneos entre suas partículas.

Estudos sobre fatores que promovem a estimulação do processo de neoformação óssea são freqüentes (Boyne *et al.*, 2005; Fiorelline *et al.*, 2005). Atualmente sabe-se que dentre as proteínas ósseas morfogenéticas a recombinante humana-2 é a que apresenta melhores resultados em termos de osteoindução (Boyne *et al.*, 2005). Para sua utilização é imprescindível o uso de veículos para sua inserção no leito receptor. Dentre estes veículos pode-se citar a membrana de colágeno (Boyne *et al.*, 2005).

Santa-Comba *et al.* (2000), pesquisaram diferentes carreadores para serem utilizados com veículos durante a inserção da BMP-2. Para isto utilizaram diferentes carreadores oriundos da metil-celulose: hiroxi-propimetil-celulose, carboxi-metil-celulose e hidróxido de alumínio. Os autores observaram que o nível de fosfatase alcalina, envolvida no processo de neoformação óssea aumentou quando utilizada a carboxi-metil-celulose sendo, maior quando associada à BMP-2, ao passo que a hidroxipropimetil-celulose não apresentou interferência no nível de fosfatase alcalina, estando associados ou não à BMP-2.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar comparativamente, por meio de avaliação radiológica e histológica, o processo de reparação óssea utilizando a matriz óssea bovina anorgânica associada aos veículos carboxi-metil-celulose e soro fisiológico 0,9%.

4 METODOLOGIA

Previamente ao início da fase experimental, o projeto deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP sob número de protocolo 1343-1 (Anexo 1).

4.1 SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 06 cães adultos, machos, sem distinção de raça, com peso médio de 15 Kg. Os cães, procedentes do biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, sob as mesmas condições ambientais durante todo o estudo, em baias individuais e recebendo ração e água *ad libitum*.

4.2 FASE CIRÚRGICA

4.2.1 Medicação pré-operatória e anestesia

Como profilaxia antibiótica os animais receberam, 30 minutos antes do procedimento, injeção intramuscular de 0,1 mL/kg peso de benzilpenicilina benzatina e dexametasona (0,5 mg/Kg). Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram sedados com o indutor anestésico *Cloridrato de Ketamina* (0,15 ml/Kg), via intramuscular e submetidos à anestesia geral, com injeção intravenosa de *Pentobarbital Sódico* 3% (30mg/Kg), ambos conforme recomendações do fabricante.

4.2.2 Procedimento Cirúrgico e Material avaliado

As intervenções cirúrgicas foram executadas dentro de condições assépticas, respeitando as normas de biosseguranças preconizadas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), subordinada ao

Ministério da Ciência e Tecnologia. Após indução anestésica, foi realizada tricotomia na cabeça dos cães e anti-sepsia com solução aquosa de polivinilpirrolidona iodo a 10% . Para o isolamento da área foram utilizados campos cirúrgicos estéreis descartáveis (Figura 1).



Figura 1: Vista superior da cabeça do animal, após tricotomia,desinfecção e aposição de campo cirúrgico estéril.

Infiltrou-se anestésico local com vasoconstritor (Lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000) em dosagem de 5mg/Kg (Figura 2). Em seguida, utilizando-se de lâmina de bisturi nº 15 realizou-se uma incisão linear de aproximadamente 05 centímetros na pele e subcutâneo, em um sentido ântero-posterior, estendendo-se de frente à região occipital (Figura 3). A porção óssea do crânio do animal foi exposta após descolamento do pericrânio da região envolvendo os músculos temporais (Figura 4).



Figura 2: Procedimento de infiltração anestésica para promover hemostasia.

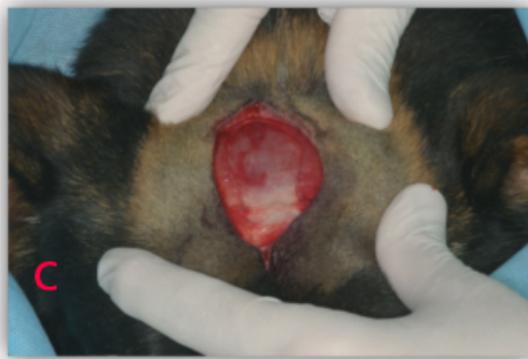


Figura 3A-C: Após infiltração com anestésico local, procedeu-se com a incisão linear em pele (A-B) e subcutâneo (C).



Figura 4: Regiões parietais da calota craniana expostas.

Em seguida foram trefinadas duas cavidades em regiões parietais direita e esquerda, preservando-se a integridade da dura-máter, com auxílio de uma broca trefina de 08 mm de diâmetro (Figura 5), acoplada a um contra-ângulo 1:1, a 15000 rotações por minuto.



Figura 5: Broca trefina de 8mm de diâmetro utilizada para demarcação dos defeitos.

A irrigação abundante da broca e do tecido ósseo durante o momento da trefinagem com solução fisiológica a base de cloreto de sódio

0,9% foram mantidas durante toda perfuração com intuito de não causar o superaquecimento da região, e assim prejudicar a interpretação dos resultados. Uma vez concluídas as perfurações (Figura 6), a porção óssea delimitada pela trefina foi removida com o auxílio de um descolador de periósteo tipo Molt, expondo dura-mater (Figura 7).

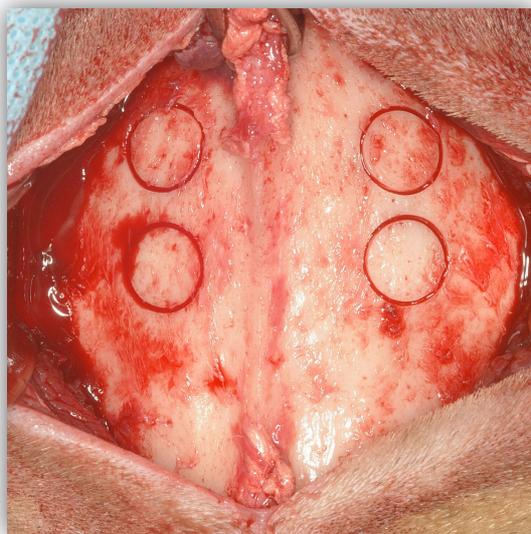


Figura 6: Demarcações dos defeitos

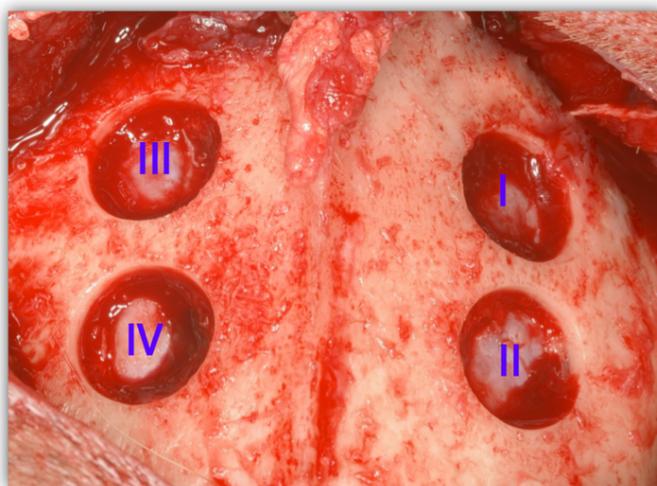


Figura 7: Aspecto trans-cirúrgico (vista ântero-posterior) após aremoção em espessura total de parte da calota do animal, mantendo a dura-máter intacta. Note a distribuição numérica das cavidades.

Os fragmentos ósseos removidos foram triturados em particulador de osso e mantidos hidratados em soro fisiológico 0,9% até o momento de sua utilização (Figura 8). Ao término desta etapa, obteve-se 4 cavidades na calvária de cada animal, sendo, por fins didáticos, denominadas e preenchidas do seguinte modo:

1. Grupo I (Grupo controle negativo): Localizada na região posterior da calvária esquerda, preenchida com coágulo sangüíneo do próprio animal;
2. Grupo II (Grupo controle positivo): Localizada na região anterior da calvária esquerda, preenchida com osso autógeno particulado;
3. Grupo III: Localizada na região posterior da calvária esquerda, preenchida com matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina (menor que 450 μ m), associada ao soro fisiológico a 0,9%;
4. Grupo IV: Localizada na região anterior da calvária direita, preenchida com matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina (menor que 450 μ m), associada à carboxi-metil-celulose.

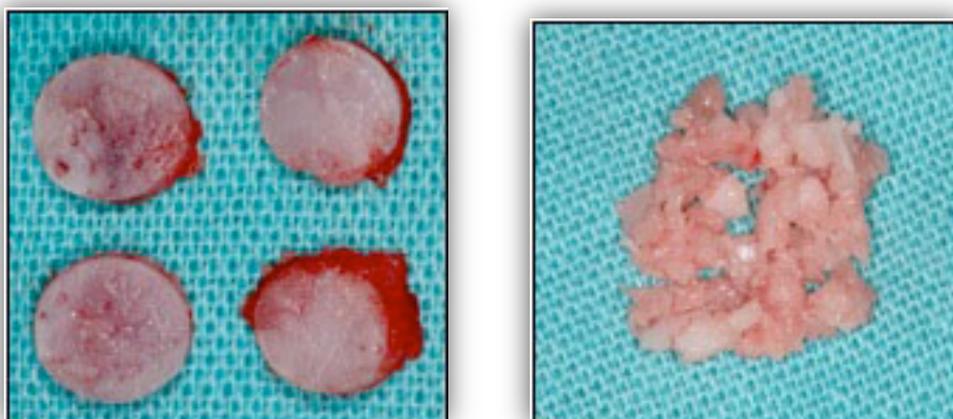


Figura 8A-C: Fragmentos ósseos removidos em espessura total (A) e triturados (B).

Os biomateriais para preenchimento das cavidades III e IV pertenciam à marca comercial Consulmat® Indústria e Comercio Ltda (Figura 9).

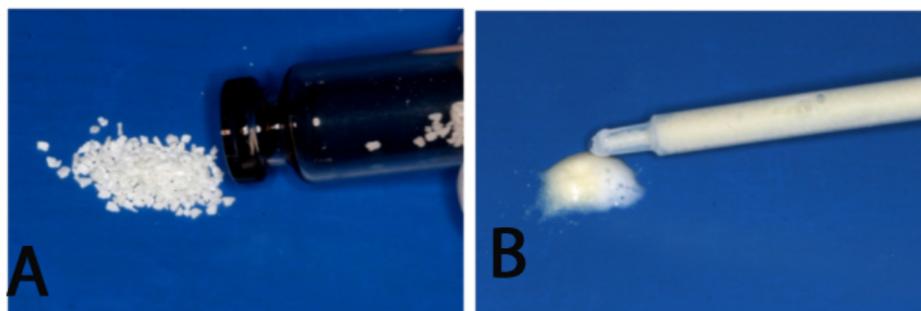


Figura 9A-B: Matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina (A) e em consistência pastosa (B).

Após o preenchimento das cavidades (Figura 10), os músculos temporais e periósteo foram reaproximados com suturas utilizando fio absorvível (Poliglactina 910). Da mesma forma, os planos superficiais foram suturados com fio de nylon monofilamentar 4-0 (Figura 11).



Figura 10: Materiais inseridos nos defeitos ósseos. Em sentido horário, Grupo I – coágulo sanguíneo, Grupo II – osso autógeno particulado, Grupo III – matriz óssea bovina anorgânica associada ao soro fisiológico 0,9%, Grupo IV - matriz óssea bovina anorgânica associada à carboxi-metil-celulose.

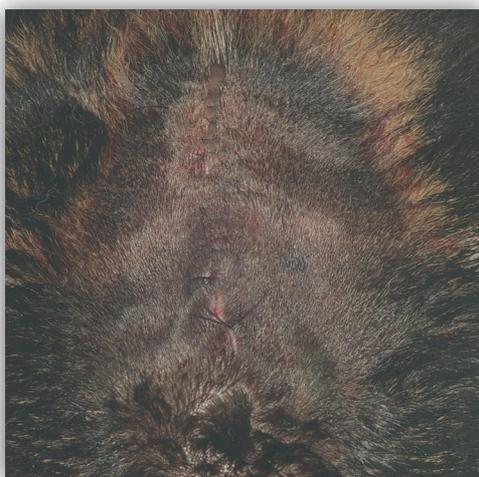


Figura11: Aspecto pós-operatório imediato, apos realização de suturas por planos.

Após o ato cirúrgico os animais permaneceram em observação no período inicial da recuperação anestésica e em seguida foram levados para suas baias, onde permaneceram até o momento do sacrifício.

4.3 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, correspondentes aos dois períodos de sacrifício: o primeiro grupo, constituído de 4 animais, foi sacrificado ao completar o período de 3 semanas do procedimento cirúrgico; o segundo grupo de 4 animais foi sacrificado 6 semanas após o procedimento cirúrgico. O sacrifício foi realizado através de overdose endovenosa de *Cloreto de Potássio* a 19,1%, até se obter a parada cardiorrespiratória.

Posteriormente a esta etapa, foi confeccionado o acesso ao crânio do animal como descrito anteriormente (Páginas 20 e 21) e exposição da região enxertada.

O blocos ósseos foram obtidos por seccionamento transversal e coronal do osso com broca tronco-cônica 702 em turbina de alta rotação sob irrigação constante e abundante com solução fisiológica de *Cloreto de Sódio* a 0,9% com uma margem de segurança para as áreas operadas previamente de 5 mm e enviados para análise.

4.4 MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS RADIOGRAFIAS

Cada defeito contido nos blocos ósseos obtidos foram radiografados com filme periapical simples do grupo de sensibilidade F, utilizando o mesmo aparelho radiográfico de uso odontológico, com regulagem de 60KV e 10mA e tempo de exposição de 0,25 segundos. O exame radiográfico foi realizado no próprio Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), sendo o sentido dos feixes perpendiculares ao bloco ósseo contendo os defeitos.

Para padronização de revelação radiográfica foi utilizado equipamento processador automático, fornecidos pela Área de Radiologia desta mesma instituição, e soluções químicas para revelação e fixação do tipo T-mat. O tempo total de revelação foi de 7 minutos para cada película.

Após este processo os filmes foram acondicionados em recipientes próprios para posterior análise em um negatoscópio.

4.5 MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Os blocos ósseos obtidos foram imersos em solução de formaldeído 10% e tampão fosfato por um período de trinta dias. Após esse período foram lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificados em solução de *Citrato de sódio* ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 20% e *Ácido fórmico* (HCOOH) a 50% em partes iguais (Morse, 1945), durante um período de 62 dias. Ao final deste processo, a

calota craniana foi seccionada no sentido sagital, resultando em duas peças: uma delas contendo as cavidades I e II (lado esquerdo) e a outra contendo as cavidades III e IV (lado direito). Cada fragmento ósseo contendo os dois defeitos foi seccionado ao meio dividindo-os em dois hemi-círculos. A partir desta fase procedeu-se a realização das etapas de processamento laboratorial, sendo cada defeito inserido em uma lâmina isoladamente. Inicialmente foi feita a lavagem das peças em água corrente durante 5 horas, desidratação com álcool a 70% (12 horas), álcool a 80% (1 hora), álcool a 90% (1 hora), álcool absoluto (1 hora), diafanização com Xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$) por meio de três trocas a cada 20 minutos e infiltração em parafina (1 hora) em estufa a 70° Celsius realizando-se 3 trocas. Cortes seriados com 6µm de espessura foram realizados e em seguida corados pela Hematoxilina de Carazzi e Eosina – Lison, para posterior visualização em microscópio óptico comum.

Todo o processamento foi realizado por um profissional da Área de Histologia da FOP-UNICAMP. As regiões dos cortes para confecção das lâmina foram orientadas pelo próprio autor, aluno de Pós-graduação, e por um professor da Área de Cirurgia Buco-maxilo-facial da FOP-UNICAMP.

4.6 ANALISE DOS RESULTADOS

4.6.1 Análise Radiológica descritiva

As imagens radiográficas obtidas foram analisadas de forma comparativa entre a região do defeito ósseo confeccionado e a área de osso intacto existente na periferia dos defeitos, relacionando a densidade radiográfica nas regiões centrais e periféricas.

4.6.2 Análise Histológica descritiva

Na análise histológica descritiva foram avaliados padrões de regeneração óssea tais como: presença de reação inflamatória assim como a seqüência de eventos que envolveram a reparação óssea dos defeitos

circulares. Os eventos e características teciduais do processo de reparação óssea eram descritos como necrose, hemorragia, atividades osteoclásticas e osteoblásticas, presença de tecido conjuntivo e grau de maturação, presença de remanescentes do material enxertado, assim como neoformação de tecido ósseo maturo e/ou imaturo.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE RADIOLÓGICA DESCRITIVA

5.1.1 Coágulo

Na avaliação do Grupo I no período de 3 semanas, sugere-se uma cavidade bem delimitada assim como uma radiopacidade consideravelmente menor ao comparar à periferia do defeito, tanto na região central e periférica (Figura 12A). No período de 6 semanas, observou-se uma diminuição na demarcação dos limites entre o defeito e osso pré-existente, assim como uma menor radiolucidez correspondente a região do coágulo, principalmente nas regiões periféricas do defeito (Figura 12B).

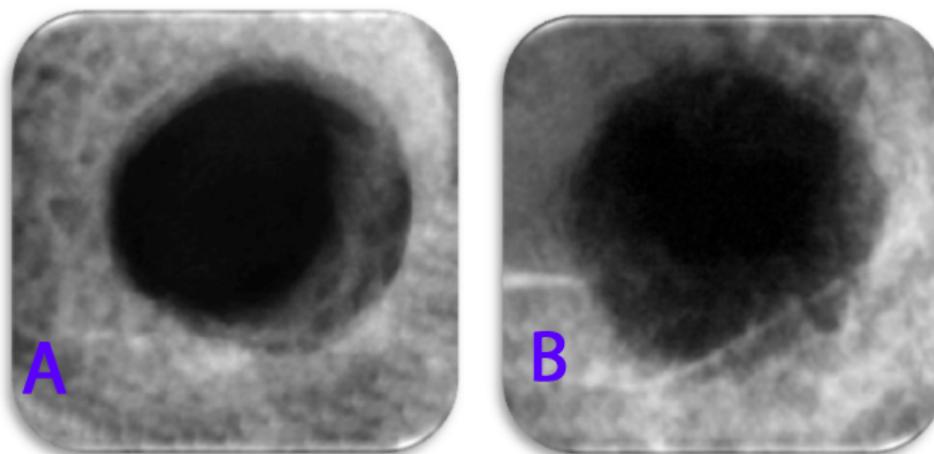


Figura 12 A-B: Radiografias do Grupo I. Período de 3 semanas (A) e 6 semanas (B).

5.1.2 Osso autógeno

Nas cavidades preenchidas com osso autógeno, a tomada radiográfica realizada nas peças com 3 semanas de período pós-operatório revelou uma cavidade bem delimitada e totalmente preenchida, sendo possível observar áreas radiopacas em seu interior, achado compatível com a compactação do enxerto no trans-operatório (Figura 13A). No grupo sacrificado após 6 semanas, a região da ostectomia foi praticamente imperceptível e o seu preenchimento apresenta radiopacidade semelhante ao osso adjacente, porém ainda disperso e com trabeculado não definido, de forma amorfa com pontos de mineralização (Figura 13B).

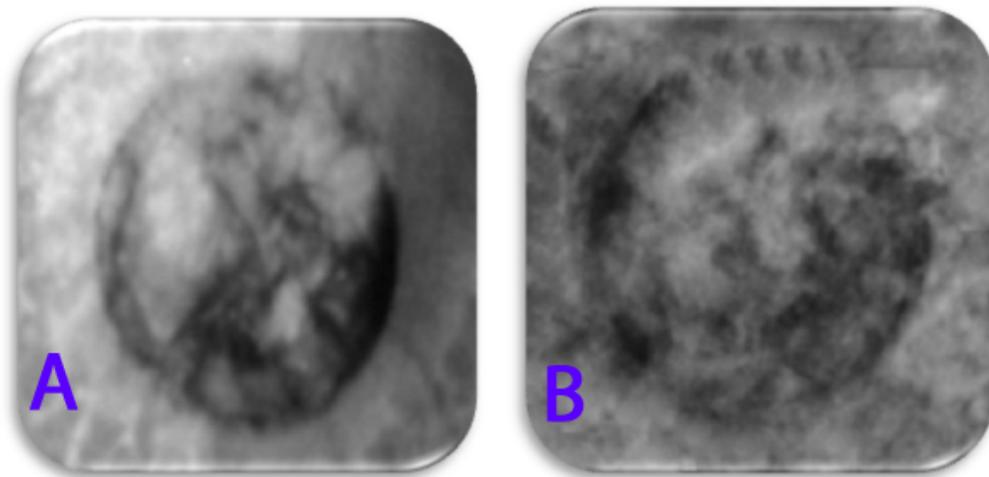


Figura 13 A-B: Radiografias do Grupo II. Período de 3 semanas (A) e 6 semanas (B).

5.1.3 Matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina associada ao soro fisiológico 0,9%

Este grupo apresentou após 3 semanas de pós-operatório um nítido contorno da loja cirúrgica, a qual se encontra visivelmente mais radiolúcida que o tecido ósseo adjacente (Figura 14A). Ao exame radiográfico das peças com 6 semanas de período pós-operatório, observou-se nitidez dos contornos da loja cirúrgica, apresentando o defeito uma imagem visivelmente mais radiopaca, principalmente na região central, sugerindo início de um processo de reparação óssea de forma centrífuga (Figura 14B).

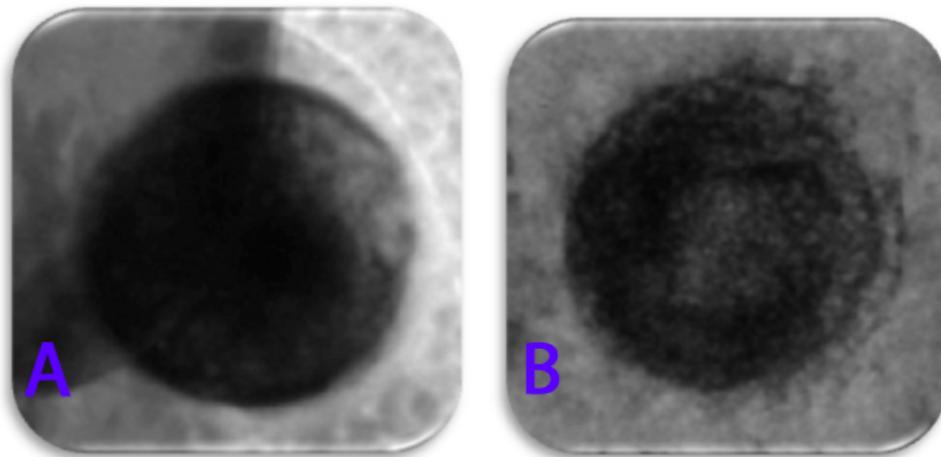


Figura 14 A-B: –Radiografias do Grupo III. Período de 3 semanas (A) e 6 semanas (B).

5.1.4 Matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina associada à carboxi-metil-celulose

A avaliação radiográfica mostrou um nítido contorno da loja cirúrgica após 3 semanas de pós-operatório neste grupo. Além disso, a loja apresentou-se visivelmente mais radiolúcida que o tecido ósseo adjacente (Figura 15A). Para as tomadas das peças com 6 semanas após a criação e preenchimento do defeito, observou-se nitidez nos contornos da loja cirúrgica, assim como maior radiolucidez que o tecido ósseo adjacente quando comparado ao período de 3 semanas, sugerindo reabsorção das partículas do substituto ósseo inserido (Figura 15B).

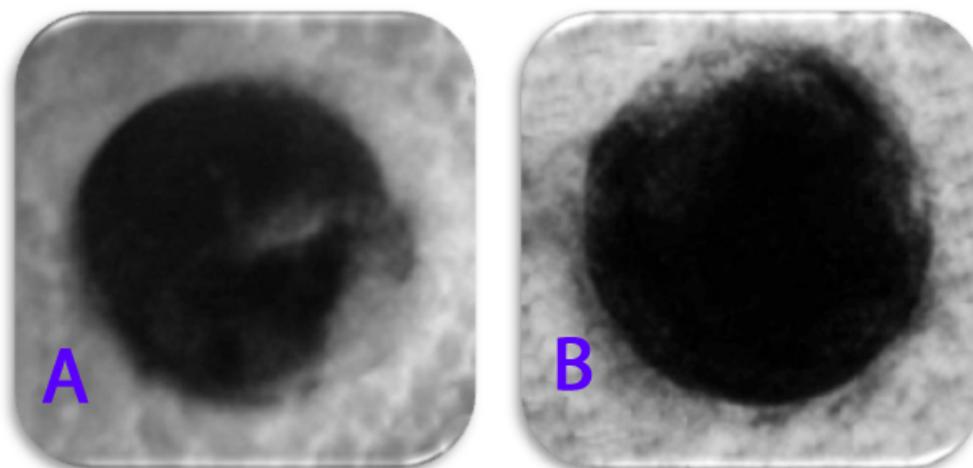


Figura 15 A-B: Radiografias do Grupo I. Período de 3 semanas (A) e 6 semanas (B).

Deste modo os resultados dos períodos de sacrifícios de 3 e 6 semanas podem ser agrupados conforme tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1: Resumo da análise radiológica descritiva nos períodos de 3 e 6 semanas.

GRUPO	Região central do defeito	Região periférica do defeito	Osso Pré-existente	Material enxertado
GRUPO I	Radiolúcido	Nítida	Radiopaco	Radiolúcido
GRUPO II	Radiopaco	Não-nítida	Radiopaco	Radiopaco
GRUPO III	Radiolúcido	Nítida	Radiopaco	Radiolúcido
GRUPO IV	Radiolúcido	Nítida	Radiopaco	Radiolúcido

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

5.3.1 Período de sacrifício de 3 semanas

5.3.1.1 Cavidade I - Coágulo

No Grupo I, correspondente aos defeitos preenchidos com coágulo, verificou-se a presença de tecido conjuntivo preenchendo quase a totalidade da cavidade cirúrgica. A periferia encontrou-se bem delimitada, sendo o osso pré-existente caracterizado pela presença de duas corticais nítidas (Figura 16). A região das bordas do defeito apresenta áreas de remodelação, com ponto de reabsorção e aposição óssea. Entre o tecido conjuntivo neoformado é possível notar a presença de um discreto processo inflamatório e alguns vasos sanguíneos existentes (Figura 17). Não se observou a presença de tecido ósseo neoformado.

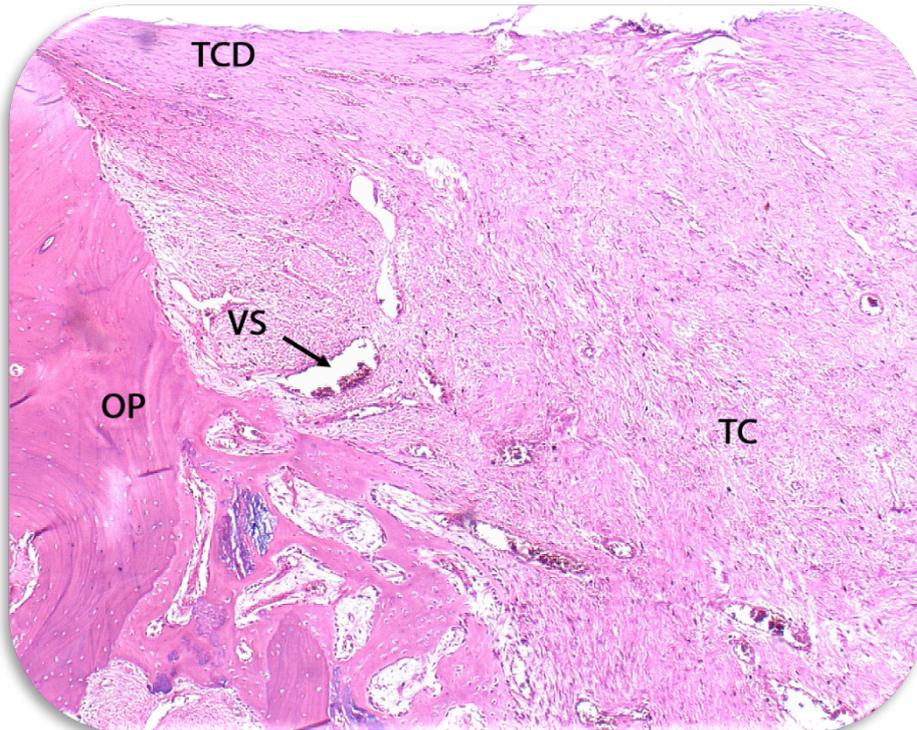


Figura 16: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OP:** osso pré-existente. **VS:** vaso sanguíneo. **TC:** tecido conjuntivo. **TCD:** tecido conjuntivo denso.

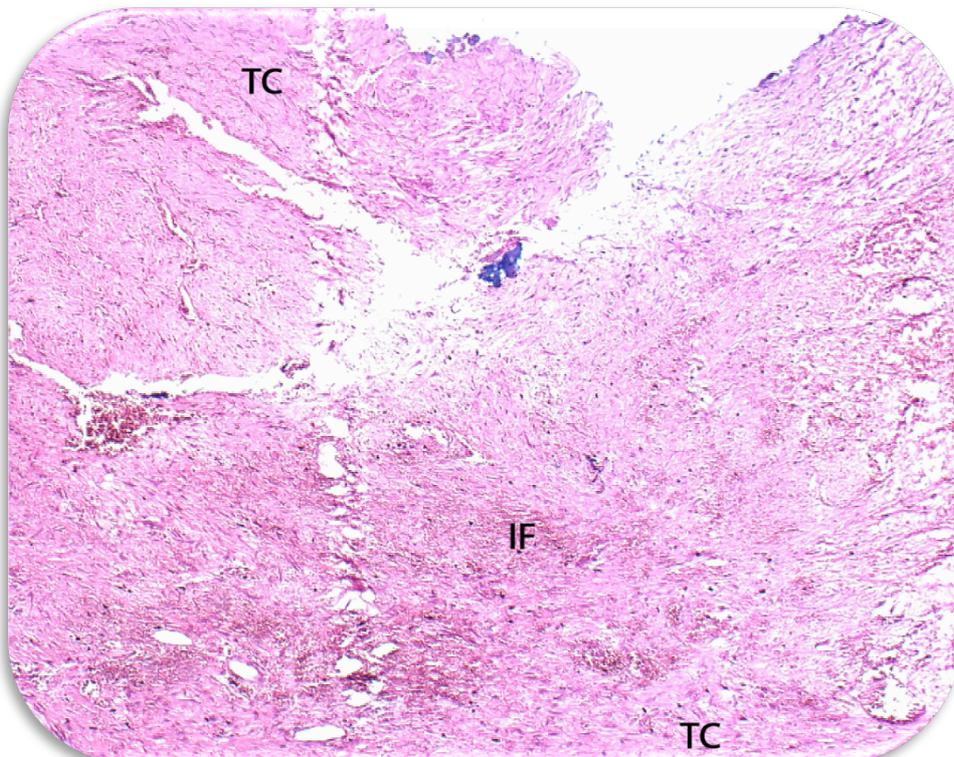


Figura 17: fotomicroscopia após 3 semanas. 20x (HE). **TC:** tecido conjuntivo. **TCD:** tecido conjuntivo denso. **IF:** infiltrado inflamatório.

5.3.1.2 Cavidade II – Osso autógeno particulado

Os defeitos preenchidos com osso autógeno particulado mostraram um comportamento semelhante aos do Grupo I, sendo possível a identificação da região limite entre osso pré-existente e o enxerto. As margens do defeito apresentaram áreas de remodelação e neoformação óssea em direção ao centro do defeito, caracterizando um processo de formação óssea centrípeta (Figura 18). Observou-se também a interposição de tecido conjuntivo fibroso entremeadado com as trabéculas ósseas neoformadas, além de áreas de revascularização. Por meio da análise do enxerto verificou-se um estado mais avançado de cicatrização óssea já que este serviu como base para a evolução do processo de reparação por substituição (Figura 19). Houve uma tendência a formação óssea em direção centrípeta com a presença de alguns fragmentos de osso necrótico remanescentes (Figura 20). Em algumas áreas havia presença de discreta reação inflamatória, porém menor quando comparado ao grupo coágulo.

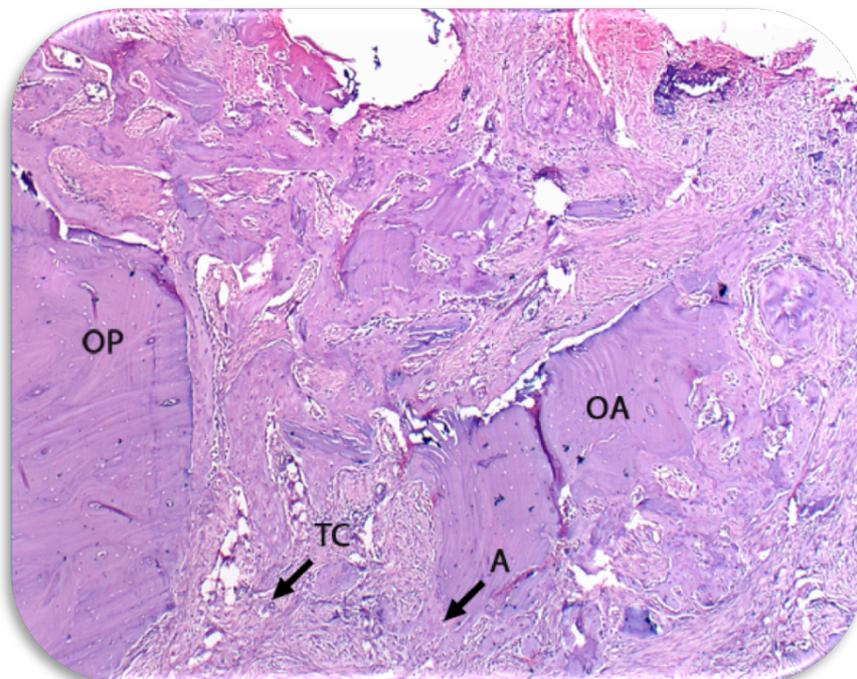


Figura 18: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OP:** osso pré-existente. **A:** aposição de novo osso. **OA:** enxerto ósseo autogeno. **TC:** tecido conjuntivo.

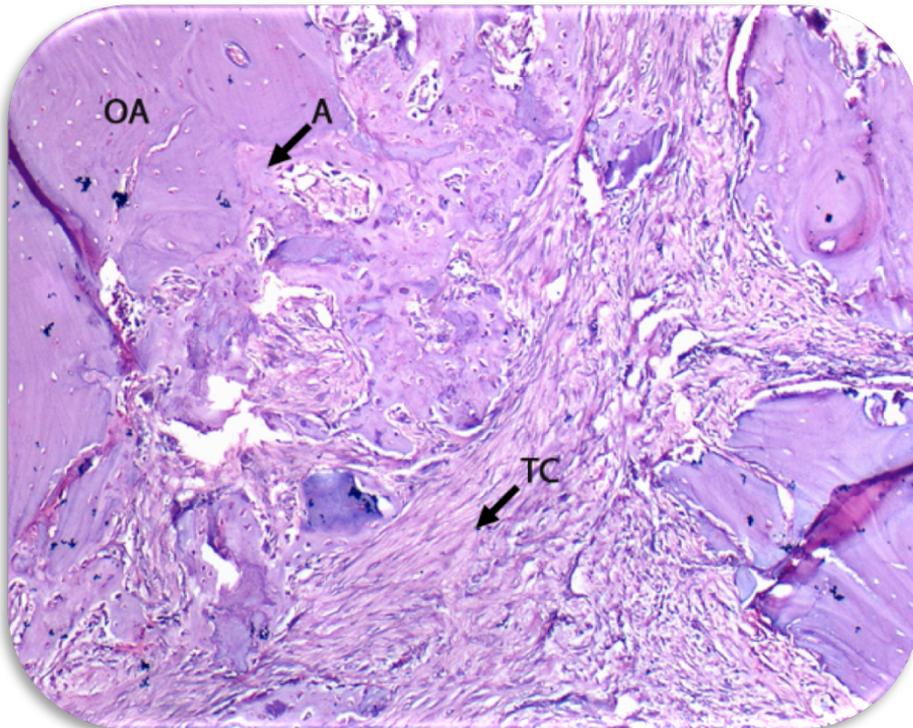


Figura 19: fotomicroscopia após 3 semanas. 20x (HE). **A:** aposição de novo osso. **OA:** enxerto ósseo autogeno. **TC:** tecido conjuntivo.

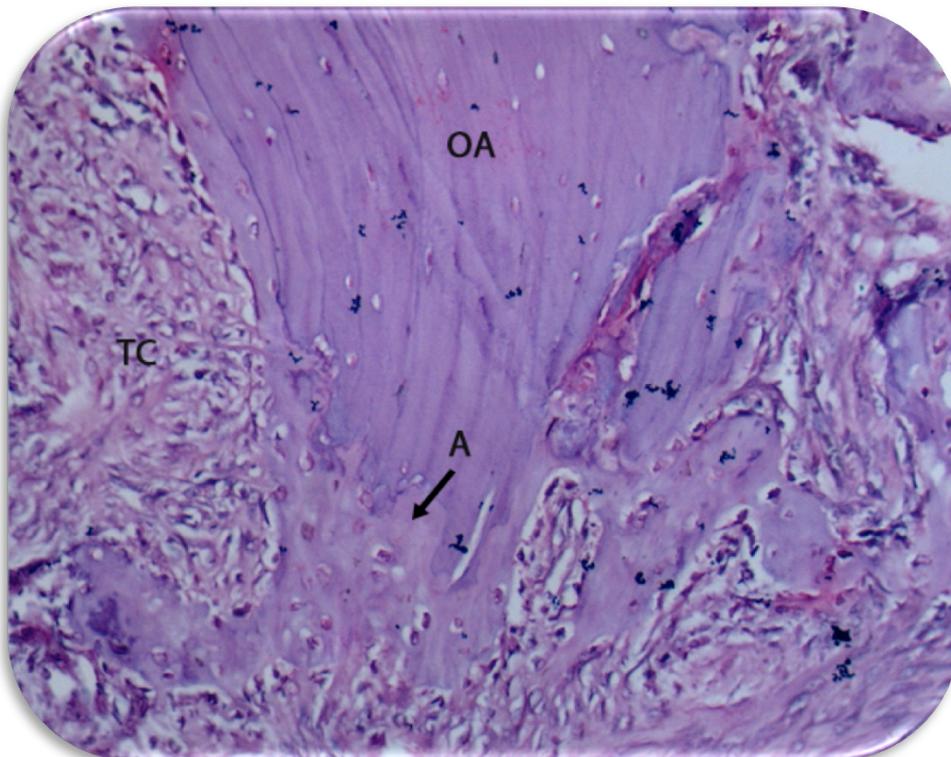


Figura 20: fotomicroscopia após 3 semanas. 40x (HE). **A:** aposição de novo osso. **OA:** enxerto ósseo autogeno. **TC:** tecido conjuntivo.

5.3.1.3 Cavidade III – Matriz óssea bovina anorgânica em granulação fina associada ao soro fisiológico 0,9%

Nos cortes histológicos correspondentes aos defeitos ósseos preenchidos com matriz óssea anorgânica em granulação fina após 3 meses do procedimento cirúrgico, verificou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso preenchendo a quase totalidade da cavidade cirúrgica. Observou-se poucas trabéculas ósseas neoformadas ainda imaturas entremeadas pelo tecido conjuntivo fibroso. A borda do defeito apresentou-se nítida, sendo o osso pré-existente caracterizado pela presença de duas corticais e tecido medular constituído por tecido adiposo e rica celularidade, apresentando as margens do defeito áreas de remodelação (Figura 21). No centro da cavidade óssea cirúrgica observou-se algumas partículas remanescentes do material utilizado para preenchimento da cavidade (Figura 22). O grupo apresentou ainda um discreto processo inflamatório, menor que o grupo do Coágulo, porém maior que o grupo Autógeno, de forma subjetiva.

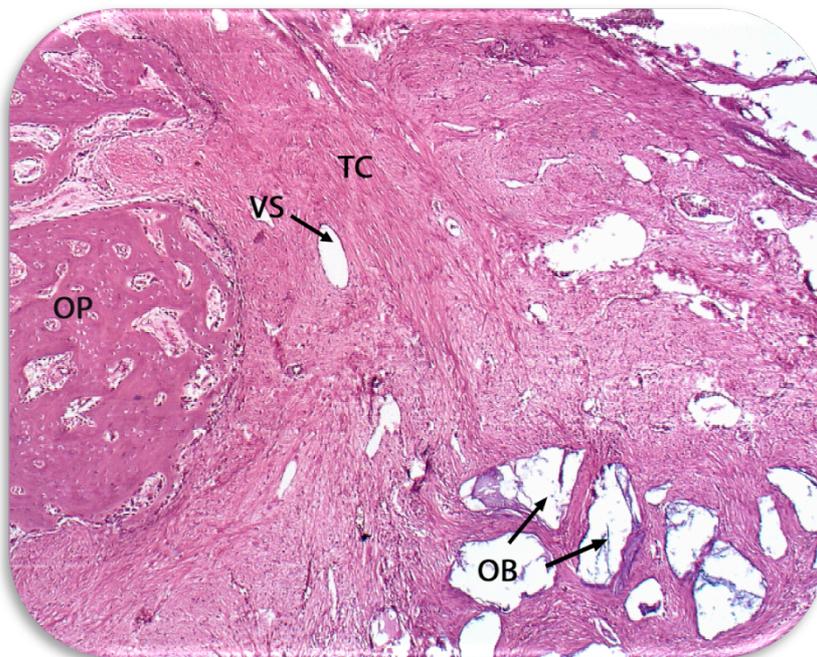


Figura 21: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OP:** osso pré-existente. **OB:** matriz óssea bovina. **VS:** vaso sanguíneo. **TC:** tecido conjuntivo.

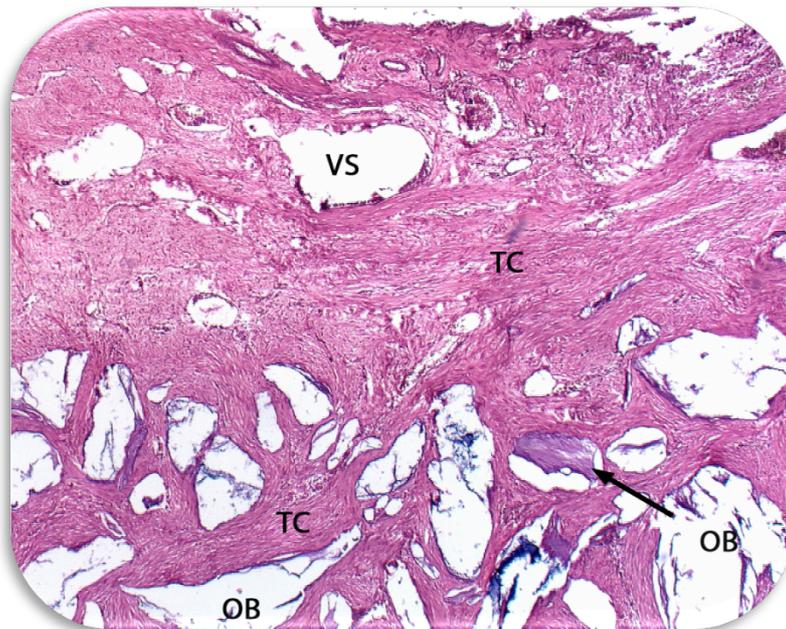


Figura 22: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OB:** matriz óssea bovina. **VS:** vaso sanguíneo. **TC:** tecido conjuntivo.

5.3.1.4 Cavidade IV – Matriz óssea bovina anorgânica em granulação fina associada à carboxi-metil-celulose

No grupo IV, em todos os defeitos pode-se observar o limite entre o osso pré-existente e o defeito produzido cirurgicamente. Este último se encontrou preenchido em quase sua totalidade por tecido conjuntivo fibroso. Notou-se que o osso pré-existente foi caracterizado pela presença de duas corticais nítidas e tecido medular constituído por tecido conjuntivo com rica celularidade e boa vascularização. Observou-se áreas de reabsorção e aposição óssea promovendo remodelação das margens da cavidade óssea cirúrgica e a presença do material adaptado circundado por tecido fibroso em toda a cavidade óssea cirúrgica. Juntamente com essas partículas que estavam preenchendo quase totalmente a cavidade, pode-se visualizar a presença de processo inflamatório agudo, sendo este maior que todos os outros grupos avaliados (Figuras 23-24).

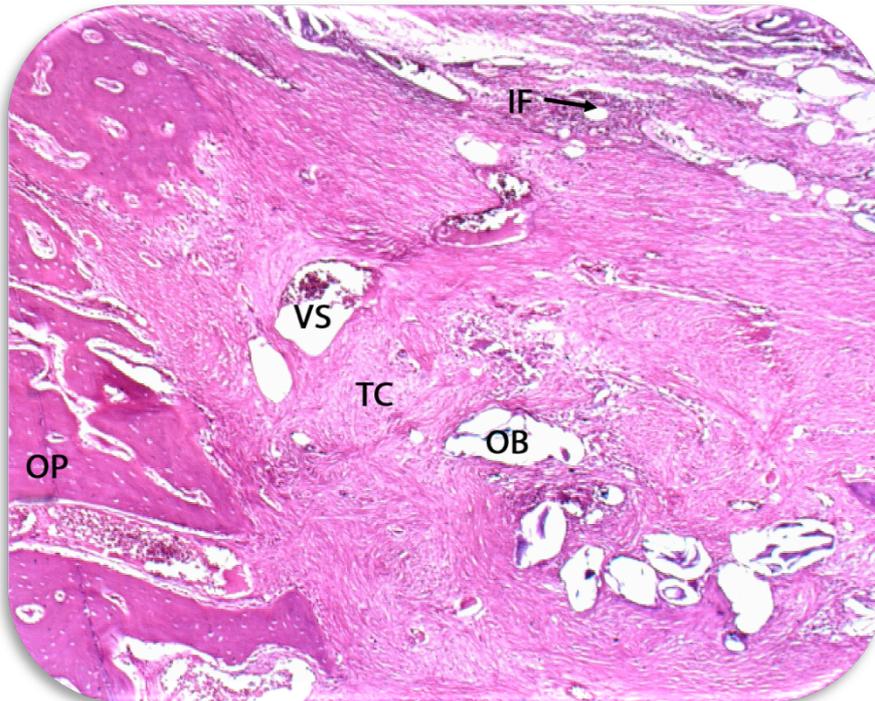


Figura 23: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OP:** tecido ósseo pré-existente **OB:** matriz óssea bovina. **VS:** vaso sangüíneo. **TC:** tecido conjuntivo.

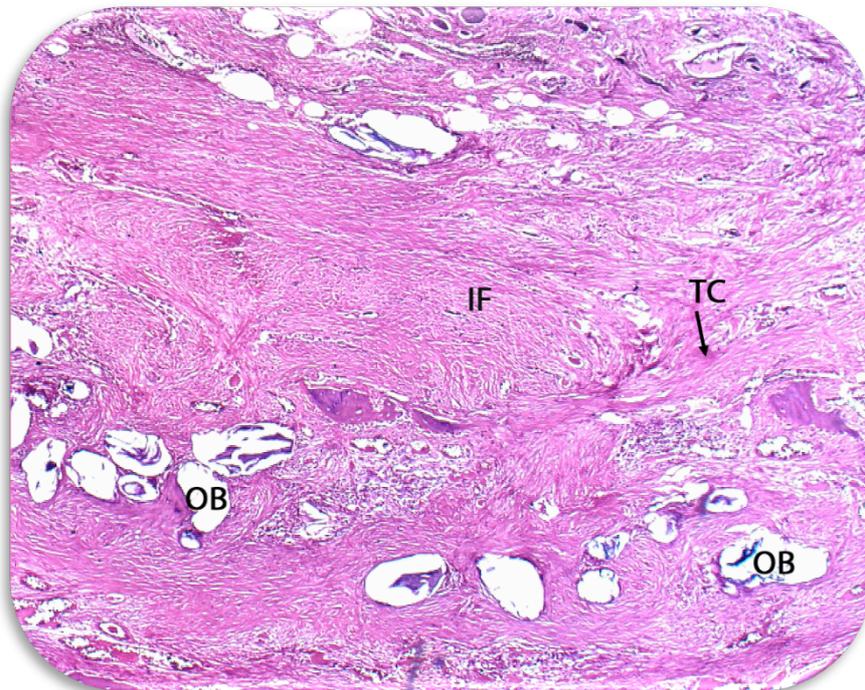


Figura 24: fotomicroscopia após 3 semanas. 10x (HE). **OB:** matriz óssea bovina. **IF:** infiltrado inflamatório. **TC:** tecido conjuntivo.

Deste modo pode-se agrupar os resultados histológico deste período de 3 semanas de sacrifício do seguinte modo (Tabela 2):

Tabela 2: Resumo da análise histológica descritiva no período de 3 semanas.

GRUPO	Tecido conjuntivo	Infiltrado inflamatório	Aposição óssea	Tecido ósseo neoformado	Material enxertado	Vaso sanguíneo	Periferia do defeito
I	Presente	Discreto	Ausente	Ausente	Inexistente	Presente	Presente
II	Presente	Discreto	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
III	Presente	Acentuado	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Discreto	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente

5.3.2 Período de sacrifício de 6 semanas

5.3.2.1 Cavidade I – Coágulo

Após um período de 6 semanas da criação dos defeitos, a região limite entre o osso pré-existente e o osso neoformado nos defeitos preenchidos com coágulo pode ser identificada tanto pelo aspecto morfológico quanto pela invaginação de tecido conjuntivo fibroso. O osso pré-existente apresentou duas corticais nítidas e tecido medular constituído de tecido conjuntivo com boa celularidade e vascularização. Junto às margens da cavidade óssea cirúrgica notou-se áreas de remodelação do osso pré-existente e osso neoformado em direção centrípeta (Figuras 25-26). Na porção central observou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso interposto a algumas trabéculas ósseas neoformadas.

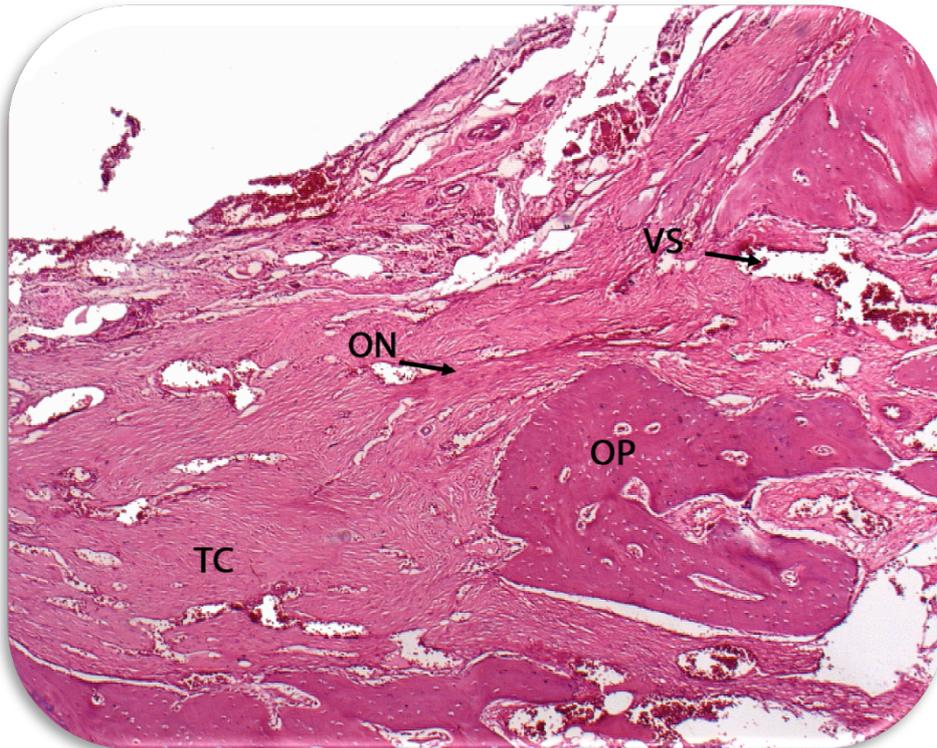


Figura 25: fotomicroscopia após 6 semanas. 10x (HE). **OP:** tecido ósseo pré-existente. **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **VS:** vaso sanguíneo.

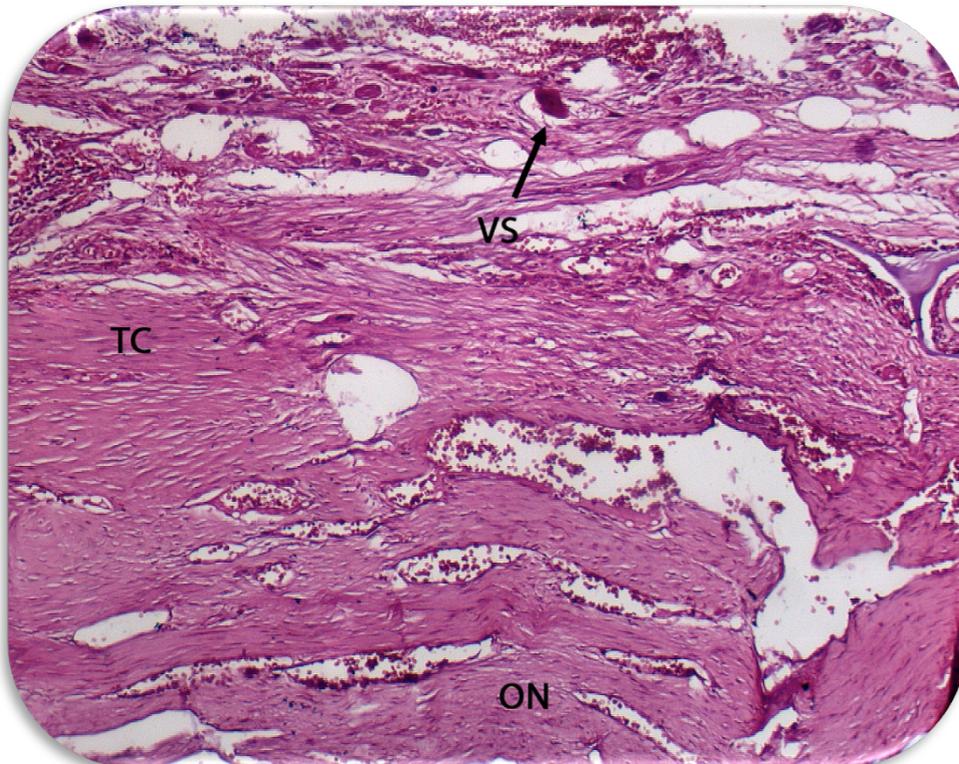


Figura 26: fotomicroscopia após 6 semanas. 20x (HE). **OP:** tecido ósseo pré-existente. **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **VS:** vaso sanguíneo.

5.3.2.2 Cavidade II – Osso autógeno particulado

Neste grupo observou-se o preenchimento da cavidade cirúrgica quase totalmente por trabéculas ósseas neoformadas, entremeadas por algumas áreas de tecido conjuntivo fibroso e tecido ósseo medular. As bordas do defeitos não se apresentaram bem delimitadas. No interior de tecido ósseo neoformado visualizou a presença de algumas partículas de enxerto utilizado no preenchimento da cavidade cirúrgica e também de alguns vasos sanguíneos. Nas margens deste tecido ósseo pré-existente áreas de remodelação e neoformação óssea eram observadas, sendo o crescimento considerado centrípeto (Figuras 27-29). Através da análise do enxerto verificase um estado mais avançado de regeneração óssea já que este serviu como base para a evolução do processo de regeneração por substituição.

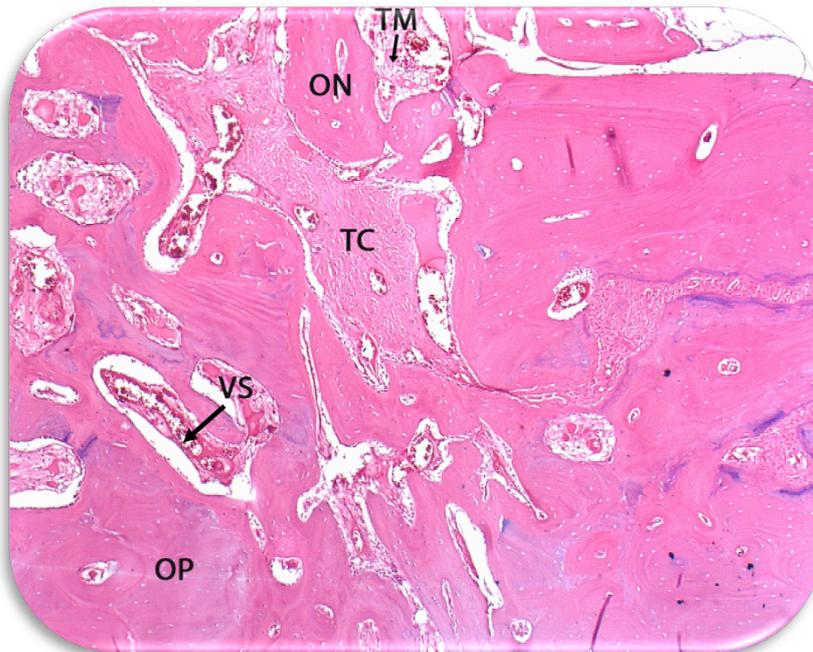


Figura 27: fotomicroscopia após 6 semanas. 10x (HE). **OP:** tecido ósseo pré-existente. **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **VS:** vaso sanguíneo. **TM:** tecido ósseo medular.

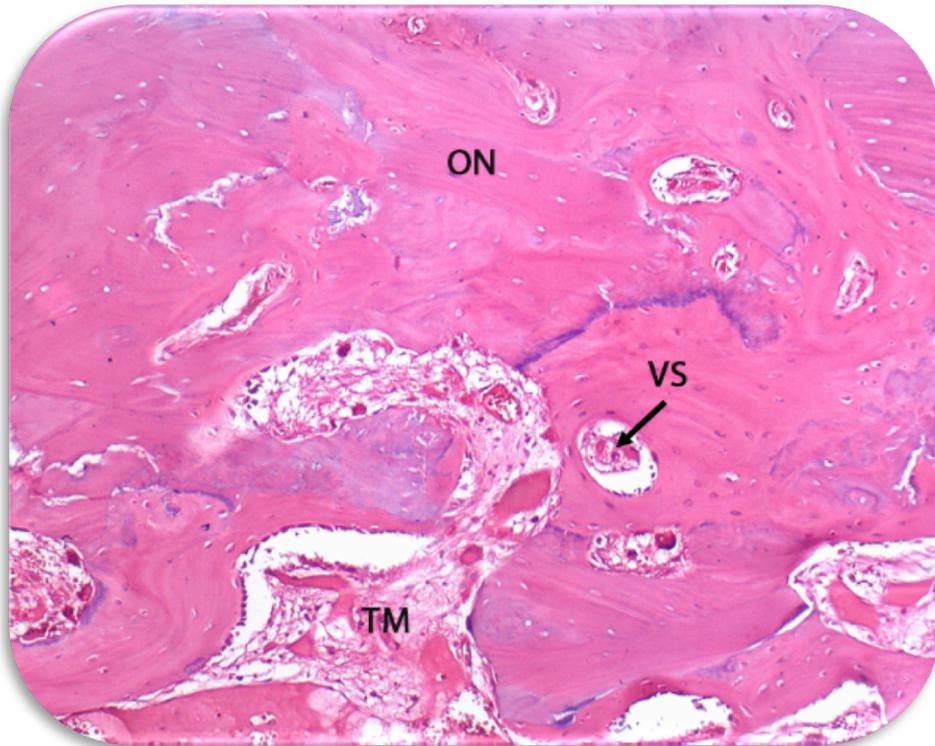


Figura 28: fotomicroscopia após 6 semanas. 20x (HE). **ON:** tecido ósseo neoformado. **TM:** tecido ósseo medular. **VS:** vaso sanguíneo.

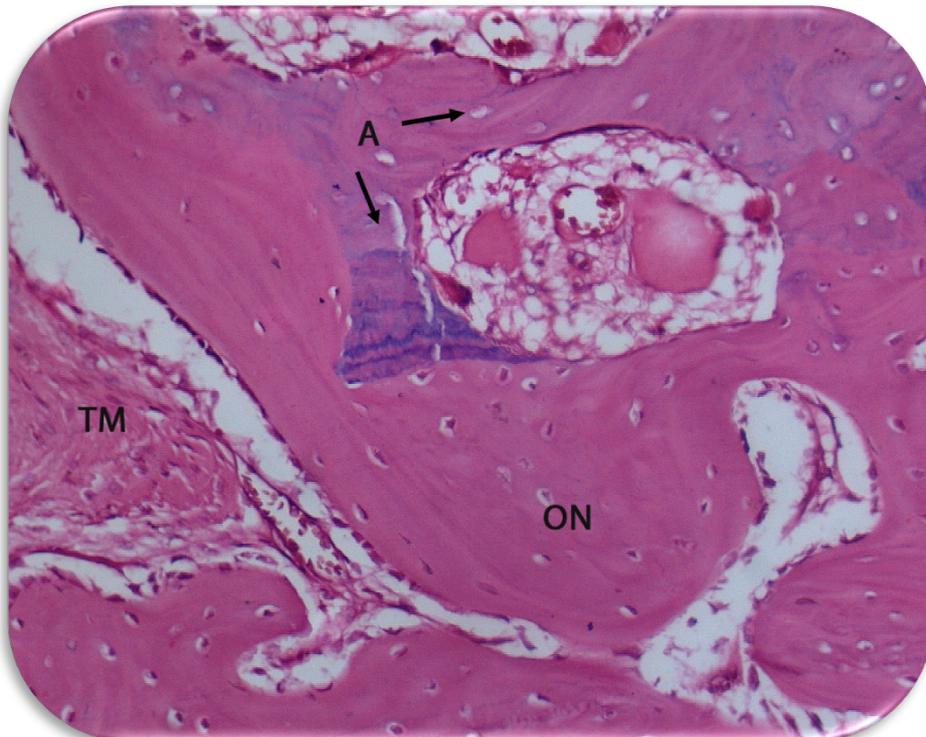


Figura 29: fotomicroscopia após 6 semanas. 40x (HE). **ON:** tecido ósseo neoformado. **TM:** tecido ósseo medular. **A:** aposição de novo tecido ósseo.

5.3.2.3 Cavidade III – Matriz óssea bovina anorgânica em granulação fina associada ao soro fisiológico 0,9%

Nos defeitos preenchidos por matriz óssea bovina anorgânica, observou-se que no local de preenchimento havia presença de vascularização adiantada e início de formação de tecido ósseo medular. O processo encontrou-se em estágio mais avançado de neoformação óssea, porém notam-se ainda alguns fragmentos ósseos necróticos. Entretanto estes fragmentos apresentam sinais claros de processo de reabsorção intenso variado, com algumas partículas quase que totalmente reabsorvidas e outras em apenas uma parte (Figura 30). Estas partículas encontraram-se circundadas por tecido conjuntivo fibroso e, às vezes, por tecido ósseo neoformado. O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente foi facilmente identificado. Esta região estava caracterizada pela presença de duas corticais bem definidas, tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa celularidade e vascularização (Figuras 31-32). Na periferia o tecido ósseo pré-existente apresentou áreas de remodelação e neoformação óssea centrípeta. Encontrou-se, ainda, um discreto processo inflamatório, principalmente ao redor destas partículas do substituto ósseo utilizado.

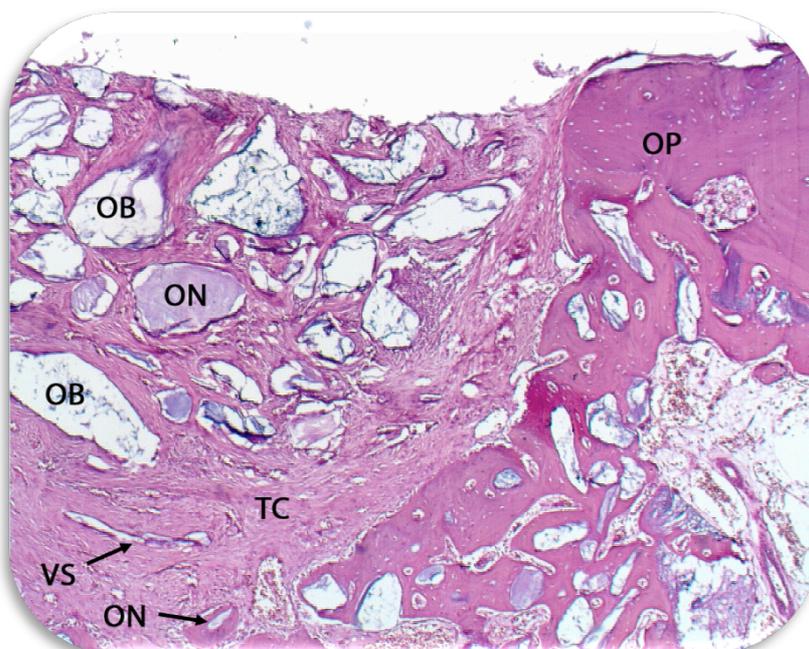


Figura 30: fotomicroscopia após 6 semanas. 10x (HE). **OP:** osso pré-existente. **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **OB:** matriz óssea bovina anorgânica.

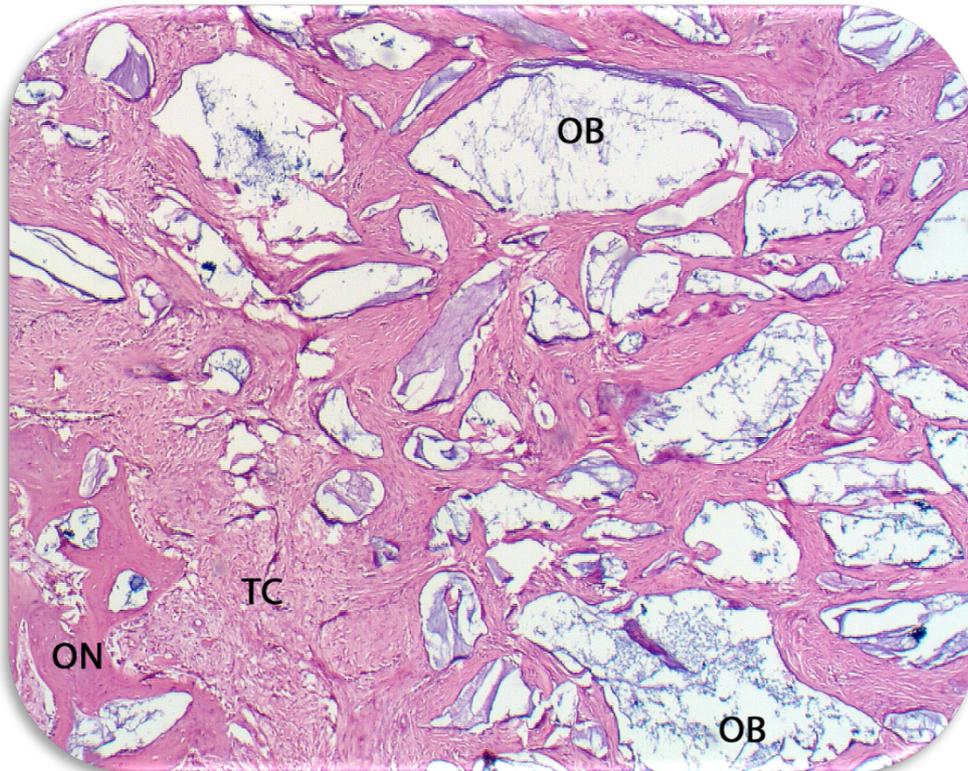


Figura 31: fotomicroscopia após 6 semanas. 20x (HE). **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **OB:** matriz óssea bovina anorgânica.

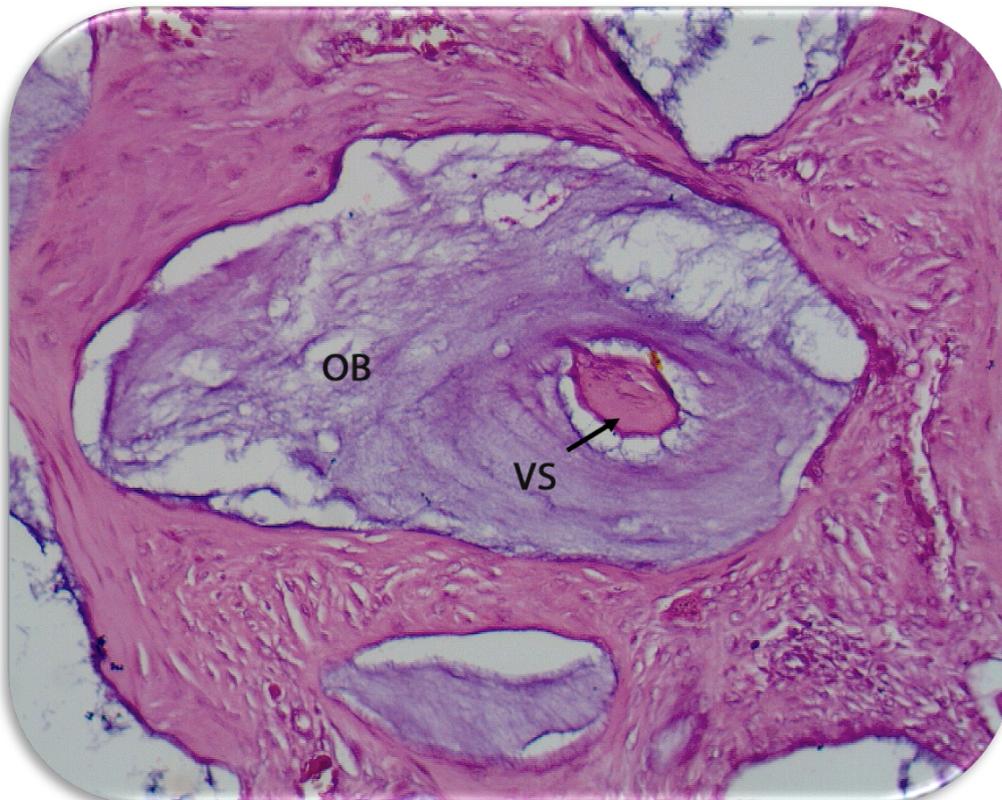


Figura 32: fotomicroscopia após 6 semanas. 40x (HE). **VS:** vaso sanguíneo. **OB:** matriz óssea bovina anorgânica

5.3.2.4 Cavidade IV – Matriz óssea bovina anorgânica em granulação fina associada à carboxi-metil-celulose

A cavidade cirúrgica correspondente ao grupo IV, após um período de 6 semanas pós-operatórias, apresentou-se preenchida em sua grande maioria por tecido conjuntivo fibroso, sendo que em seu interior foi possível observar a presença de partículas do material utilizado para o preenchimento da cavidade. Estas partículas se encontraram distribuídas pela cavidade óssea cirúrgica e circundadas por tecido conjuntivo (Figura 33). Também notou-se algumas poucas trabéculas ósseas neoformadas circundadas pelo tecido conjuntivo ainda imaturo. As margens da cavidade ósseas cirúrgica foram facilmente identificadas e apresentaram duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido conjuntivo com boa vascularização e celularidade (Figura 34). No entanto, ainda observa-se discreto processo inflamatório.

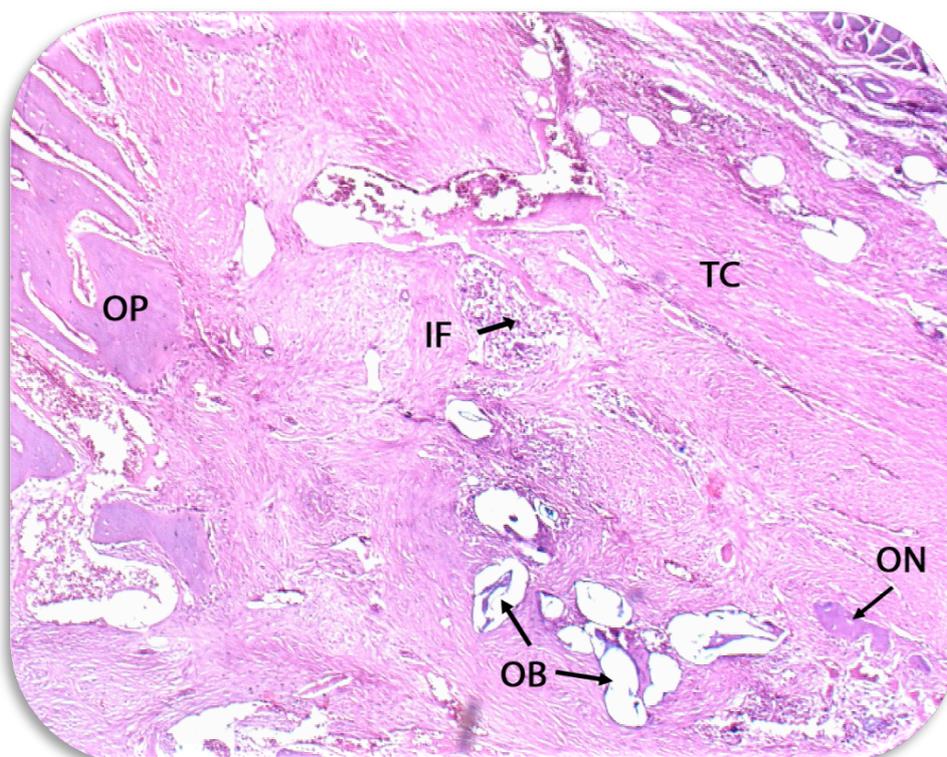


Figura 33: fotomicroscopia após 6 semanas. 10x (HE). **OP:** osso pré-existente. **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **OB:** matriz óssea bovina anorgânica. **IF:** infiltrado inflamatório.

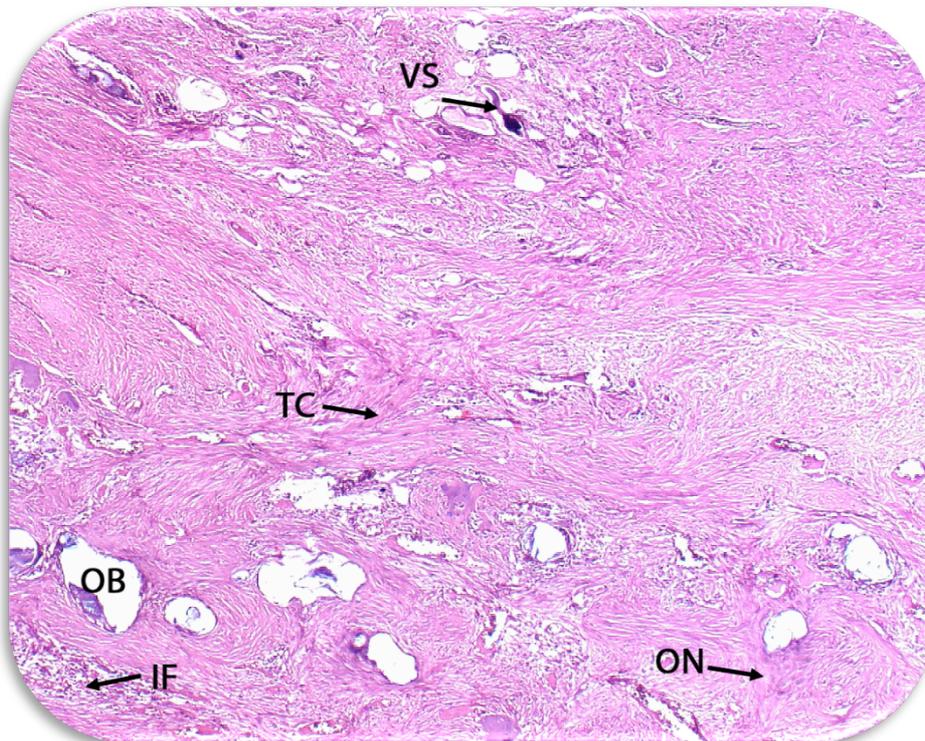


Figura 34: fotomicroscopia após 6 semanas. 10x (HE). **ON:** tecido ósseo neoformado. **TC:** tecido conjuntivo. **OB:** matriz óssea bovina anorgânica. **IF:** infiltrado inflamatório.

Deste modo pode-se agrupar os resultados histológico deste período de 6 semanas de sacrifício do seguinte modo (Tabela 3):

TABELA 3: Resumo da análise histológica descritiva no período de 6 semanas.

GRUPO	Tecido conjuntivo	Infiltrado inflamatório	Aposição óssea	Tecido ósseo neoformado	Material enxertado	Vaso sanguíneo	Periferia do defeito
I	Presente	Discreto	Ausente	Presente	Inexistente	Presente	Presente
II	Presente	Discreto	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
III	Presente	Moderado	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Discreto	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente

6 DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que, dentre os materiais avaliados, o osso autógeno apresentou-se com um processo de reparação tecidual mais avançado quando comparado ao grupo controle composto pelo coágulo sangüíneo, assim como os grupos compostos pelos enxertos heterógenos, conforme resultados encontrados na literatura pesquisada (Haas *et.al.*, 2002; Laureano Filho *et.al.*, 2007).

O uso da matriz óssea bovina anorgânica é amplamente utilizada e aceita na literatura. Na área odontológica, este substituto ósseo pode ser utilizado em casos de regeneração de defeitos periodontais, recobrimento das fenestrações em implantodontia, como material osteocondutor após remoção de lesões císticas, durante elevação do assoalho do seio maxilar e em associação ao osso autógeno (Pallesen *et al.*, 2002; Gomes, 2002). Esta grande utilização pelos cirurgiões-dentistas se deve pela facilidade de acesso, comprovação científica do seu emprego e, principalmente, devido seu custo.

A biocompatibilidade é uma das propriedades fundamentais dos biomateriais (Basle *et al.*,1998). A matriz óssea bovina anorgânica tem repetidamente demonstrado sua biocompatibilidade em diversos estudos realizados (Haas *et.al.*, 2002; Laureano Filho *et.al.*, 2007). Da mesma forma, no presente estudo o produto mostrou-se biocompatível, já que não foi observada a presença de células gigantes, sugerindo reação de corpo estranho. Pode ser visualizado, em algumas lâminas, a presença de novo osso no interior de algumas partículas sugerindo a incorporação do biomaterial para a formação de matriz óssea.

Várias pesquisas sobre substitutos ósseos, principalmente a matriz óssea bovina anorgânica, foram desenvolvidas em animais. Dentre estes pode-se destacar macacos, cães, ratos e mini porcos (Turner *et al.*, 2001; Roberts, 1988; Nunamaker, 1998). O presente trabalho optou por trabalhar com cães devido seu baixo custo, além de apresentarem uma conformação do tecido

ósseo também semelhante ao de seres humanos, conforme descrito por Turner *et al.* (2001). A decisão pela escolha de regiões temporais da calvária destes animais consistiu na possibilidade de confeccionar todos defeitos em um mesmo sítio, favorecendo o estabelecimento de variáveis locais semelhantes para indivíduos diferentes, assim como facilidade no manuseio.

Turner *et al.* (2001), avaliando os processo de reparação tecidual em diferentes animais como primatas, cães, gatos, ratos, coelhos e mini porcos, observaram que a relação no processo de reparação óssea entre cães e seres humanos é de 1:3. Deste modo, de acordo com os estudos de Prein (1998), os períodos de sacrifícios de 3 e 6 semanas, corresponderiam às fases de reparação óssea entre os períodos de 1 e 2 meses, ou seja, àqueles estágios de reparação óssea primária e secundária.

Dentre as indicações dos biomateriais, pode-se citar a sua necessidade em casos de defeitos críticos, pois estes não conseguem reparar por completo sem a ajuda de algum processo reconstrutivo (Calan *et al.*, 1993). Estudos realizados previamente a este trabalho, observaram que defeitos de 8mm apresentavam-se como sendo não-críticos (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Kluppel, 2007). Apesar disto, no presente estudo observou-se que os defeitos confeccionados nas calotas dos cães podem ser classificados como críticos, visto que, no grupo controle, Coágulo, não ocorreu a reparação espontânea no final do processo, estando presente somente tecido conjuntivo na região central do defeito.

A inserção de implantes em áreas que passaram por um processo de reconstrução requer um tempo mínimo para incorporação destes enxertos. Em casos de osso autógeno, recomenda-se um tempo de espera de aproximadamente 3 a 6 meses, dependendo da forma do material utilizado (Tong *et al.*, 2000; De Boever *et al.*, 2005). O presente trabalho evidenciou, em um período correspondente a 3 semanas, período equivalente a 4 semanas em humanos, existia tecido ósseo neoformado maduro no interior dos defeitos, permitindo, desta forma, a inserção de implantes em um menor tempo. Em contrapartida, ao avaliar a matriz óssea bovina anorgânica, observou-se

presença de partículas remanescentes e pouco tecido ósseo em ambos períodos de sacrifício, indicando a necessidade de se aguardar um tempo maior para instalação de implantes em áreas reconstruídas com estes materiais.

A avaliação histológica em ambos períodos de 3 e 6 semanas, após a implantação do substituto ósseo, evidenciou a propriedade osteocondutiva da matriz óssea bovina anorgânica. Pode-se concluir então que as partículas deste substituto ósseo serviram como arca-bouço para a deposição de tecido ósseo neoformado, fazendo com que haja um íntimo contato entre o osso e o biomaterial. Este achado está em concordância com o que foi observado em outros estudos envolvendo animais (Okamoto *et al.*, 1994; Ruhaimi, 2001; Jensen *et al.*, 2006).

A utilização de exames radiológicos para acompanhamento pós-operatório de procedimentos cirúrgicos é rotina. As radiografias servem como parâmetro para se avaliar quantitativamente o ganho ósseo em períodos pós-operatórios, auxiliando na preservação dos casos (Rosenwasser *et al.*, 2004). O presente estudo, observou que os exames de imagem, em casos de reconstrução com enxertos autógeno mostrou-se eficaz, visto que os resultados dos exames radiográficos e histológicos foram similares. Em contrapartida, os resultados deste estudo colocam em evidência a possibilidade do exame radiográfico, que é um parâmetro bastante valorizado no acompanhamento de cirurgias reconstrutivas, ser insuficiente para se determinar a qualidade do tecido ósseo neoformado quando a matriz óssea bovina anorgânica é utilizada como osteocondutor. Isto é exemplificado pelo fato dos defeitos tratados com a matriz óssea bovina de granulação fina apresentarem aspecto de radiolucidez ao término do período experimental, o que poderia sugerir pouca neoformação óssea. Na realidade, o que ocorre é que a cavidade está preenchida por tecido ósseo imaturo e as partículas altamente reabsorvidas. O mesmo ocorre nos defeitos preenchidos pelo coágulo sangüíneo, pois, apesar de ao exame radiográfico não se evidenciar

nenhum processo de reparação óssea, observou-se, por meio de análise histológica, que havia um processo de reparação em atividade.

O osso autógeno ainda é considerado o “*padrão ouro*” em reconstruções. Diversos estudos ratificaram sua capacidade de estimular positivamente o processo de reparação, permitindo que a região em questão apresente uma reparação mais eficiente, acelerando significativamente o processo (Tong *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2006, Hing *et al.*, 2007). Durante avaliação histológica deste estudo, pode-se observar que as cavidades preenchidas com osso autógeno apresentaram-se, em ambos períodos, um processo de reparação mais avançado, observando-se regiões de aposição óssea nas periferias dos defeitos no período de 3 semanas, assim como dificuldade na identificação entre osso pré-existente e neoformado no período de 6 semanas, sugerindo que o tecido ósseo encontrava-se totalmente regenerado.

Em procedimentos de enxertia óssea, um dos fatores fundamentais para o sucesso clínico é a adaptação precisa deste enxerto no leito receptor, apesar de, em alguns casos, serem difíceis (Tong *et al.*, 2000; Linka *et al.*, 2008). Desta forma, diferentes veículos para inserção dos enxertos vêm sendo pesquisados, objetivando uma melhora na adaptação e sucesso. Apesar disto, ainda é incerto a forma como estes carreadores atuam nas atividades de reparação tecidual (Boyne *et al.*, 2005; Santa-Comba *et al.*, 2000). Dentre os veículos pesquisados, a carboxi-metil-celulose, apresenta características interessantes como um alto poder aglutinante, fornecendo ao material uma consistência pastosa, facilitando, desta forma, a inserção destes materiais durante o procedimento cirúrgico. Durante os procedimentos deste trabalho observou-se uma facilidade e adaptação melhor quando se utilizou a carboxi-metil-celulose ao invés de soro fisiológico.

Os materiais utilizados como substitutos ósseos neste trabalho apresentam uma composição semelhante, sendo compostos por matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina (menor que 450µm), segundo fabricante. A diferença entre eles consiste no veículo utilizado. Apesar disto, comportaram-

se de forma diferente durante o processo de reparação óssea. Com a utilização de soro fisiológico 0,9% como veículo, observou-se no período de 3 semanas a presença de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, assim como remanescentes do material. No período de 6 semanas, observou-se que o processo de reparação havia avançado, havendo regiões de novo osso e, apesar de haver remanescentes do biomaterial, estes apresentam-se em processo de reabsorção, concordando com os resultados descritos na literatura (Kluppel, 2007).

A carboxi-metil-celulose foi considerada biocompatível por diversos autores (Santa-Comba *et al.*, 2000; Vance *et al.*, 2004), havendo relatos, inclusive, que a substância favoreceu o processo de reparação tecidual quando inserida isoladamente em defeitos ósseos (Santa-Comba *et al.*, 2000). Ao avaliar o Grupo IV do presente trabalho, observou-se resultados diferentes. No período de 3 semanas, um grande infiltrado inflamatório, pouco tecido conjuntivo fibroso, assim como uma rica trama de vasos sanguíneos, e uma menor quantidade de biomaterial quando comparado ao Grupo III, foram observados. No período de 6 semanas visualizou-se uma quantidade menor de tecido ósseo neoformado, estando a região preenchida por tecido conjuntivo. Existia ainda reação inflamatória, atrasando, deste modo o processo de reparação tecidual, impedindo, possivelmente, a instalação de implantes dentários neste período de tempo.

Ao término do processo de reparação óssea, quanto maior for a quantidade de tecido conjuntivo entremeando-se às partículas do biomaterial, menor é a sua capacidade osteocondutora (Buser *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 2002; Kluppel, 2006). Nesse estudo, ao avaliar os materiais heterógenos, a matriz óssea bovina anorgânica em grânulo apresentou um processo de reparação avançado quando comparado ao mesmo material em consistência pastosa. Apesar disto, não se pode afirmar que o Grupo III apresentou um potencial osteocondutivo superior, visto que, no estágio final de reparação óssea foi observado um número menor de partículas do biomaterial, talvez pela presença da carboxi-metil-celulose em detrimento ao biomaterial.

Ao comparar o Grupo IV com o Grupo I, observou-se que no grupo controle o processo de reparação apresentou-se em estágio mais avançado durante todo o processo de reparação. No período de 3 semanas, a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo já apresentava tecido conjuntivo denso nas regiões centrais e periféricas dos defeitos, ao passo que os defeitos preenchidos pela matriz óssea associada a carboxi-metil-celulose havia praticamente a presença de um infiltrado inflamatório intenso. O mesmo se observa no período de 6 semanas, onde, apesar de existir áreas de tecido ósseo formado e volume considerável de tecido conjuntivo, existem ainda regiões de reação inflamatória no grupo IV. Deste modo, pode-se sugerir que o veículo utilizado no Grupo IV influenciou de forma negativa no processo de reparação tecidual, pois foi o que diferenciou-o do Grupo III, apesar de haver estudos afirmando seu potencial osteocondutor na literatura (Santa-Comba *et al.*, 2000).

De forma geral, o processo de reparação tecidual encontrou-se mais avançado nas cavidades preenchidas por osso autógeno, matriz óssea bovina anorgânica em grânulos, coágulo sanguíneo e matriz óssea bovina anorgânica em pasta respectivamente.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, pode-se concluir que:

O osso autógeno obteve melhor resultado no procedimento reconstutivo utilizado;

O veículo carboxi-metil-celulose influenciou negativamente no processo de reparação tecidual;

O exame radiográfico, apesar de eficaz em caso de enxertos autógenos, não serve para avaliar reparo tecidual quando se utiliza a matriz óssea bovina anorgânica como substituto ósseo.

REFERÊNCIAS

Basle MF, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D. Shape and orientation of osteoblast-like cells (saos 2) are influence by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. J Biomed Mat Res. 1998; 40: 350-7.

Bhatt KA, Chang EI, Waren SM, Lin SE, Bastidas N, Ghali S *et al.*. Uniaxial Mechanical Strain: An In Vitro Correlate to Distraction Osteogenesis. J Surg Res. 2007; 143: 329 –36.

Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB *et al.* De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63 (12): 1693-707.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969, 3(2): 81-100.

Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editores. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Santos; 1996, p.31-48.

Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge deffects: a human clinical and histologic case report. J Periodontol. 1993, 64: 575-82.

Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation of growth factors from adult bovine bone. *Calcif Tissue Int.* 1988;43(6): 346-51.

Carvalho VA, Tosello Dde O, Salgado MA, Gomes MF. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58 (2): 247-8.

Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31(1):73-7.

Christoph HF. Temporal Dynamics of Healing in Rabbit Cranial Defects Using Guided Bone Regeneration . *J Oral Maxillofac Surg,* 1995, 53: 167-74.

Coradazzi LF. Avaliação dos enxertos ósseos autógenos triturados manualmente ou coletados durante osteotomia. Análises histológica e histométrica em coelhos. [Dissertação] Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 2003.

De Boever AL, De Boever JA. Guided bone regeneration around non-submerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. *Clin Oral Impl Res.* 2005, 16: 549.

Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Immunol Cell Biol.* 2009; 87 (1): 20-9.

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

Fiorellini JP, Nevins M. Bone regeneration. Repair and regeneration of oral tissues: the molecular approach. *Postgrad Dent.* 1996, 3(2): 3-8.

Franceschi C. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126 (2): 351-61.

Gomes LA. *Implantes osseointegrados: técnica e arte.* São Paulo: Santos; 2002, 278p.

Haas R, Haidvogel, Donath K, Watzek G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep: Part I – Histological findings. *Clin. Oral Impl. Res.*, 2002,13, 396-404.

Hämmerle HF, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal Dynamics of Healing in Rabbit Cranial Defects Using Guided Bone Regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 1995, 53:167-174.

Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J.* 2007; 7 (4): 457-90.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990, 1(1): 60-68.

Issa MJP, Tiozzi R, Pitol DL & Mello SAS. TGF- β and new bone formation. *Int.J.Morphol.* 2006, 24(3):399-405.

Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. *Clin Oral Impl Res.* 2006, 17: 237-243.

Kirit A B *et al.*. Uniaxial Mechanical Strain: An In Vitro Correlate to Distraction Osteogenesis . *J Surg Res* 2007, 143, 329 –336.

Klüppel, LE. Influência dos diferentes tamanhos de partículas da matriz óssea bovina anorgânica no processo de reparo ósseo. Análise histológica e radiográfica de defeitos criados cirurgicamente em calvária de coelhos. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.

Kübler A, Neugebauer J, Oh J, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts in different bone graft substitutes. An in vitro study. *Implant Dentistry* 2004, 13(2): 171-179.

Laureano Filho JR, Branco BLC, Andrade ESS, Albergaria Barbosa JR. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2007; 73 (2): 123:45.

Leucht P, Minear S, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA. Translating insights from development into regenerative medicine: The function of Wnts in bone biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Sep 7. [*In press*]

Linka et.al..Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF-b1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials.* 2008; 29: 675–82.

Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Carol Stream: Quintessence Books; 1999, 325p.

Misch CE, Qu Z, Bidez MW. Is trabecular bone in the mandible different? *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55 (3): 260-7.

Moioli *et al.*. Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis, *Bone,* 2007,10: 1016.

Nishimura *et al.*. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clin. Oral Impl. Res.* 2004; 15: 293–300.

Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. Clin Orthop Relat Res. 1998, Oct;(355 Suppl):S56-65.

Oliveira SA, Souza BS, Guimaraes-Ferreira CA, Barreto ES, Souza SC, Freitas LA *et al.* Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. World J Gastroenterol. 2008, Oct 14;14(38):5842-50.

Okamoto T, Garcia Júnior IR, Magro Filho O. Implante de osso anorgânico em cavidade óssea. Rev Odontol Unesp .1994, 23(2): 213-219.

Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. Int J Oral Maxillofac Implants. 2002, Jul-Aug;17(4):498-506.

Prein. Manual of the internal fixation in Cranio-facial Eskeleton. Hardcover Springer; 1995, 750 p.

Roberts WE. Bone Tissue Interface. J Dent Ed. 1988; 52 (12): 804-9.

Rosenwasser MP, Garino JP, Kiernan HA, Michelsen CB. Long term followup of thorough debridement and cancellous bone grafting of the femoral head for avascular necrosis. Clin Orthop Relat Res. 1994; 306: 17-27.

Ruhaimi KA. Bone Graft Substitutes: A Comparative Qualitative Histologic Review of Current Osteoconductive Grafting Materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16(1): 105-114.

Santa-Comba A, Pereira A, Lemos R, Santos D, Amarante J, Pinto M, *et al*. Evaluation of carboxymethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, and aluminum hydroxide as potential carriers for rhBMP-2. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(12): 1693-707.

Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Lee JS, Shi S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*. 2008; 14(5):428-34.

Serra e Silva F, Albergaria-Barbosa JR, Mazzone R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006, 64: 931-5.

Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2002, 31: 469–484.

Schwarz F, Rothamel D, Hertel M, Ferrari D, Sager M, Becker J. Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes biocoated with rhGDF-5 and rhBMP-2: an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(5): 679-86.

Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol.* 1999, 70: 1053-1063.

Tong L, Buchman SR. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *The Journal of Craniomaxillofacial Trauma.* 2000; 6(1): 31-41.

Turner AS. Animal models of osteoporosis – Necessity and limitations. *European Cells and Materials* 2001;1: 66-81.

Vance GS, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Johnston H, Scheetz JP. Comparison of an allograft in an experimental putty carrier and a bovine-derived xenograft used in ridge preservation: a clinical and histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19(4): 491-7.

Wang HL, Boyapati L. “PASS” Principles for Predictable Bone Regeneration. *Implant Dentistry.* 2006;15 (01):1-17.

Wang YN, Feng CC, Liu JL, Li F, Fu L, Wang Z. [Transforming Growth Factor beta Alleviates Acute Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Murine Model.] *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2008, Oct;16(5):1135-9.

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

ANEXO



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

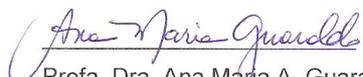
CERTIFICADO

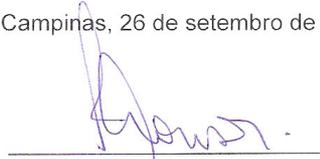
Certificamos que o Protocolo nº 1343-1, sobre "Estudo comparativo da influência da consistência da matriz óssea bovina em defeitos na calota de cães. Avaliação histológica e radiológica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Renato Mazzone / Henrique Duque de Miranda Chaves Netto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1343-1, entitled "Comparative study of the consistence of bovine bone matrix influence in defects on dog's calvarium. Histological and radiologic analyses", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>