



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**BRUNO BOTTO DE BARROS DA SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS  
TRATADOS COM DIFERENTES ENXERTOS XENÓGENOS –  
Estudo Experimental em Ratos**

Salvador

2010

**BRUNO BOTTO DE BARROS DA SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS  
TRATADOS COM DIFERENTES ENXERTOS XENÓGENOS –  
Estudo Experimental em Ratos**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado em  
Odontologia da Universidade Federal  
da Bahia, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de  
Mestre em Odontologia - Área de  
concentração em Clínica  
Odontológica.

**Orientadora: Profa. Dra. Viviane Almeida Sarmiento**

Salvador

2010

S587 Silveira, Bruno Botto de Barros da  
Avaliação do reparo de defeitos ósseos críticos tratados  
com diferentes enxertos xenógenos: estudo experimental em  
ratos / Bruno Botto de Barros da Silveira. – Salvador, 2010.  
99 f. : il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Almeida Sarmiento.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Odontologia, 2010.

I. Transplante ósseo. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Em-  
genharia tecidual. 4. Procedimentos cirúrgicos operatórios. I.  
Universidade Federal da Bahia.Faculdade de Odontologia. II.  
Sarmiento, Viviane Almeida. III. Título.

CDU 616.314-089

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho de dissertação aos meus pais Arnaldo e Julia por todo o carinho, compreensão, dedicação e toda a ajuda que me deram para a conquista de mais uma etapa; a minha irmã Fernanda, por todo o carinho e admiração; a minha avó Thereza por cada palavra de conforto e afeto nos momentos mais necessários; a Tia Aninha pelo carinho, conforto e acolhimento e a minha namorada Renata por todo amor e companheirismo.*

*Sei que, cada sonho meu realizado, será sempre motivo de orgulho para eles.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha querida amiga e orientadora, Dra. Viviane Sarmento, pela amizade, oportunidade, orientação e por todos os ensinamentos, sobretudo, com tranquilidade e clareza, nos momentos mais estressantes.

Ao amigo Dr. Dario Miranda, meu grande incentivador, por todos os ensinamentos e conselhos, não só profissionais mas para toda a vida;

A Dra. Luciana Ramalho por todo o carinho, apoio e disponibilidade;

A Dra. Rhyna, por tamanha disponibilidade e ajuda;

As colegas Polyana e Gardênia por toda a dedicação e apoio;

AoS amigoS Almiro e Francisco, por todo apoio, sobretudo durante nossas atividades experimentais;

A D. Lourdes por toda a dedicação e empenho na concretização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A UEFS, no nome do Dr. Orestes e do amigo Junior por todo apoio na execução laboratorial/cirúrgica desta pesquisa;

Aos meus grandes amigos/irmãos Makyo e Murilo, por sempre estarem presentes e me mostrarem que nunca podemos desistir dos nossos objetivos;

A todos os amigos que tive a alegria de conhecer aqui no curso, por todos os ensinamentos e carinho;

E por fim, um agradecimento especial a todos os meus familiares e amigos, por sempre me incentivarem e carinhosamente perdoarem meus momentos ausentes.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus sonhos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém  
Tem gente que machuca os outros  
Tem gente que não sabe amar  
Mas eu sei que um dia a gente aprende  
Se você quiser alguém em quem confiar  
Confia em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança.”

(Renato Russo)

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos, tratados com diferentes enxertos xenógenos. Os defeitos foram produzidos em ratos Wistar, machos, divididos equitativamente em quatro grupos: **Grupo A** – tratados com Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland); **Grupo B** – tratados com Gen-ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil); **Grupo C**- tratados com Bonefill® (Bionnovation Produtos Biomédicos S.A. São Paulo, Brasil); **Grupo D**- defeitos ósseos não tratados (controle). Os animais foram sacrificados trinta e sessenta dias após o procedimento cirúrgico, quando então suas calotas cranianas foram removidas, radiografadas de forma padronizada e enviadas para preparação histológica. As radiografias obtidas foram digitalizadas (600 dpi, 8 bits), corrigidas em brilho no Programa Photoshop® (Adobe Systems Incorporated, Mountain View, Califórnia, EUA) e depois avaliadas no Programa ImageTool® (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA), onde a média e o desvio-padrão dos níveis de cinza da área dos defeitos foram mensurados. A partir desses valores foi calculado ainda o coeficiente de variação dos níveis de cinza. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e picrossirius. Os resultados da análise histológica revelaram que após trinta dias do procedimento cirúrgico, a neoformação óssea era incipiente nos grupos tratados com os diferentes enxertos, embora na análise radiográfica o grupo tratado com o enxerto Gen-Ox tenha mostrado uma média significativamente maior ( $p < 0,05$ ) dos níveis de cinza (141,00), em relação ao grupo controle (130,00). Isso provavelmente se deve a uma maior radiopacidade do material, visto que o coeficiente de variação dos níveis de cinza nesse grupo não mostrou diferença em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), o que denota uma homogeneidade na distribuição dos níveis de cinza na área do defeito, que parece não refletir a dinâmica de uma neoformação óssea. Histologicamente, a inflamação estava presente em grau discreto a moderado, embora no grupo tratado com o enxerto Bio-oss a inflamação tenha sido considerada severa em 100% dos casos. Após sessenta dias do procedimento cirúrgico, a neoformação óssea foi significativa nos grupos Gen-ox ( $p = 0,0498$ ) e Bonefill ( $p = 0,0014$ ) e a intensidade do processo inflamatório

diminuiu em todos os grupos testados, na análise histológica. Na análise radiográfica, todos os grupos testados mostraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da média dos níveis de cinza e aumento do coeficiente de variação dos níveis de cinza ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle, demonstrando a presença de neoformação óssea na área do defeito. Diante do exposto, pode-se concluir que os grupos tratados com Gen-ox e o Bonefill foram os materiais que mais demonstraram capacidade osteocondutora e osteoindutora e desencadearam menor reação inflamatória.

**Palavras-Chave:** Defeito ósseo, biomateriais, engenharia tecidual

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the repair of critical bone defects in the calvaria of rats treated with different Xenograft. The defects were produced in male Wistar rats, and they were divided equally into four groups: Group A - treated with Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), Group B - treated with Gen-ox® Inorg (Baumer, São Paulo, Brazil), Group C-treated Bonefill® (Bionnovation Biomedical Products SA Sao Paulo, Brazil), Group D-bone defects untreated (control). The animals were sacrificed thirty and sixty days after the surgery, then their calvaria were removed, radiographed in standardized conditions and sent for histological preparation. Radiographs have scanned (600 dpi, 8 bits), adjusted in brightness in the program Photoshop® (Adobe Systems Incorporated, Mountain View, California, USA) and then evaluated by the program ImageTool® (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA), where the mean and standard deviation of gray levels in the area of the defects were measured. From these values have been calculated the coefficient of variation of gray levels. Histology slides were stained by hematoxylin-eosin and picosirius. The results of histological analysis revealed that after thirty days after surgery, new bone formation was incipient in the groups treated with different grafts, although at radiographic analysis the group treated with the graft Gen-Ox has shown an average significantly higher ( $p < 0.05$ , 2005) of gray levels (141.00) to the control group (130.00). This is probably due to increased radiopacity of the material, since the coefficient of variation of gray levels in this group showed no difference in the control group ( $p > 0.05$ ), which denotes a homogeneous distribution of gray levels in the defect area, which seems to reflect the dynamics of bone formation. Histologically, inflammation was present in mild to moderate, although in the group treated with Bio-oss graft inflammation was considered severe in 100% of cases. After sixty days of surgery, new bone formation was significant in the Gen-ox groups ( $p = 0.0498$ ) and Bonefill ( $p = 0.0014$ ) and intensity of inflammation decreased in all groups tested, at the histological analysis. On radiographic analysis, all groups showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the average of gray levels and increase the coefficient of variation of gray levels ( $p < 0.05$ ) compared with the control group, demonstrating the presence of new

bone formation in the defect area. Given the above, one can conclude that the groups treated with Gen-ox and Bonefill were the materials that showed more osteoconductive and osteoinductive capacity and triggered minor inflammatory reaction.

**Keywords:** defect bone, biomaterials, tissue engineering

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Incisão bicoronal na calvária do animal (a) e posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal (b).	39
Figura 2	Vista superior do defeito crítico antes da remoção do bloco ósseo (a); observa-se o local dos orifícios para colocação do amálgama, anteriormente a na porção posterior do defeito.	40
Figura 3	Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo (a).	40
Figura 4	Vista superior do defeito crítico após implantação do enxerto (a); Tecido suturado (b).	41
Figura 5	Porção da calvária posicionada sobre o filme radiográfico, associado a um penetrômetro de alumínio (a); Simulador de tecido mole e posicionamento do aparelho radiográfico.	42
Figura 6	Estufa de ar quente (a); <i>scanner</i> com leitor de transparência (b).	43
Figura 7	Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Ferramenta “seleção retangular” sendo utilizada para delimitar o terceiro degrau do penetrômetro de alumínio.	45
Figura 8	Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Seleção da ferramenta “histograma”.	45
Figura 9	Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Determinação da média dos níveis de cinza	46

	do terceiro degrau do penetrômetro.	
Figura 10	Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Seleção da ferramenta “ajuste de brilho/contraste”.	46
Figura 11	Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Janela para alteração do brilho sendo acionada.	47
Figura 12	Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Seleção da ferramenta “histograma”.	47
Figura 13	Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Determinação da área a ser avaliada no defeito ósseo.	48
Figura 14	Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Histograma demonstrando a média e o desvio-padrão dos níveis de cinza da área selecionada do defeito ósseo.	48
Figura 15	Grau de inflamação no período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	53 e 54
Figura 16	Grau de hiperemia nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	54 e 55
Figura 17	Grau de hiperemia e necrose nos período de 30 dias (a, c) e 60 dias (b, d), para os quatro grupos testados.	56 e 57
Figura 18	Presença de colágeno nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	57 e 58
Figura 19	Presença de osteoblastos nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	59
Figura	Presença de osteoblastos nos período de 30 dias (a) e	60

20	60 dias (b), para os quatro grupos testados.	
Figura 21	Grau de neoformação nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	61 e 62
Figura 22	Grau de presença do enxerto nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	62 e 63
Figura 23	Grau de reabsorção do enxerto nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	63 e 64
Figura 24	Grau de reabsorção da borda do defeito nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.	64
Figura 25	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo Bonefill (30 dias). Observa-se intensa neoformação óssea (setas amarelas), aproximando as margens do defeito ósseo.	66
Figura 26	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo Bonefill (30 dias). Observa-se neoformação óssea e osteoblastos (setas amarelas), osso maduro da margem do defeito (seta verde) e remanescentes do enxerto (seta azul).	66
Figura 27	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Bonefill (30 dias). Observa-se intensa reabsorção do enxerto (seta amarela) e presença de células gigantes multinucleadas (setas azuis).	66
Figura 28	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo Bonefill (30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) e disceto infiltrado inflamatório do tipo linfo-plasmocitário (seta azul).	67
Figura 29	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo Bonefill (30 dias). Observa-se intensa	67

	hiperemia (seta amarela).	
Figura 30	Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 40x). Grupo Bonfill (30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) e fibras colágenas (seta azul).	67
Figura 31	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo Bio-oss (30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) e enxerto (seta azul).	68
Figura 32	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo Bio-oss (30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) aproximando as margens do defeito.	68
Figura 33	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo Bio-oss (60 dias). Observa-se neoformação óssea (setas amarelas) a partir do enxerto ósseo.	68
Figura 34	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Bio-oss (60 dias). Observa-se formação de abscessos e intenso infiltrado inflamatório.	69
Figura 35	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Bio-oss (30 dias). Observa-se reabsorção do enxerto e célula gigante multinucleada (seta amarela).	69
Figura 36	Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 200x). Grupo Bio-oss (30 dias). Observa-se deposição de fibras colágenas.	69
Figura 37	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo controle (30 dias). Observa-se neoformação óssea na margem do defeito.	70

Figura 38	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo controle (60 dias). Nota-se ausência de infiltrado inflamatório.	70
Figura 39	Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 40x). Grupo controle (30 dias). Observa-se deposição de fibras colágenas na região central do defeito.	70
Figura 40	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Gen-ox (30 dias). Neoformação óssea, osteoblastos (seta amarela) e enxerto (seta azul).	71
Figura 41	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 40x). Grupo Gen-ox (30 dias). Neoformação óssea adjacente à área do enxerto.	71
Figura 42	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Gen-ox (60 dias). Encapsulamento do enxerto.	71
Figura 43	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 200x). Grupo Gen-ox (30 dias). Célula gigante multinucleada (seta amarela) reabsorvendo o enxerto (seta azul).	72
Figura 44	Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 100x). Grupo Gen-ox (30 dias). Observa-se formação de abscesso e intenso infiltrado inflamatório.	72
Figura 45	Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 100x). Grupo Gen-ox (30 dias). Observa-se deposição de fibras colágenas.	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e coeficiente de atenuação dos níveis de cinza dos defeitos ósseos produzidos na calota craniana dos animais dos diferentes grupos avaliados e sacrificados 30 ou 60 dias após o ato cirúrgico	52
Tabela 2	Avaliação histológica dos diferentes parâmetros histológicos: Presença de Inflamação, Neoformação óssea e Presença de Osteoblastos, entre os grupos Teste vs. Controle, nos períodos de 30 e 60 dias.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BA	Bahia
<i>Bit</i>	<i>Binary digit</i> (elemento binário)
<i>Bpm</i>	<i>Bit-mapped format</i>
<i>BMP</i>	Proteína morfogenética óssea
CD-ROM	<i>Compact Disc Read-Only Memory</i> - Disco Compacto com Memória Apenas para Leitura
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro(s)
<i>Dpi</i>	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegada; 1 polegada = 2,54 cm))
et al.	E outros
EUA	Estados Unidos da América
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
G	Gramma(s)
H	Hora(s)
HE	Hematoxilina-eosina
kVp	Kilovoltagem pico
mA	Miliamperagem
mm	Milímetro(s)
n.	Número
O1	Observação 1
O2	Observação 2
p	Probabilidade de erro ou variabilidade amostral
PMNs	Polimorfonucleares
R	<i>Randomized</i> (aleatório)
rpm	Rotações por minuto
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
X	Veze
X	Experimento
°	Grau(s)
%	Porcentagem
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>21</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TECIDO ÓSSEO	21
2.2 BASES BIOLÓGICAS DO REPARO ÓSSEO	<b>22</b>
2.3. BIOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO	<b>24</b>
2.4 MODELO DE ESTUDO	<b>35</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	<b>36</b>
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<b>36</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	<b>37</b>
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	<b>37</b>
4.3 BIOMATERIAIS UTILIZADOS	<b>38</b>
4.4 COLETA E PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS	<b>39</b>
4.5 ANÁLISE DE DADOS	<b>51</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEUA - UEFS</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE A – Registro dos Dados da Avaliação Histológica</b>	<b>95</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As reconstruções craniofaciais e a correção de defeitos ósseos, provenientes de traumas cirúrgicos ou acidentais e/ou doença periodontal, têm sido tema de grandes pesquisas, discussões e controvérsias na literatura, principalmente em razão do rápido crescimento de tecido conjunção, o qual impede ou dificulta a formação de tecido ósseo novo no defeito (FIGUEIREDO, 2000). Segundo Carvalho et al. (2004), o tratamento regenerativo dos defeitos ósseos podem apresentar dois tipos de resultados: a reparação, na qual um tipo de tecido diferente daquele originalmente perdido, no que diz respeito à morfologia e função, recompõe a área e a regeneração, na qual o reparo ocorre por um tecido idêntico ao tecido original preexistente.

Para o tratamento de defeitos ósseos a colocação de enxertos é uma opção freqüentemente utilizada em Odontologia. Os enxertos ósseos podem ter diferentes origens: autógenos (provenientes do próprio indivíduo), enxertos alogênicos (oriundos de banco de ossos liofilizados de cadáveres humanos), xenógenos (derivados de outros animais como o osso bovino) e aloplásticos (que são materiais sintéticos). Além desses materiais ainda podem ser citadas as técnicas de regeneração óssea guiada e a utilização de fatores de crescimento.

Os enxertos autógenos são considerados “padrão-ouro” em cirurgias maxilofaciais, craniofaciais, bucais, ortopédicas e em cirurgias plásticas (TSONIS, 2002). No entanto, o principal problema relacionado a esse material é a morbidade que acomete o paciente (ORR et al., 2001), assim como a quantidade limitada de material coletado (SCHIMMING e SCHMELZEISEN, 2004).

Tentando superar estes obstáculos, pesquisas foram dirigidas para a obtenção de um substituto adequado para o enxerto ósseo autógeno (MOREIRA et al., 2003). Nesta linha, os enxertos alógenos, aloplásticos e xenógenos têm sido usados como auxiliares ou substitutos aos enxertos autógenos. A demanda para esses chamados biomateriais aumentou de forma logarítmica nos Estados Unidos da América (EUA), assim como houve um aumento significativo no Brasil nos últimos dez anos.

Diversos estudos da literatura demonstram que materiais derivados de osso bovino mostram-se perfeitamente biocompatíveis. Trata-se de um material colhido de uma fonte abundante e com um custo acessível (WENZ et al., 2002). Os ossos colhidos são processados para remover propriedades antigênicas usando varias técnicas de preparação químicas. Tais materiais têm sido utilizados com sucesso para preservar o osso no local pós extração; contudo, Block et al. (2002), relataram que até quatro meses as partículas dos enxertos estão presentes sem sinal de reabsorção ou substituição.

Pesquisas experimentais, utilizando animais, vêm sendo conduzidos no intuito de encontrar um substituto ósseo ideal, assim como verificar os diversos materiais presentes no mercado. Para a realização destes estudos, observa-se que o modelo de defeitos na calvária de ratos tem sido usado com grande freqüência (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986; DAHLIN et al., 1991; LINDE et al., 1993; BOSCH et al., 1995, 1998; MATZENBACHER et al., 2003; MOKBEL et al., 2008; SHIRASU et al., 2009). Taga (2004), assim como Mokbel et al. (2008) e Kim e Kim (2008) demonstraram que a utilização do enxerto xenógeno de osso bovino desproteínizado promoveu reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico em calvária de cobaias.

Apesar das várias opções de tratamento dos defeitos ósseos, são escassos na literatura estudos que avaliem sua efetividade e eficácia, mesmo sendo esses materiais de uso comum na prática odontológica. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar radiográfica e histologicamente a reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos, tratados com diferentes enxertos xenógenos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é considerado uma forma especializada de tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular é mineralizada e lhe confere a característica de rigidez. Além de proporcionar suporte e proteção às estruturas orgânicas, o tecido ósseo representa o maior reservatório de cálcio do organismo, o qual participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução dos impulsos elétricos em nervos e músculos. Dessa forma, o tecido ósseo apresenta uma grande capacidade de remodelação, principalmente em resposta às necessidades metabólicas do corpo e à manutenção da estabilidade da calcemia (MARKS, 2002).

A arquitetura microestrutural do tecido ósseo é formada por três componentes: células, matriz orgânica e matriz inorgânica. Esses, por sua vez, são integrados em duas hierarquias macroestruturais: osso cortical (compacto) e osso esponjoso (trabecular) (BOGLIOLO, 1994; KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

Histologicamente, o tecido ósseo pode demonstrar duas variáveis de formação: primário (imaturo), o qual apresenta-se com uma disposição irregular das fibras colágenas e uma menor quantidade de hidroxapatita e secundário (maduro, haversiano ou lamelar), com fibras colágenas dispostas em lamelas concêntricas ou paralelas em torno dos canais de Havers, formando osso esponjoso ou compacto (COTRAM, KUMAR e COLLINS, 2005).

Para Andia, Cerri e Spolidorio (2006) as células responsáveis pelos processos de reabsorção, manutenção e remodelação óssea, são de quatro tipos distintos que se originam de duas linhagens: uma relacionada a formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos. Os **osteoblastos** são células de origem mesenquimal, mononucleadas que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. Trata-se de um grupo de células completamente diferenciadas cuja principal função é a formação óssea (osteogênese). São responsáveis pela síntese

dos componentes orgânicos da matriz óssea (colágeno do tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas e glicoproteínas), bem como dos componentes inorgânicos (LINDHE et al., 2005). As **células de revestimento ósseo** são células representadas por osteoblastos, após alterações morfológicas e funcionais, que recobrem a superfície do tecido ósseo quiescente, dessa forma, estas células exibem escassas organelas de síntese e secreção de proteínas e formam uma camada contínua e interconectada com a capacidade de manter a homeostase e regulação da concentração plasmática de cálcio (SODEK, 2000). Segundo o mesmo autor, as células de revestimento ósseo sob determinados estímulos, podem diferenciar-se em osteoblastos demonstrando um importante papel na manutenção e homeostase da matriz óssea e influência no metabolismo de cálcio e fosfato e troca de substâncias. Os **osteócitos** são células maduras (anteriormente osteoblastos) que se situam dentro da matriz por eles formada (osteoplástos), demonstram uma redução das organelas de síntese e secreção e desempenham um importante papel no controle dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo (SAUERESSIG, 2005). São as células mais abundantes no tecido ósseo, caracterizadas por formas elípticas, menores que os osteoblastos e que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior dos canálculos ósseos. Estas estruturas possibilitam interconectar a superfície óssea com as porções mais internas e desta forma auxiliar na manutenção e vitalidade da matriz óssea (BANKOFF, ZYLBERBERG e SCHIAVON, 1998; TATE, 2004). Os **osteoclastos** são células gigantes multinucleadas, derivadas dos monócitos do sangue. Estas células participam da reabsorção da matriz mineralizada e orgânica do tecido ósseo, participando dos processos de remodelação e reabsorção óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

## 2.2 BASES BIOLÓGICAS DO REPARO ÓSSEO

A formação de tecido ósseo durante o desenvolvimento do esqueleto pode ocorrer de uma forma direta, por meio de uma membrana, sendo denominada de ossificação intramembranosa, ou de uma forma indireta, através de um estágio intermediário de cartilagem, denominado de ossificação endocondral (MARKS e GARG, 1998).

A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário, no interior de uma membrana conjuntiva, onde células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos para iniciar a formação de tecido ósseo. Como exemplo desse tipo de ossificação, têm-se alguns ossos do crânio, alguns ossos faciais e parte da clavícula e da mandíbula ( MARKS e GARG, 1998).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2004), os ossos associados a uma maior sobrecarga formam-se pela ossificação endocondral. Nesses tecidos, o mesênquima embrionário transforma-se em cartilagem, comportando-se como um modelo para a formação óssea.

De acordo com os estudos de Schenk (1996) a formação de tecido ósseo depende de dois fatores importantes: suprimento vascular e suporte mecânico. Este mesmo autor salienta que a falha de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grandes volumes e tecidos competidores com alta atividade de proliferação, podem dificultar ou mesmo impedir o reparo ósseo.

De acordo com os mecanismos biológicos de reparo do tecido ósseo, Garg (1999) destaca a presença de três diferentes processos biológicos associados a este evento: osteogênese, osteoindução ou osteocondução, ou por meio de uma combinação de mecanismos.

#### **a- Osteogênese**

Trata-se de um termo que denota os elementos celulares do enxerto que sobreviveram ao transplante e estão ativamente produzindo osso novo (MELLONIG et al., 1989; LANE, 1995). Segundo Dalapicula (2007), o osso autógeno é o único material de enxerto disponível com propriedade osteogênica.

#### **b- Osteoindução**

O termo refere-se ao processo pelo qual as células tronco mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao local do enxerto, são induzidas à diferenciação em células de linhagem osteogênica (BOYAN et al., 2006).

Lane (1995) e Lindhe et al., (2005) caracterizam a osteoindução como a formação de novo osso por novos osteoblastos diferenciados de células mesenquimais indiferenciadas sob a influência de agentes indutores como a proteína morfogenética óssea (BMP) e fatores de crescimento.

### **c- Osteocondução**

É o processo que favorece a proliferação, migração e maturação de osteoblastos e a aposição do osso diretamente sobre o material (LANE, 1995). Os materiais osteocondutores servem portanto como arcabouço para a proliferação do tecido ósseo perdido (CARVALHO et al., 2004), sustentando uma estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos trazendo, então, os componentes necessários para a formação óssea (GATTI, 2002).

Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, não apresentando reação tóxica evidente e, os mais comuns são os enxertos xenógenos e os enxertos aloplásticos (DALAPICULA, 2007).

## **2.3 BIOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO**

A necessidade de utilizar enxertos como forma de tratamento para diferentes tipos de defeitos ósseos torna fundamental o entendimento da interação do biomaterial com o ambiente vivo. A partir deste conhecimento, é possível a produção de substâncias compatíveis com a saúde.

A reconstrução Ideal do tecido ósseo depende, principalmente, da atividade de células osteoprogenitoras (OREFFO e TRIFFIT, 1999). Sicca (2005) afirma que o número dessas células é limitado e a sua ação depende de estímulos, como os promovidos pelos fatores de crescimento. Dessa forma, o mesmo autor demonstra a importância de se encontrar técnicas e materiais que estimulem a sua proliferação e diferenciação a fim de auxiliar no reparo de grandes defeitos ósseos.

Costa e Veinstein (1994) classificaram os enxertos em: 1. Enxertos autógenos ou auto-enxertos, quando o tecido é transferido de local para outro, de um mesmo indivíduo. 2. Enxertos alogênicos, homogênicos ou homoenxertos são tecidos enxertados entre indivíduos da mesma espécie com genes não idênticos, como o osso fresco, congelado, liofilizado (FDBA), desmineralizado e liofilizado (DFDBA). 3. Aloplástico, corpo estranho, inerte, utilizado para implantação nos tecidos, como fosfato de cálcio, hidroxiapatita, biocerâmica, além de outros tipos. 4. Xenoenxertos,

heteroenxertos ou heterólogos, enxertos realizados entre indivíduos de espécies diferentes.

Atualmente, diversos materiais têm sido utilizados com o propósito de favorecer o reparo ósseo, como os enxertos autógenos, alogênicos, aloplásticos ou xenógenos assim como os fatores de crescimento e morfogenes, seja de forma isolada ou em combinações.

### **2.3.1 Enxertos Autógenos**

Os enxertos ósseos autógenos são os materiais mais amplamente utilizados em cirurgias para aumento de rebordo e para reconstruções de defeitos ósseos, desde que contenham células viáveis como células osteoprogenitoras de osso medular, matriz extracelular colagenosa e não colagenosa e fatores de crescimento/diferenciação. São materiais biológicos considerados “padrão ouro” na terapia para reparo ósseo, por sua capacidade de induzir a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução (CONZ et al., 2005).

Embora os enxertos autógenos possam ser tanto de osso cortical quanto medular ou da associação de ambos, Misch (2000) em seus estudos afirma que o osso medular é o material mais eficiente na reconstrução de defeitos ósseos, por possibilitar uma maior quantidade de células osteogênicas, aumentando o seu potencial de osseindução e osseocondução.

Pesquisas por um substituto ósseo ideal foram realizadas por mais de 20 anos, sendo o osso autólogo considerado o melhor dos materiais para enxerto, pois além do seu potencial para reter células vitais, são materiais do próprio organismo receptor, não produzindo uma reação imunológica (CAMELO, 2001).

Os enxertos ósseos autógenos podem ser retirados tanto de áreas extra-orais como crista ilíaca, calota craniana e tíbia, quanto de áreas intra-orais como a região retro molar, tuberosidade de maxila e sínfise mandibular (MISCH, 2000), a depender da necessidade imposta pelo defeito ósseo.

Park (2004) observou que a sínfise mandibular é preferida como sítio doador para enxertos ósseos relativamente pequenos necessários ao procedimento de

enxerto ósseo autógeno. A observação pertinente aos ossos cortical e trabecular, auxiliam na determinação da profundidade da osteotomia. Estes resultados fornecem uma informação útil sobre o enxerto retirado da sínfise mandibular para a colocação de implantes dentários. Desta forma, permitirão que o volume da placa cortical da região da sínfise mandibular, seu tamanho adequado, profundidade e localização sejam previstos quando se vem a remover o bloco do enxerto.

Em um estudo prospectivo realizado por Chiapasco et al. (2007), foram tratados seis pacientes com severa atrofia de mandíbula edentula, as quais foram reconstruídas com múltiplas camadas de enxerto ósseo da calvária colocados na área intraforames da mandíbula. Cinco a 8 meses após, 23 implantes dentais foram colocados nas áreas reconstruídas e carga imediata com overdenture implanto suportada. Os pacientes foram anualmente avaliados clínico e radiograficamente. Os autores demonstraram que a carga imediata de implantes dentais colocados em áreas severamente atrofiadas de mandíbulas edentulas reconstruídas com enxerto ósseo da calvária é um procedimento previsível, os quais permitem um sucesso na reabilitação com o tempo de tratamento reduzido.

Os enxertos ósseos autógenos em geral, são preferidos por sua biocompatibilidade, por não apresentarem potencial imunogênico e pelo poder osteogênico (YOSHIKAWA et al., 2004), além de serem provenientes do próprio paciente, não oferecendo risco de transmissão de doenças (TOTH et al., 1995).

Entretanto, diversos inconvenientes como a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, quantidade limitada, alto risco de reabsorção e morbidade da área doadora (BURG et al., 2000; CRUZ et al., 2006), podem limitar sua atuação na área clínica, exigindo em alguns casos procedimentos em ambiente hospitalar, além de um aumento no tempo cirúrgico e nos custos operacionais.

### **2.3.2 Enxertos Alogênicos, Homógenos ou Homo enxertos**

São enxertos transplantados entre indivíduos de uma mesma espécie, porém com carga genética diferente (DALAPICULA, 2007). O tecido é obtido de osso humano, processado e estocado sob várias formas e tamanhos, em bancos de ossos para uso futuro (OREFFO e TRIFFITTI, 1999).

De acordo com Sicca (2005), esses materiais podem ser divididos em 2 tipos, o osso alogênico congelado e liofilizado (FDBA) e o osso alogênico congelado desmineralizado e liofilizado (DFDBA), sendo o segundo mais utilizado pela liberação facilitada de fatores de crescimento e BMPs. Se destacam pela maior facilidade de obtenção em relação aos enxertos autógenos, não necessitando de um segundo procedimento cirúrgico.

No entanto, o uso de aloenxertos envolve certo risco quanto a antigenicidade, muito embora sejam, usualmente, pré tratados por congelamento, radiação ou agentes químicos, visando evitar reação de corpo estranho ( LINDHE et al., 2005).

Embora possa haver variações, o processo de produção do FDBA e do DFDBA é específico. De acordo com Dalapicula (2007), o processo denominado liofilização dos enxertos alógenos se inicia pela remoção do osso cortical e medular do doador seguindo o processo de lavagem em água destilada e particulando o osso em tamanhos que variam de 500µm a 5µm. A fim de remover a gordura, o osso é imerso em etanol a 100%, em seguida o material é congelado em nitrogênio, seco e então esterilizado em óxido de etileno ou irradiado e, posteriormente, armazenado. Esse processo de desidratação permite um maior tempo de armazenamento e diminuição da antigenicidade. A produção do DFDBA contém um estágio adicional no qual a desmineralização das partículas é feita em 0,6 N de ácido clorídrico ou nítrico durante 6 a 16 horas, melhorando dessa forma o seu potencial osteogênico pela exposição de BMPs.

Boëck-Neto et al. (2000) em um estudo com 10 biópsias, incluindo 10 pacientes, 10 meses após cirurgia de levantamento de seio usando uma combinação de 50% de osso autógeno plus, 50% de enxerto alogênico de osso liofilizado desmineralizado (DFDBS grupo) ou 50% de osso autógeno plus e 50% de hidroxiapatita (HA grupo). Processamento histológico de rotina e descoloração com hematoxilina e eosina e tricromo de Masson foram realizados. Os resultados indicaram que ambos DFDBA e HA associados com um enxerto de osso autógeno foram biocompatíveis e promoveram osteocondução, atuando como uma matriz para formação óssea. Entretanto ambos os materiais ainda estavam presentes após 10 meses.

Baptista (2003) observou que devido ao crescente uso dos enxertos homólogos humanos, nas cirurgias reconstrutivas, há necessidade do completo conhecimento

de suas características biomecânicas e microscópicas. Os enxertos ósseos não necessitam de células viáveis para sua utilização, logo, o processo de criopreservação é um método útil para o armazenamento dos aloenxertos em bancos de tecidos, não inviabilizando seu emprego futuro nas cirurgias ortopédicas.

### **2.3.3 Enxertos Aloplásticos**

Materiais aloplásticos são biomateriais sintéticos ou inorgânicos utilizados como alternativa na reconstrução de defeitos ósseos. De acordo com Bezzi (2003), estes materiais devem ter um controle bem rigoroso de suas propriedades físicas e químicas durante o processo de fabricação a fim de permitir uma resposta tecidual previsível.

Trabalhos clássicos da literatura demonstram uma preocupação com os diversos substitutos ósseos, possibilitando desde então uma grande evolução na engenharia tecidual. Shaffer e App (1971) relataram que, embora muitos materiais sintéticos correntemente usados para o tratamento de defeitos periodontais sejam de componentes cerâmicos de fosfato de cálcio (fosfato tricalcio, hidroxiapatita porosa, hidroxiapatita não porosa ou combinações de hidroxiapatita e fosfato tricalcio (fosfato de cálcio bifásico), um número de materiais sintéticos não cerâmicos tem também sido usado nos anos recentes. Isto inclui materiais como sulfato de cálcio (gesso) o qual é prontamente disponível, barato, fácil manuseio e esterilizado. Embora tenha sido demonstrado ser biocompatível e prontamente absorvido, não há evidência de qualquer propriedade osteocondutora.

Figueiredo et al. (2001) utilizaram em sua pesquisa 42 coelhos albinos (Nova Zelândia), submetidos a defeito padrão em 84 cêndilos femorais, e implantação aleatória, em cada lado, de enxerto ósseo autógeno ou hidroxiapatita porosa. Foram avaliados os aspectos da evolução clínica diária dos animais. Após duas, quatro e doze semanas, grupos de 14 animais foram sacrificados e feita a avaliação radiológica e macroscópica da integração dos enxertos. Peças das regiões operadas foram colhidas para estudo histológico dessa integração. Os resultados macroscópicos mostraram que a integridade óssea, coloração, cicatrização da cortical e mobilidade dos implantes não foram estatisticamente significantes para os

dois tipos de enxertos, nos diferentes tempos de observação. Concluiu-se que a hidroxiapatita porosa de coral foi um substituto adequado ao enxerto ósseo autógeno em coelhos

Em uma pesquisa desenvolvida por Duarte et al. (2006) avaliou-se a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo na regeneração do processo alveolar, utilizando-se 28 cães adultos hípidos, pesando entre 10 e 15kg, divididos em dois grupos. Foram criados defeitos de aproximadamente 6 x 5mm na superfície vestibular do processo alveolar até atingir a raiz do quarto pré-molar mandibular direito. Em um grupo, o defeito foi totalmente preenchido com hidroxiapatita sintética; o outro, sem tratamento, foi usado como controle. Aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias, foram coletados fragmentos ósseos para a análise histológica sob microscopia óptica. Observou-se crescimento ósseo e vascular no interior dos poros de hidroxiapatita, intensa proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. A biocompatibilidade da hidroxiapatita permitiu a sua integração com o processo alveolar por meio da formação direta de um osso lamelar. Ocorreu neoformação óssea à medida que a hidroxiapatita foi degradada.

Socoll et al. (2006) em um estudo experimental randomizado, utilizaram 24 ratos da linhagem Wistar- Furth. Um defeito ósseo de 0,75cm x 1,5cm no corpo de cada hemimandíbula foi realizado em todos os animais com broca esférica de baixa rotação. Padronizou-se à esquerda o preenchimento do defeito ósseo, no grupo I com 15 microgramas de hidroxiapatita e no grupo II com preenchimento de submucosa de intestino delgado porcina (SID), e à direita o não-preenchimento serviu como controle. A eutanásia foi realizada no 40º dia de pós-operatório, após a qual se procederam as análises macroscópicas e histológicas das peças. No grupo hidroxiapatita a neoformação óssea fez uma área correspondente à 76,64% do total já no grupo SID 63,64% do total. Os resultados macroscópicos e microscópicos foram superiores com a utilização do enxerto de hidroxiapatita quando comparado ao grupo submucosa de intestino delgado porcino. Entretanto os dois bioenxertos mostraram-se osteoindutores quando comparados ao controle.

### 2.3.4 Xenoenxertos, Heteroenxertos ou Heterólogos

Os enxertos xenógenos são biomateriais obtidos de doadores de outras espécies, sobretudo bovinos, caprinos e suínos. Segundo Tadjedin et al. (2003); Simion e Fontana (2004) trata-se de um material com grande potencial osteocondutor e, química e fisicamente semelhante ao osso humano.

Os enxertos xenógenos, por eliminar riscos cirúrgicos e reduzir a possibilidade de infecções são importantes alternativas ao uso de osso autógeno. Além de poder ser obtido de fontes virtualmente inesgotáveis, apresentando resultados previsíveis quanto aos princípios cirúrgicos. Entretanto, a utilização de enxertos de origem bovina incluem a possibilidade de transmissão de doenças e a reação imune do hospedeiro ao material enxertado, em casos onde o enxerto apresente remanescente de matriz orgânica, o que diminui a aceitação da utilização desses materiais pelos pacientes e pelos profissionais (CALLAN e ROHRER, 1993).

Dentre os materiais, utilizados no mercado, provenientes de osso bovino inorgânico, encontra-se o Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). Trata-se de uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular.

Schlegel *et al.* (2003) compararam um substituto de osso bovino (*Bio-Oss*) ao osso autógeno com respeito ao seu valor como material para aumento do seio maxilar, não sendo observados problemas na cicatrização. Os resultados indicaram que devido às propriedades de não reabsorção do substituto ósseo Bio-Oss, a regeneração dos defeitos é possível. Demonstrou-se, também, que o substituto ósseo pareceu comportar-se como um implante permanente e o volume da área enxertada por osso autógeno diminuiu durante o período de observação.

A fim de investigar as respostas de células ósseas para um material de osso bovino desproteínizado, Bio-Oss, Tapety et al. (2004) realizaram uma pesquisa na qual o biomaterial foi enxertado em defeitos artificiais no fêmur de ratos. As limitadas penetrações foram preparadas no fundo da cavidade, permitindo a migração celular para o osso medular. Um defeito no fêmur esquerdo sem Bio-oss foi usado como controle. Os autores concluíram que o Bio-oss pode servir como suporte para as

células osteogênicas tão bem quanto para promover a diferenciação dos osteoblastos e a síntese da matriz.

Este material ósseo bovino inorgânico (Bio-oss) é amplamente utilizado no mercado e na prática clínica. Entretanto, trata-se de um produto importado e de alto custo. Após alguns esforços para a obtenção de um material nacional com propriedades semelhantes, chegou-se ao que hoje é encontrado no mercado com o nome comercial de Gen-Ox® (Baumer S.A., São Paulo, Brasil) e Bonefill® (Bionnovation Produtos Biomédicos S.A. São Paulo, SP). Produtos com menores custos e propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes aos biomateriais importados. Estes materiais vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas, a fim de verificar a sua biocompatibilidade, suas características físico-químicas e o seu potencial osteoindutor e osteocondutor.

Sanada et al. (2003), avaliaram a biocompatibilidade de blocos de enxerto de osso bovino esponjoso acelular e desmineralizado (Gen-Ox), implantados em músculo abductor da coxa de 30 ratos. Foram realizadas avaliações radiográficas e histológicas. De acordo com os resultados encontrados, os autores concluíram que o enxerto de matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco é biocompatível quando implantado em tecido conjuntivo intramuscular de ratos, sendo absorvido e substituído por tecido conjuntivo característico da região, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica.

Em 2003, Oliveira et al., buscaram avaliar a biocompatibilidade de dois enxertos ósseos preparados a partir de osso cortical bovino, um desproteínizado a 100°C (produzido no laboratório de Bioquímica da FOB-USP) e outro a 1.000°C (Gen-Ox). Esses materiais foram utilizados em partículas de tamanho de 1000 a 2000µm, implantados em tecido subcutâneo de 60 ratos. Foram realizadas análises microscópicas e de fosfatases ácidas. No tecido reacional ao osso desmineralizado a 1.000°C notou-se fibrosamento maior e as células gigantes não exibiam indícios de atuarem na degradação do material. Entretanto, a resposta celular ao osso 100°C indicou uma interação maior com as células gigantes e sinais de reabsorção. Dessa forma, pode concluir que a temperatura de desproteínização alterou a resposta biológica, provavelmente devido a material orgânico no osso desproteínizado a 100°C. Esses materiais, ambos biocompatíveis, podem ser usados como de

preenchimento ósseo-substitutos ou potenciais carreadores de proteínas morfogenéticas do osso.

Zambuzzi, Oliveira e Granjeiro (2006), realizaram um estudo para avaliar o potencial das fosfatases ácidas como biomarcadores da resposta tecidual ao implante de osso medular inorgânico bovino (Gen-Ox), utilizaram cápsulas de colágeno como carreadores de partículas macro (1000 a 2000  $\mu\text{m}$ ) e microgranulares (200 a 600  $\mu\text{m}$ ) e as implantaram em subcutâneo de 60 ratos Wistar. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, os autores puderam concluir que a atividade das fosfatases ácidas e tirosina fosfatase são moduladas, tanto em função do tempo como do tamanho da partícula, durante a resposta tecidual ao osso medular inorgânico bovino implantado em subcutâneo de ratos. Além disso, os autores afirmam que o exato papel de cada uma dessas enzimas nesta complexa cadeia de eventos deve, ainda, ser investigado.

Cruz et al. (2006), avaliaram as características físico-químicas e a biocompatibilidade de dois diferentes biomateriais: Gen-Ox e HA-U (Hidroxiapatita sintética experimental- Universidade estadual de Ponta Grossa). Esses materiais foram implantados no tecido subcutâneo de 36 ratos Wistar. As propriedades físico-químicas foram realizadas utilizando análise granulométrica, microscópio eletrônico de varredura, raios X de energia de dispersão, raios X de fluorescência e raios X de difração. Após todas as análises, os autores concluíram que estes biomateriais possuem características físico-químicas e biocompatibilidade similares.

Em um estudo avaliando o comportamento do osso cortical bovino inorgânico liofilizado (Gen-Ox) após implante em alvéolos dentais de 32 ratos, Dall'Antonia et al. (2006), demonstraram que o material é bem aceito pelo organismo sendo lentamente reabsorvido. A presença do implante ocasiona retardamento na cronologia do processo de reparo alveolar e pode ser considerado como material viável para uso em alvéolo dental quando indicado.

Accorsi-Mendonça et al. (2008), buscaram caracterizar as propriedades físico-químicas de dois diferentes biomateriais: Bio-Oss (granulação de 250 a 450  $\mu\text{m}$ ) desproteinizados a 300 °C e Gen-Ox (granulação de 250 a 1000  $\mu\text{m}$ ) desproteinizado a 950 a 1000°C. Foram utilizados para a análise microscópio eletrônico de varredura, espectroscópio regional infra-vermelho, raios X de difração, termogravimetria e análise de degradação. De acordo com os achados, os autores

concluíram que ambos os materiais comerciais são compostos de hidroxiapatita, sendo o Bio-Oss menos cristalino do que o Gen-Ox e portanto, mais suscetível à degradação.

Golçalves (2008) buscou avaliar a neoformação óssea a partir da associação do plasma rico em plaquetas com o osso bovino inorgânico (Bonefill), em 22 enxertos de seio maxilar. Foram realizadas análises histológicas e de acordo com os resultados, o autor pode concluir que a associação do osso bovino inorgânico e o plasma rico em plaquetas otimizaram as propriedades osteocondutoras do osso; induziram a formação óssea, acelerando a sua maturação, apresentando histologicamente um índice de sucesso de 88,88%. Além disso destaca a importância de outros estudos histomorfométricos, de análise de sucesso e capacidade osteocondutora, para ratificar o comportamento biológico e clínico da associação destes biomateriais.

Alves (2008) buscou avaliar através de uma análise histomorfométrica o reparo ósseo de uma área enxertada com osso autógeno e xenógeno (Bonefill). A partir das análises, o autor pode concluir que associação do osso autógeno com o biomaterial Bonefill na proporção de 1:1 é biocompatível, em humanos, podendo ser utilizado como material de substituição óssea em procedimento de levantamento de seio maxilar.

Os xenoenxertos podem ser indicados para diversos procedimentos regenerativos, os quais pode-se destacar os defeitos ósseos, defeitos periodontais, enxertos de seio maxilar, deiscências ósseas ao redor de implantes e regeneração óssea guiada (WORTH et al., 2005; WALLACE et al., 2005).

### **2.3.5 Fatores de Crescimento**

Os fatores de crescimento são polipeptídeos com aproximadamente 6-45 kD os quais estão envolvidos na proliferação celular, diferenciação e morfogênese de tecidos e órgãos durante a embriogênese, infância até a idade adulta (WOZNEY, 1998).

Para Lindsey (2001), alguns fatores de crescimento assumem um efeito endócrino e são estabelecidos devido à elevados níveis séricos. Muitos fatores de crescimento são depositados na matriz extracelular onde são liberados durante a degradação da matriz e agem como parte de uma complexa rede de sinais com efeitos durante a regeneração e remodelação de tecidos. O efeito dos fatores de crescimento é mediado através das superfícies receptoras das células alvo, ativando enzimas fosforilases intracelulares, que em seguida induzem uma via de sinalização intracelular pela agregação de co-fatores outras proteínas as quais migram para o núcleo. No núcleo os fatores de crescimento conectam-se ao DNA e, juntamente com outros fatores, induzem a transcrição e ativação de um ou mais genes (GONÇALVES et al., 1998).

Dentre os fatores de crescimento já caracterizados, cinco deles parecem muito promissores no campo da regeneração periodontal: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF); fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e BMP, pois são capazes de estimular a proliferação de células com fenótipo osteoblástico ou do ligamento periodontal, promover a formação óssea ou a regeneração periodontal em estudos em animais ou in vitro (STEFANI et al., 1997).

As BMPs são as responsáveis pela sinalização para a indução da formação óssea (REDDI, 1994; RIPAMONTI E REDDI, 1994; WOZNEY, 1995). Representam uma família com mais de vinte proteínas relatadas, as quais representam parte da família dos fatores -  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF-  $\beta$ ) (BLUMENTHAL et al., 2002), ativando e inibindo, os fatores de diferenciação e crescimento (GDFs) (WOZNEY, 1998).

A BMP tem a capacidade de estimular o mecanismo de regeneração óssea. As BMPs pertencem a uma família de fatores de crescimento e, como tal, desempenham um papel importante na formação dos ossos e cartilagens, na cicatrização das fraturas, bem como na reparação de outros tecidos osteomusculares (SCHMITT, 1999). As funções do BMP são promover a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condrócitos, como também influencia a formação dos padrões esquelético (WOZNEY, 1998).

Uma característica dessas proteínas morfogenéticas é que elas necessitam de um veículo para sua liberação, que pode ser colágeno, fibrina do colágeno, sulfato

de cálcio, matriz orgânica de osso, hidroxiapatita, ácido polilático ou poliglicólico (MUNHOZ, 2005).

O substrato carreador ideal preencheria os seguintes requisitos: relativa insolubilidade em condições fisiológicas; ser biodegradável; proteger contra atividades proteolíticas; funcionar como substrato para a adesão e proliferação celular; ser inerte imunologicamente; manter biodisponível a BMP através da degradação biológica controlada; ter estabilidade mecânica para unir defeitos ósseos (GONÇALVES et al., 1998).

## 2.4 MODELO DE ESTUDO

Defeitos ósseos críticos são definidos por Hollinger e Kleinschmidt (1990); Schmitz e Hollinger (1986) como o menor defeito intra-ósseo que não cicatrizam durante o período de vida do animal, justificando a necessidade da utilização de algum material para preenchimento ósseo. Os defeitos são criados em diferentes ossos como tíbia, calvária, fêmur e mandíbula.

Diversos modelos animais têm sido utilizados em experimentos para avaliar o grau de reparo ósseo utilizando-se biomateriais, dentre eles podemos destacar: ratos (STAVROPOULOS et al., 2003; ZAMBUZZI, OLIVEIRA e GRANJEIRO, 2006; DALL' ANTONIA et al., 2006; da SILVA et al., 2008; LEITE e RAMALHO, 2008; DEVELIOGLU, UNVER SARAYDIN e KARTAL, 2009), cães (ARAÚJO et al., 2002; POLYZOIS et al., 2007; YOU et al., 2007; ABUSHAHBA et al., 2008), coelhos (TAMIMI et al., 2006; DEHGHANI et al., 2008) e macacos (MIRANDA et al., 2005), ovelha (KRAMER et al., 2008).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o reparo de defeitos ósseos críticos produzidos na calvária de ratos, tratados com diferentes enxertos xenógenos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar radiograficamente, por meio de critérios quantitativos;
- E histologicamente, qualitativa e quantitativamente, o reparo de defeitos ósseos tratados com os seguintes enxertos xenógenos:
  - Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland);
  - Gen-ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil);
  - e Bonefill® (Bionnovation Produtos Biomédicos S.A. São Paulo, Brasil).

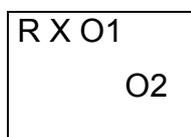
## 4 METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), seguindo todas as normas de conduta para experimentação animal, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição, em 24 de setembro de 2008 (ANEXO A). A obtenção das imagens radiográficas, sua digitalização e avaliação foram realizadas no Serviço de Radiologia e Laboratório de Imagens Eletrônicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), e a preparação e análise das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia da FOUFBA.

### 4.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA

Foi realizado um estudo sob os paradigmas qualitativo e quantitativo (PÁDUA, 1998), conforme especificado a seguir:

Estudo Experimental Verdadeiro, com grupo controle e só pós-teste. Diagrama:



(CAMPBELL; STANLEY, 1970; CAMPBELL; STANLEY, 1973; CAMPBELL; STANLEY, 1979)

E estudo descritivo não-experimental (KÖCHE, 1997).

### 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Setenta e dois ratos, machos, adultos, da espécie *Rattus Norvegicus Albinus*, *Rodentia Mammalia*, da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 300g, clinicamente saudáveis, provenientes do referido Biotério foram aleatoriamente selecionados para o estudo e separados em quatro grupos experimentais, contendo 18 animais cada, identificados a seguir:

- **Grupo A (G.A)**– tratados com Bio-oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland);
- **Grupo B (G.B)** – tratados com Gen-ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil);
- **Grupo C (G.C)**- tratados com Bonefill® (Bionnovation Produtos Biomédicos S.A. São Paulo, Brasil);
- **Grupo D (G.D)**- defeitos ósseos não tratados (controle).

Os referidos animais foram mantidos em gaiolas individuais, medindo 20 x 30 x 13 cm, em condições ambientais de temperatura (22° C) e luminosidade (ciclo 12h dia / 12h noite), umidade relativa de 50%, alimentados com uma ração comercial sólida sob forma de pelotas (Nuvilab® CR 1) e hidratados com água corrente *ad libidum*. Antes do confinamento, os animais receberam uma dose única de 0,2 ml de ivermectina. Os animais foram monitorados diariamente quanto a sinais de infecção e desconforto desde o início do cativeiro até o dia do sacrifício.

Um bioterista foi contratado para fazer a higienização diária das gaiolas, troca de maravalha e de água dos recipientes e reposição de ração. O biotério também recebeu higienização diária com detergente neutro e hipoclorito de sódio 1%.

#### 4.3 BIOMATERIAIS UTILIZADOS

##### Bio-Oss®

O Bio-Oss® é osso bovino medular inorgânico, produzido por Geistlich Pharma Ag (Switzerland). A sua desproteinização, de acordo com o fabricante, ocorre a cerca de 300°C .

##### Gen-Ox®

O Gen-Ox é produzido pela Baumer S. A. (Registro no Ministério da Saúde n. 10345500001) e apresenta-se em diferentes formas (particulados e blocos) e composições (orgânicos e inorgânicos). Neste estudo, utilizou-se micropartículas (250-1000µm) de osso bovino medular inorgânico a 1000°C.

Bonefill ®

O Bonefill ® é produzido pela Bionnovation Produtos Biomédicos S.A., a partir da extração de osso natural de fêmur bovino, totalmente desnaturado. Trata-se de osso bovino inorgânico particulado, com diversas granulações. Para esse estudo utilizou-se granulação média (partículas de 0,6 a 1,5 mm).

#### 4.4 COLETA E PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

##### 4.4.1. Procedimento Cirúrgico

As cirurgias foram realizadas no centro cirúrgico do Biotério da UEFS, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pela instituição. Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina na proporção de 0,08 mL/100g de massa corporal, e ainda foram submetidos a sedação e analgesia com injeção intramuscular em dose única de cloridrato de xilazina, na proporção de 0,04 mL/100g de massa corporal. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito ventral e então foi realizada tricotomia na região da calvária, anti-sepsia da área cirúrgica com álcool iodado e anestesia local infiltrativa com xilocaína a 2% com epinefrina 1:50.000 (Merrel Lepetit Farmacêutica e Indústria Ltda).

Seguindo o mesmo protocolo estabelecido por Chesmel et al (1998), foi realizado acesso coronal, com incisão cutânea e muscular, com aproximadamente 3 cm de extensão para a exposição do tecido ósseo, utilizando cabo de bisturi n. 7 com lâmina n. 15C. Os tecidos subcutâneo e muscular foram então divulsionados. Em seguida o periósteo foi incisado e afastado. O acesso e visualização do campo operatório foram mantidos por meio de três pinças hemostáticas (Figura 1a).

Foi confeccionado um defeito na porção mediana da calota craniana de cada rato, entre os ossos parietais, com aproximadamente 10 mm de diâmetro e com cerca de 1,5 mm de profundidade, por meio de uma broca trefina de 9 mm de diâmetro interno (3i-Implants), montada em um contra-ângulo com redução 1:20, com o auxílio de um motor para implantes (Driller BLM 600 double, SP, Brasil) a

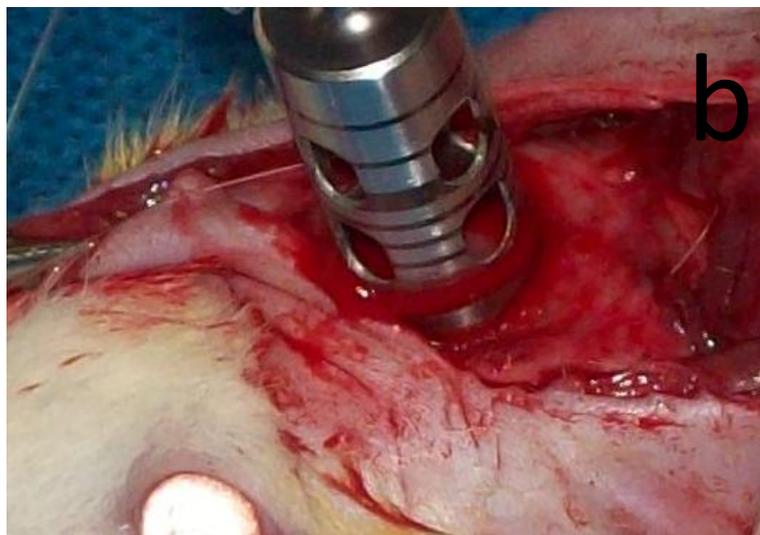
1500 rpm, sob irrigação externa peristáltica, com soro fisiológico a 0,9%. A dura-máter foi mantida íntegra (Figura 1b e 3).

Em seguida o biomaterial foi colocado no defeito ósseo, a depender do grupo experimental. No Grupo A, o defeito foi preenchido com Bio-oss; no Grupo B, foi utilizado Gen-ox; no Grupo C, foi utilizado Bonefill; e no Grupo D nenhum tratamento específico foi realizado no defeito. Utilizou-se uma colher de chá rasa (5 ml) como medida para padronizar a quantidade de biomaterial a ser introduzido no defeito. O enxerto foi colocado diretamente no defeito criado na calvária, misturando-o apenas com o sangue presente no leito cirúrgico (Figura 4a).

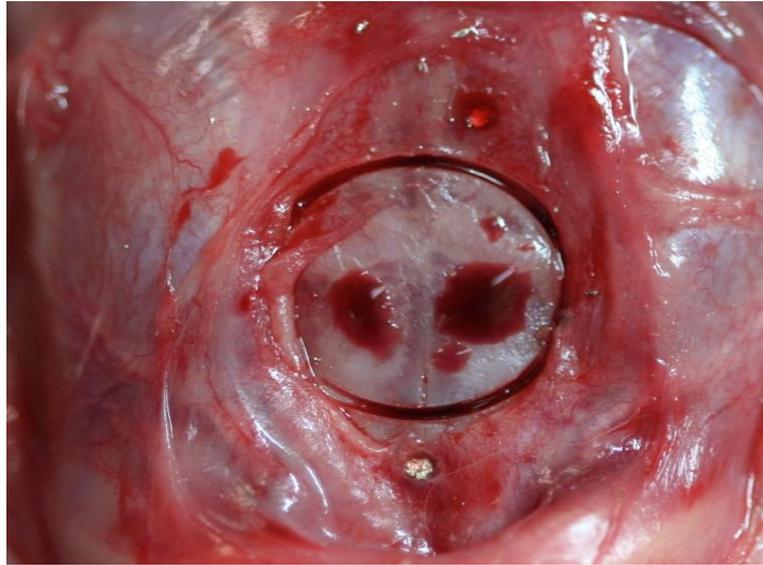
Eqüidistante do centro do defeito ósseo, dois buracos foram confeccionados com uma fina broca carbide de tungstênio (ISSO 012, n. 9803, Horico, Germany), um anterior e outro posterior, a 1 mm das margens do defeito. Os buracos foram preenchidos com amálgama (Dispersalloy, código regular do grupo 2891, Johnson e Johnson, Skillman, NJ, EUA) (Figura 2). Essas marcações serviram como referência para delimitação do defeito ósseo quando da análise radiográfica.

Os tecidos subcutâneos foram reaproximados com uma sutura contínua simples e a pele com pontos simples separados, empregando fio de náilon n. 5 (Figura 4b). Não foram utilizados antibióticos e antiinflamatórios durante o experimento.

Após a cirurgia, os animais foram observados por um período de até oito semanas. O sacrifício dos animais ocorreu 30 e 60 dias após a cirurgia. Os ratos foram mortos por *overdose* do anestésico utilizado. A porção do crânio que continha os defeitos foi removida, conservando-se os tecidos moles superficiais, usando discos de diamante montados em baixa rotação, com irrigação abundante com soro fisiológico a 9%. As peças cirúrgicas foram então colocadas em frascos com tampa, contendo formol a 10%, em quantidade superior ao tamanho da peça.



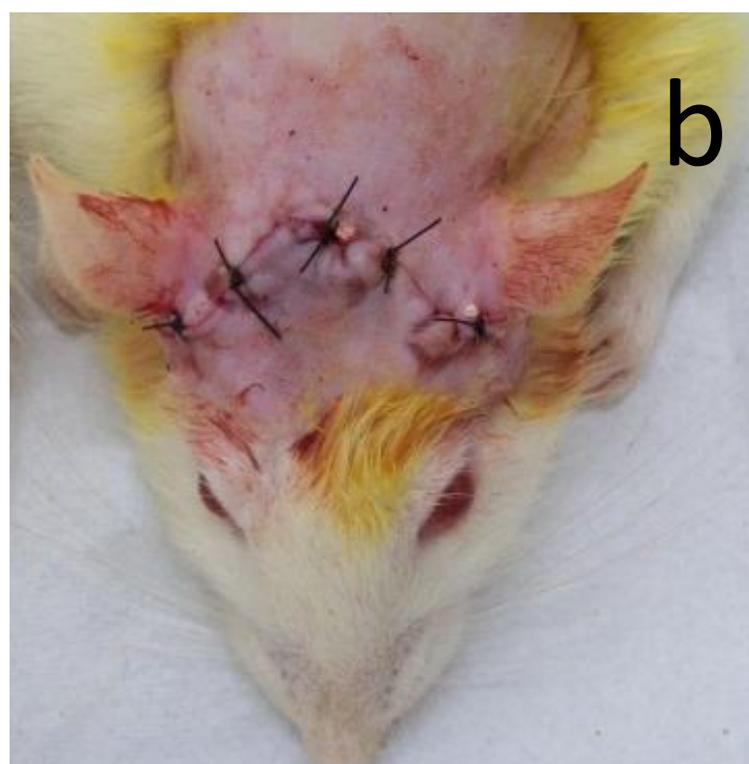
**Figura 1.** Incisão bicoronal na calvária do animal (a) e posicionamento da trefina circular, durante a realização do procedimento de transfixação da calvária do animal (b).



**Figura 2.** Vista superior do defeito crítico antes da remoção do bloco ósseo (a); marcações antero/posterior com amálgama.



**Figura 3.** Vista superior do defeito crítico após remoção do bloco ósseo (a).



**Figura 4.** Vista superior do defeito crítico após implantação do enxerto(a); Tecido suturado(b).

#### 4.4.2 Exame Radiográfico

Após a morte dos animais, a porção da calvária contendo o defeito ósseo foi posicionada diretamente sobre um filme radiográfico (tamanho 2, sensibilidade E/F, marca Kodak®), de forma que sua superfície caudal ficasse voltada para a face ativa do filme. Foi adicionado ao conjunto um penetrômetro de alumínio de cinco degraus com 1 mm de incremento, que foi posicionado ao lado da peça cirúrgica, e um simulador de tecidos moles (caixa de acrílico contendo aproximadamente 5 cm<sup>3</sup> de água), que foi posicionado acima da peça cirúrgica, durante a aquisição da radiografia. Foi utilizado um aparelho radiográfico de 70 kV e 8 mA, com um tempo de exposição de 0,2 segundos, distância focal de 20 cm, sendo que o feixe de radiação X incidiu perpendicularmente ao objeto (Figura 5 a e b).

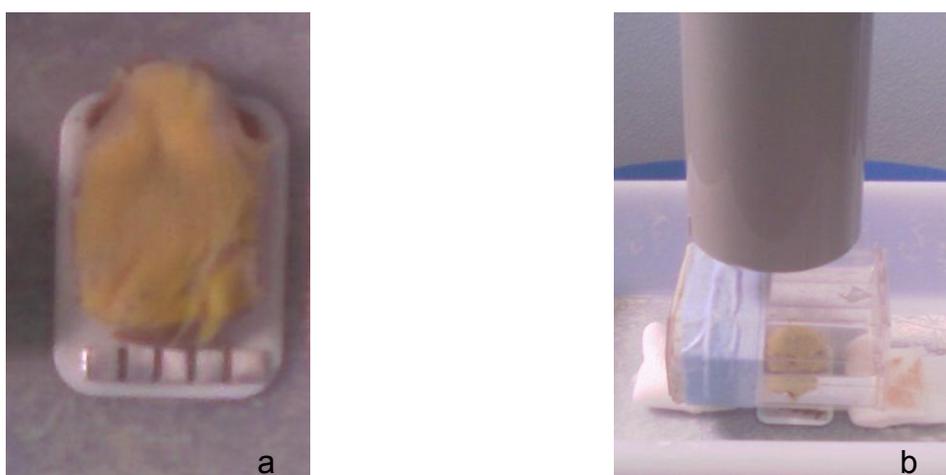


Figura 5: Porção da calvária posicionada sobre o filme radiográfico, associado a um penetrômetro de alumínio (a); Simulador de tecido mole e posicionamento do aparelho radiográfico.

Os filmes foram processados, pelo método manual (temperatura-tempo), com soluções de processamento novas (Kodak®), em câmara escura apropriada (tipo labirinto, com luz de segurança GBX-2 (Kodak®)). Todos os filmes de um mesmo grupo foram processados simultaneamente, de forma a minimizar as possíveis distorções de densidade e contraste inerentes ao processamento com soluções

químicas. Em seguida foram secas em estufas de ar quente (EMB®). Depois foram armazenadas em cartelas plásticas sob um código específico (Figura 6a).

As radiografias foram digitalizadas por um *scanner* com leitor de transparência (*HP PrecisionScan Pro 2.5, ScanJet XPA, Hewlett Packard Company, Greeley, Colorado, EUA*), com uma resolução espacial de 600 *dpi*, ampliação de 100%, no modo tons de cinza e 8 *bits*. O posicionamento da radiografia sobre a face ativa do *scanner*, assim como os ajustes de exposição (meios-tons, sombras e destaques) foram observados, de modo a padronizar todas as aquisições. Optou-se sempre pelo ajuste automático da escala de cinza, a cada captura. Máscaras de papel preto recobriram as áreas não utilizadas do *scanner* durante a aquisição da imagem radiográfica digitalizada (Figura 6b). Todas as imagens foram salvas em *CD-rom*, no formato *bmp*, sob um código específico.

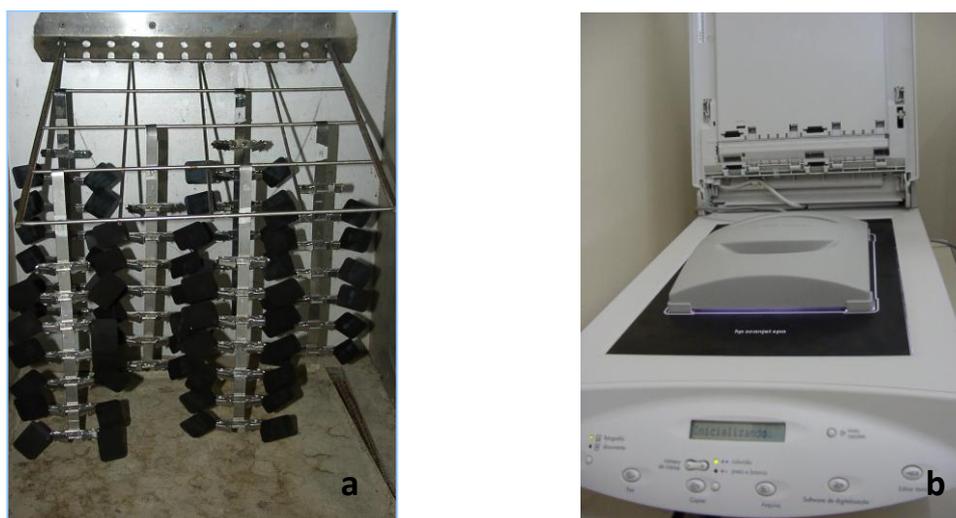


Figura 6: Estufa de ar quente (a); *scanner* com leitor de transparência (b).

#### 4.4.3 Avaliação Radiográfica

Antes da análise, as imagens digitalizadas foram ajustadas em brilho. Tal procedimento teve como finalidade a uniformização dos níveis de cinza exibidos pelas imagens dos diferentes grupos avaliados, evitando que o ruído fotônico ou

diferenças no processamento com soluções químicas interferissem na avaliação radiográfica. Assim, inicialmente uma imagem digitalizada foi aberta no programa *Photoshop v 7.0* (*Adobe Systems Incorporated, Mountain View, Califórnia, EUA*), e utilizando a ferramenta “marca de seleção retangular”, foi selecionada uma área de tamanho pré-fixado no terceiro degrau do penetrômetro de alumínio (Figura 7). A partir daí exibiu-se o histograma da área selecionada (Figura 8), e obteve-se a média (M) de brilho da referida área (Figura 9). Para as demais imagens, o valor de M dos níveis de cinza (NC) do mesmo degrau do penetrômetro foi mensurado e comparado com o valor de referência da primeira imagem. Diferenças superiores ou inferiores a cinco unidades, naquele valor, foram corrigidas, a partir da ferramenta “ajuste de brilho/contraste” (Figuras 10 e 11), e as imagens salvas.

As imagens digitalizadas corrigidas foram então abertas no programa *ImageTool® v. 3.0* (*University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA*). Através da ferramenta “histograma” (Figuras 12) foi mensurada a M dos NC assim como o desvio-padrão (DP) dos NC da região do defeito ósseo (guiada pelas marcações previamente realizadas com amálgama (Figuras 13 e 14). Dos valores obtidos, foi calculado o coeficiente de variação (CV) dos NC da área ( $CV = (DP/M) \times 100\%$ ). Esse valor indicou a homogeneidade ou não do tecido presente na área do defeito. Para esta análise não foi possível a alteração da aparência da imagem, além da correção do brilho já realizada.

Todas as análises radiográficas digitais foram realizadas em um monitor de tala plana, *SuperVGA*, de 15”, por um único avaliador, duas vezes, com intervalo de uma semana entre as avaliações. Os dados foram anotados para posterior análise.

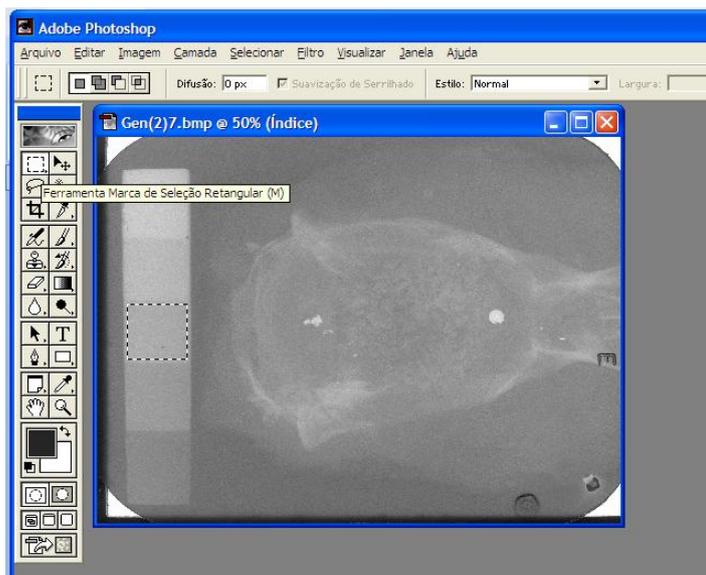


Figura 7: Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Ferramenta “seleção retangular” sendo utilizada para delimitar o terceiro degrau do penetrômetro de alumínio.

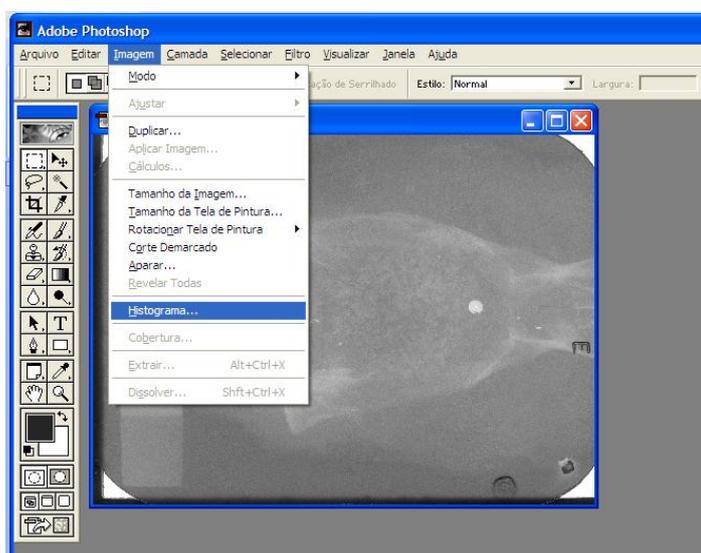


Figura 8: Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Seleção da ferramenta “histograma”.

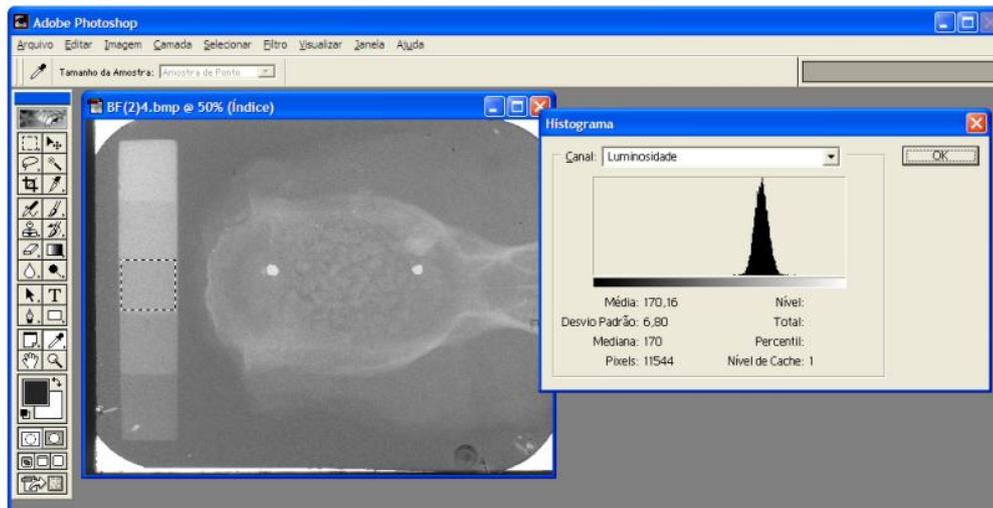


Figura 9: Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Determinação da média dos níveis de cinza do terceiro degrau do penetrômetro.

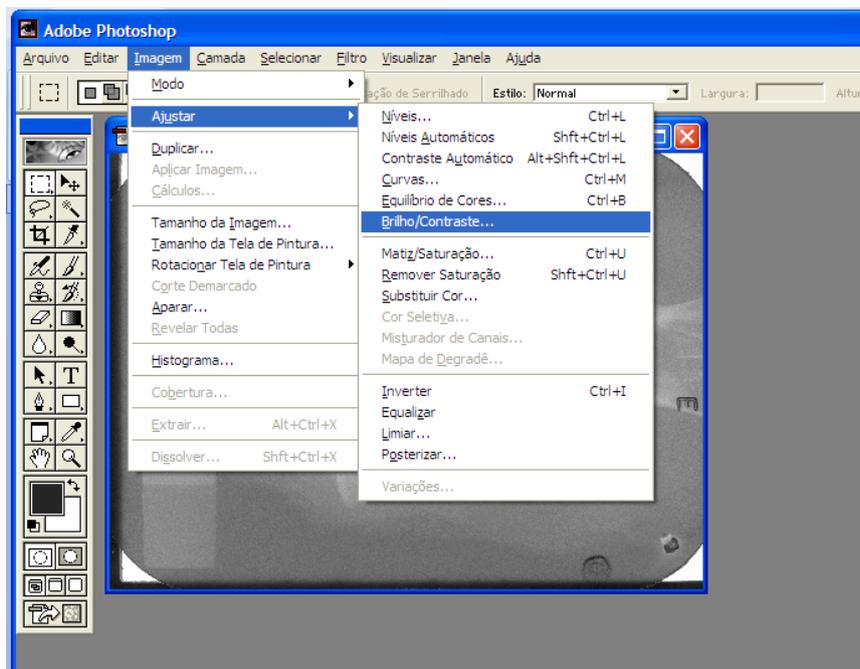


Figura 10: Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Seleção da ferramenta “ajuste de brilho/contraste”.

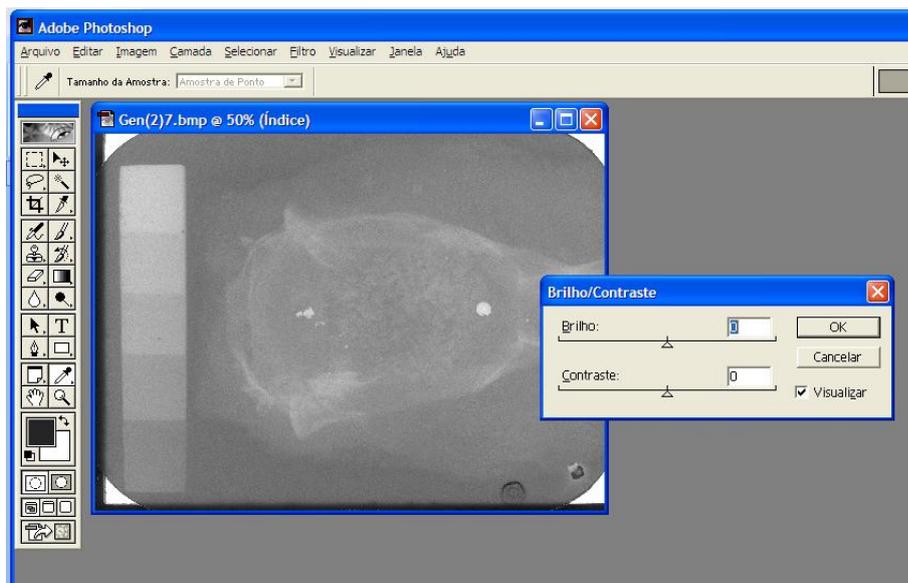


Figura 11: Radiografia digitalizada aberta no Programa Photoshop®. Janela para alteração do brilho sendo acionada.



Figura 12: Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Seleção da ferramenta “histograma”.

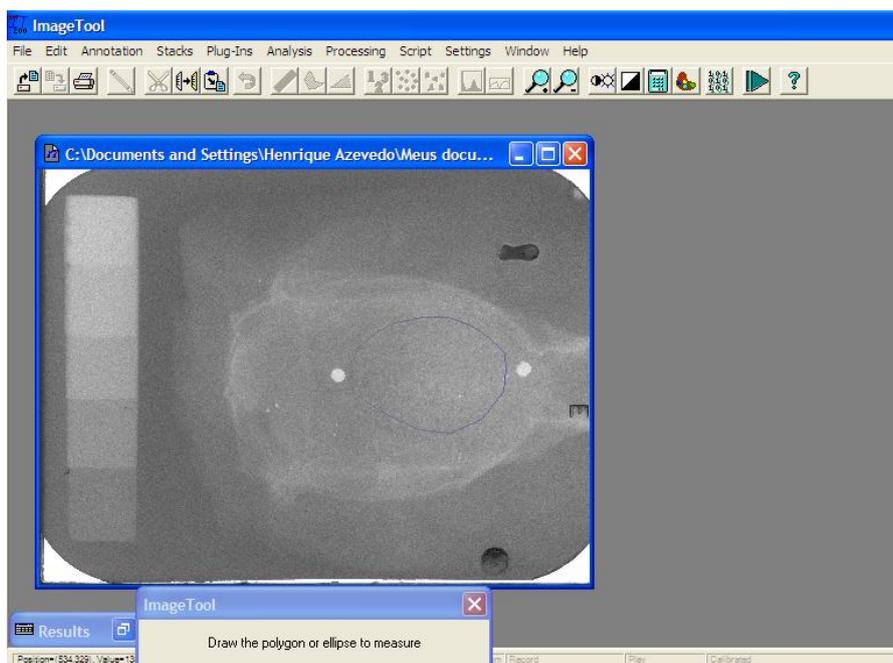


Figura 13: Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Determinação da área a ser avaliada no defeito ósseo.

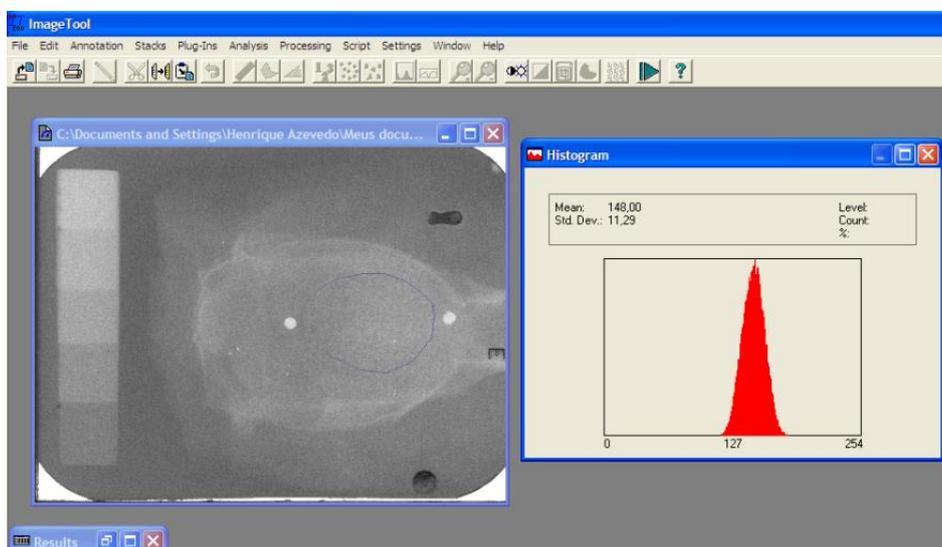


Figura 14: Radiografia digitalizada aberta no Programa ImageTool®. Histograma demonstrando a média e o desvio-padrão dos níveis de cinza da área selecionada do defeito ósseo.

#### 4.4.4 Avaliação Histológica

As peças foram fixadas em solução de formol a 10%, por aproximadamente sete dias. Após a fixação, foram descalcificados, com ácido nítrico 5% por duas horas, desidratadas e incluídas em parafina para posteriores cortes histológicos de 5µm. Uma parte dos cortes foi corada por Hematoxilina-Eosina (HE), e outra parte pela Coloração de Picosírius, sendo esta última específica para fibras colágenas.

Para a análise histológica pela microscopia convencional utilizou-se um Microscópio Nikon Eclipse E600 (magnificações: x4, x10 e x 20) acoplado a uma câmera digital Nikon DW100 (Nikon, Yohohama, Japão), usado para prover avaliação qualitativa e semi-quantitativa da tolerabilidade do local e desempenho do material testado.

A avaliação da tolerabilidade do local incluiu a presença de hiperemia, necrose, edema, reação inflamatória, fibras colágenas; tipo celular predominante (células polimorfonucleares [PMNs], eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes).

A avaliação do desempenho dos materiais testados inclui a neoformação óssea, osteoblastos, células multinucleadas, presença do enxerto, reabsorção do enxerto, reabsorção da borda do defeito. A avaliação histopatológica foi registrada, com base numa escala de quatro pontos: 0= ausente, 1= leve, 2= moderada, 3= severa. A avaliação foi feita por um examinador experiente e os dados foram anotados em fichas específicas (APÊNDICE A) para posterior análise.

#### 4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para as diferentes análises realizadas, distintos testes estatísticos foram aplicados, sempre para uma probabilidade de erro de 5%. Assim, para a análise radiográfica quantitativa (M e CV dos NC) ao se comparar dois grupos foi empregado o teste de Mann-Whitney, já quando mais de dois grupos foram comparados utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis tendo como *post hoc*, o teste de Dunn. Para a análise histológica, estimou-se a distribuição dos achados nos diferentes grupos e empregou-se o teste exato de Fischer, para avaliar a associação entre as variáveis. Para esta análise a intensidade dos critérios avaliados foram agrupados (“Graus 0 e 1” e “Graus 2 e 3”).

## 5 RESULTADOS

Alguns animais (seis ao todo) morreram durante a fase pós-cirúrgica do experimento, e assim, contabilizadas as perdas, ao final os grupos foram constituídos por sete a nove animais cada. Vale ressaltar que tais mortes não puderam ser associadas a nenhum evento específico, e seu número encontra-se dentro do patamar esperado de eventuais perdas quando da experimentação em animais.

### 5.1 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Após sacrifício dos animais, 30 ou 60 dias após a cirurgia, e separação de sua porção superior da cabeça, mantendo tecidos moles de superfície, as peças cirúrgicas foram mantidas em frascos contendo formol a 10%, devidamente identificados. Em seguida as peças cirúrgicas foram radiografadas e as radiografias digitalizadas de forma padronizada, sendo as imagens ajustadas eletronicamente em brilho e avaliadas duas vezes, com um intervalo de no mínimo uma semana entre as avaliações, por um único examinador. Foram anotados a média (M) dos níveis de cinza (NC) e o desvio-padrão (DP) da M dos NC da área da calota craniana dos animais, onde o defeito ósseo foi criado. Para a delimitação desta área com as ferramentas do programa digital utilizado, foram utilizadas as marcações obtidas com os orifícios preenchidos com amálgama confeccionados durante o mesmo ato cirúrgico do experimento. O coeficiente de variação (CV) da M dos NC foi calculado para cada espécime aplicando-se a seguinte fórmula:  $CV = (DP/M) \times 100\%$ . Das duas medidas obtidas (a avaliação foi realizada duas vezes) de cada parâmetro ainda foi calculada uma média, que serviu de base para a análise estatística.

Avaliando-se primeiramente os animais sacrificados após 30 dias do experimento, pode-se verificar que entre o grupo Bonefiil (M= 130,38) e o grupo controle (M= 130,00) não houve diferença significativa na M dos NC ( $p = 0,80$ ; Teste Mann-Whitney). O mesmo pode ser observado ( $p = 0,06$ ; Teste de Mann-Whitney) entre os grupos Bio-oss (M= 138,06) e o grupo controle (M= 130,00). Já entre os grupos Gen-ox (M= 141,00) e controle (M= 130,00), a diferença foi significativa ( $p = 0,04$ ; Teste de Mann-Whitney). Comparados os três grupos experimentais entre si,

pode-se observar que não houve diferença significativa entre eles ( $p= 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Os dados são mostrados na Tabela 1.

Na avaliação do CV nos espécimes sacrificados após 30 dias do ato cirúrgico, os resultados revelaram que entre os grupos Bonefill (CV= 6,13) e controle (CV= 5,17) houve uma diferença significativa ( $p= 0,001$ ; Teste de Mann-Whitney). O mesmo resultado ( $p= 0,001$ ; Teste de Mann-Whitney) foi encontrado entre os grupos Bio-oss (CV= 6,49) e controle (CV= 5,17). Já entre os grupos Gen-ox (CV= 5,52) e controle (CV= 5,17) não houve diferença estatística ( $p= 0,11$ ; Teste de Mann-Whitney). Comparados os três grupos experimentais entre si, observa-se que houve diferença significativa ( $p= 0,02$ ; Teste de Kruskal-Wallis), sendo esta determinada pela diferença entre os grupos Bio-oss e Gen-ox ( $p<0,05$ ; Teste de Múltiplas Comparações de Dunn). Os dados são exibidos na Tabela 1.

Para os animais sacrificados após 60 dias do ato cirúrgico, observa-se que a diferença da M dos NC foi estatisticamente significativa ( $p= 0,03$ ; Teste Mann-Whitney) entre os grupos Bonefill (M= 138,44) e controle (M= 134,35). O mesmo ocorreu ( $p= 0,003$ ; Teste Mann-Whitney) entre os grupos Bio-oss (M= 141,72) e controle (M= 134,35), e também ( $p= 0,03$ ; Teste Mann-Whitney) entre os grupos Gen-ox (M= 143,78) e controle (M= 134,35). Quando foram comparados os três grupos experimentais entre si, não houve diferença estatística ( $p= 0,07$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Dados exibidos na Tabela 1.

Em relação ao CV dos NC dos espécimes sacrificados em 60 dias, observa-se que entre os grupos Bonefill (CV= 6,02) e controle (CV= 4,78) houve diferença significativa ( $p= 0,006$ ; Teste Mann Whitney), assim como ( $p= 0,008$ ; Teste Mann-Whitney) entre os grupos Bio-oss (CV= 5,59) e controle (CV= 4,78), e ( $p< 0,0001$ ; Teste Mann Whitney) entre os grupos Gen-ox (CV= 6,29) e controle (CV= 4,78). Ao serem comparados os três grupos experimentais entre si, observa-se que não houve diferença significativa entre eles ( $p= 0,33$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Os dados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Média e coeficiente de variação dos níveis de cinza dos defeitos ósseos produzidos na calota craniana dos animais dos diferentes grupos avaliados e sacrificados 30 ou 60 dias após o ato cirúrgico

Tempo de sacrifício	30 dias		60 dias	
	M	CV	M	CV
Bonefill	130,38 <sup>a</sup>	6,13 <sup>a</sup>	138,44 <sup>a</sup>	6,02 <sup>a</sup>
Controle	130,00 <sup>a</sup>	5,17 <sup>b</sup>	134,35 <sup>b</sup>	4,78 <sup>b</sup>
Bio-oss	138,06 <sup>a</sup>	6,49 <sup>a</sup>	141,72 <sup>a</sup>	5,59 <sup>a</sup>
Controle	130,00 <sup>a</sup>	5,17 <sup>b</sup>	134,35 <sup>b</sup>	4,78 <sup>b</sup>
Gen-ox	141,00 <sup>a</sup>	5,52 <sup>a</sup>	143,78 <sup>a</sup>	6,29 <sup>a</sup>
Controle	130,00 <sup>b</sup>	5,17 <sup>a</sup>	134,35 <sup>b</sup>	4,78 <sup>b</sup>

Valores seguidos de letras iguais = sem diferença estatística ( $p > 0,05$ )

Valores seguidos de letras diferentes = com diferença estatística ( $p < 0,05$ )

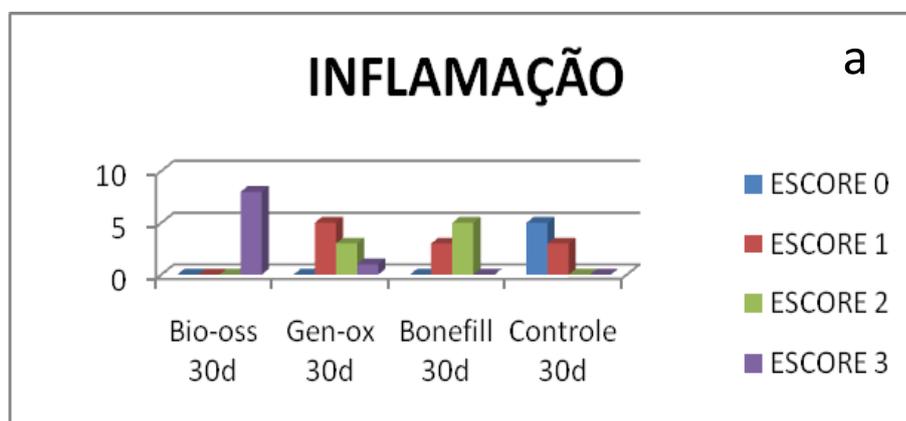
## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Quanto à avaliação histológica, foram avaliados critérios de tolerabilidade local à presença dos diferentes enxertos e seu desempenho na reparação dos defeitos ósseos. A descrição das lâminas e as fotomicrografias selecionadas estão aqui representadas de acordo com cada período biológico estudado, relacionados individualmente com as variáveis avaliadas, os valores de  $p$  estão demonstrados na Tabela 2.

Analisando-se inicialmente a presença e intensidade da reação inflamatória, observa-se que no grupo controle, após 30 dias, não houve inflamação tecidual em 62,5% (5 espécimes) dos casos e a inflamação foi leve nos casos restantes (37,5% - 3 espécimes (Figura 38). Aos 60 dias, nota-se que 37,5% (3 casos) não houve inflamação e em 62,5% (5 casos) a inflamação foi leve. Já ao se avaliar o grupo Bio-oss, nota-se que em 100% dos casos (8 animais) houve inflamação severa aos 30 dias, e que aos 60 dias, a inflamação foi distribuída entre os graus leve (33,3% - 3 casos), moderado (33,3% - 3 casos) e severo (33,3% - 3 casos) (Figura 34),

uniformemente. Nos espécimes tratados com Gen-ox, após 30 dias do procedimento cirúrgico, observa-se que em 55,6% dos casos (5 espécimes), a inflamação foi considerada leve (Figuras 43 e 44), o mesmo ocorrendo após 60 dias. No grupo Bonefill, após 30 dias, observa-se um grau moderado em 62,5% (5 espécimes), ao passo que após 60 dias 71,2% (5 espécimes), demonstraram grau leve de inflamação (Figura 15 a e b).

A análise estatística quando aplicada à variável “inflamação” revelou uma diferença extremamente significativa ( $p=0,0002$ ) e muito significativa ( $p=0,009$ ), para os períodos de 30 e 60 dias, respectivamente, quando confrontado o grupo Bio-oss e o grupo controle. Entretanto para ambos os períodos a análise demonstrou diferenças não significantes ( $p=0,0824$ ) para o grupo Gen-ox em comparação ao grupo controle. Para o grupo Bonefill, comparado ao grupo controle percebe-se que no período de 30 dias houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0254$ ) e para o período de 60 dias não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,1750$ ).



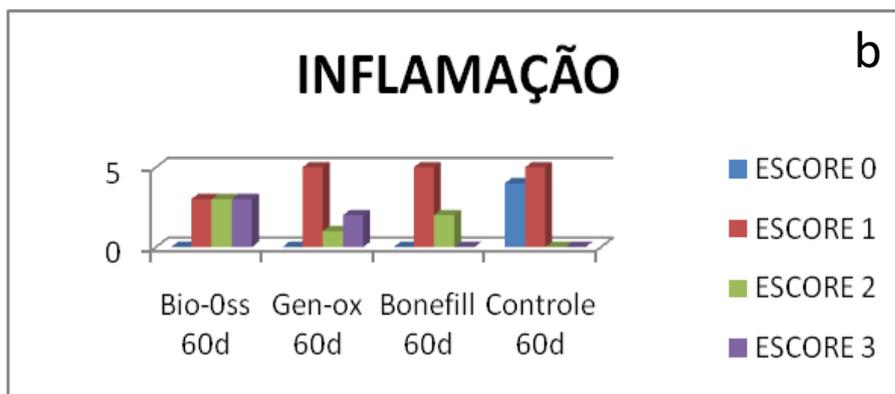
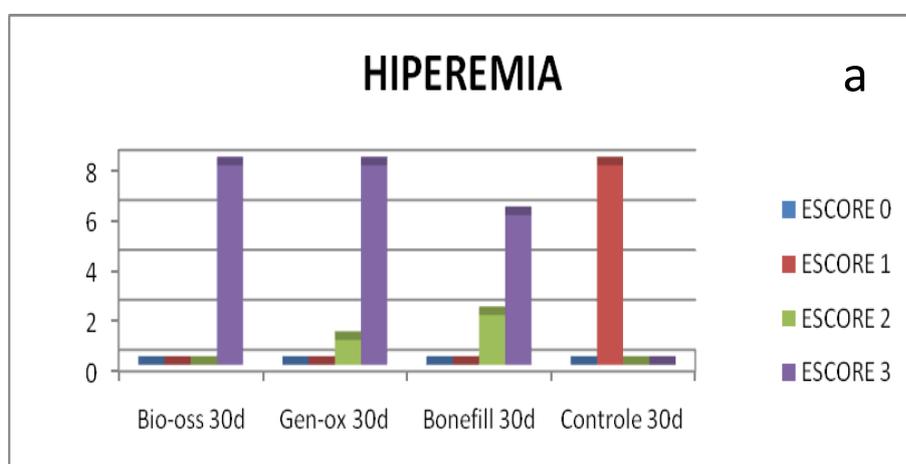


Figura 15: Grau de inflamação no período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quanto à presença de hiperemia, no grupo controle, ela estava ausente em 100% dos casos (8 espécimes), aos 30 dias, e em 62,5% dos casos (5 espécimes) aos 60 dias. No grupo tratado com Bio-oss, depois de 30 dias da cirurgia, 100% dos animais (8 espécimes) possuíam hiperemia severa, e após 60 dias, esse valor era de 77,8% (7 espécimes). No grupo Gen-ox, a hiperemia foi severa em 88,9% dos casos (8 animais) após 30 dias e em 62,5% dos casos (5 espécimes) após 60 dias da cirurgia. No grupo Bonefill, 75%( 6 espécimes), após 30 dias do procedimento cirúrgico demonstraram grau severo (Figura 29) e 85,71%(6 espécimes) após 60 dias (Figura 16 a e b).



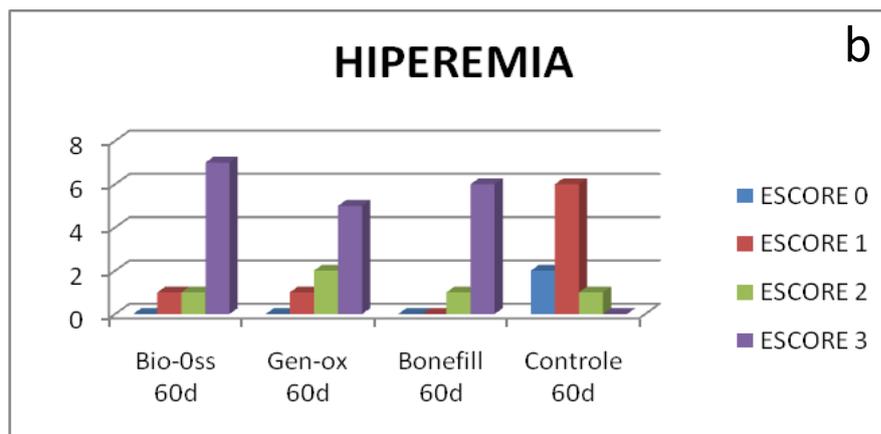
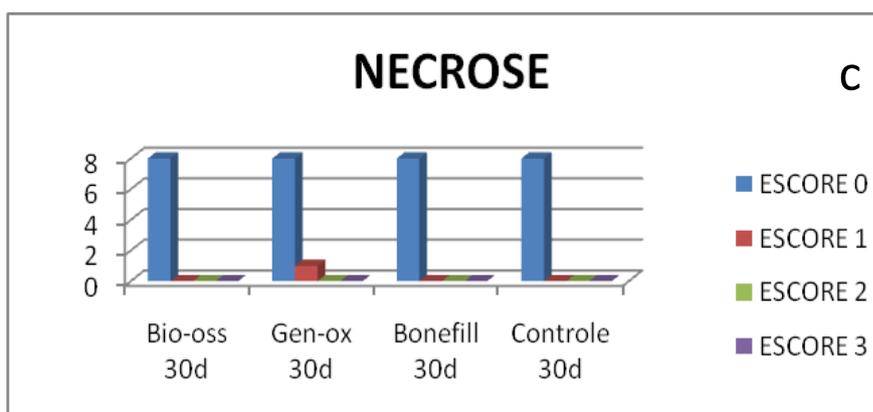
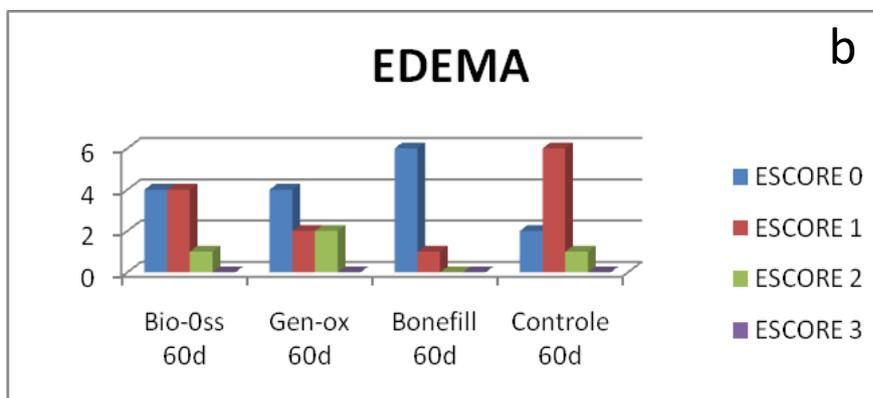
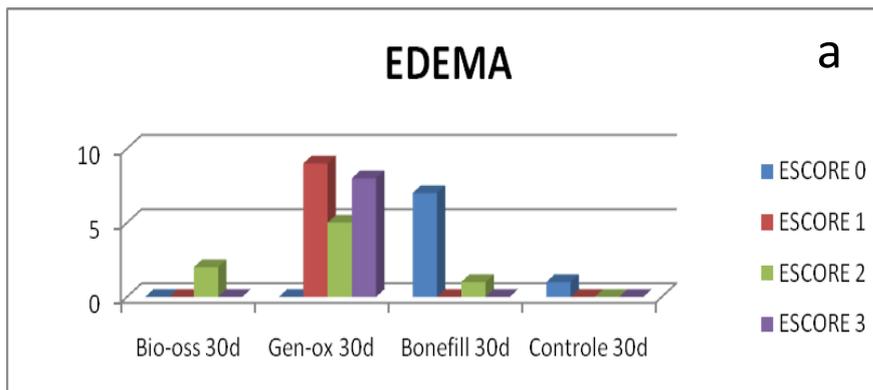


Figura 16: Grau de hiperemia nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quanto à presença de células inflamatórias, no grupo controle, independente do tempo de sacrifício, foram encontrados linfócitos ocasionais em metade dos casos (50% - 4 espécimes), já nos grupos tratados com enxertos xenógenos, a predominância foi de infiltrado do tipo linfo-plasmocitário.

Quanto aos critérios “edema” e “necrose” observa-se uma uniformidade de valores para o grupo controle, com 100% dos casos de ausência desses padrões para ambos os grupos de 30 dias (8 espécimes) e 60 dias (9 espécimes). Já para o grupo tratado com Bio-oss, 100% dos animais demonstraram edema moderado e 100% de ausência de necrose após 30 dias da cirurgia, ao passo que 44,4% (4 espécimes) demonstraram ausência de edema, 44,4% (4 espécimes) apresentaram edema leve e 88,88% (8 espécimes) não demonstraram necrose, após 60 dias da cirurgia. Para o grupo tratado com Gen-ox, observa-se edema leve e ausência de necrose em 100% (9 espécimes) após 30 dias e 50% (4 espécimes) e 75% (6 espécimes) demonstraram ausência de edema e necrose, respectivamente, após 60 dias. No grupo tratado com Bonefill, observa-se um grau leve de edema em 62,5%(5 espécimes) após 30 dias do procedimento cirúrgico e ausência de edema em 85,71% (6 espécimes), após 60 dias, para este material 100% (7 espécimes) para os dois tempos pós cirúrgicos demonstraram ausência de necrose (Figuras 17 a, b, c e d).



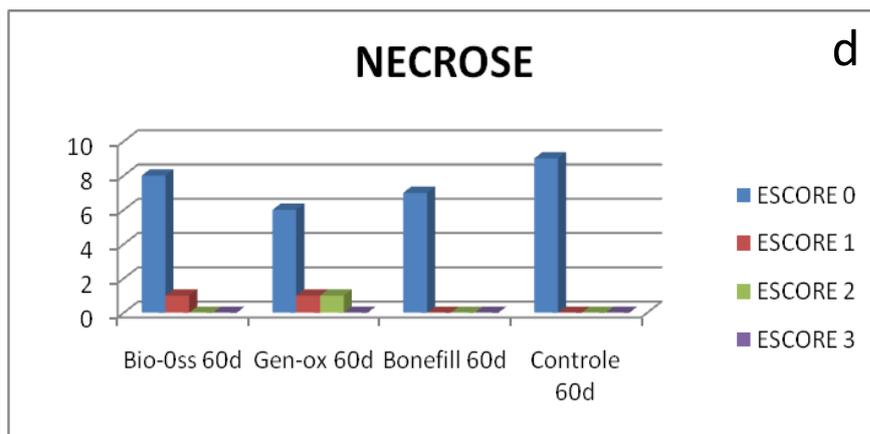
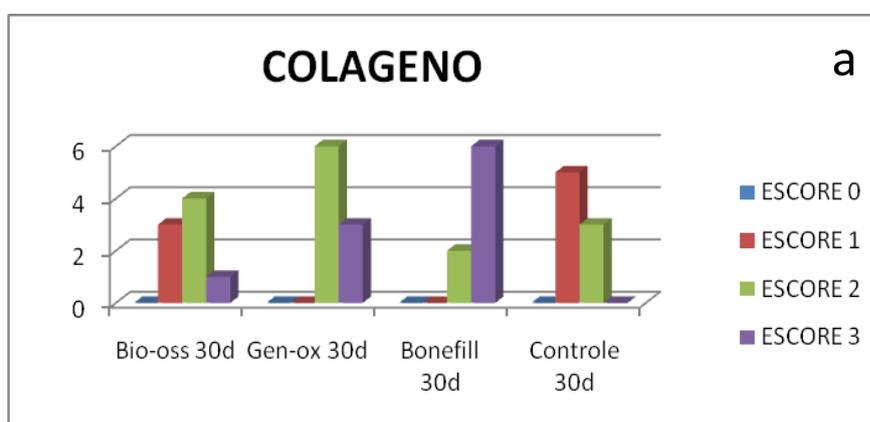


Figura 17: Grau de hiperemia e necrose nos período de 30 dias (a, c) e 60 dias (b, d), para os quatro grupos testados.

Quanto à presença de colágeno observa-se que no grupo controle 62,5% (5 espécimes) demonstraram uma presença leve de colágeno após 30 dias (Figura 39) e 100 % (9 espécimes) presença moderada, após 60 dias do procedimento cirúrgico. Para o grupo tratado com Bio-oss após 30 dias, 50%(4 espécimes) demonstraram presença moderada de colágeno (Figura 36), ao passo que 100% (9 espécimes), demonstraram uma presença severa após 60 dias da cirurgia. No grupo Gen-ox, a presença de colágeno foi moderada em 66,6%(6 espécimes) para o período de 30 dias (Figuras 45) e 75% (6 espécimes) para o período de 60 dias. Para o grupo tratado com Bonefill, 75%(6 espécimes) apresentaram um grau severo, após 30 dias (Figura 30) e 85,71%(6 espécimes) após 60 dias (Figura 18 a e b).



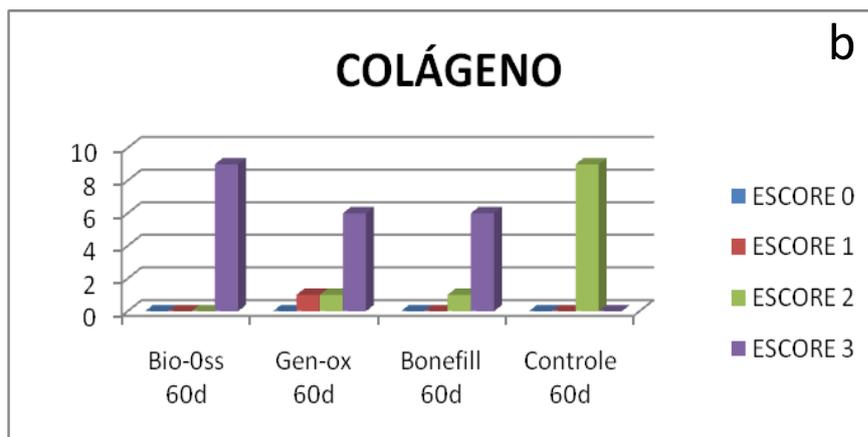


Figura 18: Presença de colágeno nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quanto aos critérios de desempenho dos materiais enxertados, observa-se que a presença de osteoblastos foi visualizada em grau leve em 75% dos casos (6 espécimes) após 30 dias no grupo controle. Neste mesmo grupo a ausência de osteoblastos (50% dos casos – 4 espécimes) ocorreu em número igual de casos ao grau leve de osteoblastos (50% - 4 espécimes). No grupo tratado com Bio-oss, a ausência de osteoblastos foi observada em 62,5% dos casos (5 espécimes) após 30 dias e em 66,7% dos casos (6 espécimes) após 60 dias. No grupo Gen-ox, os osteoblastos foram encontrados em grau leve em 44,4% dos casos (4 animais) após 30 dias do experimento, e em grau moderado em 62,5% dos casos (5 animais) após 60 dias da cirurgia. No grupo Bonefill, observa-se após 30 dias um grau severo em 50% (4 espécimes) da amostra, ao passo que em 42,85% (3 espécimes) dos casos demonstraram grau moderado após 60 dias da cirurgia (Figura 19 a e b).

A análise estatística quando aplicada à variável “osteoblastos” revelou para os dois períodos analisados que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=1,000$ ) entre os grupos Bio-oss e o grupo controle. Quando analisado o grupo Gen-ox em relação ao grupo controle, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,4706$ ), ao passo que para o período de 60 dias nota-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,0498$ ). O grupo Bonefill, quando confrontado com o grupo controle, demonstrou uma diferença muito significativa ( $p=0,007$ ) para o período de 30 dias, e

para o período de 60 dias não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,5253$ ).

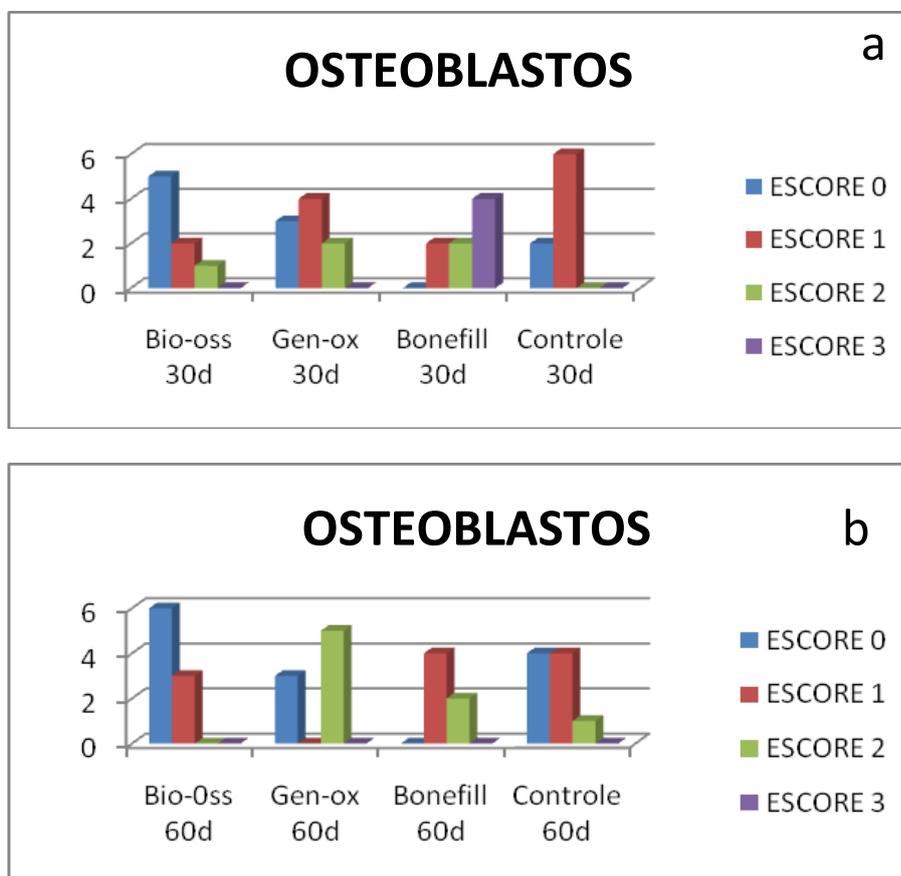


Figura 19: Presença de osteoblastos nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Células gigantes não foram observadas no grupo controle, nos dois tempos de estudo, e ao contrário foram freqüentes nos grupos tratados com enxertos xenógenos, sendo no grupo Bio-oss em grau moderado em 75% dos casos (6 espécimes) após 30 dias (Figura 35), e em grau leve em 55,6% dos casos (5 espécimes) após 60 dias. No grupo Gen-ox as células gigantes foram visualizadas em grau leve em 77,8% dos casos (7 espécimes) após 30 dias (Figura 43), e em 50% dos casos (4 espécimes) após 60 dias (Figura 42). No grupo tratado com Bonefill, observa-se um grau severo em 75% (6 espécimes) dos casos após 30 dias (Figura 27) e 100% dos casos apresentaram grau leve, após o período de 60 dias (Figura 20 a e b).

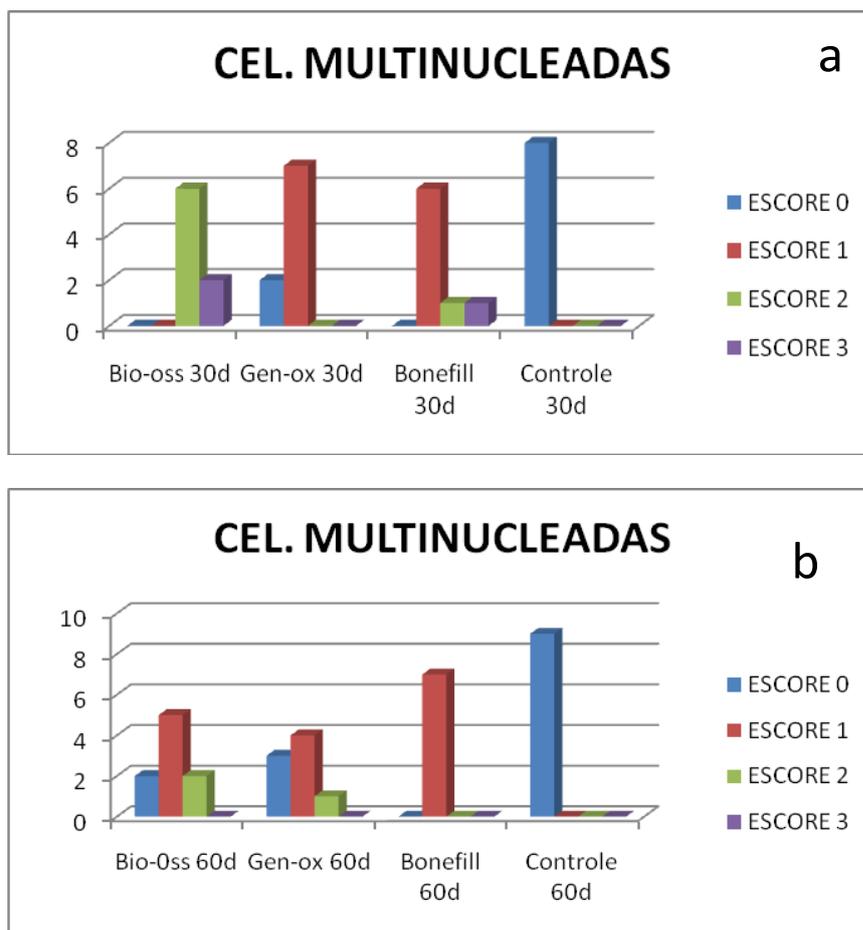


Figura 20: Presença de células gigantes multinucleadas nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quanto a neoformação óssea, observou-se um grau leve no grupo controle em 62,5% (5 espécimes) no período de 30 dias (Figura 37), ao passo que no período após 60 dias demonstrou um grau leve em 77,77% (7 espécimes). Para o grupo tratado com Bio-oss, um grau leve de neoformação óssea foi observado em 62,5% (5 espécimes) e um grau moderado em 12,5% (1 espécime) após 30 dias (Figura 31 e 32), no período após 60 dias do procedimento cirúrgico, observa-se que em 33,33% (3 espécimes) e 44,44% (4 espécimes), houve um grau severo de neoformação óssea e ausência, respectivamente (Figura 33). No grupo tratado com Gen-ox, um grau leve foi observado em 44,44% (4 espécimes), após 30 dias (Figuras 40 e 41) e um grau severo em 50% (4 espécimes) após 60 dias. Para o grupo tratado com Bonefill, 62,5% (5 espécimes) dos casos apresentaram grau severo, após 30 dias da cirurgia (Figuras 25, 26 e 28), ao passo que após 60 dias,

71,42% (5espécimes) dos casos apresentaram grau moderado de neo formação óssea (Figura 21 a e b).

A análise estatística quando aplicada à variável “neoformação óssea” revelou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=1,000$ ), para o grupo Bio-oss, quando confrontado com o grupo controle, para ambos os períodos em estudo. Quando confrontado o grupo Gen-ox com o grupo controle, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=1,000$ ), para o período de 30 dias e que houve diferença estatística entre os grupos para o período de 60 dias ( $p=0,0498$ ). Observa-se ainda que para o grupo Bonefill, quando confrontado com o grupo controle, não demonstrou diferença estatisticamente significativa para o período de 30 dias ( $p=0,6193$ ), ao passo que para o período de 60 dias nota-se uma diferença muito significativa entre os grupos ( $p=0,0014$ ).

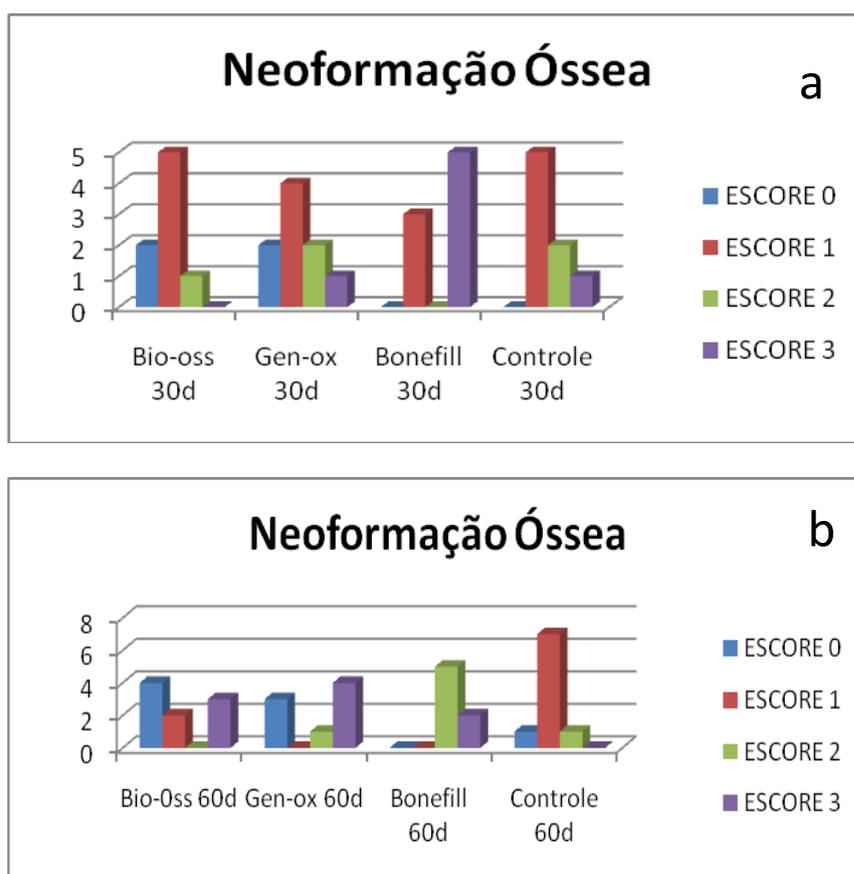


Figura 21: Grau de neoformação nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

O enxerto ainda estava presente em grau severo em 75% dos casos (6 espécimes) após 30 dias, e 66,7% dos casos (6 espécimes) após 60 dias no grupo Bio-oss. No grupo Gen-ox, o material esteve presente em grau moderado em 77,77% (7 espécimes) após 30 dias, e 50% (4 espécimes) após 60 dias. Quanto ao grupo tratado com Bonefill, observa-se uma presença do enxerto em grau moderado em 50% (4 espécimes) dos casos após 30 dias e um grau leve, em 57,14% (4 espécimes) dos casos após 60 dias (Figura 22 a e b).

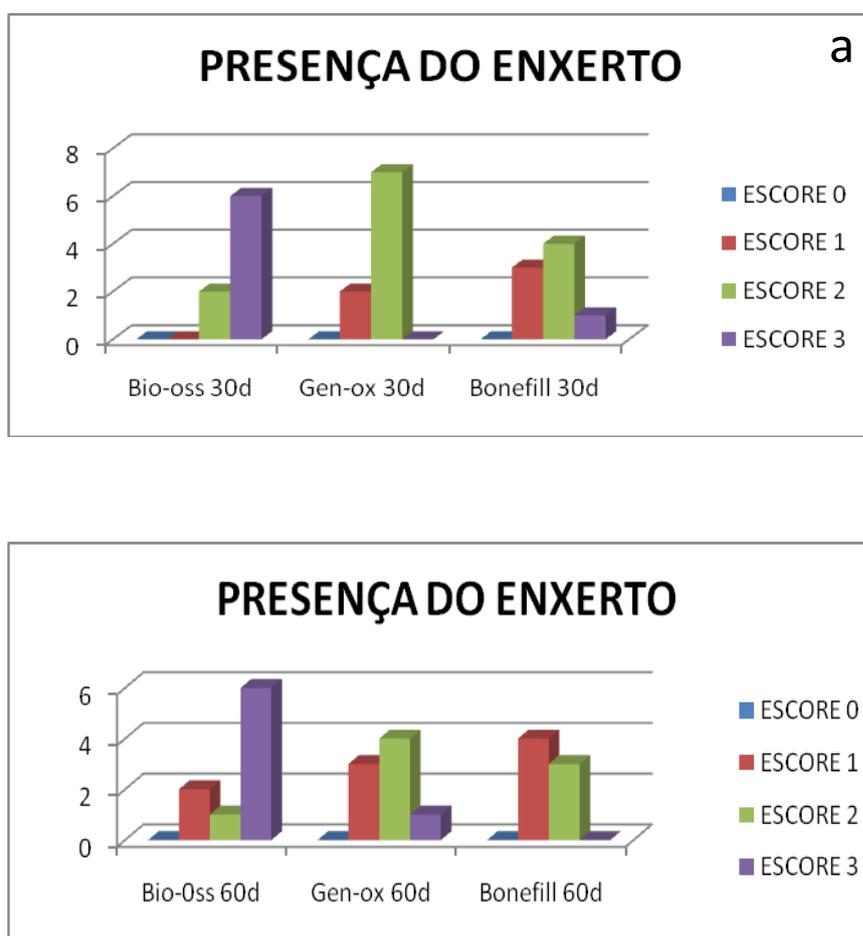


Figura 22: Grau de presença do enxerto nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quanto a reabsorção do enxerto, o grupo tratado com Bio-oss demonstrou um grau leve em 62,5%(5 espécimes), após 30 dias (Figura 35), e 44,44% (4 espécimes), após 60 dias. Para o grupo Gen-ox, 44,44% (4 espécimes) apresentaram grau moderado, após 30 dias (Figura43), 75% (6 espécimes) após 60

dia. Para o grupo tratado com Bonefill, a reabsorção do enxerto demonstrou grau moderado em 37,5% (3 espécimes), após 30 dias (Figura 27) e em 100% (7 espécimes) dos casos após 60 dias (Figura 23 a e b).

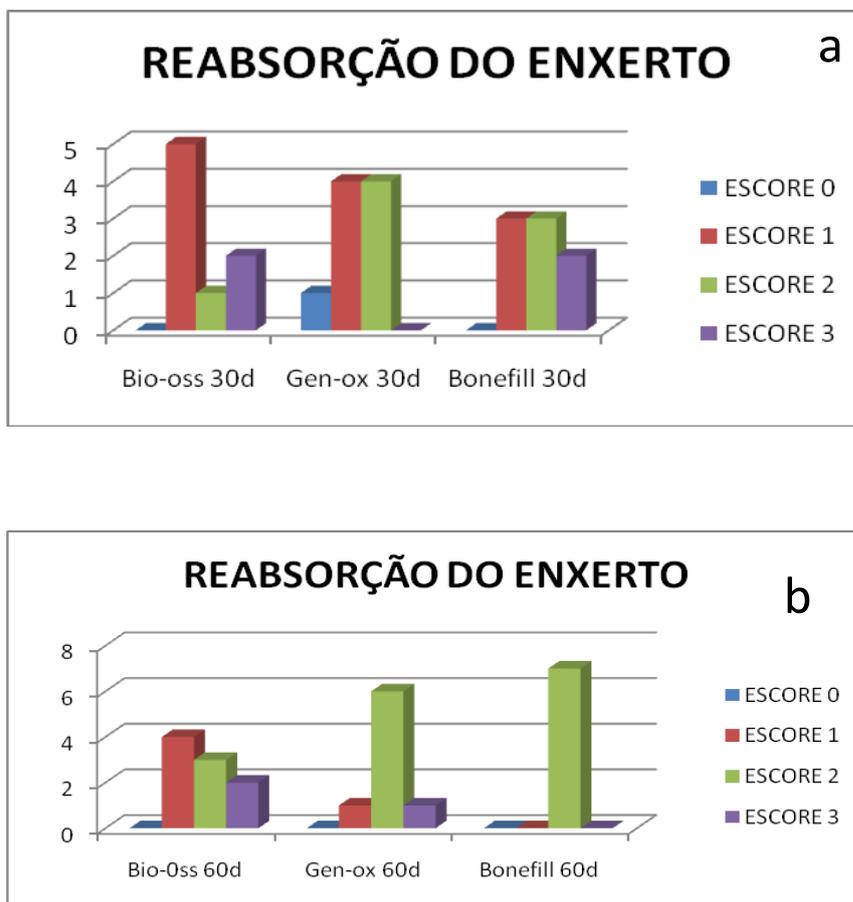


Figura 23: Grau de reabsorção do enxerto nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Quando avaliado a reabsorção da borda do defeito, observa-se ausência em todos os grupos avaliados (Figura 24 a e b).

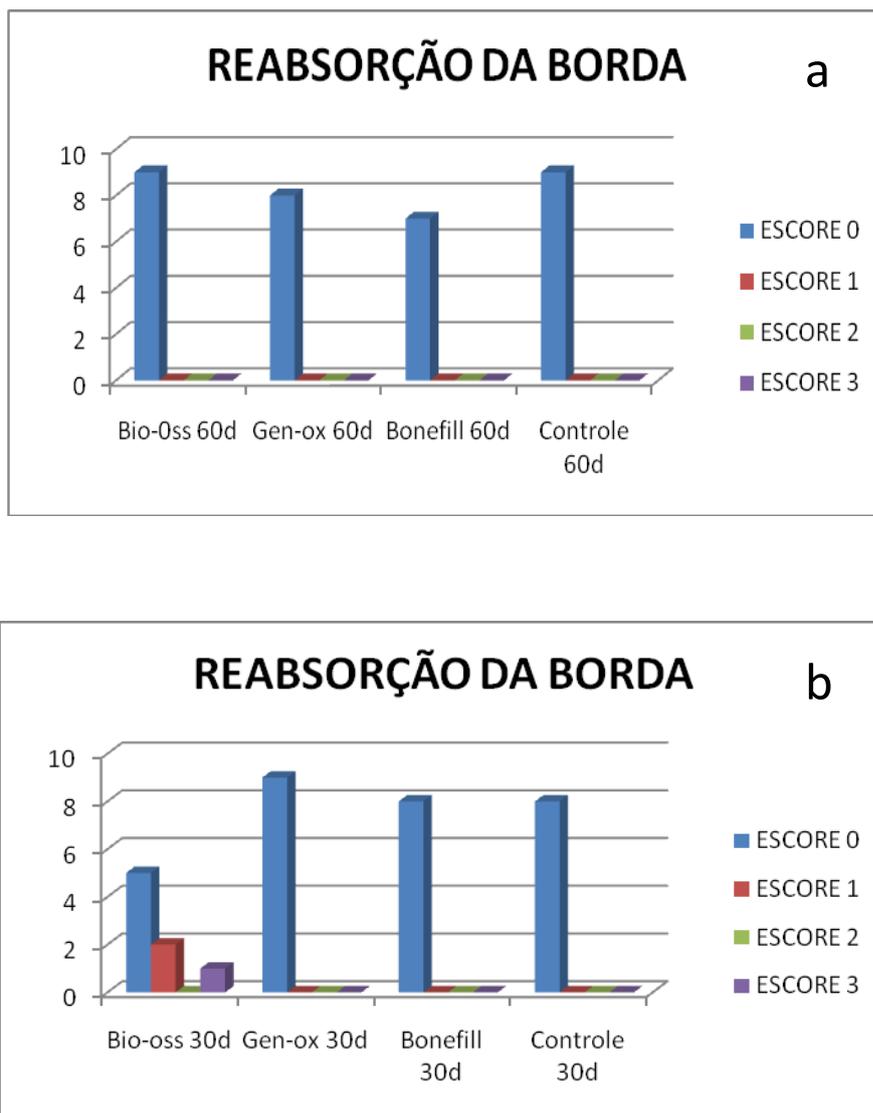


Figura 24: Grau de reabsorção da borda do defeito nos período de 30 dias (a) e 60 dias (b), para os quatro grupos testados.

Esses resultados demonstram que os materiais em estudo determinaram importantes alterações inflamatórias, que tendeu a diminuir com o tempo, sendo o enxerto Bio-oss o que determinou alterações mais intensas. Esse estudo impõe a necessidade de novas investigações com maiores tempos de sacrifício, a fim de se determinar o comportamento tecidual a longo prazo, frente aos materiais testados, assim como para avaliar o desempenho de outros materiais comercializados.

Tabela 2: Avaliação histológica dos diferentes parâmetros histológicos: Presença de Inflamação, Neoformação óssea e Presença de Osteoblastos, entre os grupos Teste vs. Controle, nos períodos de 30 e 60 dias.

Grupos Experimentais	Tempo de sacrifício					
	30 dias			60 dias		
	Inflam.	NO	Osteob.	Inflam.	NO	Osteob.
Bio-oss Controle	p= 0,0002 <sup>***</sup>	p=0,5692 <sup>ns</sup>	p=1,000 <sup>ns</sup>	p=0,009 <sup>**</sup>	p=0,5765 <sup>ns</sup>	p=1,000 <sup>ns</sup>
Gen-ox Controle	p=0,0824 <sup>ns</sup>	p=1,000 <sup>ns</sup>	p=0,4706 <sup>ns</sup>	p=0,0824 <sup>ns</sup>	p=0,0498 <sup>*</sup>	p=0,0498 <sup>*</sup>
Bonefill Controle	p=0,0256 <sup>*</sup>	p=0,6193 <sup>ns</sup>	p=0,0070 <sup>**</sup>	p=0,175 <sup>ns</sup>	p=0,0014 <sup>**</sup>	p=0,5353 <sup>ns</sup>

Inflam.= inflamação; NO= neoformação óssea; Osteob.= osteoblastos

<sup>ns</sup> não significativa \*Significante \*\*Muito significativa \*\*\*Extremamente significativa

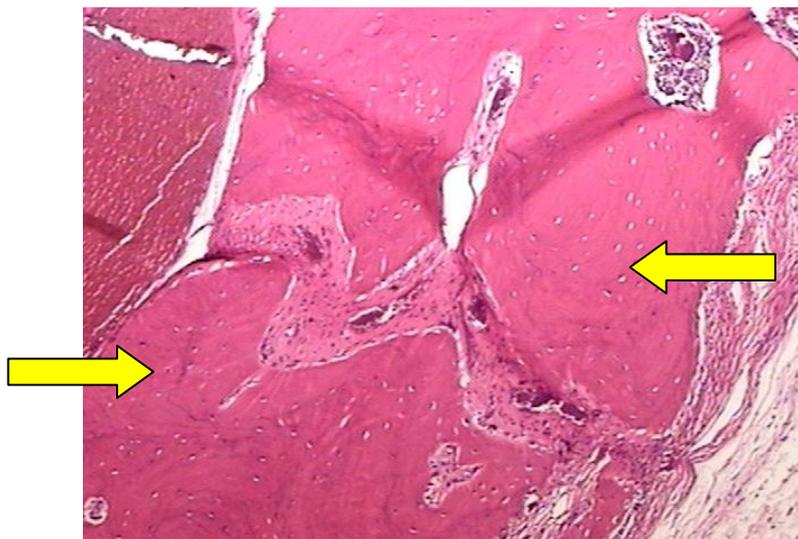


Figura 25: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 4x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se intensa neoformação óssea (setas amarelas), aproximando as margens do defeito ósseo.

Figure 25: Histological section stained with HE (increase of about 4X). group Bonefill (30 days). Observed intense bone formation (yellow arrows), approaching the margins of the bone defect

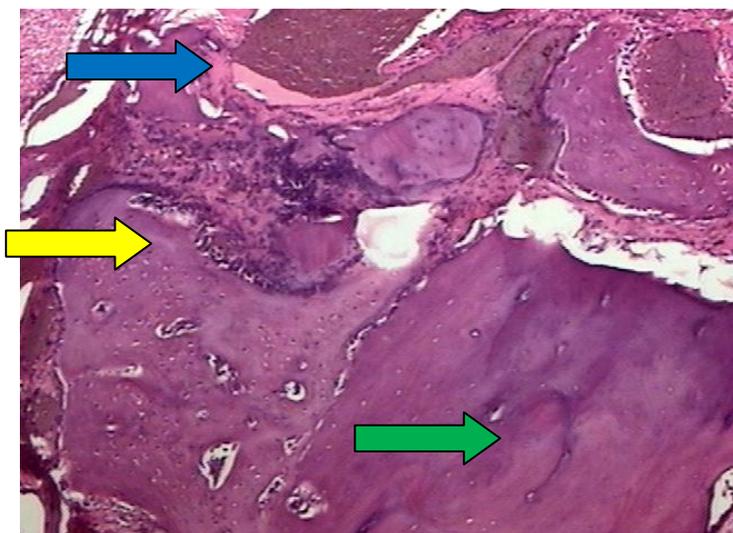


Figura 26: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 4x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se neoformação óssea e osteoblastos (setas amarelas), osso maduro da margem do defeito (seta verde) e remanescentes do enxerto (seta azul).

Figure 26: Histological section stained with HE (increase of about 4X). Bonefill group (30 days). Observed bone formation and osteoblasts (yellow arrows), mature bone margin of the defect (white arrow) and remaining graft (blue arrow).

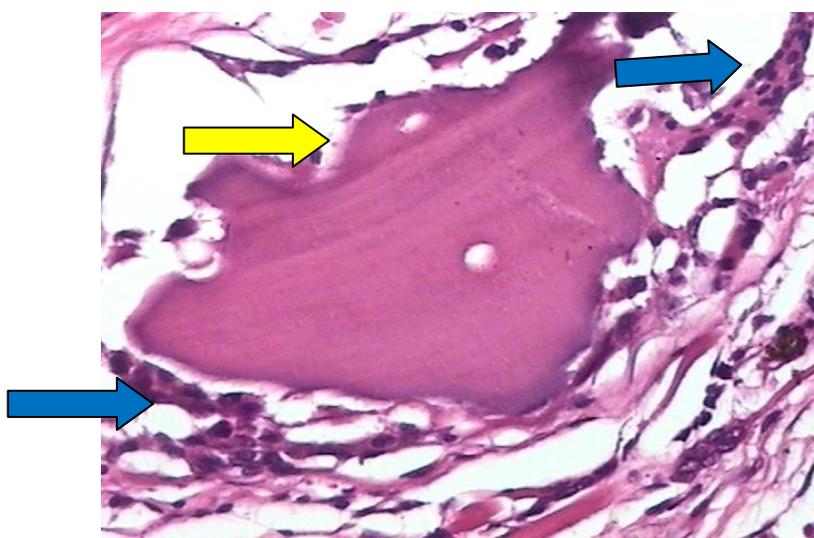


Figura 27: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se intensa reabsorção do enxerto (seta amarela) e presença de células gigantes mutinucleadas (setas azuis).

Figure 27 : Histological section stained with HE ( approximate increase of 20x ) . group Bonefill (30 days). Observed intense resorption of the graft ( yellow arrow ) and presence of giant cells mutinucleadas (blue arrows).

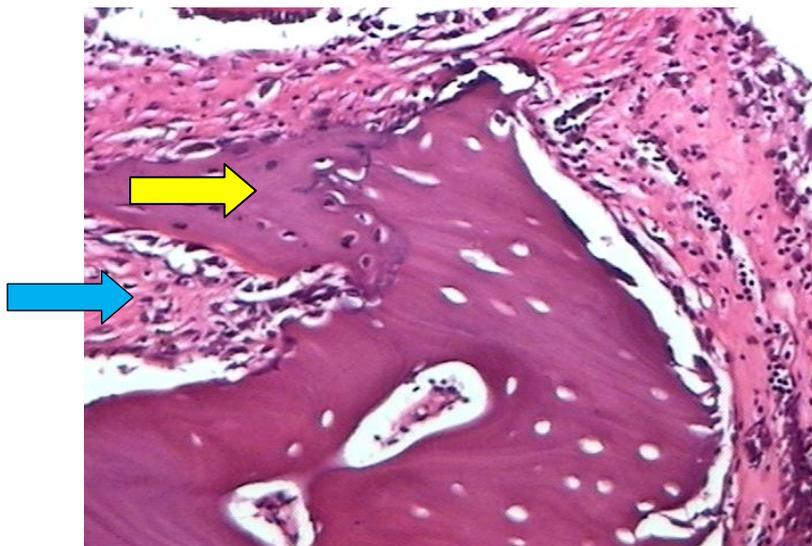


Figura 28: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se neof ormação óssea (seta amarela) e disceto infiltrado inflamatório do tipo linfo-plasmocitário (seta azul).

Figure 28 : Histological section stained with HE (approximately 10X magnification) . group Bonefill (30 days). Observed neof ormation bone ( yellow arrow ) and infiltrated disceto inflammatory type of lymphocytes and plasma cells (arrow blue).



Figura 29: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se intensa hiperemia (seta amarela).

Figure 29 : Histological section stained with HE (approximately 10X magnification) . group Bonefill (30 days). Observed intense hyperemia ( yellow arrow ) .

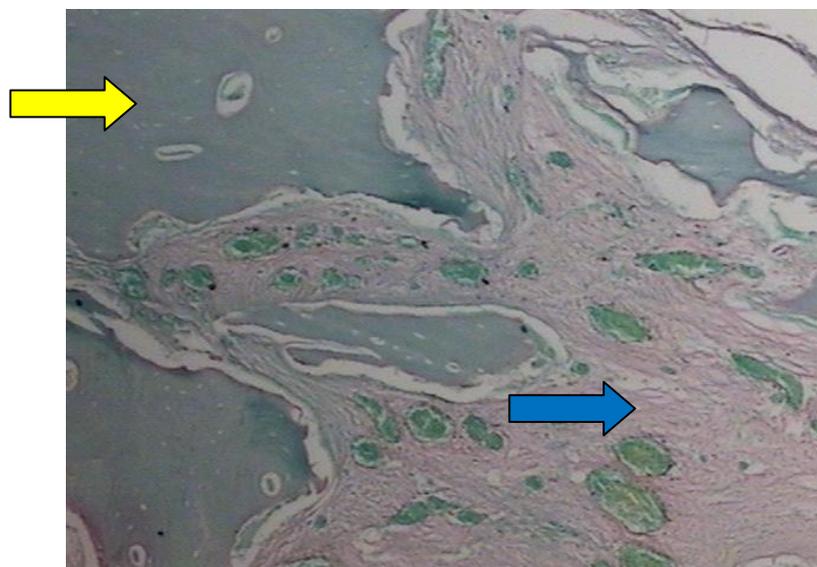


Figura 30: Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 4x). Grupo Bonefill(30 dias). Observa-se neof ormação óssea (seta amarela) e fibras colágenas (seta azul).

Figure 30 : Histological section stained by Pricosirius ( increase of about 4X). Bonefill group ( 30 days). Observed bone formation ( yellow arrow ) and fibers collagen ( blue arrow ) .

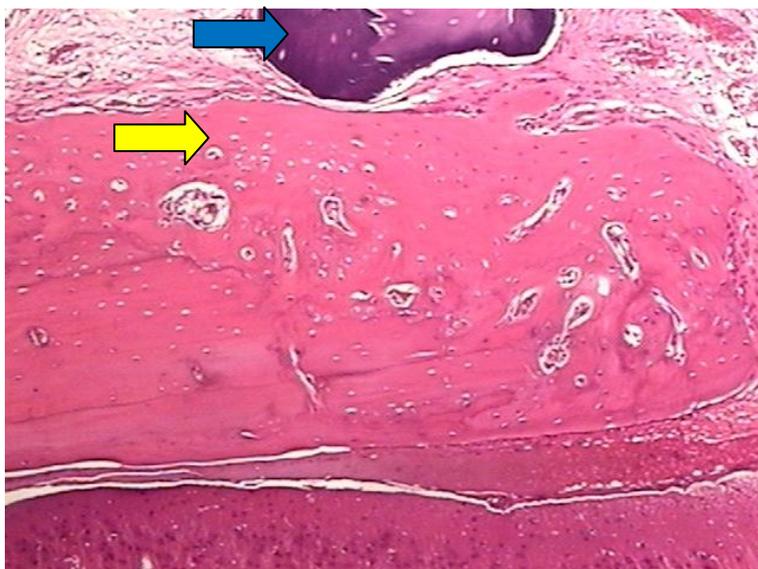


Figura 31: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 4x). Grupo Bio-oss(30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) e enxerto (seta azul).



Figura 32: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo Bio-oss (30 dias). Observa-se neoformação óssea (seta amarela) aproximando as margens do defeito.

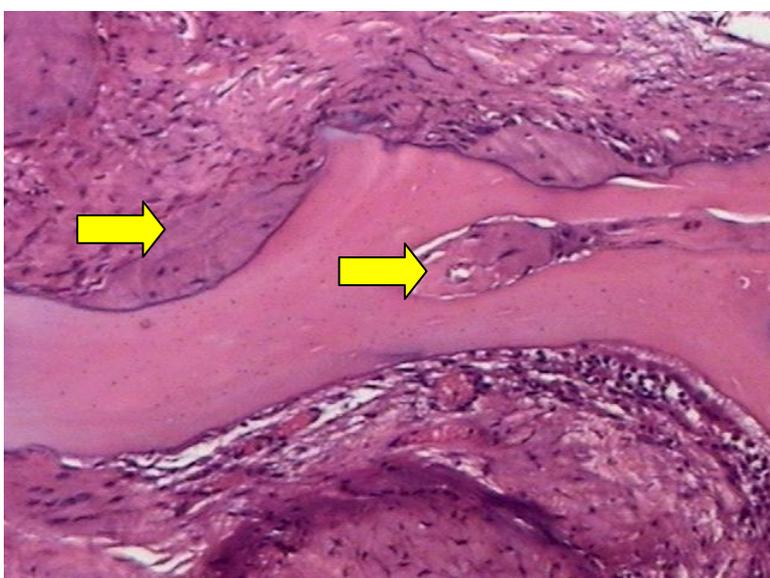


Figura 33: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo Bio-oss(60 dias). Observa-se neoformação óssea (setas amarelas) a partir do enxerto ósseo.

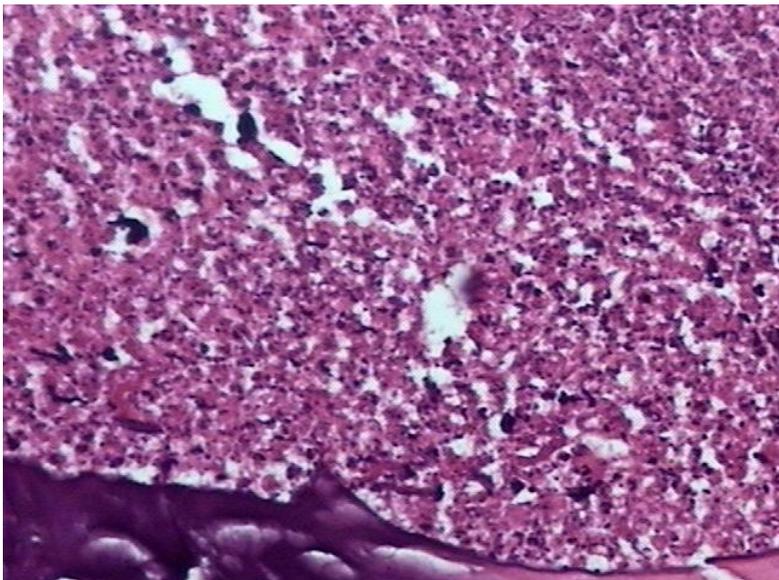


Figura 34: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Bio-oss(60 dias). Observa-se formação de abscessos e intenso infiltrado inflamatório.

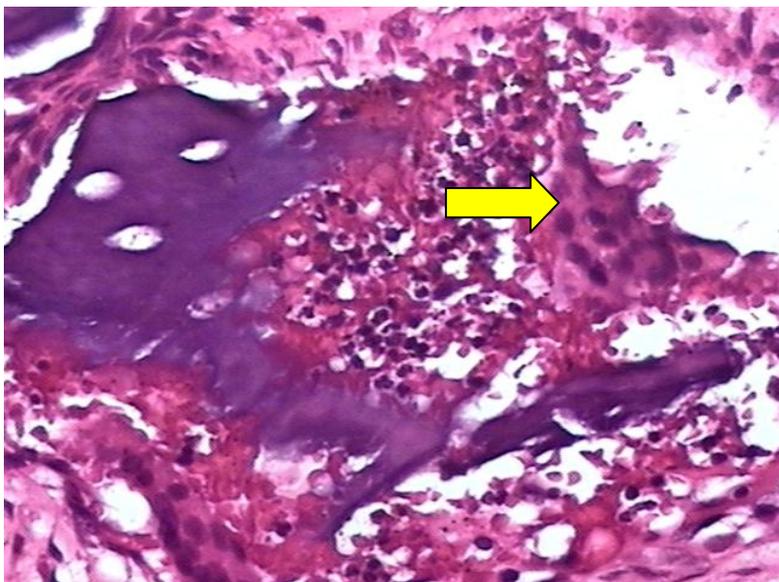


Figura 35: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Bio-oss(30 dias). Observa-se reabsorção do enxerto e célula gigante multinucleada (seta amarela).

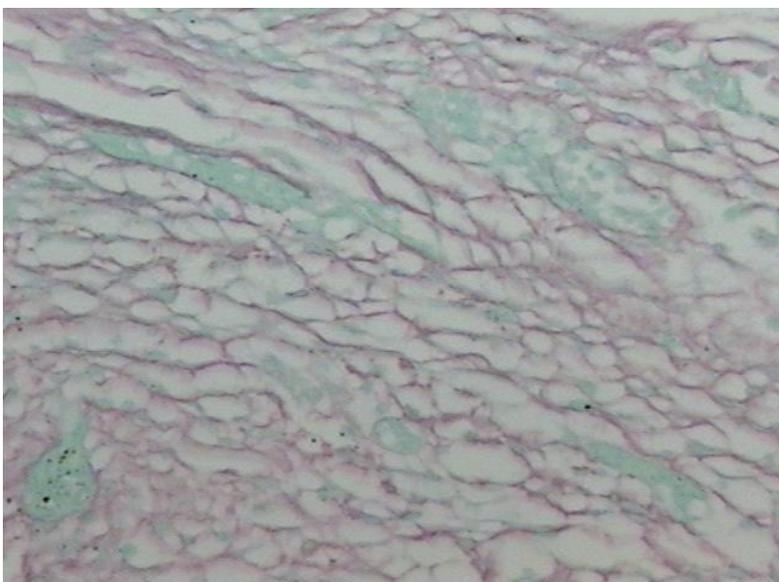


Figura 36: Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 20x). Grupo Bio-oss(30 dias). Observa-se deposição de fibras colágenas.

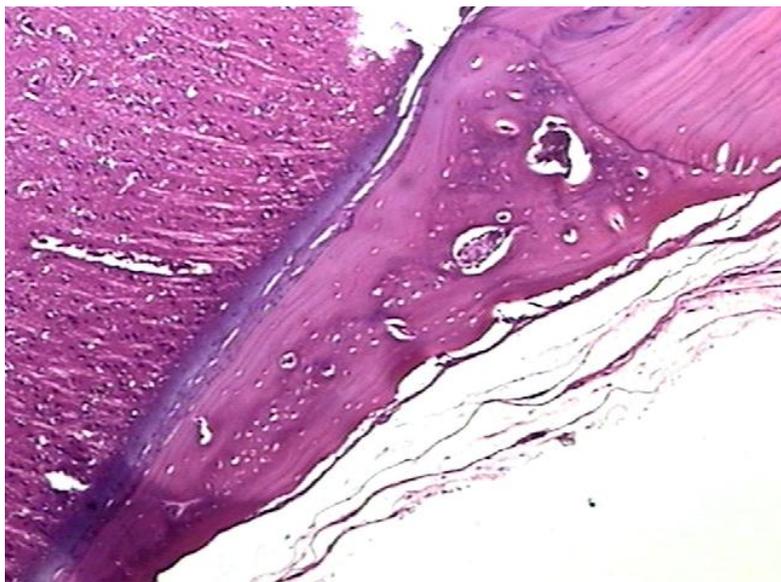


Figura 37: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 4x). Grupo controle(30 dias). Observa-se neof ormação óssea na margem do defeito.



Figura 38: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo controle(60 dias).. Nota-se ausência de infiltrado infamatório.

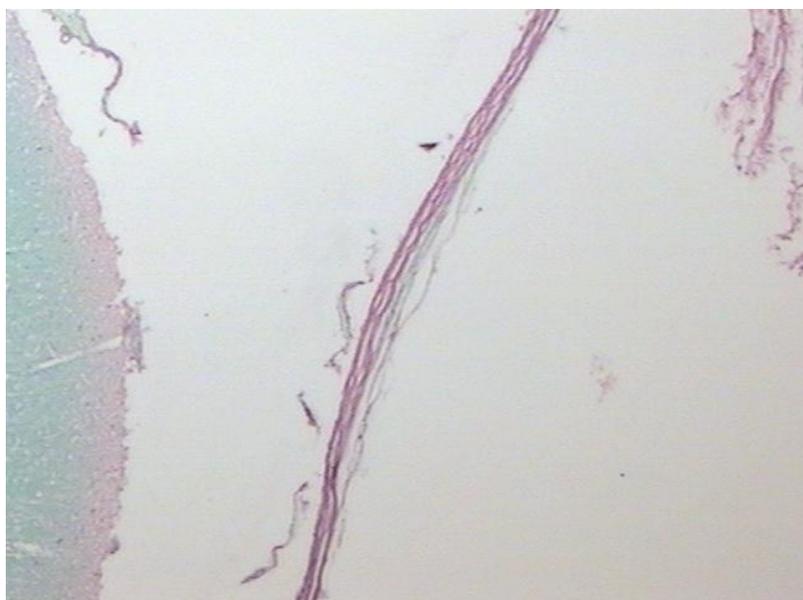


Figura 39: Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 4x). Grupo controle(30 dias).. Observa-se deposição de fibras colágenas na região central do defeito.

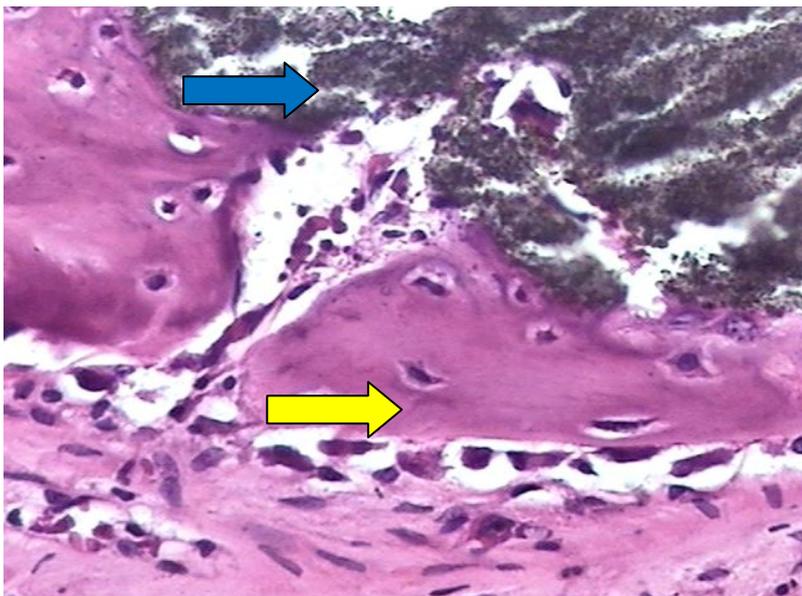


Figura 40: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Gen-ox(30 dias). Neoformação óssea, osteoblastos (seta amarela) e enxerto (seta azul).

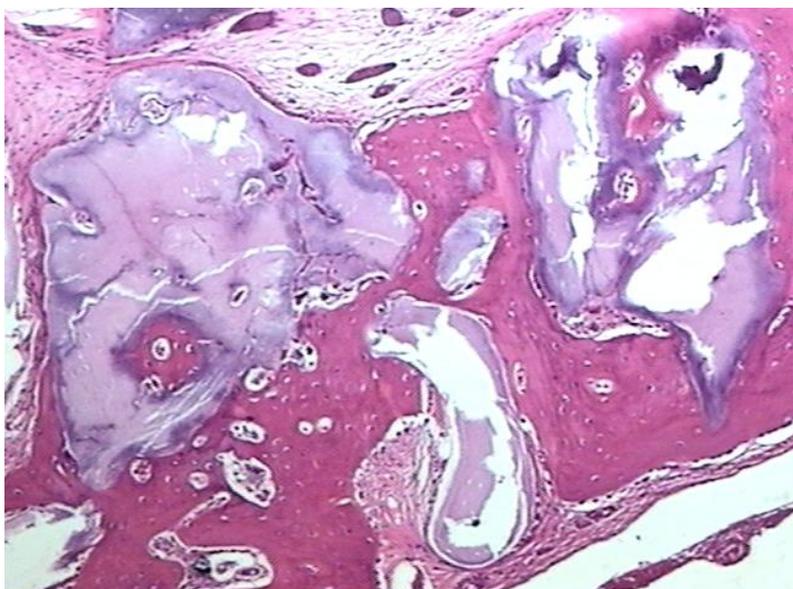


Figura 41: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 4x). Grupo Gen-ox(30 dias).. Neoformação óssea adjacente à área do enxerto.

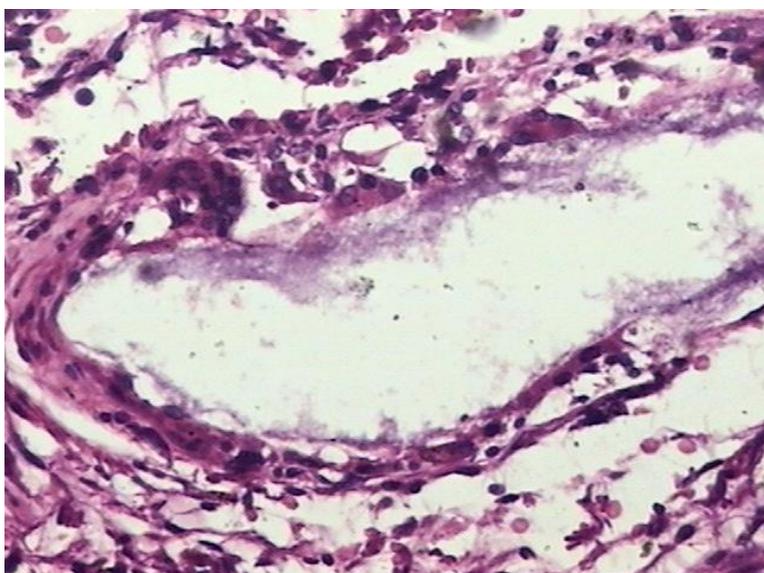


Figura 42: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Gen-ox(60 dias).. Encapsulamento do enxerto.

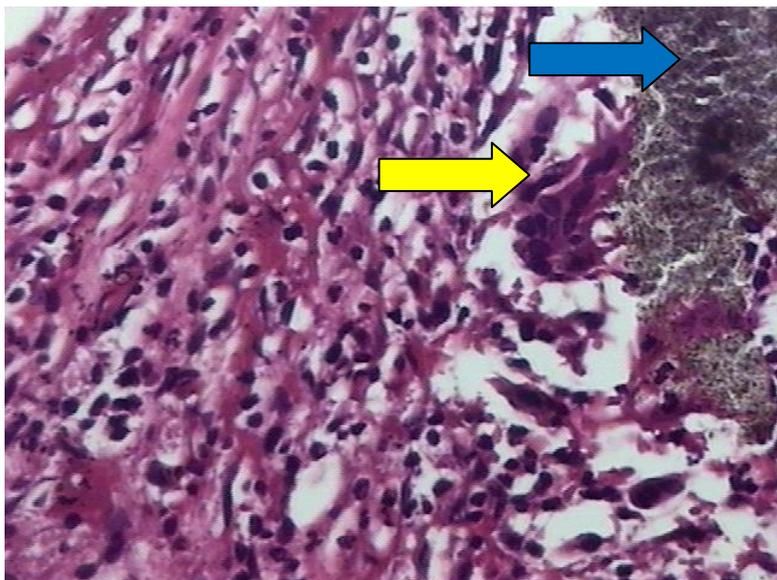


Figura 43: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 20x). Grupo Gen-ox(30 dias). Célula gigante multinucleada (seta amarela) reabsorvendo o enxerto (seta azul).

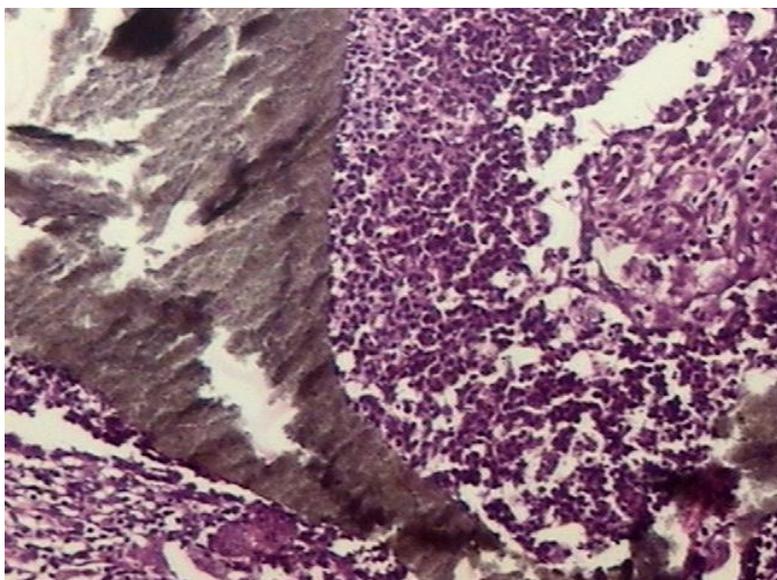


Figura 44: Corte histológico corado por HE (aumento aproximado de 10x). Grupo Gen-ox(30 dias). Observa-se formação de abscesso e intenso infiltrado inflamatório.

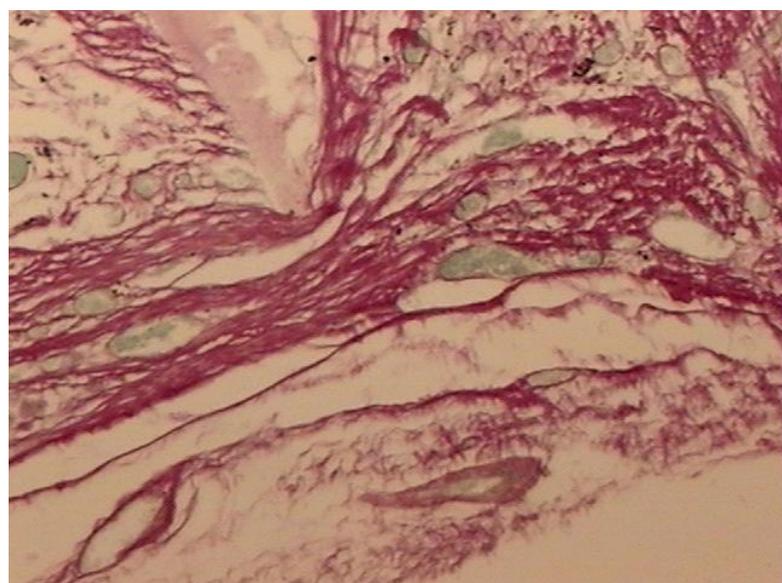


Figura 45: Corte histológico corado por Pricosirius (aumento aproximado de 10x). Grupo Gen-ox(30 dias). Observa-se deposição de fibras colágenas.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico observa-se um maior entendimento sobre a fisiologia óssea, assim como um considerável conhecimento sobre seus potenciais substitutos - os biomateriais. Os enxertos autógenos são os substitutos ósseos mais amplamente utilizados em cirurgias de aumento de rebordo e reconstrução de defeitos ósseos, desde que estes enxertos contenham células viáveis tais como células progenitoras de osso medular, matriz extracelular colagenosa e não colagenosa e fatores de diferenciação e crescimento. Trata-se de um material considerado padrão-ouro para as terapias de reparo ósseo, por suas propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras (CONZ et al., 2005, CRUZ et al., 2006). A maior desvantagem desta técnica é a morbidade do local doador, a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, a limitação de material de enxerto e o alto custo (BURG et al., 2000; JOSHI, 2004; CRUZ et al., 2006), o que tem motivado pesquisadores a desenvolverem novos biomateriais que possam atuar como substitutos ósseos.

O biomaterial ideal para enxerto ósseo deve promover osteogênese, osteoindução; permitir a angiogênese e a osteocondução; estar disponível em quantidade suficiente para o tratamento proposto; ser de fácil manuseio; apresentar estrutura física capaz de manter o espaço para a formação óssea; ser reabsorvível e não imunogênico (JENSEN et al., 1996; LOURENÇO, 2002). Apesar do grande número de biomateriais disponíveis no mercado, o biomaterial ideal, aliando propriedades físicas e biológicas que favoreça ao reparo ósseo ainda não foi produzido.

Os enxertos xenógenos possuem a vantagem de não exigir área doadora, possuir grande estabilidade dimensional na área enxertada, serem reabsorvíveis, evitando um segundo tempo cirúrgico; são biocompatíveis e osteoindutores, favorecendo o preenchimento das lojas cirúrgicas (SANCHEZ, SHERIDAN e KUPP, 2003).

Atualmente observa-se um grande número de marcas comerciais para o osso bovino desproteínizado. No presente estudo, foram avaliadas três marcas comerciais

desse tipo de material, sendo uma de fabricação norte-americana e duas nacionais. O Bio-oss® é uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular. Trata-se de um produto importado com alto custo. De acordo com Lioubavina-Hack et al. (2005) e Schwartz et al. (2008) este biomaterial é biocompatível, osteocondutor, além de demonstrar muito pouca reabsorção, como demonstrado nos estudos de Sartori et al. (2003).

**O Gen-ox assim como o Bonefill são substitutos ósseos fabricados no Brasil, derivados de osso bovino desproteínizado. Produzidos a partir de tecnologia nacional, estes produtos parecem demonstrar propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes aos similares importados, entretanto com um menor custo.**

Nesta pesquisa, a escolha dos enxertos xenógenos encontra justificativa em vários fatores aqui relacionados. Primeiro, pela posição de destaque que têm obtido no cenário clínico /científico, sem que muitas pesquisas confirmem seus atributos; por se tratar de um biomaterial que se apresenta como alternativa para a reconstrução de estruturas orgânicas danificadas por traumas ou infecções (SANADA et al., 2003; GOLÇALVES, 2008; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; DALL'ANTONIA et al., 2006; CRUZ et al., 2006); e finalmente justifica-se a escolha desses materiais pelo favorável conjunto de propriedades físico-químicas e biológicas que seus fabricantes afirmam apresentarem.

A utilização de ratos como modelo de estudo em técnicas utilizando enxertos ósseos, sobretudo em defeitos críticos na calvária, tem sido muito freqüente na literatura (KIM e KIM, 2007; MOKBEI et al., 2008; PARK et al., 2009; SHIRASU et al., 2009). Embora, demonstre capacidade regenerativa limitada, possivelmente pelo pobre suprimento sanguíneo e uma relativa deficiência de osso medular (PROLO et al., 1982), este foi o modelo de estudo escolhido por se tratar de um modelo bem documentado na literatura, pela fidedignidade biológica dos achados, demonstrada pela formação de tecido ósseo com características histológicas compatíveis com a normalidade, associada à fácil obtenção dos animais, à simplicidade da técnica e ao baixo custo.

Defeito de tamanho crítico é definido por muitos autores como aquele em que o menor diâmetro intra-ósseo não possui a capacidade de reparar espontaneamente (MOKBEL et al. 2008; SCHIMITZ e HOLLINGER, 1998). Para Bosch et al. (1998),

Mardas et al., (2002) e Khojasteh et al., (2008) o defeito de tamanho crítico na calvária de ratos é de 5 mm, embora para Dahlin et al. (1991), Mokbel et al.(2008) e Park et al. (2009) este diâmetro seja de 8 mm. Na presente pesquisa, foi confeccionado um defeito com diâmetro de 10 mm.

## 6.1 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Avaliando-se os resultados da análise radiográfica, pode-se inferir que após 30 dias do ato cirúrgico, embora todos os materiais já tenham determinado um aumento da M dos NC, comparado ao grupo controle, apenas o Gen-ox mostrou diferença significativa. Isto pode indicar que este material permitiu a formação de uma maior quantidade de tecido mineralizado ou é o material que apresenta maior radiopacidade dentre os testados. Observando-se os valores do CV dos NC, observa-se que foi apenas nesse mesmo grupo que não houve uma diferença significativa em relação ao grupo controle, o que indica uma homogeneidade da área operada. Esse fato pode justificar um aumento da M dos NC devido a uma maior radiopacidade do material e não devido a uma intensa neoformação óssea, pois um estado dinâmico de neoformação óssea, geralmente deixa a região mais heterogênea. Os dois outros materiais demonstraram um aumento da heterogeneidade, que talvez indique o início da atividade osteoblástica ou a permanência do material de enxerto em diferentes graus de reabsorção. De acordo com a análise histológica pode-se inferir que a neoformação óssea já se processava em todos os grupos avaliados, sobretudo nos tratados com os diferentes enxertos, o que determinou um aumento no CV da área avaliada, principalmente para os grupos Bio-oss e Bonefill.

Já após 60 dias, todos os materiais induziram o aumento da produção de material mineralizado no defeito ósseo, refletida pelo aumento significativo da M dos NC. Após 60 dias, em todos os grupos testados nota-se também um aumento significativo do CV que reflete a dinâmica da neoformação óssea ou o aumento da atividade inflamatória e reabsorção óssea. Mais uma vez, tendo-se a análise histológica como referência, pode-se afirmar a presença de um tecido heterogêneo

nos defeitos ósseos, devido à presença em diferentes graus de osso neoformado e restos de enxerto. Em alguns espécimes também foi encontrada áreas de abscesso e inflamação que contribuíram para a elevação do valor do CV. Tais processos se processaram em menor intensidade no grupo controle, que assim teve comparativamente menores valores de CV dos NC.

Tais análises radiográficas já foram utilizadas em diversos estudos na Odontologia, quantificando tecidos mineralizados, especialmente tecido ósseo periapical (SARMENTO e RUBIRA, 1998; SARMENTO e PRETO, 2003) ou periodontal (AZOUBEL et al., 2008), mas também a estrutura dentária (LAMBERTI, 2004) e materiais de uso odontológico (SARMENTO et al., 1998; LEAL et al., 2001; CRUZ et al., 2004; SOARES et al., 2004; FERRAZ et al., 2009). Pesquisas envolvendo tecido ósseo de animais, sobretudo ratos, seja a calvária ou o fêmur (MORAES et al., 2005; CUNHA et al., 2007) também já foram desenvolvidos. Os resultados desses estudos comprovaram a alta sensibilidade do método em detectar pequenas alterações nos tecidos radiopacos. Não se pode esquecer, no entanto, a possibilidade do ruído fotônico (SARMENTO et al., 2004) ou do processo de digitalização das radiografias (RUBIRA-BULLEN et al., 2006; RUBIRA-BULLEN et al., 2007) interferir nos resultados encontrados. No presente estudo tentou-se minimizar essas possíveis distorções a partir da padronização dos processos e ajuste eletrônico do brilho das imagens.

A importância dessa avaliação reside no fato que quando do uso clínico em humanos dos materiais de enxerto, a avaliação histológica não é indicada, por questões éticas, principalmente. Porém a avaliação radiográfica é factível e simples de ser executada. Comprovando-se a correspondência dos achados da avaliação radiográfica com aquela da histológica, os clínicos terão um subsídio confiável para avaliar o resultado do tratamento de seus pacientes, mensurando a M e o CV dos níveis de cinza das áreas tratadas com os enxertos, tomados os devidos cuidados na obtenção e padronização das radiografias e imagens digitalizadas.

## 6.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A formação óssea é um processo coordenado envolvendo vários fatores biológicos (HUANG et al., 2005). Muitos fatores de crescimento/ citocinas expressados durante o desenvolvimento do esqueleto fetal são induzidos em resposta a injúrias e possuem um papel importante no processo de reparo ósseo. Nota-se, portanto, a importância do preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo, favorecendo o seu íntimo contato com as paredes do defeito e com células osteoprogenitoras (MARKS e ODEGREN, 2002).

A análise dos resultados histológicos obtidos para o grupo controle mostrou que não houve o completo reparo ósseo do defeito ao longo do período analisado. Microscopicamente, observa-se que a neoformação óssea analisada no grupo controle, restringiu-se à borda do defeito para o período de 30 dias, mantendo os mesmos padrões para o período de 60 dias após o procedimento cirúrgico, associada a uma pequena quantidade de osteoblastos na periferia, corroborando com os achados de Mokbel et al. (2008) e Develioğlu, Unver Saraydin e Kartal (2009). Em relação ao centro do defeito observou-se, no presente estudo, uma quantidade maior de fibras colágenas e pequena quantidade de células inflamatórias (DEVELIOĞLU, UNVER SARAYDIN E KARTAL, 2009), tendo havido um aumento discreto de seu número no período de 60 dias. Essa limitada quantidade de osso neoformado, relacionada à borda do defeito, associado a células osteoprogenitoras presentes nas margens ósseas remanescentes, apenas confirma que o defeito ósseo criado era de fato de tamanho crítico.

Ao serem avaliados os aspectos que indicam a efetivação do processo de reparo ósseo, pode-se observar padrões bem semelhantes de inflamação, edema e hiperemia entre os grupos Bio-oss, Gen-ox, Bonefill, para os períodos analisados. Para o grupo tratado com Bio-oss, no período de 30 dias após o procedimento cirúrgico um grau severo de hiperemia, inflamação e um grau moderado de edema foi constatado ao longo de todo o defeito ósseo, diferentemente dos resultados apresentados por Indovina e Block (2002), Schelegel et al. (2003), Tapety et al. (2004) e Lioubavina-Hack et al. (2004). Entretanto após 60 dias, notou-se uma redução destes parâmetros. Para o grupo Gen-ox, os presentes achados são

confirmados pelo estudo de Zambuzzi et al. (2005), os quais demonstraram a presença de células inflamatórias crônicas nos mesmos períodos aqui empregados.

Aliado a presença de muitas células inflamatórias no local do defeito, verifica-se a presença de muitas células gigantes multinucleadas, sendo esta em maior frequência no grupo Bio-oss, em comparação com os demais. Nota-se sobretudo sua presença em íntimo contato com as partículas de enxerto, no primeiro período experimental e uma redução deste aspecto durante o segundo tempo estudado.

Embora, a maioria dos estudos da literatura não demonstre a presença de células multinucleadas associadas à implantação de enxertos do grupo Bio-oss, alguns estudos demonstram a presença de tais componentes, mesmo que de forma branda durante o processo de reparo ósseo, quando utilizado o material do grupo Gen-ox (ZAMBUZZI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2003).

É de fato desejável, que os biomateriais utilizados como substitutos ósseos sejam reabsorvidos e substituídos por tecido ósseo neoformado ao longo do tempo, restabelecendo as características biológicas do tecido original. A grande presença de células multinucleadas ao longo de todos os defeitos, em maior ou menor proporção, pode sugerir um maior número de reabsorção das partículas do enxerto. Isso foi confirmado em diferentes graus ao longo dos dois períodos experimentais, embora os estudos de Schlegel et al. (2003) demonstrem uma capacidade de não reabsorção das partículas do grupo Bio-oss.

A análise histológica de todos os grupos testados puderam demonstrar a presença em graus variáveis dos materiais enxertados nos defeitos, durante todo o período da pesquisa, fato este confirmado pelos estudos de Araújo et al. (2003), Tapety et al. (2004) e Lioubavina-Hack et al. (2004) em relação ao material testado no grupo Bio-oss e de acordo com os estudos de Cruz et al. (2006), em relação ao biomaterial do grupo Gen-ox. A ausência esporádica do biomaterial, quando notada, deve-se provavelmente à reabsorção das partículas e não simplesmente à falta de preenchimento do material.

A neoformação óssea foi observada ao longo de todo o defeito, sobretudo na periferia do defeito, aos 30 dias, em todos os grupos experimentais Bio-oss, Gen-ox, Bonefill. Entretanto, constatou-se que aos 60 dias após o procedimento cirúrgico o

New bone formation was seen throughout the defect , especially in periphery of the defect at 30 days , in all Bio - oss , Gen -ox experimental groups , Bonefill . However , it was found that at 60 days after surgery the bone repair process had become little different from the initial frame , not showing great progress between periods . In groups Bio - oss and Gen -ox we observe islands of newly formed bone in the center of the defect and the associated margins the same , whereas in the group Bonefill observe a more regular form of bone formation than in the other groups and filling almost entirely around the defect.

processo de reparação óssea apresentava-se pouco diferente do quadro inicial, não demonstrando grande evolução entre os períodos. Nos grupos Bio-oss e Gen-ox, observam-se ilhas de osso neoformado no centro do defeito e associado às margens do mesmo, ao passo que no grupo Bonefill observa-se uma neoformação óssea de forma mais regular do que nos demais grupos e preenchendo quase que inteiramente todo o defeito.

O fechamento completo do defeito não ocorreu, para o período estudado, possivelmente pela grande formação de fibras colágenas entre os grupos teste analisados, de forma comparável entre eles, ou pelo período limitado em que este estudo foi conduzido.

A análise histológica demonstrou a capacidade osteocondutiva dos diferentes biomateriais testados, verificada pela aposição de tecido ósseo neoformado em sua superfície, confirmando os achados de outros autores que avaliaram biomateriais xenógenos inorgânicos, entretanto de marcas comerciais diferentes (INDOVINA e BLOCK, 2002; VALENTINI e ABENSUR, 2003).

## 7 CONCLUSÕES

A metodologia aplicada no presente estudo permite concluir que:

- 1- Radiograficamente, o grupo tratado com o enxerto Gen-ox demonstrou um maior aumento da média dos níveis de cinza nos espécimes sacrificados após 30 dias do procedimento cirúrgico (M=141,00;  $p<0,05$ ); após 60 dias, todos os grupos testados demonstraram um aumento significativo daquele valor, em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ );
- 2- Histologicamente, após 60 dias do procedimento cirúrgico, tanto o grupo tratado com o enxerto Gen-ox (Grau severo= 50%) quanto com o Bonefill (Grau moderado= 71,42%) apresentaram significativa neoformação óssea;
- 3- Os espécimes tratados com o enxerto Bio-oss demonstraram uma maior reação inflamatória, comparado aos demais grupos, principalmente após 30 dias do procedimento cirúrgico (Grau severo= 100%).

2 - Histologically, after 60 days the surgical procedure, both the group treated with graft Gen-ox (severe Grade = 50%) and with the Bonefill (Grade Moderate = 71.42%) showed significant new bone formation;  
3 - graft specimens treated with Bio-Oss showed a greater inflammatory reaction, compared to other groups, especially after 30 days after surgery (Grade severe = 100%).

## REFERÊNCIAS

- ABUSHAHBA, F. et al. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. An experimental study in the dog. **Clin. Oral Impl. Res**, v. 19, n.4 , p.329–334, 2008.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Braz Oral Res**, v.22, n.1, p.5-10, 2008.
- ALVES, L.C. **Avaliação histomorfométrica do reparo ósseo de área enxertada com osso autógeno e xenógeno (BONEFILL). Estudo em procedimento de levantamento de soalho de seio maxilar em humanos**. 2005. 83p.Uberlândia – MG: Fac. de Odontologia da Univ. Federal de Uberlândia – FOUFU.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.35, n.2, p.191-198, 2006.
- ARAÚJO, M.G. *et al.* : Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. **J Clin Periodontol** . v.29, n. 12 , p.1122-1131,2002.
- AZOUBEL, M. C. F. et al. Adjunctive benefits of systemic etoricoxib in non-surgical treatment of aggressive periodontitis short-term evaluation. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1719-1725, 2008.
- BANKOFF, A.D.P.; ZYLBERG, T.P.; SCHIAVON, L.M. A osteoporose nas mulheres pós-menopausa e a influência física: “ Uma análise de literatura”. **Revista de Educação Física/UEM**, v. 9, n.1, p. 93-101, 1998.
- BAPTISTA, A. D. *et al.*, Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. **Acta Ortop. Bras.**, v. 11, n. 4, p. 220-4, 2003.
- BEZZI, G. et al. “ A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation”. **Materials Chemistry and Physics**. v.78, n. 3 , p.816-824, 2003.
- BLOCK, M.S.; FINGER, I.; LYTLE, R. Human mineralized bone in extraction sites before implant placement: Preliminary results. **JADA**, v. 133,n. 12 ,p. 1631-1638, 2002.
- BOËCK-NETO, R.J. et al. Histomorphometrical analysis of bone formed after maxillary sinus floor augmentation by grafting with a combination of autogenos bone and demineralized freeze- dried bone allograft or hydroxyapatite. **J Periodontol**. v. 73, n. 3, p. 266-270, 2001.
- BOGLIOLO. M. C. et al. *Patologia Básica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- BOSH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membrane. **Cleft Palate Craniofac J**. v. 32, n.4 , p. 311-317, 1995.

BOSH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defects in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**.v.9,n. 4 , p. 310-316,1998.

BOYAN, B.D. et al. Osteoinductive ability of human allograft formulations. **J Periodontol**, v. 77, n. 9, p.1555-1563, 2006.

BURG, J.L.; PORTER, S.;KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23,p. 2347-2359, 2000.

CALLAN, D. P. ROHRER, M.D. Use of hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report. **J Periodontology**, v. 64, n. 6, p.575-582, 1993.

CAMELO, I. K. **Proposta de metodologia para estudo sobre a diferenciação osteoblástica associada a substâncias osteoindutoras**. Porto Alegre, 2001.96p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Odontologia – PUC-RS.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Diseños experimentales y cuasiexperimentales en la investigación social**. Buenos Aires : Amarrutu, p. 29 – 30, 1970

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Experimental and quasi-experimental designs for research**. 10. ed. Chicago : Rand McNally, p.12 –13, 1973.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo : EPU, p. 22 – 23, 1979.

CARVALHO, P.S.P.; BASSIA, A.P.F.; VIOLIN, L.A. “ Revisão e Proposta de nomenclatura para os biomateriais”. **Implant New**,. v.1, n. 3, p.255-259, 2004.

CHIAPASCO, M.; GATTI, C.; GATTI, F. Immediate loading of dental implants placed in severely resorbed edentulous mandibles reconstructed with autogenous calvarial grafts. **Clin Oral Implants Res**., v. 18 , n. 1 ,p. 13-20, 2007.

CONZ, M.B.; SOARES, G.A.; GRANJEIRO, J.M.N. “Physicochemical characterization of six comercial hydroxyapatite for medical- dental applications as bone graft”. **J Appl Oral Sci**, v.13, n.2, p.136-140, 2005.

COSTA ,O.R.; VEINSTEIN, F.J. Injertos osseos em regeneración periodontal. **Rev. Asoc. Odont. Argent.**, v.82, n.2 ,p.117-25, 1994.

COTRAM, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: COTRAM, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1088-90.

CRUZ, J. F. W. et al. A imagem digitalizada na determinação da porosidade superficial de corpos-de-prova em resina acrílica. **Jornal Brasileiro de Clínica Odontológica Integrada, Curitiba**, v. 8, n. 44, p. 106-108, 2004.

CRUZ, A.C.C. et al. Physico- chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p.219-226, 2006.

CUNHA, S. S. da, et al. Effect of Laser Therapy on Bone Tissue Submitted to Radiotherapy: experimental study in rats. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 25, p. 197-204, 2007.

DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J Neurosurg**. v. 74,n.3 , p. 487-491, 1991.

DALAPICULA, S.S. **Caracterização físico química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena**. Duque de Caxias, 2007. 103p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Grande Rio. Rio de Janeiro.

DALL'ANTONIA , R.C. et al. Implante de Osso Cortical Bovino Inorgânico Liofilizado (Gen-Ox®) em Alvéolos Dentais: Estudo Microscópico em Ratos. **Revista odontológica de Araçatuba**, v.27, n.2, p. 129-135, Julho/Dezembro, 2006.

DEHGHANI , S.N. et al. Effect of bovine fetal growth plate as a new xenograft in experimental bone defect healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. **Cell Tissue Banking**, v.9, n.2, p.91-99, 2008.

DEVELIOGLU, UNVER SARAYDIN e KARTAL. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. **Dental Materials Journal**., v.28, n.4, p.396-400, 2009.

DUARTE, T.S. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.849-853, 2006.

FERRAZ, E. G. et al. Avaliação da qualidade de duas técnicas de obturação do canal radicular por meio de radiografia digitalizada. **Revista da Faculdade de Odontologia. Universidade de Passo Fundo**, v. 14, p. 126-131, 2009.

FIGUEIREDO, A.S. **Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo bovino autógeno, em coelhos**. 2000. 75p. Dissertação (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). São Paulo, Universidade Federal de São Paulo.

FIGUEIREDO, A.S. et al. Comparação entre hidroxiapatita porosa de coral e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir. Bras**. v.16 n.3, p. 169-175 , 2001.

GARG, A. K. Grafting materials in repair and restotration. In: LINCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence, 1999. cap. 5. p. 83-101.

GATTI, A.M. et al. Clinical Long-term evaluation of hydroxyapatite granules implantation in Periodontal Defects. **Key Eng Materials**, v. 192, n.95,p.921-24, 2002.

GONÇALVES, E.A.L.; GUIMARÃES, S.A.C.; GARCIA, R.B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev Odontol Univ São Paulo**. v, 12, n, 3, p. 299-304, 1998.

GONÇALVES, A.R.Q. “**A Associação Do Plasma Rico Em Plaquetas Com O Osso Bovino Inorgânico, Em Enxertos De Seio Maxilar, Induz A Neoformação Óssea?**”. 2008. Monografia (Especialização). Rio de Janeiro, Centro de Pós-Graduação da Ciodonto.

HOLLINGER, J.O.; KLEINSCHMIDT, .JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, v.1, n.1, p.237-243, 1990.

HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**., v.26, n.36 , p.7616-7627, 2005.

INDOVINA, A.; BLOCK, M.S. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. **J Oral Maxillofac Surg**., v.60, n.1, p.53-58, 2002.

JENSEN S.S. et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. **Int. Oral Maxillofac . Implants**., v.11, n. 1 ,p55-66, 1996.

JOSHI, A. Na investigation of pos-operative morbidity following chin graft surgery. **Br Dent J**., v.196, n.4, p. 215-218, feb, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica, 10 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.

KATCHBURIAN E, ARANA V. Histologia e embriologia oral. Texto-atlas-correlações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KIM, S.S ; KIM, B.S. Comparison of Osteogenic Potential Between Apatite-Coated Poly(Lactide- Co-Glycolide)/Hydroxyapatite Particulates and Bio-Oss®. **Dental Materials Journal**, v.27, n.3, p.368-375, 2008.

Khojasteh, A. et al. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**., v.106, n.3, p.356-62, 2008.

KÖCHE, J. C. **Fundamentos de metodologia científica: teoria da ciência e prática da pesquisa**. 14 ed. Petrópolis: Vozes, 1997.

KRAMER, F-J.; et al. Experimental application of a biomaterial in bifocal transport osteogenesis for craniofacial reconstruction. **J Craniomaxillofacial Surg**, v36, n.4, p.218-26, 2008.

LAMBERTI, P. R. **Avaliação in vitro dos processos de des/remineralização do esmalte dentário - comparação radiográfica entre a análise visual convencional e técnicas digitais: visual, quantitativa e por subtração**. 2004. 148 f. Tese (Doutorado em Programa Integrado de Pós Graduação UFPB/UFBA) - Universidade Federal da Paraíba.

LANE, J.M. Bone Graft Substitutes. **West J Med.**, v. 163, n. 6, p.565-566, Dec. 1995.

LEAL, A. T. S. et al. Avaliação de condutos radiculares obturados por diferentes técnicas, utilizando radiografias digitalizadas: estudo in vitro. **Revista Odontociência**, Porto Alegre, v. 16, n. 32, p. 17-26, 2001.

LEITE, F.R.M.; RAMALHO, L.T.O. Bone regeneration after demineralized bone matrix and castor oil (*Ricinus Communis*) Polyurethane Implantation. **J Appl Oral Sci.**, v.16,n.2,p.122-6, 2008.

LINDE, A. et al. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.** v. 51, n. 8, p.892-897, 1993.

LINDHE, J.; KARRING, T., LANG, N.P. 2005. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral, 4<sup>ª</sup> Edição. São Paulo, Guanabara Koogan.

LINDSEY, W. Osseous tissue engineering with gene therapy for facial bone reconstruction. **Laryngoscope**, v. 111, n.7, p.1128-36, 2001.

LIOUBAVINA-HACK, N. et al. Effect of Bio-oss with or without platelet-derived growth factor on bone formation by "guided tissue regeneration": a pilot study in rats. **J Clin Periodontol**, v.32, n.12, p.1254-1260, 2005.

LOURENÇO, Eduardo José Veras. **Avaliação da osteogênese com proteínas óssea morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos.**2002. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

MARDAS, N. et al. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE membranes and desmineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. **J. Craniofac. Surg.**, v.13, n.3, p.453-62, 2002.

MARKS, R.E.; GARG, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent**, v. 4, n.7, p. 267-76, 1998.

MARKS JR, S.C.; ODGREEN, P.R. Structure and development of the skeleton. In.: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Principles of bone Biology. 2ed. San Diego. Academic Press., 2002. cap 1, p. 3-15.

MATZENBACHER, S.A. et al. In vivo effectiveness of a glycerol- compounded demineralized freeze- dried bone xenograft in rat calvarium. **J Periodontol**, v.74, n.11 , p. 1641-1646, 2003.

MELLONIG, J.T. et al. Comparison of decalcified freeze-dried bone allograft and porous particulate hydroxyapatite in human periodontal osseous defects. **J Periodontol**, v. 60,n.12, p. 647-654, 1989.

MIRANDA, D.A.O. *et al.* Evaluation of Recombinant Human bone Morphogenetic Protein-2 on the repair of alveolar ridge defects in baboon. **Journal of Periodontology**, v.76, n. 2, p. 210-20, 2005.

MISCH, C.E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. *Implantes Dentários Contemporâneos*. Editora Santos, 2ª Edição, São Paulo, 2000. 271-302p.

MOKBEI, N *et al.* Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. **Oral Maxillofac Surg** , v. 12, n.2 , p.73–78, 2008.

MORAES, M. *et al.* Estudo radiográfico da reparação óssea em tíbias de ratos estressado: Densidade óptica por meio de radiografia digital. **Revista Odontologia Ciênci**a, v. 20, n. 49, 2005.

MOREIRA, A. S. B. *et al.* Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. **Acta ortop bras**. v. 11, n.4, p.240-250, 2003.

MUNHOZ, E.A. **Avaliação radiográfica de enxerto ósseo xenógeno em alvéolos de terceiros molares inferiores não irrompidos**.2005. 121p. Dissertação (Mestrado). São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, R.C. *et al.* Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. **Rev. Bras. Ortoped**, v. 38, n. 9, p. 551-560, Set, 2003.

OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**., v. 25, n. 2, p. 5S-9S, Aug. 1999.

ORR, T.E. *et al.* Compressive properties of cancellous bone defects in rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. **Biomaterials**,v.22,n.14, p.1953-1959, 2001.

PÁDUA, E. M. M. **Metodologia da pesquisa: abordagem teórico-prática**. 3 ed. Campinas: Papirus, 1998.

PARK, H.O. *et al.* Tomography of the outer mandibular symphyseal region with reference to the autogenous bone graft. **Int J Oral Maxillof. Surg.**, v. 33, n.5, p. 423-523, Jul, 2004.

PARK *et al.* Bone healing with a new bone substitute. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.20, p.372-378, 2009.

POLYZOIS, I., *et al.* The effect of Bio-Oss on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects of different dimensions: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.18, n.3 , p. 304-310, 2007.

PROLO, D.J. et al. Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. **Clin Orthop** ., v.168, v.31, p.230-242, 1982.

REDDI, A.H. Extracelular matrix and bone morphogenetic proteins: molecular approaches to dentin and periodontal repair. In: GENCO, R. et al. Molecular pathogenesis of periodontal disease. Washington: American Society for Microbiology., 1994. cap. 35, p. 439-444.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J Periodontal Res**, v. 29, n.4, p. 225-235, 1994.

RUBIRA-BULLEN, I. R. F.; ESCARPINATI, M. C.; SCHIABEL, H.; VIEIRA, M. A. C.; RUBIRA, C. M. F.; LAURIS, J. R. P. Evaluating noise in digitized radiographic images by means of histogram. **J Appl Oral Sci**, v. 14, n. 6, p. 410-4, 2006.

RUBIRA-BULLEN, I. R. F.; ESCARPINATI, M. C.; SCHIABEL, H.; VIEIRA, M. A. C.; RUBIRA, C. M. F.; LAURIS, J. R. P. Digitizing radiographic films: a simple way to evaluate indirect digital images. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 1, p. 14-7, 2007.

SANADA, J.T. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J Appl Oral Sci**, v.11, n.3, p.209-15, 2003.

SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich Plasma the perfect enhancement factor? A current review. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 18, n.1, p.93-03, 2003.

SARMENTO, V. A. et al. Avaliação da qualidade de obturação endodôntica através da digitalização direta de imagens. **Revista Odontociência**, Porto Alegre, v. 13, n. 26, p. 139-155, 1998.

SARMENTO, V. A.; RUBIRA, I. R. F.. Mensuração da densidade óptica apical - uma proposta para diagnóstico diferencial em Endodontia. **Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 65-68, 1998.

SARMENTO, V. A.; CARVALHO, A. C.; LUZ, I. Avaliação do ruído fotônico em imagens digitalizadas. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 45, n. 1, p. 23-28, 2004.

SARMENTO, V. A.; PRETTO, S. M. Diagnóstico radiográfico de alterações periapicais de origem endodôntica através da determinação do nível de cinza em imagens digitais - estudo experimental em ratos. **Revista de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 333-345, 2003.

SARTORI,S. et al. Tem- year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine boné (Bio-oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Impl. Res.**, v.14,, p.369-372, 2003.

SAUERESSIG, F. **Avaliação Microscópica do Processo de Reparo Ósseo na Presença de Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado e desmineralizado e Membrana de Cortical Bovina em Calota Craniana de Ratos.** 2005. 122p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

SCHENK, R. K. Regeneração óssea: bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.;SCHENK, R. K. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence Books, 1996.p. 49-100.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. **Clin Orthop.** v. 205, p. 299-308, 1986.

SCHIMMING, R.; SCHELZEISEN, R. Tissue engineered bone for maxillary sinus augmentation. **J Ral Maxillofac Surg.**, v.62, n.6, p.724-729, June, 2004.

SCHLEGEL, K. A. *et al.*, Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. **Int. J. oral Maxillofac. Implants**, v. 18, n. 1, p. 53-8, jan./feb., 2003.

SCHWARTZ, Z. et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.19, n.12, p.1233-1245, 2008.

SHAFFER, C.D.; APP, G.R. The use of plaster of paris in treating infrabony periodontal defects on humans. **J Periodontol** v. 42, n. 11 , p. 685-690, 1971.

SHIRASU N, et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. **Acta Histochem** (2009), doi:10.1016/j.acthis.2009.01.003.

SICCA, C. M. **Análise tomográfica e histomorfométrica comparativa entre enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo xenógeno em cirurgia de levantamento de seio maxilar em coelho.** Bauru, 2005.61p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

SILVA, R.A. et al. Effect of anti-inflammatory agents on the integration of autogenous bone graft and bovine bone devitalized matrix in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** , v. 23, n. 2, p.140-148, 2008.

SOARES, R. et al. Análise dos níveis de cinza de resinas compostas de alta viscosidade utilizando radigrafias digitalizada. **Revista Odontociência**, v. 19, n. 45, 2004.

SOCCOL, A. T. et al. Comparação entre os bioenxertos de hidroxiapatita de cálcio e submucosa de intestino delgado porcino no preenchimento de defeitos ósseos criados em mandíbula de ratos. **Rev Bras Otorrinolaringol.** v.72,n. 2, p. 195-199, 2006.

SODEK, J.; MCKEE, M.E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology** 2000, v. 24, p.99-126, 2000.

STAVROPOULOS, A. et al. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss®) and bioactive glass (Biogran®) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR). An experimental study in the rat. **J Clin Periodontol**, v.30, n.7 , p.636-646, 2003.

STEFANI, C. et al. Fatores de crescimento: novas perspectivas para regeneração periodontal / The growth factors: the news perspectivas of the periodontal regeneration. **Periodontia**, v. 6, n.1, p.13-9, 1997.

TAGA, M.L.L. **Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (Cavia porcellus)**. 2004. 149p . Tese(mestrado). Universidade de São Paulo, Bauru.

TADJOEDIN, E.S. et al. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 3, p. 261-70, 2003.

TAMIMI, F.M. et al. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel b-TCP/DCPD granulate. **J Clin Periodontol**, v.33, n. 12 , p.922-928, 2006.

TAPETY, F.I. et al. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clin Oral Implants Res**. v.15, n.3, p.315-24, 2004.

TATE, M. K. *et al.* The osteocytes. **J Biochem Cell Biol**, v. 36, p. 1-8, 2004.

TOTH, J.M.; LYNCH, K.; DEVINE, T.R. 1995 "Mechanical and Biological characterization of phosphates for use as biomaterials". In. Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal. V.I, Part A, ed. Marcel. Dekka, NY: 1465-1497.

TSONIS, P.A. Regenerative Biology: The emerging field of tissue repair and restoration. **Differentiations**, v. 70, n. 8, p.397-409, 2002.

VALENTINI, P.; ABENSUR, D.J. Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical reports of long- term results. **Int J Oral Maxillofac Implants**., v.18, n.4, p. 556-560, 2003.

WALLACE, S.S. et al. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine bone (Bio-oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: Histomorphometric and clinical analyses. **Int. Journal of Periodontis & Restorative Dentistry**, v. 25, n. 6, p. 551-559, 2005.

WENZ, B. et al. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials**., v.22, p. 1599-1606, 2001.

WORTH, A. et al. The evaluation of precessed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. **Clin Oral Impl. Res.**, v. 16, n.3 , p. 379-386, 2005.

WOZNEY, J.M. The potential role of bone morphogenetic protein in periodontal reconstruction. **J Periodontal**, v. 66, n.6, p. 506-10, 1995.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clin Orthop Relat Res.** v, 346, p.26-37,1998.

YOU, T-M. et al. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n.4, p.e8-e12, 2007.

ZAMBUZZI, W.F.; OLIVEIRA, R.C.; GRANJEIRO, J.M. Avaliação bioquímica de xenoimplantes em subcutâneo de rato. **Cienc Odontol Bras**, v.9, n.4, p.44-51, out/dez 2006 .

## **ANEXOS**

## ANEXO A

  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**  
Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -  
Fone: (75) 3224-8398

Feira de Santana - BA, 24 de setembro de 2008.

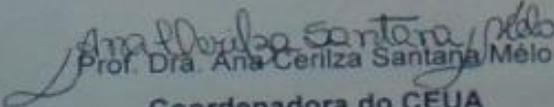
### PARECER

Todos os animais presentes da amostra desta pesquisa, serão tratados da mesma forma, quanto aos procedimentos pré, trans e pós operatórios. Entretanto, os animais presentes no Grupo D (grupo controle), não receberam o material de enxerto em estudo, mas receberão todos os cuidados dos demais grupos.

No procedimento cirúrgico será removido um bloco ósseo para a confecção do defeito, entretanto será mantida íntegra a dura-máter e o fechamento da ferida cirúrgica será por primeira intenção. Desta forma as células do hospedeiro serão as responsáveis pelo reparo ósseo, sem a interferência de outro material interveniente, sem que a área do defeito fique exposta.

Diversos trabalhos da literatura, como os do anexo do projeto, demonstram esta metodologia empregada, destacando a importância de um grupo controle, sem material de enxerto, a fim de tornar o mais próximo das condições clínicas naturais. Entretanto, os trabalhos não relatam as diversas condições no pós-operatório. Nesta pesquisa, todos os grupos serão tratados da mesma forma seguindo todo o protocolo que rege os experimentos com animais, e o protocolo utilizado pelo Biotério da UEFS o qual garante as condições ideais para tais experimentos.

Diante do exposto, o projeto encontra-se **APROVADO** pelo CEUA.

  
Prof. Dra. Ana Cerilza Santana Melo  
**Coordenadora do CEUA**

PORT. 497/2008

Dr.ª Ana Cerilza Santana Melo  
Coordenadora do CEUA  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UEFS  
Port. 497/2008

## APÊNDICE

# APÊNDICE A

QUADRO 1: Parâmetros de avaliação Histológica (Bio-oss 30 e 60 dias)

Identificação				Avaliação da Tolerabilidade							Avaliação do Desempenho					
NUM. ANIMAL	MATERIAL	GRUPO	PESO	HIPEREMIA	EDEMA	NECROSE	FIBRINA	COLAGENO	INFLAMAÇÃO	TIPO CEL. PREDOM.	OSTEOBLASTOS	CEL. MULTINUCLEADAS	NEO FORM. ÓSSEA	PRES. DO ENXERTO	REABS. DO ENXERTO	REABS. OSSEA CORT.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Bio-oss	A1		3	3	0	1	1	3	mononuc	2	2	2	2	1	3
2		A1		3	2	0	1	1	3	mononuc	0	2	0	3	1	1
3		A1		3	2	0	1	2	3	Linf. Plas	1	2	1	2	1	1
4		A1		3	2	0	1	1	3	Linf. Plas	0	2	1	3	1	0
5		A1		3	2	0	1	2	3	Linf. Plas	0	2	1	3	2	0
6		A1		3	2	0	1	3	3	Linf. Plas	0	3	1	3	3	0
7		A1		3	2	0	0	2	3	PMN	0	3	0	3	3	0
8		A1		3	2	0	0	2	3	Linf. Plas	1	2	1	3	1	0
1	Bio-oss	A2		3	0	0	0	3	1	Linf. Plas	0	0	1	3	1	0
2		A2		3	1	0	0	3	3	Linf. Plas	0	2	3	3	2	0
3		A2		3	2	1	0	3	3	Mista LP	0	1	0	3	1	0
4		A2		3	1	0	0	3	2	Linf. Plas	1	1	3	1	3	0
5		A2		3	1	0	0	3	2	Linf. Plas	0	1	0	2	1	0
6		A2		3	1	0	0	3	3	Mista LP	0	1	0	3	1	0
7		A2		2	0	0	0	3	1	Linf. Plas	1	0	3	1	3	0
8		A2		1	0	0	0	3	2	Linf. Plas	0	2	0	3	2	0
9		A2		3	0	0	0	3	1	Linf. Plas	1	1	1	3	2	0

Este quadro foi confeccionado para a organização dos dados coletados e registrados em fichas de coleta e transformados em códigos, de acordo com a legenda:

01 a 04: Identificação

01: Número do Animal

02: Material de enxerto utilizado

03: Grupo: 1 = 30 dias; 2 = 60 dias

04: Peso do animal

05 a 11: Avaliação da tolerabilidade (Histopatológica)

12 a 17: Avaliação do desempenho (Histopatológica)

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

QUADRO 2: Parâmetros de avaliação Histológica (Gen-ox 30 e 60 dias)

Identificação				Avaliação da Tolerabilidade							Avaliação do Desempenho					
NUM. ANIMAL	MATERIAL	GRUPO	PESO	HIPEREMIA	EDEMA	NECROSE	FIBRINA	COLAGENO	INFLAMAÇÃO	TIPO CEL. PREDOM.	OSTEOBLASTOS	CEL. MULTINUCLEADAS	NEOFORM. ÓSSEA	PRES. DO ENXERTO	REABS. DO ENXERTO	REABS. OSSEA CORT.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Gen-ox	B1		3	1	0	0	2	1	Linf.Plas	2	0	2	2	0	0
2		B1		2	1	1	0	2	2	Linf.Plas	1	1	1	2	2	0
3		B1		3	1	0	0	2	3	Mista LP	0	1	0	2	2	0
4		B1		3	1	0	0	2	1	Linf.Plas	0	1	0	2	2	0
5		B1		3	1	0	0	3	1	Linf.Plas	1	1	1	2	1	0
6		B1		3	1	0	0	2	2	Linf.Plas	0	1	1	2	2	0
7		B1		3	1	0	0	3	1	Linf.Plas	1	0	1	1	1	0
8		B1		3	1	0	0	2	2	Linf.Plas	1	1	2	1	1	0
9		B1		3	1	0	0	3	1	Linf.Plas	2	1	3	2	1	0
1	Gen-ox	B2		3	1	0	0	3	2	mononuc	0	2	0	2	2	0
2		B2		3	2	2	1	3	3	PMN	0	1	0	1	2	0
3		B2		3	2	1	0	3	3	PMN	0	1	0	2	1	0
4		B2		3	1	0	0	3	1	Linf.Plas	2	1	3	1	2	0
5		B2		2	0	0	0	3	1	Linf.Plas	2	0	3	2	2	0
6		B2		3	0	0	0	3	1	Linf.Plas	2	0	2	3	2	0
7		B2		2	0	0	0	2	1	Linf.Plas	2	1	3	2	2	0
8		B2		1	0	0	0	1	1	Linf.Plas	2	0	3	1	3	0

Este quadro foi confeccionado para a organização dos dados coletados e registrados em fichas de coleta e transformados em códigos, de acordo com a legenda:

01 a 04: Identificação

01: Número do Animal

02: Material de enxerto utilizado

03: Grupo: 1 = 30 dias; 2 = 60 dias

04: Peso do animal

05 a 11: Avaliação da tolerabilidade (Histopatológica)

12 a 17: Avaliação do desempenho (Histopatológica)

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

QUADRO 3: Parâmetros de avaliação Histológica (Bonefill 30 e 60 dias)

Identificação				Avaliação da Tolerabilidade						Avaliação do Desempenho					
NUM. ANIMAL	MATERIAL	GRUPO	PESO	HIPEREMIA	EDEMA	NECROSE	COLAGENO	INFLAMAÇÃO	TIPO CEL. PREDOM.	OSTEOBLASTOS	CEL. MULTINUCLEADAS	NEO FORM. ÓSSEA	PRES. DO ENXERTO	REABS. DO ENXERTO	REABS. OSSEA CORT.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Bonefill	C1		3	1	0	3	2	Mono lpr	1	1	1	2	1	0
2		C1		2	0	0	3	1	Mono lpr	3	3	3	1	3	0
3		C1		2	0	0	2	1	lp	3	1	3	1	1	0
4		C1		3	1	0	2	1	lp	2	1	3	1	1	0
5		C1		3	2	0	3	2	Mono	1	1	1	2	2	0
6		C1		3	1	0	3	2	lp	3	2	3	2	3	0
7		C1		3	1	0	3	2	lp	3	1	3	2	2	0
8		C1		3	1	0	3	2	lp	2	1	1	3	2	0
1	Bonefill	C1		3	0	0	3	2	lp	1	1	2	2	2	0
2		C1		3	0	0	2	1	lp	2	1	3	1	2	0
3		C1		3	1	0	3	2	lp	1	1	2	2	2	0
4		C1		3	0	0	3	1	lp	2	1	3	2	2	0
5		C1		2	0	0	3	1	lp	1	1	2	1	2	0
6		C1		3	0	0	3	1	lp	1	1	2	1	2	0
7		C1		3	0	0	3	1	lp	2	1	2	1	2	0

Este quadro foi confeccionado para a organização dos dados coletados e registrados em fichas de coleta e transformados em códigos, de acordo com a legenda:

01 a 04: Identificação

05 a 10: Avaliação da tolerabilidade (Histopato 0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

01: Número do Animal

11 a 16: Avaliação do desempenho (Histopato 0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

02: Material de enxerto utilizado

03: Grupo: 1 = 30 dias; 2 = 60 dias

04: Peso do animal

QUADRO 4: Parâmetros de avaliação Histológica (Controle 30 e 60 dias)

Identificação				Avaliação da Tolerabilidade							Avaliação do Desempenho					
NUM. ANIMAL	MATERIAL	GRUPO	PESO	HIPEREMIA	EDEMA	NECROSE	FIBRINA	COLAGENO	INFLAMAÇÃO	TIPO CEL. PREDOM.	OSTEOBLASTOS	CEL. MULTINUCLEADAS	NEO FORM. ÓSSEA	PRES. DO ENXERTO	REABS. DO ENXERTO	REABS. OSSEA CORT.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Controle	D1		1	1	0	0	1	0	Linf ocas	1	0	1	0	0	0
2		D1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
3		D1		1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
4		D1		1	0	0	0	1	1	linf	0	0	2	0	0	0
5		D1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0
6		D1		1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
7		D1		1	0	0	0	2	1	Linf	1	0	1	0	0	0
8		D1		1	0	0	0	2	1	Linf	1	0	3	0	0	0
1	Controle	D2		1	0	0	0	2	1	Linf	0	0	0	0	0	0
2		D2		0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0
3		D2		1	0	0	0	2	1	Linf	0	0	1	0	0	0
4		D2		2	0	0	0	2	1	Linf	1	0	1	0	0	0
5		D2		1	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0
6		D2		1	0	0	0	2	1	Linf.	0	0	1	0	0	0
7		D2		1	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0
8		D2		0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	0
9				1	0	0	0	2	0	Linf	2	0	2	0	0	0

Este quadro foi confeccionado para a organização dos dados coletados e registrados em fichas de coleta e transformados em códigos, de acordo com a legenda:

01 a 04: Identificação

05 a 11: Avaliação da tolerabilidade (Histopatológica)

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

01: Número do animal

12 a 17: Avaliação do desempenho (Histopatológica)

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= severa

02: Material de enxerto utilizado

03: Grupo: 1 = 30 dias; 2 = 60 dias

04: Peso do animal