

LEANDRO EDUARDO KLÜPPEL  
Cirurgião-Dentista

INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULAS DA  
MATRIZ ÓSSEA BOVINA ANORGÂNICA NO PROCESSO DE REPARO  
ÓSSEO. ANÁLISE HISTOLÓGICA E RADIOGRÁFICA DE DEFEITOS  
CRIADOS CIRURGICAMENTE EM CALVÁRIA DE COELHOS.

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do  
Título de Mestre em Clínica Odontológica.  
Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-  
Maxilo-Faciais

Orientador: Prof. Dr. Renato Mazzonetto

PIRACICABA  
2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

K716i

Klüppel, Leandro Eduardo.

Influência dos diferentes tamanhos de partículas da matriz óssea bovina anorgânica no processo de reparo ósseo. Análise histológica e radiográfica de defeitos criados cirurgicamente em calvária de coelhos. / Leandro Eduardo Klüppel. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Renato Mazzonetto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Substitutos ósseos. 2. Ossos - Enxerto. I. Mazzonetto, Renato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Influence of different particle sizes of anorganic bovine bone matrix on bone repair process. Histologic and radiographic analysis of surgically created defects in rabbit calvaria

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Bone substitutes. 2. Bone - Grafting

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

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: José Ricardo Albergaria Barbosa, Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Renato Mazzonetto

Data da Defesa: 09-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 09 de Fevereiro de 2007, considerou o candidato LEANDRO EDUARDC KLÜPPEL aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "RM", positioned above a horizontal line.

PROF. DR. RENATO MAZZONETTO

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Marisa C Gabrielli", positioned above a horizontal line.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARISA APARECIDA CABRINI GABRIELLI

A handwritten signature in black ink, appearing to be "JR", positioned above a horizontal line.

PROF. DR. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

Dedico este trabalho aos meus pais Marcos e Maria Lúcia, por acreditarem em meus sonhos e por nunca deixarem faltar amor, apoio, incentivo e compreensão durante esta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Prof. Dr. Renato Mazzone pela amizade, orientação e contribuição na execução desta dissertação.

Aos Professores da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP - UNICAMP, Prof. Dr. José Ricardo Albergaria Barbosa, Prof. Dr. Luis Augusto Passeri, Prof. Dr. Márcio de Moraes e Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira, pela amizade e pelos ensinamentos transmitidos durante o curso. Sou eternamente grato a todos.

Ao Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, da Área de Histologia, pela orientação no processamento histológico deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Ricardo Albergaria Barbosa, pela disposição e pelo auxílio na análise histológica deste trabalho.

À banca do exame de qualificação composta pelo Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira, Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira e Prof. Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho pelas importantes sugestões que, sem dúvida, engrandeceram este trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Prof. Dr. Mário Francisco Real Gabrielli, Profa. Dra. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira, Prof. Dr. Valfrido Antonio Pereira Filho, Prof. Dr. José Scarso Filho, Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro e Prof. Dr. Elcio Marcantonio, pela minha formação, pela amizade e pelo convívio nos últimos 5 anos. É uma honra tê-los como mestres e amigos.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Paulo Roberto Müller, Prof. Dr. Nelson Luis Barbosa Rebellato e Prof. Dr. Delson João da Costa, pelos primeiros ensinamentos na área da Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

À Marinella, pelo amor, carinho e apoio a mim destinados durante esta jornada.

Ao meu irmão Lúcio, pela união e amizade que, apesar da distância, sempre estiveram presentes.

Aos meus amigos e colegas do curso de Pós-Graduação: Anibal, Bernardo, Delson, Fabrício, Gustavo, Alex, Cecília, Glaykon, Greison, Bento, Eduardo, Renato, Fábio, Jaime, Miguel e Rafael pela amizade e pelo convívio.

Aos colegas de república Alex, Anibal, Glaykon, Greison e Bento: espero um dia poder retribuir pela maneira como fui recebido em seu lar durante estes dois anos.

Aos amigos da Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara: Marcelo, Daniel, Leandro, Higor, Adriano, Elis, Guilherme, João, Eduardo, Murillo, Lucas e Nicolau pela amizade e coleguismo.

Aos colegas de pós-graduação em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Thallita e Francisley pela amizade e pelo auxílio nas exaustivas cirurgias experimentais.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Thelma, Toninho e Suely pela disposição e amizade.

Às funcionárias da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP - UNICAMP, Didi, Sueli, Daiana e Fernanda por tornarem viável o funcionamento do Centro Cirúrgico.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta dissertação, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar histológica e radiograficamente a influência do tamanho das partículas da matriz óssea bovina anorgânica (MOBA) sobre o processo de reparação óssea. Na calvária de 18 coelhos adultos da raça Nova Zelândia foram preparadas quatro cavidades com diâmetro de 8 milímetros, sendo duas do lado direito da sutura sagital e duas do lado esquerdo. Os defeitos foram preenchidos com osso autógeno triturado (grupo controle); MOBA de granulação grossa; MOBA de granulação média ou MOBA de granulação fina. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 15, 30 e 60 dias. Antes do início do processamento histológico, as peças foram radiografadas sequencialmente. Para análise destas imagens utilizou-se como padrão de comparação o osso do crânio que não estava envolvido nas áreas de ostectomia. Desta forma, observou-se que o osso autógeno apresentava-se discretamente radiopaco inicialmente, tendendo a apresentar uma radiopacidade bastante semelhante ao tecido adjacente no período final. A MOBA de granulação grossa e média mantiveram o mesmo padrão radiográfico, sendo que aos 60 dias, o aparecimento de uma porção radiolúcida em sua porção central pode ser observada. Já a MOBA de granulação fina apresentava discreta radiolucidez no período inicial, a qual tornou-se mais intensa nos períodos sucessivos. A análise histológica demonstrou a formação de maior quantidade de osso e menos reação inflamatória no grupo controle (osso autógeno). Para o biomaterial, em todas as granulações pôde-se observar a presença de infiltrado inflamatório considerável nos períodos de 15 e 30 dias. Nos defeitos preenchidos pela MOBA de granulações grossa e média o processo de reparação transcorreu de maneira semelhante, sendo que no período final uma grande quantidade de partículas e tecido conjuntivo fibroso ainda estavam presentes na cavidade. Contrariamente, a

MOBA de granulação fina proporcionou a formação de maior quantidade de tecido osteóide e as partículas foram reabsorvidas quase que em sua totalidade transcorridos 60 dias de sua implantação. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que: (1) o enxerto ósseo autógeno isoladamente proporcionou o melhor resultado em termos de reparação dos defeitos ósseos; (2) a MOBA é um material biocompatível; (3) a MOBA de granulação grossa e média não são reabsorvidas em sua totalidade no período observado; (4) a MOBA de granulação fina foi reabsorvida de forma mais intensa e proporcionou uma maior formação de tecido osteóide quando comparada às outras granulações.

**Palavras-chave:** substitutos ósseos; enxerto ósseo; osso bovino

## **ABSTRACT**

The aim of this present study was to analyze, clinical and histologically, the influence of anorganic bovine bone matrix (ABBM) particle size on bone repair. Four calvarial defects of 8 millimeters each were prepared in 18 adult New Zealand rabbits, two in the right side, and two in the left side. The defects were filled with either particulate autogenous bone (control group); ABBM of large size granules; ABBM of medium size granules; or ABBM of small size granules. The animals were sacrificed at 15, 30, and 60 days after surgery. The samples were radiographic examined before being submitted to histological processing. The analysis of these radiographic images was performed by comparing them with images of the cranial bone not involved with the areas of osteotomy. Thus, it was observed that autogenous bone showed a slight radiopacity at the beginning, which was increased at the final period, being very similar to the adjacent bone tissue in terms of radiopacity. The large and medium size ABBM particles maintained the same radiographic behavior, showing a radiolucid area in the central portion of the defect at 60 days. On the other hand, the ABBM of small size granules showed a slight radiolucidity at the initial period, which was increased at the subsequent periods. The histological analysis showed a more intense bone formation within the control group (autogenous bone). With regards to the biomaterial, it was observed that all three particle sizes resulted in inflammatory infiltration at 15 and 30 days. The bone repair at the defects filled with ABBM of medium or large size granules was similar to each other, with the presence of a large amount of remaining particles and fibrous connective tissue in the defect at the final period. In contrast, ABBM of small size granules lead to a greater amount of osteoid tissue, and the particles were almost totally reabsorbed within 60 days of implantation. Based on these results, it was concluded that: (1) autogenous bone

graft lead to the best result in terms of bone defect repair; (2) ABBM is a biocompatible material; (3) ABBM of large and medium size granules are not totally reabsorbed at the observed period; (4) ABBM of small size granules was more intensively reabsorbed, and lead to a greater osteoid tissue formation when compared to the medium and large ABBM granules.

**Key-words:** bone substitutes; bone graft; bovine bone

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	4
2.1 O Tecido Ósseo	4
2.2 Matriz Óssea Bovina Anorgânica	7
2.2.1 Estudos Realizados em Animais	8
2.2.2 Estudos Realizados em Humanos	13
2.3 Estudos Sobre o Uso de Materiais de Preenchimento com Diferentes Granulações	16
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	18
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	19
4.1 Material	19
4.2 Método	20
4.2.1 Anestesia	20
4.2.2 Procedimento Cirúrgico	20
4.2.3 Sacrifício dos Animais	24
4.2.4 Método Radiográfico	25
4.2.5 Método Histológico	25
<b>5 RESULTADOS</b>	27
5.1 Análise Histológica	27
5.1.1 Período de 15 dias - Osso Autógeno	27
5.1.2 Período de 15 dias - Matriz de Granulação Fina	28
5.1.3 Período de 15 dias - Matriz de Granulação Média	29
5.1.4 Período de 15 dias - Matriz de Granulação Grossa	30

5.1.5 Período de 30 dias – Osso Autógeno	31
5.1.6 Período de 30 dias – Matriz de Granulação Fina	32
5.1.7 Período de 30 dias – Matriz de Granulação Média	33
5.1.8 Período de 30 dias – Matriz de Granulação Grossa	34
5.1.9 Período de 60 dias – Osso Autógeno	35
5.1.10 Período de 60 dias – Matriz de Granulação Fina	36
5.1.11 Período de 60 dias – Matriz de Granulação Média	37
5.1.12 Período de 60 dias – Matriz de Granulação Grossa	38
5.2 Análise Radiográfica	39
5.2.1 Osso Autógeno	39
5.2.2 Matriz de Granulação Fina	40
5.2.3 Matriz de Granulação Média	41
5.2.4 Matriz de Granulação Grossa	42
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Procedimentos cirúrgicos envolvendo a região maxilofacial freqüentemente requerem o uso de enxertos ósseos para a reconstrução de deformidades congênitas ou adquiridas, assim como para correções esqueléticas com finalidade estética. Os enxertos ósseos são utilizados para preencher defeitos ósseos, oferecer suporte estrutural e reconstruir áreas deficientes. Especificamente na cavidade oral, a perda de tecido ósseo pode ocorrer gradualmente quando associada a alguma patologia ou, algumas vezes, como resultado de algum tratamento que porventura tenha sido instituído. Isto é observado rotineiramente naqueles pacientes que foram submetidos a exodontias e evoluem com atrofia progressiva do rebordo alveolar (Dahlin, 1996; Pecora *et al.*, 1997).

É amplamente aceito que o tecido ósseo está sujeito a um intenso processo de remodelação durante toda a vida de um indivíduo. Isto traz inúmeros benefícios, porém, naquelas situações em que ocorre restrição da quantidade de cargas dissipadas através de sua macro e microestrutura, invariavelmente ocorrerá algum grau de reabsorção e conseqüente diminuição de seu volume. Isto é observado de maneira freqüente em pacientes edêntulos cujo osso alveolar atrofia-se progressivamente (Fiorellini & Nevins, 1996)

A despeito de sua marcante capacidade de reparação e neoformação óssea, existem algumas situações nas quais estes eventos não ocorrem espontaneamente. Isto pode ser observado, de fato, em defeitos extensos. Nestes casos, o emprego da terapia cirúrgica passa a ser condição *sine qua non* para que se observe

formação de tecido ósseo (Restrepo *et al.*, 1998). O objetivo destes procedimentos é estimular ou ao menos facilitar o crescimento de osso em uma dada região, e isto pode ser obtido por meio da utilização de enxertos autógenos, enxertos homólogos, biomateriais ou ainda, uma associação destes (Jensen *et al.*, 2006).

O enxerto ósseo autógeno, que pode ser obtido de sítios doadores intra ou extra-orais é considerado o material de eleição para as cirurgias reconstrutivas. Isto se deve ao fato de possuir propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas. A principal desvantagem deste tipo de abordagem é a morbidade associada à área doadora, limitação na quantidade de enxerto obtido e elevação global do custo do tratamento (Kübler *et al.*, 2004).

Com o objetivo de evitar a abordagem de áreas doadoras para obtenção de enxerto ósseo, os biomateriais vêm sendo desenvolvidos. A vantagem óbvia do seu uso é a diminuição tanto da morbidade do ato operatório quanto do tempo necessário para sua execução. Idealmente, um material que venha a ser empregado como substituto ósseo deve ser biocompatível, apresentar propriedades mecânicas satisfatórias e influenciar de forma positiva os processos de osteocondução e osteoindução (Dupoirieux *et al.*, 1994). Estes materiais foram definidos em 1986, pela Sociedade Européia, como sendo qualquer substância, droga ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por um período ou definitivamente para repor algum tecido ou função do corpo (Gomes, 2002). Quanto à origem podem ser classificados em:

**HOMÓGENOS:** obtidos de indivíduos de espécie semelhante ao receptor. Estes são os materiais que mais se aproximam dos enxertos autógenos (Lynch *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1994).

**HETERÓGENOS OU XENÓGENOS:** obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor (Fonseca *et al.*, 1997).

**ALOPLÁSTICOS:** materiais sintéticos que podem ser de natureza metálica, cerâmica ou plástica. Esses materiais sintéticos são denominados como implantes. O seu papel fundamental é o preenchimento de defeitos ósseos, sem haver incorporação fisiológica (Okamoto *et al.*, 1994). Existe no mercado uma infinidade de materiais para este fim, como as hidroxiapatitas sintéticas e os vidros bioativos.

Dentre os materiais heterógenos disponíveis aos cirurgiões para a realização de procedimentos de reconstrução óssea, destaca-se a matriz óssea bovina anorgânica, a qual é amplamente comercializada a um custo acessível. Este biomaterial vêm sendo exaustivamente estudado há aproximadamente duas décadas, sendo comprovadamente biocompatível e eficaz como osteocondutor (Jensen *et al.*, 2006).

Ao se verificar as apresentações comerciais deste material, observa-se que a matriz óssea bovina anorgânica é disponibilizada sob a forma de grânulos com tamanhos variáveis.

Sabendo-se que quando da utilização do osso autógeno (Pallesen *et al.*, 2002), do biovidro (Schepers & Ducheyne, 1997) ou do osso homogêneo (Xu *et al.*, 2003) o tamanho das partículas, influencia o processo de reparo ósseo, questiona-se a possibilidade disto ser verdadeiro para a matriz óssea bovina anorgânica, justificando este trabalho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado constituído de uma porção orgânica e uma porção anorgânica. A porção orgânica corresponde a 33% deste tecido, sendo representada por colágeno tipo I, osteonectina, osteocalcina, proteína óssea morfogenética, proteoglicanas ósseas e sialoproteína óssea. Já a porção anorgânica é constituída por cristais de hidroxiapatita, que perfazem 67% do osso (Ten Cate, 2001). Uma característica marcante deste tecido conjuntivo é o fato de estar constantemente passando por remodelação, regeneração e substituição. Diferentemente da maioria dos tecidos, o osso tem o potencial de passar por processo de reparação sem que haja formação de cicatriz (Tong & Buchman, 2000; Taga *et al.*, 1997). Dentre as suas funções, destacam-se o suporte estrutural, a proteção de estruturas nobres e a reserva de minerais (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os processos de formação, reabsorção, reparação e remodelação do tecido ósseo são conduzidos pelos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. O evento de formação óssea é representado pela mineralização de proteínas da matriz extracelular produzida pelos osteoblastos. Quando permanecem acondicionados no interior da matriz mineralizada, estas células ficam organizadas em lacunas e passam a ser chamadas de osteócitos. Estes, comunicam-se com células adjacentes e com o meio extra-celular por meio de projeções citoplasmáticas localizadas em canálculos

dispostos no interior da matriz mineraliza. Já os osteoclastos, apresentam-se como células multinucleadas presentes na periferia das trabéculas. Estas células contêm substâncias que levam a um processo de osteólise, participando de maneira ativa nos processos de remodelação óssea e regulação dos níveis plasmáticos de cálcio (Junqueira & Carneiro, 1999).

Conforme citado anteriormente, a porção inorgânica do osso é constituída, em sua maioria, por cristais de hidroxiapatita de cálcio,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Suas dimensões aproximadas são de 30 a 45nm de comprimento e 5nm de largura, depositando-se ao longo das fibrilas colágenas de forma paralela. Existem ainda, em menor quantidade, fases não apatíticas com o carbonato de cálcio, dolomita, bruxita, fosfato de cálcio amorfo e fosfato octacálcico. Os poros do osso variam de 1 a 100 $\mu\text{m}$  de diâmetro no osso cortical e de 200 a 400 $\mu\text{m}$  no osso medular. Estas estruturas são fundamentais nos eventos de difusão de nutrientes, migração e expressão celular, remodelação e reparação do tecido (LeGeros, 2002).

Frente a algum evento que altere a homeostasia óssea, como a realização de ostectomias, ocorre a liberação de fatores de crescimento que irão ativar a reparação óssea local pela ação dos osteoblastos. Inúmeros fatores influenciam esta etapa, como por exemplo o tamanho do defeito, a vascularização local, o estado dos tecidos moles adjacentes, a presença de infecção, a associação de doenças sistêmicas, dentre outros (Pereira, 2006).

Uma vez que diversos modelos animais são utilizados para se estudar o reparo ósseo, assim como técnicas e materiais que possam vir a influenciá-lo de forma positiva, Roberts *et al.*, (1987) compararam as etapas deste processo fisiológico em seres humanos,

cães e coelhos. Concluíram que o reparo do osso cortical em coelhos é três vezes mais rápido que no homem, ou seja, ao fim de seis semanas o ciclo completo de remodelação está concluído.

Levando-se em consideração que a calota craniana de coelhos é um sítio largamente utilizado para o teste de biomateriais, e que freqüentemente mais de um defeito é realizado, Slotte *et al.* (2004) preocuparam-se em estudar a morforlogia óssea e a vascularização desta região. Após análise microangiográfica e histológica concluíram que não existe diferença significativa relacionada a estes quesitos para as diversas regiões do crânio do animal.

Hollinger & Kleinschmidt (1990) procuraram estabelecer o tamanho de defeitos ósseos críticos para alguns animais comumente utilizados em trabalhos experimentais. Neste estudo foi realizada avaliação histológica e radiográfica de ostectomias de diversos diâmetros realizadas em calota de coelhos e preenchidas apenas com coágulo sanguíneo. Os autores concluíram que, respeitando-se as condições experimentais, o tamanho do defeito ósseo no qual não ocorre reparação espontânea deve ser de pelo menos 15mm de diâmetro. Associando-se os achados histológicos de maturidade óssea às respectivas radiografias, estes autores observaram que o osso maturo apresenta radiopacidade semelhante àquela observada no tecido ósseo craniano adjacente.

## 2.2 MATRIZ ÓSSEA BOVINA ANORGÂNICA

A utilização de tecido ósseo de origem bovina em cirurgias reconstrutivas tornou-se bastante popular no último século, mais especificamente na década de 60. Contudo, pouco tempo após o seu aparecimento foi observado que alguns pacientes desenvolviam doenças auto-imunes após contato com este material. Assim, seu uso foi abandonado até a década de 90, quando novas técnicas para extração de proteínas dos fragmentos ósseos foram desenvolvidas. Este processamento reduz a antigenicidade do material, tornando-o mais tolerável pelos tecidos do hospedeiro (Basle *et al.*,1998). A matriz óssea bovina anorgânica vem sendo exaustivamente estudada sendo que, de acordo com Hilsbo *et al.* (1993) é um biomaterial altamente osteocondutivo, e que por esta razão auxilia a reparação de defeitos ósseos. Especificamente na odontologia, este material é utilizado para o preenchimento de lesões isoladas, defeitos periodontais, fenestrações em implantes e eventualmente em cirurgias de levantamento do seio maxilar (Gomes, 2002).

Alguns autores levantaram questionamentos quanto à possibilidade de transmissão de doenças bovinas aos seres humanos por meio de enxertos ósseos (Sogal & Tofe, 1999). Em uma revisão bastante abrangente, Wenz *et al.* (2001) discutem de forma exaustiva o mecanismo de inativação do príon responsável pela encefalopatia espongiiforme bovina ou doença de Creutzfeldt-Jakob. Baseados em alguns conceitos teóricos e evidência experimental, estes autores concluem que as etapas de processamento do osso fazem com que o risco de transmissão desta doença aos seres humanos fique extinto.

Mais recentemente, algumas tentativas vêm sendo feitas no sentido de se obter melhores resultados em termos de formação óssea com o uso do osso bovino. Para tanto, fatores de crescimento como a proteína óssea morfogenética vêm sendo adicionados às partículas do biomaterial. Serra e Silva *et al.* (2006) selecionaram pacientes portadores de edentulismo em região posterior de maxila bilateralmente e com pneumatização dos seios maxilares. Em um dos lados (grupo controle) foi realizado o procedimento de levantamento de assoalho do seio maxilar e preenchimento deste com osso autógeno triturado. No lado oposto, o preenchimento foi realizado com matriz óssea bovina inorgânica associada a proteína óssea morfogenética bovina. Após um período de 6 a 11 meses, foi realizada instalação de implantes e biópsias das regiões. Clinicamente o travamento inicial dos implantes foi menor no lado tratado com biomaterial, porém, em todos os casos a foi possível a sua instalação. Histologicamente, o tecido ósseo apresentava-se menos maturo e entremeado por uma porção de tecido conjuntivo fibroso.

### **2.2.1 ESTUDOS REALIZADOS EM ANIMAIS**

Trabalhos experimentais utilizando este biomaterial em animais foram iniciados na década de 90. Pinholt *et al.*, no ano de 1991 utilizaram implantaram partículas de matriz óssea bovina anorgânica sinterizada e não sinterizada na maxila e músculo abdominal de ratos. Assim, os animais foram divididos em dois grupos:

- **Grupo I:** os materiais foram implantados na maxila e músculos abdominais. De um lado foi implantada a forma sinterizada enquanto que do outro foi utilizada a forma não sinterizada.
- **Grupo II:** os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a implantação do material.

Neste estudo o período experimental foi de 4 semanas e, ao término deste, os autores observaram não ter ocorrido osteocondução em nenhum dos sítios operados, tanto para a forma sinterizada quanto para a forma não sinterizada. O material encontrava-se envolto por tecido conjuntivo. Ainda, na região abdominal estavam presentes algumas células gigantes, caracterizando uma reação do tipo corpo estranho. Na maxila, a absorção parcial de alguns dos grânulos foi observada. Os autores concluíram que ambas as formas do biomaterial não eram biocompatíveis.

Apesar dos resultados apresentados anteriormente, Klinge *et al.* (1992) compararam a MOBA com a uma hidroxiapatita sintética não absorvível. Este estudo foi realizado em defeitos ósseos criados na calota de coelhos. Para tanto, quatro grupos distintos foram criados:

- **Grupo I:** matriz óssea bovina anorgânica.
- **Grupo II:** hidroxiapatita de granulação fina
- **Grupo III:** hidroxiapatita de granulação grossa
- **Grupo IV:** coágulo sangüíneo

Após 14 semanas, a análise histológica revelou que os grupos I e II apresentaram deposição óssea junto às partículas, ao passo que no grupo III ocorreu pouca formação de tecido ósseo no defeito.

No ano de 1994, Okamoto *et al.*, analisaram o processo de reparo ósseo de defeitos criados em tíbias de ratos. Após análise histológica, os autores concluíram que o osso bovino anorgânico permite o crescimento de tecido conjuntivo e a sua posterior diferenciação em tecido ósseo, não havendo retardo do processo de reparação. Os autores também observaram que 50% do material permanecia nas cavidades, em íntimo contato com o osso neoformado.

Com o objetivo de avaliar a qualidade do osso neoformado assim como o comportamento do biomaterial ao redor de implantes de titânio, Berglundh & Lindhe (1997) selecionaram três grupos de cães, divididos da seguinte forma:

- **Grupo I:** os defeitos foram preenchidos com osso bovino anorgânico, sem a colocação de implantes de titânio.
- **Grupo II:** os defeitos foram preenchidos com osso bovino anorgânico e foram instalados implantes osseointegrados.
- **Grupo III:** o defeito não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Após 3 meses, a análise histológica demonstrou que no grupo I as partículas estavam rodeadas por uma matriz osteóide, enquanto no grupo II as partículas do biomaterial estavam separadas do implante por uma fina camada de tecido ósseo mineralizado. Ao término de 7 meses, em ambos os grupos em que foi utilizado, o material encontrava-se totalmente integrado ao tecido ósseo adjacente, o qual se apresentava caracteristicamente maturo.

Uma vez que a comunidade científica passou a apoiar o uso do osso bovino anorgânico, outros trabalhos foram desenvolvidos no sentido de compará-lo com outros biomateriais e de elucidar o seu

comportamento em áreas onde foi realizada a instalação de implantes osseointegrados. Outra questão que permanecia sem resposta era relacionada à possibilidade das partículas do osso bovino anorgânico sofrerem absorção. McAllister *et al.* (1999), realizaram a elevação da mucosa do seio maxilar em chimpanzés fazendo uso deste material. Após 18 meses os animais foram sacrificados e a região foi analisada histologicamente, onde se observou a presença de partículas incorporadas ao tecido ósseo.

Ruhaimi, no ano de 2001, realizou um estudo em coelhos para testar o processo de reparação óssea frente ao uso de alguns substitutos ósseos. O autor realizou defeitos ósseos com 5mm de diâmetro e 8mm de profundidade em tíbias de coelhos, os quais foram preenchidos com osso bovino anorgânico, biovidro e hidroxiapatita sintética. Após análise histológica à microscopia óptica e à microscopia eletrônica de varredura, os autores concluíram que o biomaterial com maior potencial osteocondutivo foram os grânulos de osso bovino anorgânico, seguido pelo biovidro e hidroxiapatita respectivamente.

Tamini *et al.* (2006) utilizaram a matriz óssea bovina anorgânica para o preenchimento de defeitos em calvária de coelhos e observaram que este material apresenta propriedade osteocondutiva. No entanto, durante as 4 semanas correspondentes ao período experimental, a reabsorção das partículas do biomaterial foi desprezível.

Com o objetivo de comparar a matriz óssea bovina anorgânica com o fosfato tricálcico- $\beta$ , Jensen *et al.*, no ano de 2006, utilizaram 12 mini-porcos nos quais foram confeccionados três defeitos ósseos bilateralmente nos ângulos mandibulares. Estes

foram preenchidos com matriz óssea bovina anorgânica, fosfato tricálcico- $\beta$  e osso autógeno particulado (grupo controle). Os animais foram sacrificados após 1, 2, 4 e 8 semanas e os espécimes submetidos a análise histológica e histomorfométrica. Os resultados indicam que após 2 semanas o grupo controle apresentava maior neoformação óssea que os dois grupos experimentais. Após 4 semanas, a quantidade de osso neoformado nos defeitos preenchidos com matriz óssea bovina anorgânica era significativamente menor do que aquela observada no grupo controle e no outro grupo experimental. Ao término de 8 semanas os autores observaram uma maior neoformação óssea nos defeitos tratados com enxerto autógeno, seguido daqueles preenchidos por fosfato tricálcico- $\beta$ , seguido pela matriz óssea bovina anorgânica. Em relação à reabsorção das partículas dos biomateriais, ficou claro que ao término do período experimental o fosfato tricálcico- $\beta$  havia sido totalmente reabsorvido, ao passo que a matriz óssea bovina permaneciam estáveis. Os resultados obtidos levam os autores a concluir que ambos os materiais de preenchimento testados retardaram o processo de reparação nas fases iniciais, porém mais tardiamente foram totalmente incorporados por tecido ósseo, o que comprova a sua biocompatibilidade. Em relação ao fato da matriz óssea bovina anorgânica não ser totalmente reabsorvida, estes autores citam que esta pode ser uma qualidade desejável, especialmente naquelas situações em que a demanda mecânica é maior.

## 2.2.2 ESTUDOS REALIZADOS EM HUMANOS

No ano de 1993, Callan & Rohrer relatam o uso do osso bovino anorgânico na reconstrução dos rebordos alveolares de dois pacientes. Após 120 dias, biópsias destas áreas evidenciaram pouca reação inflamatória e ausência de reação de corpo estranho. Observa-se um contato íntimo do osso nativo com os grânulos do biomaterial.

Em 1997, Skoglund *et al.*, realizaram análise histológica de rebordos alveolares atróficos que foram reconstruídos com osso bovino anorgânico e posteriormente receberam implantes osseointegrados. Após um período que variou de 9 a 44 meses, foi possível observar que as partículas do material eram biocompatíveis, uma vez que se encontravam misturadas ao osso neoformado e sem evidências de processo inflamatório. Outros autores, como Zitzmann *et al.* (1991) corroboram este resultado e acrescentam que mesmo 4 anos após a inserção do biomaterial algumas de suas partículas encontram-se presentes e incorporadas ao tecido ósseo.

Norton *et al.* (1991) estudaram histológica e histometricamente o comportamento da matriz óssea bovina anorgânica para a reconstrução de pequenos defeitos alveolares visando a posterior instalação de implantes osseointegrados em 15 pacientes. Biópsias foram obtidas após um período médio de 26 semanas. As seguintes características foram observadas no fragmento ósseo: 26,9% de sua totalidade estava ocupada por tecido ósseo; 25,6% estava ocupada por biomaterial e 47,4% por tecido fibroso. Os autores concluem que este biomaterial é um osseocondutor adequado, pois permitiu a neoformação óssea em

defeitos pós-exodontia e levantamento de seio maxilar, havendo um contato íntimo entre o osso e as partículas.

No ano de 2003, Mural *et al.* realizou 15 procedimentos de elevação do assoalho do seio maxilar em 11 pacientes. Como material de preenchimento foi utilizada a matriz óssea bovina anorgânica misturada ao sangue venoso coletado do próprio paciente. Após um período médio de 6,8 meses, quando da instalação dos implantes osseointegrados biópsias foram obtidas e submetidas a análise histológica e histomorfométrica. Os resultados indicaram presença de osso neoformado da ordem de 14,7% . Da mesma forma, 29,7% do volume era ocupado por grânulos do biomaterial. Estes grânulos apresentavam contato direto com o osso neoformado em cerca de 29,1% de sua superfície. Decorridos 6 meses da instalação dos implantes osseointegrados, especificamente na fase de reabertura, os autores observaram um índice de perda primária destes implantes da ordem de 10,5%. As conclusões deste trabalho são que o biomaterial em questão é osteocondutivo e apresenta uma taxa de reabsorção bastante lenta. Além disso, o seu uso em cirurgias de elevação do assoalho do seio maxilar possibilita a instalação de implantes osseointegrados com taxas de sucesso aceitáveis.

Com o objetivo de avaliar a efetividade da matriz óssea bovina anorgânica no recobrimento de roscas de implantes não submersos que haviam sido inseridos em rebordos alveolares com largura óssea insuficiente, De Boever & De Boever (2005) selecionaram 13 pacientes que, durante a instalação de 16 implantes, apresentaram fenestrações vestibulares de 3 a 9mm. Durante o ato cirúrgico os autores trataram estes defeitos com o biomaterial, o qual foi recoberto por uma membrana não absorvível de

politetrafluoretileno expandido. No momento da remoção desta (24 semanas após a instalação) 14 implantes apresentavam todas as roscas recobertas por um tecido ricamente vascularizado. Apenas 2 implantes não tiveram as suas roscas totalmente recobertas, sendo que 1 deles não se encontrava osseointegrado. Após a instalação das coroas, o acompanhamento clínico e radiográfico (12 a 114 meses) não revelou alterações inflamatórias ou infecciosas, excetuando-se 1 caso no qual foi observada perda óssea marginal de 3mm, porém sem interferir com a estabilidade do implante.

Proussaefs & Lozada (2006) avaliaram clínica, histológica e radiograficamente o uso da matriz óssea bovina anorgânica associada ao osso autógeno particulado em procedimentos de aumento de rebordo alveolar para posterior instalação de implantes. Neste estudo 17 pacientes foram submetidos ao procedimento reconstrutivo por meio de uma mistura de osso autógeno e matriz óssea bovina anorgânica em uma proporção de 1:1. O período médio de espera para a instalação dos implantes osseointegrados, possível em todos os casos, foi de 8,47 meses, sendo que neste momento foram realizadas biópsias com trefina. O exame histológico e histométrico revelou ter ocorrido neoformação óssea da ordem de 36,47% e de tecido conjuntivo da ordem de 49,18%. Ainda, as partículas do biomaterial ocupavam 14,35% do fragmento obtido durante a biópsia. O contato entre as partículas da matriz óssea bovina e o osso neoformado foi da ordem de 44,65%, o que põe em evidência a propriedade osteocondutiva do material. Os autores concluem que a associação da matriz óssea bovina anorgânica ao osso autógeno obtido de fontes intra-orais propicia volume ósseo adequado à instalação de implantes osseointegrados.

## 2.3 ESTUDOS SOBRE O USO DE MATERIAIS DE PREENCHIMENTO COM DIFERENTES GRANULAÇÕES

Xu *et al.*, 2003 realizaram cirurgias de elevação do seio maxilar em coelhos utilizando como material de preenchimento partículas de osso homogêneo anorgânico com duas diferentes granulações (300 a 500 $\mu\text{m}$  e 850-1000 $\mu\text{m}$ ). Os animais foram sacrificados após 1, 4 e 8 semanas e os cortes histológicos avaliados ao microscópio óptico. Os resultados demonstraram a ausência de infiltrado inflamatório em todos os grupos sendo que a qualidade do osso neoformado foi melhor quando da utilização de partículas menores. Assim, estes autores concluem que a capacidade osteocondutiva do osso homogêneo anorgânico é tão maior quanto menor for o tamanho dos fragmentos do material de preenchimento. Este estudo evidenciou que o crescimento ósseo se dá a partir das paredes ósseas do seio maxilar e que é facilitado pelo espaço interparticular, uma vez que o osso de granulação fina dispõe-se de forma a apresentar um maior espaçamento entre as partículas, o qual é tomado por tecido ósseo neoformado.

Pallesen *et al.* (2002), testaram a influência do tamanho das partículas do enxerto de osso autógeno em defeitos criados na calvária de coelhos. Foram utilizados fragmentos com volume de 0.5 a 2mm<sup>3</sup> e 10mm<sup>3</sup> e os animais foram sacrificados e analisados após 1 e 4 semanas. A microscopia óptica revelou que naqueles defeitos em que foi utilizada a granulação menor ocorreu maior neoformação óssea. Observaram também que ao término dos 28 dias, os fragmentos ósseos menores foram substituídos por osso neoformado de forma mais intensa do que observado para os fragmentos maiores.

Coradazzi, no ano de 2003, estudou o processo de reparação óssea em defeitos de 7mm criados na tíbia de coelhos quando fazia uso de enxerto autógeno na forma triturada ou na forma obtida por meio de coletor ósseo associado ao aspirador cirúrgico. O autor salienta que o osso autógeno triturado apresentava partículas significativamente maiores que aquele obtido em coletor. Os animais foram sacrificados aos 7, 15 e 30 dias, sendo que a análise histológica e histomorfométrica revelou não haver diferença significativa entre os dois grupos, porém, a neoformação óssea foi significativamente maior do que observado no grupo controle (coágulo sangüíneo).

Schepers & Ducheyne (1997) estudaram o processo de reparo ósseo de defeitos criados em rebordos alveolares de cães quando se utilizava partículas de biovidro com diferentes tamanhos (300 a 355 $\mu$ m e 350 a 710 $\mu$ m). Três meses após sua implantação, os animais foram sacrificados e a região analisada histológica e histometricamente. Os resultados demonstraram que as partículas menores proporcionaram a formação de maior quantidade de tecido ósseo, ao passo que no grupo onde foram utilizadas partículas maiores estava presente grande quantidade de tecido fibroso. Os autores concluem que as partículas menores têm potencial osteocondutor maior que aquelas de maior tamanho.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O propósito do presente estudo foi avaliar histológica e radiograficamente a influência do tamanho das partículas de matriz óssea bovina anorgânica sobre o processo de reparação óssea de defeitos criados cirurgicamente na calvária de coelhos.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 MATERIAL

Foram utilizados 18 coelhos brancos da raça *New Zealand*, machos, com idade variando entre 04 e 06 meses e peso corporal médio de 2,9 kg, procedentes do Biotério Central do campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas, à temperatura ambiente e, durante todo o período experimental receberam dieta sólida e água à vontade. Estes animais foram divididos igualmente e sacrificados em três períodos diferentes: 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

Esta pesquisa foi desenvolvida respeitando-se os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP sob protocolação número 858-1 (Anexo 1).

## **4.2 MÉTODO**

### **4.2.1 ANESTESIA**

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia geral. Com o objetivo de controlar a bradicardia provocada pelo anestésico, cinco minutos antes da sua administração foi aplicada atropina 1% na dose de 0,15ml/kg de peso, por via subcutânea. Após, Ketamina e solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6dihidro-4-H-1,3-tiazin foram aplicados numa concentração de 0,5ml/kg de peso, por via intramuscular profunda (Massone, 1994).

### **4.2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

As intervenções cirúrgicas foram realizadas sob condições assépticas utilizando-se instrumental e campos esterilizados em autoclave, sob pressão de 15 libras e temperatura de 134°Celsius por um período de 20 minutos.

O ato operatório foi conduzido respeitando-se o protocolo cirúrgico descrito por Alberius *et al.* (1989) e Alberius & Johnel (1991). Após o preparo do animal (tricotomia e aplicação tópica de solução aquosa de polivinilpirrolidona iodo a 10%), uma incisão linear de aproximadamente 4 centímetros através da pele e subcutâneo, estendendo-se da região inter-orbital até a região occipital, foi

realizada com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Becton & Dickson, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, o periósteo subjacente foi incisado, descolado e afastado, expondo a porção óssea do crânio do animal (Figura 1).

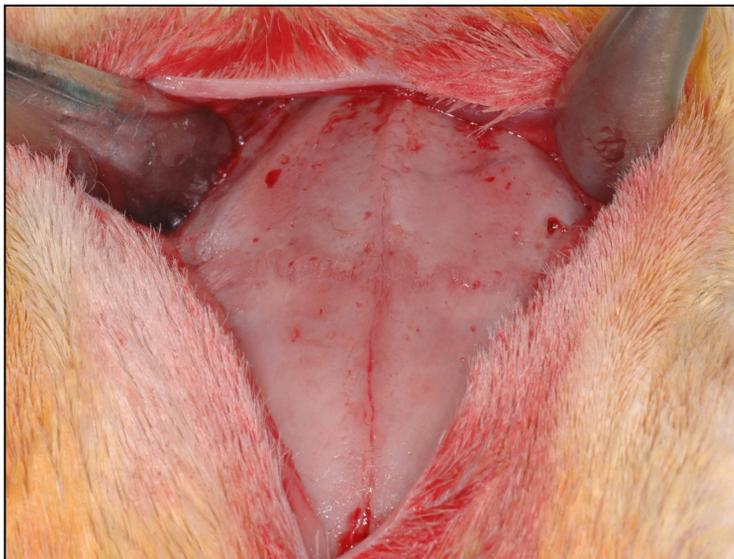


Figura 1: Acesso cirúrgico e exposição da calvária.

Duas cavidades foram produzidas na região parietal direita e outras duas na região parietal esquerda, com o cuidado de se manter a integridade da dura-máter. Nesta etapa, foi utilizada uma broca trefina com 8 milímetros de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil), acoplada a um contra-ângulo redutor 16:1 montado em um motor elétrico, o que proporcionou um total de 1500 rotações por minuto. A refrigeração da broca e tecido ósseo foi realizada por meio de irrigação constante com solução de cloreto de sódio a uma concentração de 0,9%. Uma vez concluídas as perfurações, a porção óssea delimitada pela trefina foi delicadamente removida com o auxílio de um descolador de periósteo. Assim, ao término desta etapa 4 cavidades estavam presentes na calvária de cada animal (Figura 2).

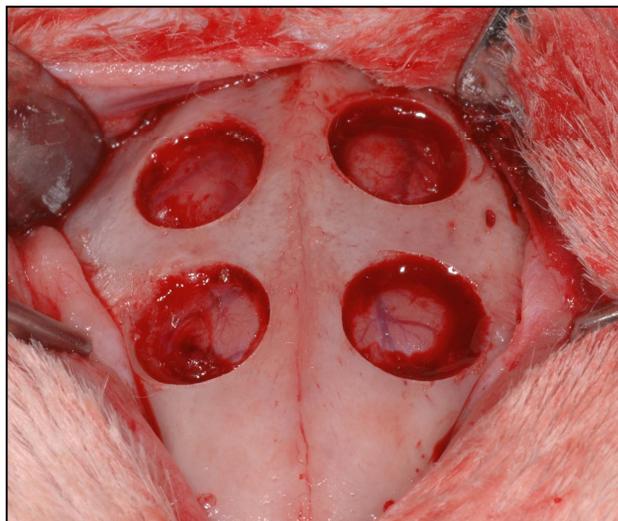
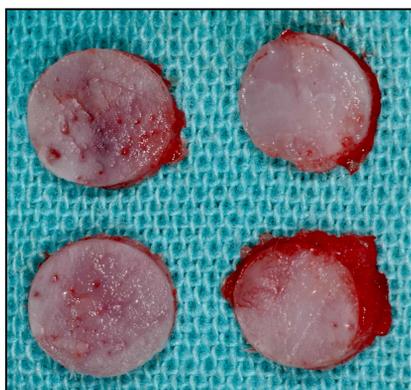


Figura 2: Confeção dos defeitos ósseos.

Os fragmentos ósseos removidos foram triturados em particulador ósseo (Neodent, Curitiba, Brasil) e mantidos hidratados em soro fisiológico até o momento de sua utilização (Figuras 3 e 4). De acordo com o fabricante, o tamanho dos fragmentos obtidos quando da trituração de osso cortical varia de 1,2 a 2,6mm de comprimento por 0,5mm de espessura.



Figuras 3e 4: Fragmentos ósseos após remoção e trituração.

De acordo com a posição, as cavidades foram numeradas. A cavidade localizada mais anteriormente do lado direito foi denominada cavidade número I. Aquela localizada mais

posteriormente do lado direito foi denominada número II. No lado esquerdo, as cavidades localizadas mais anteriormente e mais posteriormente foram denominadas III e IV respectivamente.

Em todos os animais o preenchimento das cavidades foi realizado respeitando-se o seguinte protocolo: a cavidade I foi preenchida com osso autógeno triturado; a cavidade II foi preenchida com matriz óssea bovina anorgânica de granulação grossa (750 a 1000 $\mu$ m); a cavidade III foi preenchida com matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina (menor que 450 $\mu$ m); a cavidade IV foi preenchida com matriz óssea bovina anorgânica de granulação média (450 a 749  $\mu$ m), como se observa nas figuras 5 e 6. O biomaterial, em suas três granulações, foi fornecido pelo mesmo fabricante (Consulmat Produtos Técnicos Ind. e Com. Ltda. São Carlos, SP – Brasil)



Figura 5: Aspecto macroscópico das três diferentes granulações.

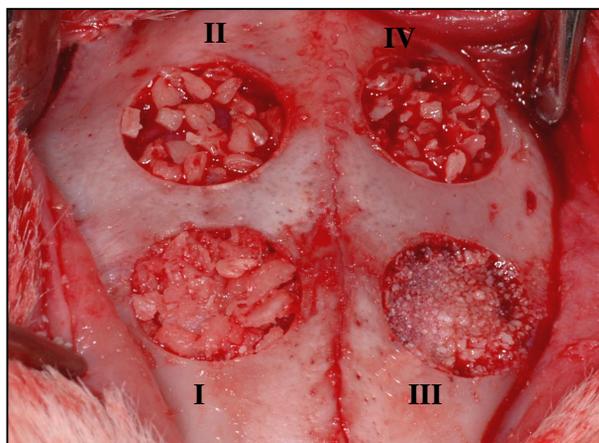


Figura 6: cavidades ósseas preenchidas.

Posteriormente, o periósteo foi reaproximado por meio de suturas com fio reabsorvível (poliglactina 910). Os planos superficiais foram suturados com fio de nylon monofilamentar número 4-0.

Todos os animais receberam Penicilina Benzatina em dose única de 0,1ml/kg, por via intramuscular, segundo as recomendações do fabricante. O controle da dor foi feito pela administração de 0,1 ml de Dipirona Sódica (500mg/ml) por via intramuscular a cada 6 horas durante os três primeiros dias pós-operatórios.

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

#### **4.2.3 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS**

Os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30 e 60 dias de pós-operatório, num total de 6 animais para cada período de sacrifício. Foi utilizada uma superdose da mistura anestésica contendo Ketamina e solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6dihidro-4-H-1,3-tiazin, para o sacrifício dos animais. Após isto, procedeu-se a remoção dos blocos ósseos contendo as cavidades.

#### **4.2.4 MÉTODO RADIOGRÁFICO**

Antes de se iniciar o processo de descalcificação das peças, foram obtidas radiografias em filme oclusal simples do grupo de sensibilidade F (kodak insight, Eastman Kodak Company, New York, USA). Para tanto, fez-se uso do aparelho de radiografias intra-buciais GE 100 (General Electric Company, Milwaukee, USA), com uma regulagem de 60kV e 10mA com tempo de exposição de 0,25 segundos.

Os filmes foram processados em processadora automática modelo Dent-X 9000 (Dent-X Visionary Imaging, New York, USA), com tempo de seco à seco de 5 minutos. Foram utilizadas soluções químicas para revelação e fixação do tipo T-mat (Eastman Kodak Company, New York, USA). Após este processo, os filmes foram acondicionados em cartelas próprias e analisados em sala de interpretação radiológica. A análise destas imagens utilizou como padrão de comparação o osso do crânio que não estava envolvido nas áreas de ostectomia.

#### **4.2.5 MÉTODO HISTOLÓGICO**

As porções das calvárias dos animais que continham as cavidades foram imersas em solução de formaldeído 10% em tampão fosfato por um período de 48 horas; a seguir foram lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificados em solução de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (citrato de sódio) a 20% e  $\text{HCOOH}$  (ácido fórmico) a 50% em partes iguais (Morse, 1945), durante um período de 62 dias.

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

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

#### 5.1.1 PERÍODO DE 15 DIAS - OSSO AUTÓGENO

À microscopia óptica (figura 7) observa-se um nítido limite da cavidade. Estão presentes os fragmentos ósseos utilizados para o preenchimento do defeito, os quais apresentam uma característica madura, representada pela presença de inúmeros osteócitos.

A cavidade encontra-se repleta de vasos sangüíneos. Pela ausência de macrófagos sugere-se que o processo inflamatório, neste momento, seja desprezível. Intensa atividade osteoblástica pode ser visualizada, estando evidentes as áreas de reabsorção das partículas do enxerto e a sua substituição por osso imaturo. Ainda, existem trabéculas ósseas neoformadas entremeadas por tecido conjuntivo denso.

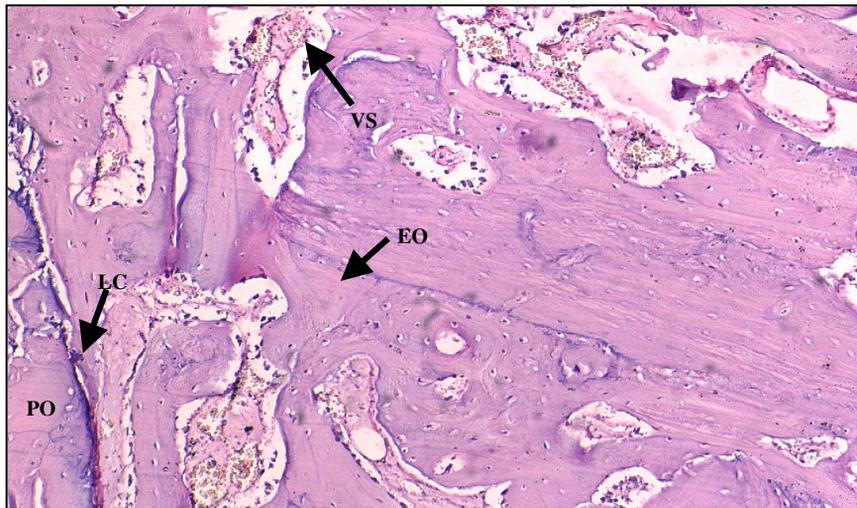


Figura 7: fotomicroscopia após 15 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **LC**: limite da cavidade. **EO**: enxerto ósseo. **VS**: vaso sangüíneo.

### 5.1.2 PERÍODO DE 15 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO FINA

Existe um limite nítido entre o osso do animal e a cavidade cirúrgica, a qual se encontra preenchida por partículas do biomaterial e trabéculas imaturas, ambas entremeadas por tecido conjuntivo fibroso. Inúmeros macrófagos estão presentes, o que sugere um intenso processo inflamatório. Alguns vasos sanguíneos podem ser visualizados, porém em menor quantidade que no grupo controle (figura 8).

As partículas de matriz óssea bovina anorgânica encontram-se em fase de remodelação, estando evidente as áreas de reabsorção e formação de tecido osteóide ao seu redor, o que lhes confere a característica de osteocondutoras. Também fica clara a formação de trabéculas ósseas a partir das paredes laterais da cavidade, local onde a atividade osteoblástica é intensa.

Em nenhuma das lâminas foi possível observar a presença de células gigantes, o que indicaria uma reação do tipo corpo estranho.

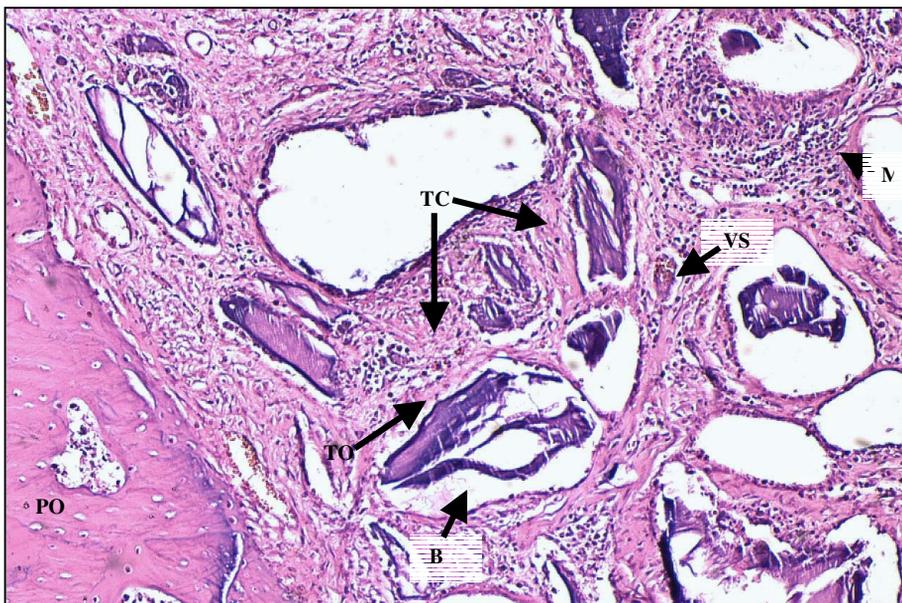


Figura 8: fotomicroscopia após 15 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: macrófagos. **B**: biomaterial. **VS**: vaso sanguíneo. **TC**: tecido conjuntivo. **TO**: tecido osteóide.

### 5.1.3 PERÍODO DE 15 DIAS – MATRIZ DE GRANULAÇÃO MÉDIA

À microscopia óptica observa-se que as bordas do defeito são nítidas, sendo que este se encontra preenchido por partículas do biomaterial e algumas trabéculas ósseas imaturas, ambas entremeadas por tecido conjuntivo fibroso.

Intenso processo inflamatório está presente, o qual é evidenciado pelo grande número de macrófagos na região. Numerosos vasos sanguíneos podem ser observados, sendo que alguns deles apresentam seu trajeto no interior da partícula.

As partículas se encontram em processo de reabsorção. Em algumas áreas ocorre aposição óssea ao seu redor, revelando atividade osteocondutiva do material.

Próximo às paredes laterais dos defeitos pode-se observar a presença de trabéculas ósseas neoformadas com intensa atividade osteoblástica (figura 9).

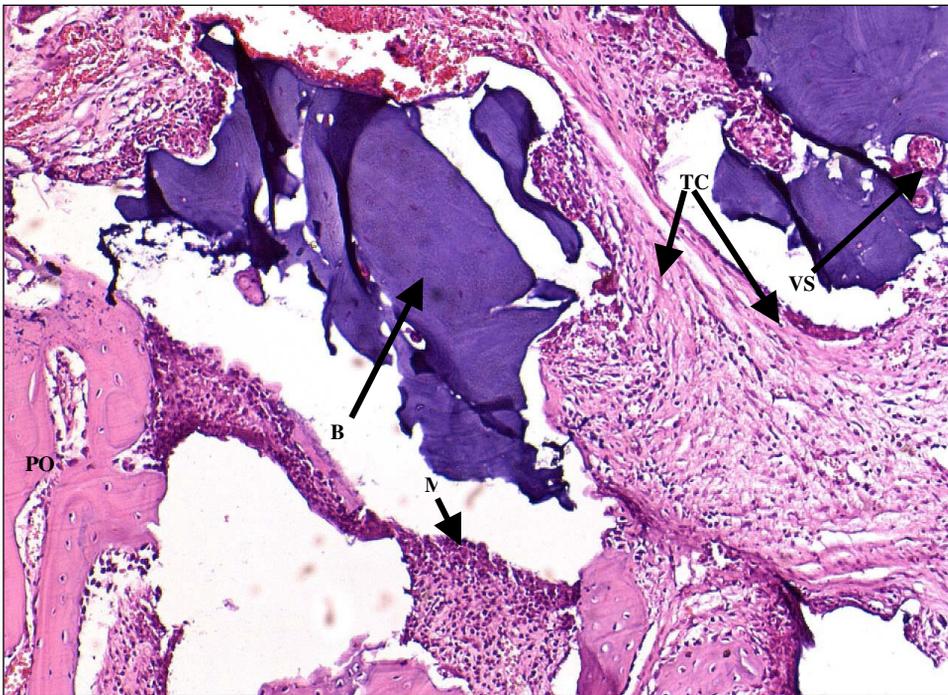


Figura 9: fotomicroscopia após 15 dias. 10x (HE). PO: parede óssea. M: macrófagos. B: biomaterial. VS: vaso sanguíneo. TC: tecido conjuntivo.

#### 5.1.4 PERÍODO DE 15 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO GROSSA

O exame microscópico (figura 10) revelou o defeito ósseo com nítidos limites, estando preenchido por partículas do biomaterial. Pequenas áreas de reabsorção e aposição óssea estavam presentes na periferia destas. Entremeando-se às partículas, em toda a extensão do defeito, encontra-se um tecido conjuntivo do tipo fibroso.

Uma característica marcante é a presença de um intenso processo inflamatório, representado por uma grande quantidade de macrófagos na região. Numerosos vasos sanguíneos podem ser observados. Eventualmente alguns destes vasos penetram as partículas.

Na porção periférica do defeito observa-se a presença de trabeculado ósseo, no qual a atividade osteoblástica é intensa.

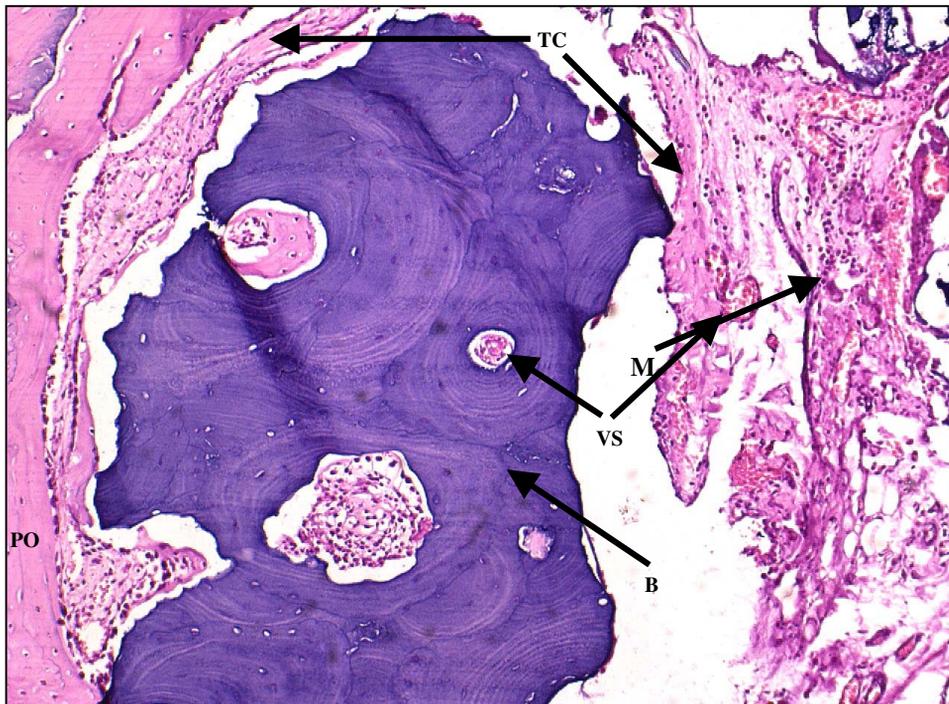


Figura 10: fotomicroscopia após 15 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: macrófagos. **B**: biomaterial. **VS**: vaso sanguíneo. **TC**: tecido conjuntivo.

### 5.1.5 PERÍODO DE 30 DIAS - OSSO AUTÓGENO

A microscopia revela, em linhas gerais, a presença do defeito com limites nítidos, uma grande quantidade de vasos sangüíneos, intensa atividade osteoblástica em toda extensão da cavidade e processo inflamatório moderado.

Entremeando-se às partículas do enxerto, as quais se encontram parcialmente absorvidas, existe uma quantidade razoável de trabéculas ósseas neoformadas, assim como tecido conjuntivo fibroso. É importante salientar que as trabéculas neoformadas estão presentes em toda a cavidade, desde sua porção central até a periferia. As áreas de reabsorção e aposição óssea são expressivas, havendo a formação de uma grande quantidade de tecido osteóide (figura 11).

Em relação ao período de 15 dias, o tecido ósseo está relativamente mais amadurecido. Isto pode ser comprovado pelo aumento do número de osteócitos, pela maior reabsorção das partículas e pela maior quantidade de tecido osteóide substituindo o tecido conjuntivo fibroso.

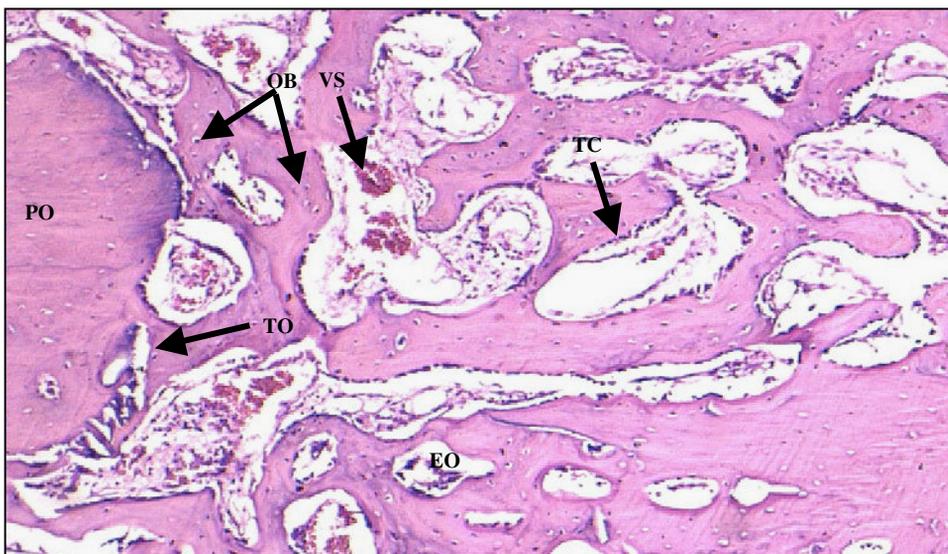


Figura 11: fotomicroscopia após 30 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: macrófagos. **EO**: enxerto ósseo. **VS**: vaso sangüíneo. **TC**: tecido conjuntivo. **OB**: osteoblastos. **TO**: trabéculas ósseas.

### 5.1.6 PERÍODO DE 30 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO FINA

O exame de microscopia óptica (figura 12) demonstra que a cavidade óssea apresenta limites bem definidos, estando preenchidas por partículas do biomaterial. Estas, por sua vez, encontram-se mais reabsorvidas quando comparadas ao período anterior. Da mesma forma observa-se um decréscimo na intensidade do processo inflamatório. Os vasos sanguíneos são abundantes, porém ocorrem em menor quantidade que no grupo controle (osso autógeno).

Entremeando as partículas está presente uma quantidade importante de tecido conjuntivo fibroso. Existe uma grande quantidade de tecido osteóide formando-se a partir do biomaterial, sendo que em algumas áreas, este se encontra totalmente envolto por tecido ósseo. Eventualmente, algumas trabéculas ósseas formam-se a partir das partículas, porém, a maioria origina-se a partir das paredes laterais do defeito ósseo. Ocorre intensa atividade osteoblástica nas trabéculas.



Figura 12: fotomicroscopia após 30 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: mastócitos. **B**: biomaterial. **VS**: vaso sanguíneo. **TC**: tecido conjuntivo. **OB**: osteoblastos. **TO**: trabéculas ósseas.

### 5.1.7 PERÍODO DE 30 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO MÉDIA

A microscopia óptica comum demonstra que o defeito ósseo encontra-se bem delimitado e preenchido por tecido conjuntivo fibroso entremeando-se às partículas, as quais encontram-se em fase de reabsorção. Uma pequena quantidade de tecido osteóide está presente. O processo inflamatório neste momento é moderado e numerosos vasos sanguíneos dispõem-se pela cavidade.

A atividade osteoblástica torna-se evidente nas trabéculas ósseas. Estas, por sua vez, concentram-se nas proximidades das paredes do defeito, estando praticamente ausentes em sua porção mais central. Nesta região observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso (figura 13).



Figura 13: fotomicroscopia após 30 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: mastócitos. **B**: biomaterial. **VS**: vaso sanguíneo. **TC**: tecido conjuntivo. **OB**: osteoblastos. **TO**: trabéculas ósseas.

### 5.1.8 PERÍODO DE 30 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO GROSSA

O exame microscópico (figura 14) revela a cavidade óssea bem delimitada e preenchida por partículas, as quais são envoltas por tecido conjuntivo fibroso. As áreas de reabsorção do material são marcantes, porém, neste momento, observa-se pouca aposição óssea junto às partículas. O processo inflamatório presente é do tipo moderado e alguns vasos sanguíneos estão presentes.

Observa-se o crescimento de trabéculas ósseas a partir das paredes laterais, as quais se dirigem em menor proporção, ao centro da cavidade, estando praticamente ausentes nesta região. Existe pouca quantidade de tecido osteóide que se localiza exclusivamente na porção periférica do defeito. É justamente nesta região que se observa atividade osteoblástica importante.

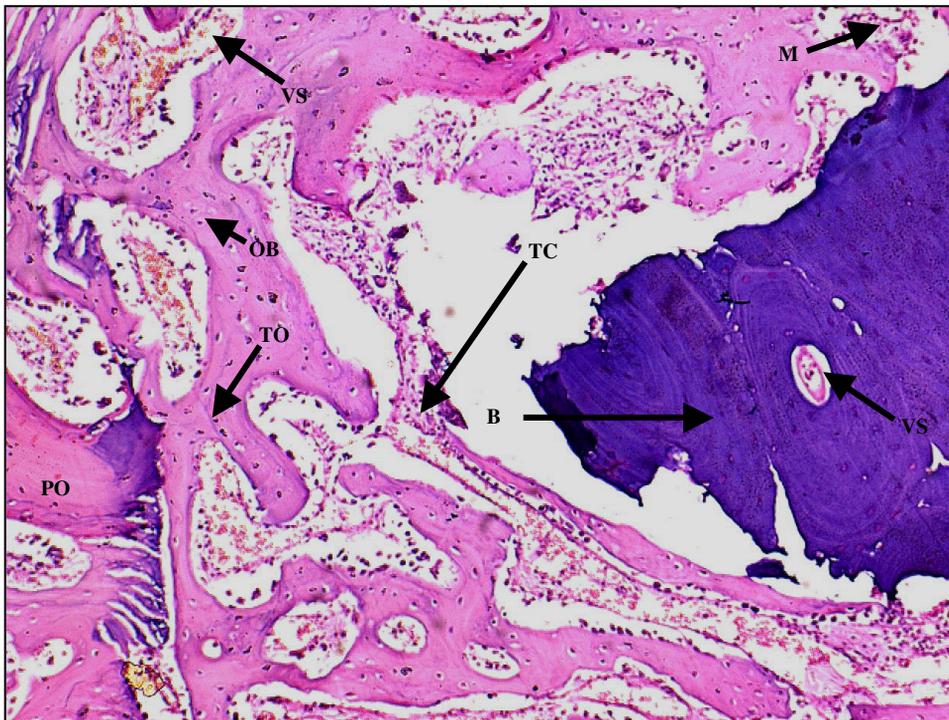


Figura 14: fotomicroscopia após 30 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **M**: macrófagos. **B**: biomaterial. **VS**: vaso sanguíneo. **TC**: tecido conjuntivo. **OB**: osteoblastos. **TO**: trabéculas ósseas.

### 5.1.9 PERÍODO DE 60 DIAS - OSSO AUTÓGENO

O exame de microscopia óptica revela que a cavidade está totalmente preenchida por tecido ósseo neoformado de características maduras. Não existe um limite nítido das bordas do defeito ósseo.

Neste momento, as partículas do osso autólogo foram totalmente reabsorvidas e substituídas por tecido ósseo maduro. Alguns vasos sanguíneos estão presentes e não há infiltrado inflamatório.

Os espaços intra-trabeculares estão preenchidos por tecido do tipo medular, havendo, neste momento, atividade osteoblástica desprezível (figura 15).



Figura 15: fotomicroscopia após 60 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **OB**: osteoblastos. **OC**: osteoclastos. **VS**: vaso sanguíneo. **ON**: osso neoformado.

### 5.1.10 PERÍODO DE 60 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO FINA

Neste período, a microscopia revela algumas partículas preenchendo a cavidade, as quais se encontram em fase final de reabsorção. Da mesma forma que o grupo controle, os limites do defeito ósseo desaparecem, uma vez que este se encontra preenchido por osso caracteristicamente maturo. Uma pequena quantidade de tecido fibroso entrelaça pelas trabéculas ósseas.

Inúmeros vasos sanguíneos podem ser observados. Não há processo inflamatório evidente e pouquíssimas áreas de osso imaturo são encontradas, onde se observa discreta atividade osteoblástica (figura 16). De forma geral, a formação do tecido ósseo é menor do que aquela observada no grupo controle.

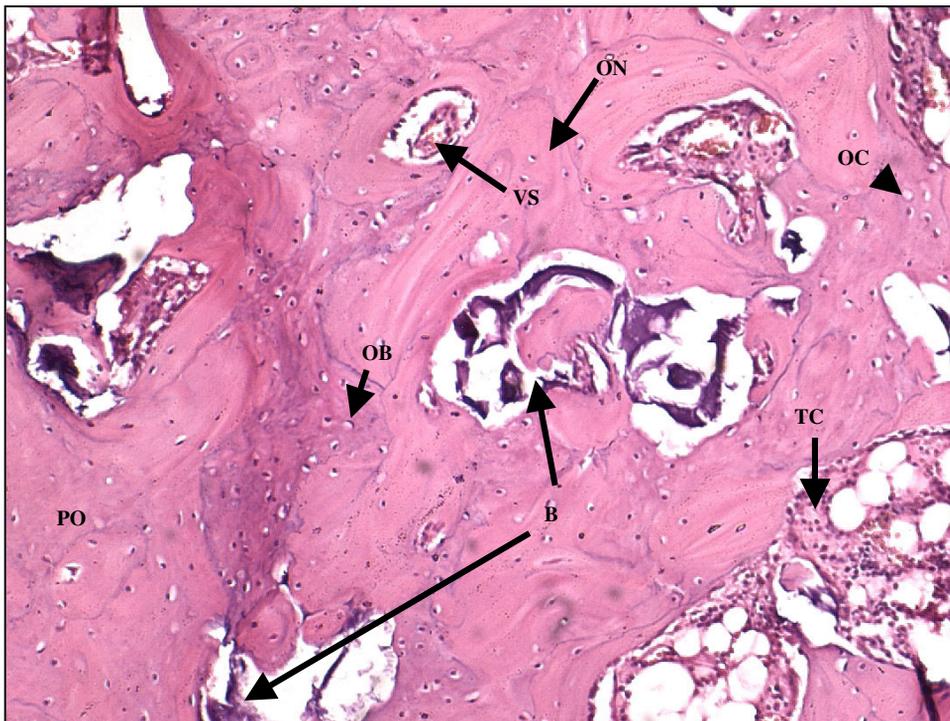


Figura 16: fotomicroscopia após 60 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **OB**: osteoblastos. **B**: biomaterial. **TC**: tecido conjuntivo. **OC**: osteócitos. **ON**: osso neoformado. **VS**: vaso sanguíneo.

### 5.1.11 PERÍODO DE 60 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO MÉDIA

Neste período, o exame microscópico revela nitidez dos limites da cavidade óssea. No interior desta, estão presentes partículas em fase de reabsorção, havendo aposição de tecido ósseo ao seu redor. Alguns vasos sanguíneos estão presentes e a atividade inflamatória presente é desprezível.

Observa-se o crescimento de trabéculas ósseas da periferia em direção à região central do defeito, a qual ainda apresenta quantidade razoável de tecido conjuntivo fibroso. As trabéculas ósseas ainda são imaturas, havendo atividade osteoblástica especialmente naquelas que se encontram na periferia (figura 17).

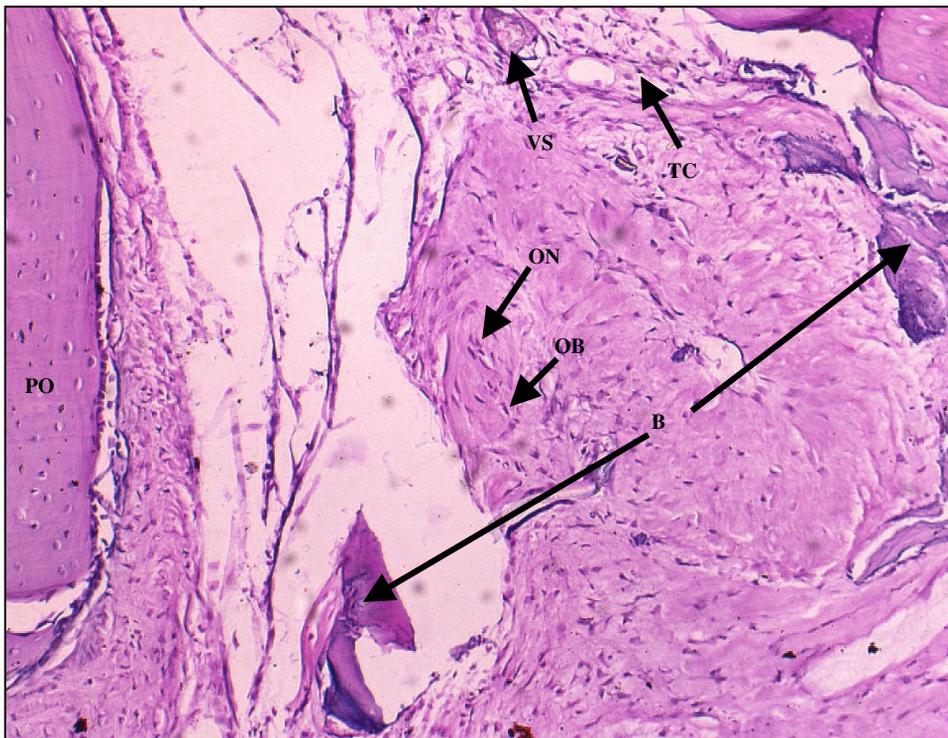


Figura 17: fotomicroscopia após 60 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **OB**: osteoblastos. **B**: biomaterial. **TC**: tecido conjuntivo. **ON**: osso neoformado. **VS**: vaso sanguíneo.

### 5.1.12 PERÍODO DE 60 DIAS - MATRIZ DE GRANULAÇÃO GROSSA

A visualização ao microscópio óptico evidencia a presença de uma cavidade com limites bem definidos. Algumas partículas encontram-se inteiras e outras em fase de reabsorção, havendo áreas de aposição de tecido ósseo ao seu redor.

Não há infiltrado inflamatório considerável e alguns vasos sangüíneos distribuem-se pela cavidade.

Junto às paredes do defeito existe uma quantidade considerável de trabéculas ósseas neoformadas e tecido osteóide, os quais vão se tornando mais escassos na porção central. Nesta região está presente uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso (figura 18).

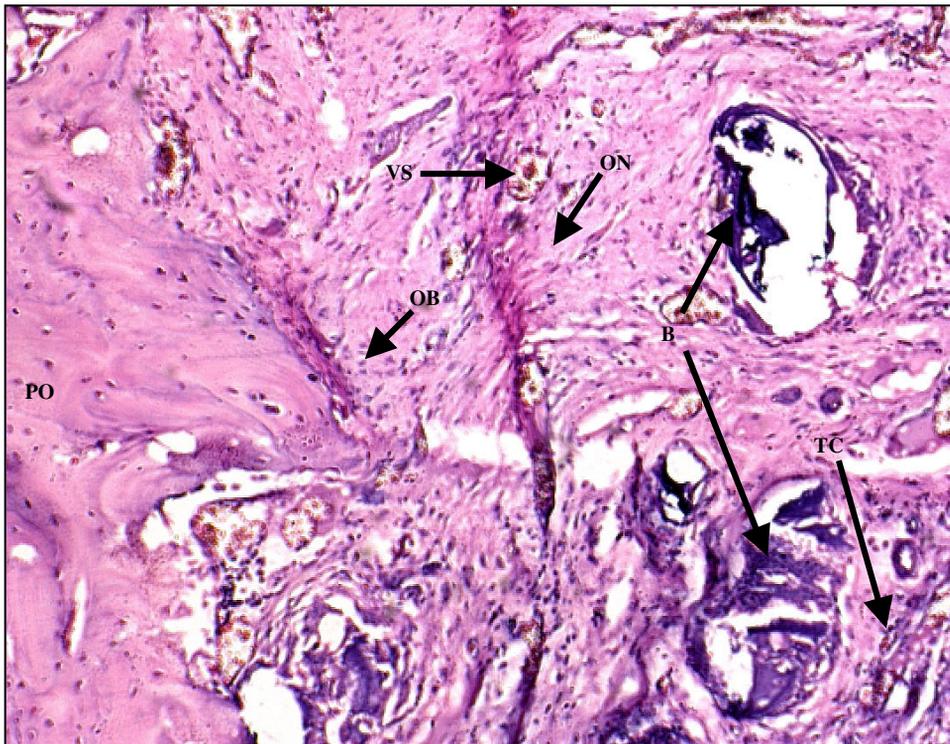


Figura 18: fotomicroscopia após 60 dias. 10x (HE). **PO**: parede óssea. **OB**: osteoblastos. **B**: biomaterial. **TC**: tecido conjuntivo. **ON**: osso neoformado. **VS**: vaso sangüíneo.

## 5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

### 5.2.1 OSSO AUTÓGENO

A tomada radiográfica 15 dias após a intervenção cirúrgica (figura 19a) revela uma cavidade bem delimitada e totalmente preenchida. É possível se observar maior radiopacidade em relação ao osso adjacente, achado compatível com a compactação do enxerto no trans-operatório. Aos 30 dias (figura 19b) as margens do defeito tornaram-se menos nítidas e o osso autógeno particulado utilizado para o preenchimento tornou-se menos radiopaco do que no período anterior. No grupo sacrificado aos 60 dias (figura 19c), a região da osteotomia é praticamente imperceptível e o seu preenchimento apresenta radiopacidade semelhante ao osso adjacente.

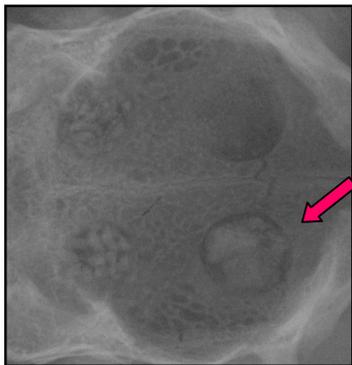


Figura 19a: Radiografia após 15 dias.

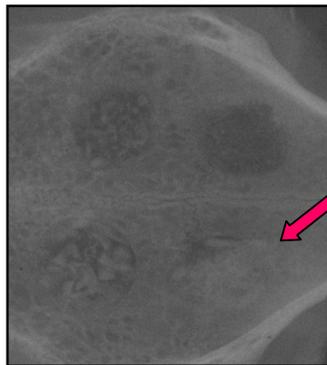


Figura 19b: Radiografia após 30 dias.

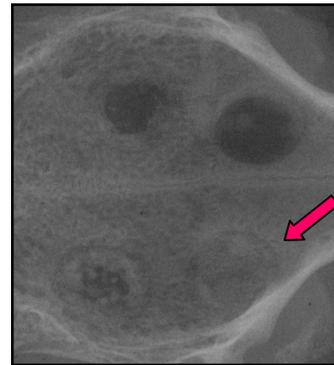


Figura 19c: Radiografia após 60 dias.

## 5.2.2 MATRIZ DE GRANULAÇÃO FINA

A tomada radiográfica 15 dias após a intervenção cirúrgica (figura 20a) demonstra nitidamente os limites do defeito ósseo. O interior deste apresenta-se discretamente mais radiolúcido quando comparado ao tecido ósseo adjacente. Aos 30 dias (figura 20b) observa-se que a cavidade ainda mantém-se nítida, ocorrendo um aumento da sua radiolucidez. Em sua porção periférica ocorre a formação de um delgado halo radiopaco. Já no período de 60 dias (figura 20c), observa-se uma perda da nitidez dos contornos da loja cirúrgica, a qual se encontra visivelmente mais radiolúcida que o tecido ósseo adjacente.

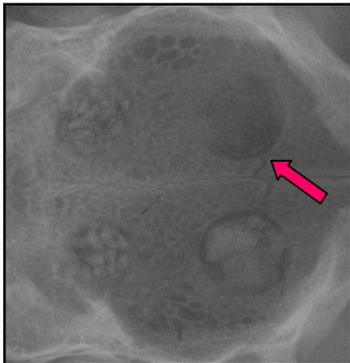


Figura 20a: Radiografia após 15 dias.

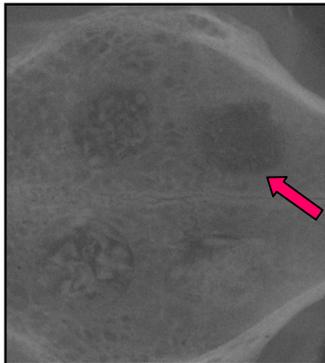


Figura 20b: Radiografia após 30 dias.

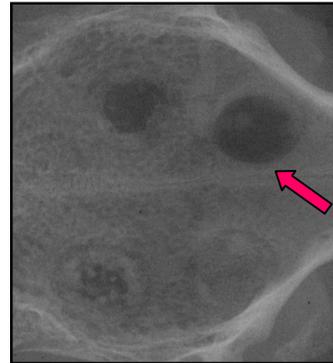


Figura 20c: Radiografia após 60 dias.

### 5.2.3 MATRIZ DE GRANULAÇÃO MÉDIA

A tomada radiográfica correspondente ao período de 15 dias (figura 21a) revela nitidamente os limites da cavidade, a qual encontra-se preenchida por grânulos de material cuja densidade radiográfica assemelha-se ao osso adjacente. Aos 30 dias (figura 21b), ainda é possível visualizar a presença destes grânulos, porém, não é possível se observar com clareza os limites da cavidade. No período de 60 dias (figura 21c), surge uma imagem radiolúcida na porção central do defeito, sendo que suas porções periféricas continuam mantendo radiopacidade semelhante àquela observada no período anterior.

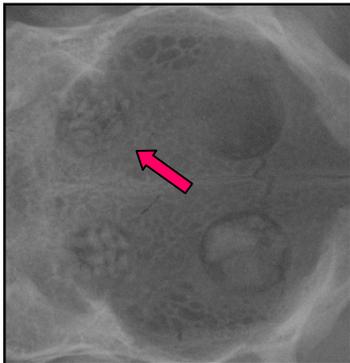


Figura 21a: Radiografia após 15 dias.

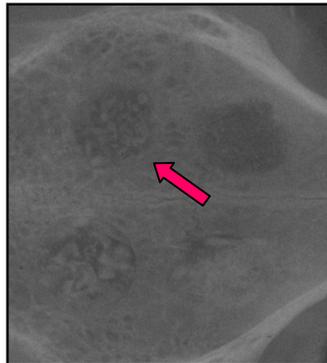


Figura 21b: Radiografia após 30 dias.



Figura 21c: Radiografia após 60 dias.

## 5.2.4 MATRIZ DE GRANULAÇÃO GROSSA

A avaliação radiográfica correspondente ao período de 15 dias (figura 22a) mostrou uma cavidade nítida e preenchida por grânulos do biomaterial, os quais eram mais radiopacos relativamente ao osso adjacente. Aos 30 dias (figura 22b) a imagem correspondente à cavidade perde a nitidez de limites, porém, ainda é possível visualizar partículas individualizadas de osso bovino. Ao término de 60 dias (figura 22c) a cavidade apresenta um aspecto discretamente radiolúcido em sua porção central e radiopaco na periferia. Chama atenção o fato de partículas do material ainda estarem visíveis de forma isolada ao exame radiográfico.

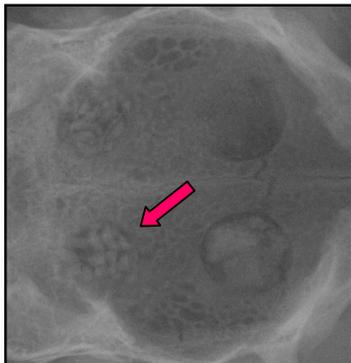


Figura 22a: Radiografia após 15 dias.

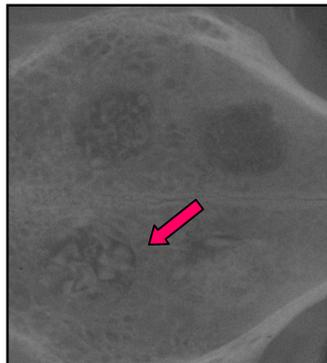


Figura 22b: Radiografia após 30 dias.

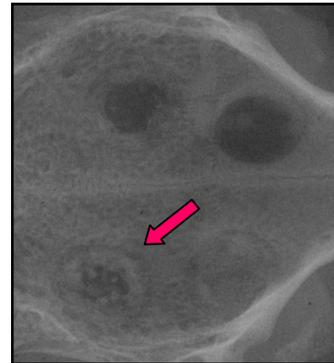


Figura 22c: Radiografia após 60 dias.

## 6 DISCUSSÃO

O uso da matriz óssea bovina anorgânica é amplamente aceito na literatura. Especificamente na área odontológica, este biomaterial está indicado nas seguintes situações: regeneração de defeitos periodontais; recobrimento de fenestrações decorrentes da instalação de implantes ou doença periimplantar; elevação do seio maxilar; tratamento de pequenas áreas de atrofia óssea alveolar; em associação como o osso autógeno, seja ele na forma triturada ou em blocos. Esta alta aceitação por parte dos profissionais deve-se ao fato de ser um produto de origem natural com baixo custo, fácil disponibilidade e estudado exaustivamente nos últimos 15 anos.

Em relação à resposta tecidual frente a este biomaterial, a imensa maioria dos trabalhos atesta-o como sendo biocompatível (Norton *et al.*, 1991; Berglundh & Lindhe, 1997; McAllister *et al.*, 1999; Callan & Rohrer, 1993), com exceção de um dos primeiros artigos publicados (Pinholt *et al.*, 1991), no qual foi observada reação de corpo estranho tanto em região subcutânea quanto em tecido ósseo da maxila de ratos. O presente estudo vai ao encontro daqueles achados pela maioria dos autores, uma vez que o exame histológico não revelou em nenhum dos cortes a presença de células gigantes que poderiam sugerir reação de corpo estranho. Um outro achado que coloca em evidência a biocompatibilidade da matriz óssea bovina anorgânica testada é o fato de ter ocorrido proliferação vascular no interior de algumas partículas.

Dentre os modelos animais mais utilizados para testes envolvendo o processo de reparação óssea associado ao uso da matriz óssea bovina anorgânica, destacam-se os trabalhos realizados em ratos (Pinholt *et al.*, 1991), coelhos (Klinge *et al.*, 1992; Ruhaimi, 2001; Tamini *et al.*, 2006; ), cães (Berglundh & Lindhe, 1997), chimpanzés (McAllister *et al.*, 1999) e mini-porcos (Jensen *et al.*, 2006). A opção pela utilização de coelhos no presente estudo foi feita levando-se em consideração o grande número de publicações utilizando este modelo experimental. Pelo mesmo motivo a calvária foi eleita como local para implantação do biomaterial, além do fato de propiciar a realização dos quatro defeitos em um único sítio, o que minimiza o tempo e a morbidade operatória e faz com que todos os grupos experimentais em um dado animal estejam sujeitos aos efeitos das mesmas variáveis.

No que diz respeito ao tamanho dos defeitos utilizados, sabe-se que a sua reparação não irá ocorrer espontaneamente, em calvária de coelhos, se este medir 15mm de diâmetro ou mais (Hollinger & Kleinschmidt, 1990). Levando-se em conta que a maioria dos trabalhos publicados utiliza defeitos não críticos e que o objetivo final deste estudo era comparar as três apresentações do biomaterial entre si e com o grupo controle, as cavidades experimentais foram confeccionadas com um diâmetro de 8mm.

Os períodos de sacrifício dos animais foram definidos de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura. Foi feita a opção por uma avaliação precoce (15 dias), uma avaliação intermediária (30 dias) e uma avaliação tardia (60 dias) com o objetivo de se acompanhar todo o curso do processo de reparação óssea. Levando-se em consideração o trabalho realizado por Roberts *et al.* (1987) o qual demonstrou que, em coelhos o processo de

reparação óssea é três vezes mais rápido do que em seres humanos pode-se, dentro dos limites deste estudo, considerar que os achados no período de sacrifício de 60 dias seriam correspondentes àquilo que se observa aos 6 meses em humanos.

Este período, em humanos, é aquele recomendado por Tong & Buchman (2000) para que se possa realizar a instalação de implantes osseointegrados em áreas submetidas à reconstrução óssea. Ficou claro que, aos 60 dias, as áreas reconstruídas com o biomaterial estavam preenchidas por um tecido ósseo menos maturo quando comparadas ao grupo controle. A repercussão clínica deste achado é que, em áreas reconstruídas com a matriz óssea bovina anorgânica, deve-se aguardar um período superior a 6 meses para se proceder a instalação dos implantes a fim de não comprometer sua estabilidade primária.

A avaliação histológica, especialmente nos períodos de 30 e 60 dias após a implantação do biomaterial, revela a propriedade osteocondutiva da matriz óssea bovina anorgânica, ou seja, suas partículas servem de arcabouço para a deposição de tecido ósseo neoformado, fazendo com que haja um íntimo contato entre o osso e o biomaterial. Este achado está em concordância com o que foi observado em outros estudos envolvendo animais (Okamoto *et al.*, 1994; Berglundh & Lindhe, 1997; McAllister *et al.*, 1999; Ruhaimi, 2001; Jensen *et al.*, 2006; Tamini *et al.*, 2006) e seres humanos (Norton *et al.*, 1991; Callan & Rohrer, 1993; Skoglund *et al.*, 1997; Mural *et al.*, 2003; Proussaefs & Lozada, 2006).

Partindo-se da premissa que, ao se encerrar o processo de reparação óssea, quanto maior for a quantidade de tecido conjuntivo entremeando-se às partículas do biomaterial, menor é a

sua capacidade osteocondutora, a análise histológica deste estudo sugere que a matriz de granulação fina apresenta maior potencial osteocondutor que aquelas granulações maiores (média e grossa). Não existe nenhum trabalho na literatura que avalie a influência do tamanho dos grânulos da matriz óssea bovina anorgânica sobre o processo de osteocondução. Contudo, a literatura disponibiliza alguns trabalhos onde esta avaliação foi feita para outros substitutos ósseos, como por exemplo o biovidro (Schepers & Ducheyne, 1997), o osso homogêneo particulado (Xu *et al.*, 2003) e o osso autógeno (Pallesen *et al.*, 2002; Coradazzi, 2003). Todos estes trabalhos indicam que o osso neoformado é melhor tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo à medida que se diminui o tamanho das partículas. A explicação seria a existência de maior contato entre a superfície do substituto ósseo e os tecidos adjacentes, o que facilitaria a sua reabsorção e a aposição de tecido ósseo neoformado. No presente estudo é observado claramente que a matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina é consideravelmente mais reabsorvida do que as partículas de tamanho médio e grande. Como consequência direta, a quantidade de tecido ósseo neoformado que se deposita ao redor das partículas é maior, oferecendo um resultado superior quando comparado às outras granulações.

Os únicos autores a se preocuparem em associar o controle radiográfico à análise histológica de defeitos ósseos criados em calvária de coelhos foram Hollinger & Kleinschmidt (1990). É importante salientar que o objetivo destes estudiosos era definir o tamanho de um defeito ósseo crítico, e não o seu comportamento quando preenchido por um biomaterial. Assim, os resultados deste estudo colocam em evidência a possibilidade do exame radiográfico, que é um parâmetro bastante valorizado no acompanhamento de cirurgias reconstrutivas, ser insuficiente para se determinar a

qualidade do tecido ósseo neoformado quando a matriz óssea bovina anorgânica é utilizada como osteocondutor. Isto é exemplificado pelo fato dos defeitos tratados com a matriz óssea bovina de granulação fina apresentarem aspecto de radiolucidez ao término do período experimental, o que poderia sugerir pouca neoformação óssea. Na realidade, o que ocorre é que a cavidade está preenchida por tecido ósseo imaturo e as partículas altamente reabsorvidas. O contrário ocorreu com as granulações maiores (grossa e média), cuja aparência ao exame radiográfico era compatível com o osso maturo. No entanto, a avaliação histológica revelou a presença de grande quantidade de partículas não reabsorvidas entremeadas por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo fibroso.

Em relação à reabsorção das partículas da matriz óssea bovina anorgânica, tanto estudos em humanos (Norton *et al.*, 1991; Zitzmann *et al.*, 1991; Callan & Rohrer, 1993; Skoglund *et al.*, 1997; Mural *et al.*, 2003; Proussaefs & Lozada, 2006) quanto experimentos em animais (Okamoto *et al.*, 1994; Berglundh & Lindhe, 1997; McAllister *et al.*, 1999; Tamini *et al.*, 2006) chegam ao consenso de que este biomaterial, mesmo após longos períodos de sua implantação, não é completamente reabsorvido. Na verdade, ocorre incorporação das partículas ao osso neoformado. Os resultados do presente estudo são condizentes com estes achados. Contudo, parece importante chamar atenção ao fato de que as partículas de granulação fina são visivelmente mais absorvidas que as outras granulações. Somando este achado à propriedade osteocondutora do material discutida anteriormente, têm-se uma maior deposição óssea junto às partículas menores. Seguindo esta linha de raciocínio, a cavidade cujas partículas apresentarem uma maior taxa de reabsorção, será preenchida por uma quantidade maior de tecido ósseo neoformado.

Uma vez que boa parte dos procedimentos reconstrutivos com o uso da matriz óssea bovina anorgânica tem como objetivo o ganho de volume ósseo para a posterior instalação de implantes osseointegrados (Skoglund *et al.*, 1997), e que ao menos uma porção deste biomaterial permanece incorporada ao tecido ósseo neoformado de forma inerte (Norton *et al.*, 1991; Zitzmann *et al.*, 1991; Callan & Rohrer, 1993; Skoglund *et al.*, 1997; Mural *et al.*, 2003; Proussaefs & Lozada, 2006), parece sensato que se desenvolvam estudos clínicos e experimentais com o objetivo de elucidar como se comportam os implantes aí instalados e se o biomaterial causa algum efeito deletério sobre o processo de osseointegração. Uma metodologia bastante interessante que utiliza um modelo animal para avaliar qualitativa e quantitativamente a osseointegração de implantes instalados em áreas tratadas com substitutos ósseos foi proposta por Pereira no ano de 2006. Infelizmente, apesar da matriz óssea bovina anorgânica vir sendo utilizada há praticamente 2 décadas, a literatura é carente de estudos clínicos bem delineados e com acompanhamento a longo prazo de implantes instalados em áreas reconstruídas com este biomaterial. Os trabalhos disponíveis indicam haver uma incidência de perda primária de implantes da ordem de 10% quando estes são instalados em região de seio maxilar tratada exclusivamente com a matriz óssea bovina anorgânica (Mural *et al.*, 2003). Já naqueles casos em que se faz o recobrimento de fenestrações vestibulares com o mesmo biomaterial existe uma incidência de perda primária de 6,3% (De Boever & De Boever, 2005).

Quando o processo de reparação das cavidades preenchidas pelo biomaterial é comparado ao grupo controle (osso autógeno particulado) algumas diferenças marcantes podem ser observadas, as quais serão listadas e discutidas a seguir:

- No período de 15 dias, o processo inflamatório no grupo controle é menos intenso quando comparado aos defeitos tratados com o biomaterial, independentemente de sua granulação. Este achado é corroborado por outros autores (Pinholt *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 1994) e é também observado com outros substitutos ósseos (Schepers & Ducheyne, 1997; Jensen *et al.*, 2006). Aos 30 dias o processo inflamatório tende a diminuir, estando ausente aos 60 dias.

- Em relação à atividade osteoblástica, esta pode ser observada de forma intensa no grupo controle aos 15 dias de pós-operatório. Já as cavidades que receberam o biomaterial a atividade osteoblástica neste período é discreta e limita-se às bordas do defeito. No período de 30 dias o grupo controle demonstra um decréscimo da atividade osteoblástica uma vez que o osso vai adquirindo características de maturidade. Contrariamente, este é o período em que a atividade osteoblástica é mais intensa em todos os defeitos preenchidos pela matriz óssea bovina anorgânica. Aos 60 dias de pós-operatório, apesar da atividade osteoblástica ser inexistente no grupo controle (tecido ósseo totalmente maturo), esta ainda pode ser observada nos locais onde foi utilizado o biomaterial. Estes achados são extremamente relevantes e indicam que, tomando como padrão de comparação o grupo controle, ocorre um atraso no processo de reparação quando se utiliza a matriz óssea bovina anorgânica.

- Acerca do padrão de formação de tecido ósseo no interior das cavidades, fica evidente que no grupo controle isto ocorre de forma homogênea em toda a cavidade, evidenciando as propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênese

oferecidas pelo osso autógeno, conforme descrição de Tong e Buchman (2000). Em contrapartida, quando se avalia as cavidades preenchidas pela matriz óssea bovina anorgânica observa-se que a neoformação óssea ocorre predominantemente a partir das paredes do defeito e em menor grau ao redor das partículas, o que é totalmente compatível com a propriedade osteocondutiva deste material descrita por diversos autores (Okamoto *et al.*, 1994; Berglundh & Lindhe, 1997; McAllister *et al.*, 1999; Ruhaimi, 2001; Jensen *et al.*, 2006; Tamini *et al.*, 2006; Norton *et al.*, 1991; Callan & Rohren, 1993; Skoglund *et al.*, 1997; Mural *et al.*, 2003; Proussaefs & Lozada, 2006).

- Considerando o tipo de tecido formado no interior das cavidades ao término do período experimental, o grupo controle sobressaiu-se por ter sido preenchido praticamente em sua totalidade por tecido ósseo. Quando a matriz óssea bovina anorgânica foi utilizada ocorreu, invariavelmente, a formação de alguma quantidade de tecido fibroso. Este achado não difere daquilo que foi observado por Norton *et al.* (1991); Ruhaimi (2001); Mural *et al.* (2003) e Tamini (2006). Contudo, no presente estudo, ficou claro que quanto maior o tamanho dos grânulos do biomaterial, maior foi a formação de tecido conjuntivo fibroso. Este resultado é inédito para a matriz óssea bovina anorgânica, apesar de já ter sido observado em outros substitutos ósseos como o biovidro (Schepers & Ducheyne, 1997), o osso homogêneo particulado (Xu *et al.*, 2003) e o osso autógeno (Pallesen *et al.*, 2002).

Em linhas gerais, fica claro pelos pontos discutidos acima que a matriz óssea bovina anorgânica apresenta algumas desvantagens em relação ao uso do osso autógeno: atraso no processo de reparação; formação de menor quantidade de tecido

ósseo e maior quantidade de tecido fibroso; incorporação de partículas ao tecido ósseo neoformado. Com o objetivo de superar estas deficiências nos últimos anos inúmeras tentativas vêm sendo feitas no sentido de se acrescentar substâncias que possam conferir propriedades osteoindutivas a este e outros biomateriais. Apesar dos resultados iniciais serem pouco elucidativos (Serra e Silva *et al.*, 2006), este parece ser um campo de estudo bastante promissor e que certamente trará benefícios aos pacientes que porventura necessitem procedimentos de reconstrução óssea.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e com os resultados obtidos é possível concluir que:

1. A matriz óssea bovina anorgânica utilizada é um material biocompatível em todas as granulações testadas.

2. A matriz óssea bovina anorgânica de granulação fina proporcionou um melhor padrão de reparo ósseo quando comparada às granulações média e grossa.

3. Quanto maior o tamanho das partículas de matriz óssea bovina anorgânica, mais difícil é sua reabsorção.

4. Não é possível determinar por meio de radiografias o padrão qualitativo de reparação óssea quando da utilização de matriz óssea bovina anorgânica.

## REFERÊNCIAS \*

Alberius P, Isaksson S, Klinge B, Sjogren S, Jonsson J. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. **J Craniomaxillofac Surg.** 1990; 18(6): 179-181.

Alberius P, Johnell O. Repair of intramembranous bone fractures and defects in rats. Immunolocalization of bone and cartilage proteins and proteoglycans. **J Craniomaxillofac Surg.** 1991; 19(1): 15-20.

Basle MF, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D. Shape and orientation of osteoblast-like cells (saos 2) are influence by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. **J Biomed Mat Res.** 1998; 40: 350-357.

Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clin Oral Impl Res.** 1997; 8(2): 117-124.

Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. **J Periodontol.** 1993; 64: 575-582.

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

Dahlin C. A origem científica da regeneração óssea guiada. *In*: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editores. **Regeneração óssea guiada na implantodontia.** São Paulo: Santos Editora, 1996. p.31-48.

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

Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1994; 23(6): 395-398.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

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

Fonseca RJ. Oral and maxillofacial trauma. Philadelphia: WB Saunders, second edition, 1997: 652p.

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

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

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

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica.** 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 700p.

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

LeGeros Rz. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res.** 2002; 395(2): 81-98.

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

Massone F. **Anestesiologia veterinária. Farmacologia e técnicas.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.105-110.

Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld H, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss<sup>®</sup> in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. **Clin Oral Impl Res.** 2000; 11: 217.

Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. **Clin Oral Impl Res.** 2003; 14: 775-783.

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

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

Pecora G, Andreana S, Margarone JE, Covani U, Sottosanti JS. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1997; 84: 424-429.

Pereira CL. **Influência da radiação laser de baixa intensidade sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio instalados em defeitos tratados ou não com substituto ósseo: análise histométrica em coelhos.** 2006, Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, P414i .

Proussaefs P, Lozada J. Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation. **J Oral Implantol.** 2006; 32(5): 237-247.

Restrepo L, Marzola C, Consolaro A, Costa Pereira AA, Toledo Filho J, Andreo JC. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. **Rev Bras Implant.** 1998; 4: 8.

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

Schepers EJG, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. **J Oral Rehab.** 1997; 24:171-181.

Serra e Silva F, Albergaria-Barbosa JR, Mazzone R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg.** 2006; 64: 931-935.

Skoglund A, Hising P, Young C. A clinical and histological examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1997; 12(2): 194-199.

Slotte C, Lundgren D, Sennerby L. Bone morphology and vascularization of untreated and guided bone augmentation-treated rabbit calvaria: evaluation of an augmentation model. **Clin Oral Impl Res.** 2005; 16: 228-235.

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

Taga R, Cestari TM, Silva TL, Stipp CM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev Bras Implant.** 1997; 3(1): 13-20.

Tamini FM, Torre J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel b-TCP/DCPD granulate. **J Clin Periodontol.** 2006; 33: 922-928.

Ten Cate AR. **Histologia Bucal.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 101-122.

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

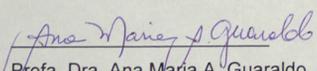
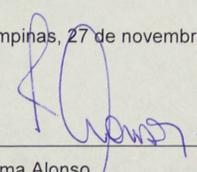
Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials.** 2001; 22: 1599-1606.

Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya, K. Experimental sinus bone grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. **Clin Oral Impl Res.** 2003; 14: 548-555.

Zitzman NU. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. **Int J Periodont Rest Dent.** 2001; 21(3): 289-295.

# ANEXO

Certificado emitido pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP).

	<b>Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia</b>	
		CEEA-IB-UNICAMP
<b>Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP</b>		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o Protocolo nº <u>858-1</u>, sobre "<u>ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA QUANDO DA UTILIZAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA BOVINA ANORGÂNICA DE DIFERENTES GRANULAÇÕES E ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO. ANÁLISE HISTOLÓGICA E RADIOGRÁFICA DE DEFEITOS CRIADOS EM CALVÁRIA DE COELHOS</u>" sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Renato Mazzonetto / Leandro Eduardo Klüppel</u> está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de <u>06 de julho de 2005</u>.</p>		
<b>C E R T I F I C A T E</b>		
<p>We certify that the protocol nº <u>858-1</u>, entitled "<u>COMPARATIVE STUDY OF BONE REPAIR PROCESS IN THE PRESENCE ANORGANIC BOVINE BONE MATRIX OF DIFFERENT GRANULATION AND AUTOGENOUS BONE GRAFT. HISTOLOGIC AND RADIOGRAPHIC ANALYSIS OF DEFFECTS CREATED IN RABBIT CALVARIA</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on <u>July 6, 2005</u>.</p>		
		Campinas, 27 de novembro de 2006.
		<b>2ª. VIA</b>
		
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente - CEEA/IB/UNICAMP	Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP	
<small>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL</small>		<small>TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124</small>