



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti

Orientador: Roger William Fernandes Moreira

Ano de Conclusão do Curso: 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Roger Moreira", written over a horizontal line.

Assinatura do Orientador

Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti

ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE COELHOS

***HISTOLOGIC & HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF A BONE SUBSTITUTE IN RABBIT
CALVARIAL BONE***

Monografia apresentada ao Curso
de Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,
para obtenção do Diploma de Cirurgião-
Dentista.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Roger William Fernandes MOREIRA

Piracicaba – SP

Dezembro/2006

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à **Helenice Maria dos Santos**, minha mãe, e a **Laércio Xisto Braga Cavalcanti**, meu pai, que me apoiaram, me incentivaram, colaboraram, torceram, e me permitiram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP – UNICAMP)** pelo acolhimento.

Ao **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/CNPq**, pelo suporte econômico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira**, pela oportunidade da realização deste trabalho, pelo apoio e pelos ensinamentos que certamente serão de grande importância para meu futuro.

À **Cecília Luíz Pereira** pela orientação e colaboração com este trabalho. Seu apoio foi essencial para que aprendesse como se realiza um trabalho científico. Lembrarei de sua amizade com muito carinho.

Aos professores, alunos da pós-graduação e funcionários da **Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial** da FOP-UNICAMP pelo apoio.

Ao funcionário do biotério da FOP-UNICAMP, **Fábio Vinícius Borges Padilha**, pelo auxílio no cuidado com os animais.

Aos **Profs. Drs. Pablo Augustin Vargas e Pedro Duarte Novaes**, aos funcionários **Adriano Luís Martins, Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani** e aos alunos da pós-graduação em semiologia **Jorge e Guilherme** pela ajuda no processamento das lâminas e análise histológica.

Aos colegas de sala **Joel Motta Júnior, Rafael Pino Vitti, Fabiana Seguin, Hugo Felipe do Vale** pelo apoio na cirurgia, análise histomorfométrica e análise estatística.

A família que eu construí fora de casa e com quem aprendi a conviver com todo carinho, minhas irmãs de coração: **Francine Petrecca, Rafaela da Silva Carvalho, Luale Leão Ferreira, Juliana de Souza Dias Marcassa e Fernanda Graziela Signoreti.**

A todos amigos que fiz durante estes quatro anos.

A **47ª Turma de Odontologia da FOP-UNICAMP**, especialmente a essas amigas que tanto amo: **Maria Rachel F. P. Monteiro, Viviane Alfim Teixeira, Jessica Mie F. K. Takahashi, Vanessa Rodrigues e Paula Rizzo Palermo**, e aos amigos das **Repúblicas Tiembokofumo e Inferninho** por me apoiar nos momentos mais difíceis, me alegrar sempre e por terem feito com que estes quatro anos de graduação fossem os mais divertidos da minha vida.

"Passem-se dias, horas, meses, anos

Amadureçam as ilusões da vida

Prossiga ela sempre dividida

Entre compensações e desenganos."

Vinícius de Moraes

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... 8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... 11

RESUMO..... 12

INTRODUÇÃO..... 13

OBJETIVO..... 15

MATERIAL E MÉTODOS..... 16

 1. PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA..... 16

 2. SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS..... 16

 3. FASE CLÍNICA: REALIZAÇÃO DOS ENXERTOS..... 17

 3.1. Profilaxia Antimicrobiana e Anestesia..... 17

 3.2. Procedimento Cirúrgico..... 17

 4. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO HISTOLÓGICO..... 19

 4.1. Períodos e forma de sacrifício..... 19

 4.2. Preparo Histológico..... 19

RESULTADOS..... 21

DISCUSSÃO..... 31

CONCLUSÕES..... 34

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 35

ANEXOS..... 40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Calvária de coelho apresentando um defeito de 8,0 mm de diâmetro em cada osso parietal. O defeito ósseo da direita foi preenchido com osso autógeno particulado e compactado e o defeito ósseo da esquerda foi preenchido com BoneSource.....	18
Figura 2.	Defeito ósseo, preenchido por BoneSource, recoberto por membrana colágena.....	18
Figura 3.	Defeito ósseo, preenchido por osso autógeno particulado e compactado, recoberto por membrana colágena.....	18
Figura 4.	Divisão das amostras para inclusão e corte.....	20
Figura 5.	Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Osso pré-existente, osso neoformado, partículas de osso autógeno, tecido conjuntivo. Grupo 1, osso autógeno, 3 semanas, H. E. Objetiva 2,5x.....	23
Figura 6.	Área central da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Neoformação óssea a partir de uma partícula de osso autógeno circundada por tecido conjuntivo. Grupo 1, osso autógeno, 3 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	23
Figura 7.	Nota-se alta atividade osteoblástica próximo a borda da cavidade óssea cirúrgica, neoformação óssea e existência de tecido ósseo pré-existente. Grupo 1, osso autógeno, 3 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	23
Figura 8.	Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Osso pré-existente, projeções de tecido ósseo neoformado em direção centrípeta, tecido conjuntivo. Grupo 2, biomaterial, 3 semanas, H. E. Objetiva 2,5x..	24
Figura 9.	Área central da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Tecido conjuntivo denso. Grupo 2, biomaterial, 3 semanas, H. E. Objetiva 10x...	24

Figura 10.	Visão aproximada do limite da cavidade cirúrgica. Observa-se: Tecido ósseo pré-existente e tecido ósseo neoformado. Grupo 2, biomaterial, 3 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	24
Figura 11.	Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Projeções de tecido ósseo neoformado promovendo a união entre as bordas do tecido ósseo pré-existente e as partículas de osso autógeno e tecido conjuntivo. Grupo 1, osso autógeno, 6 semanas, H. E. Objetiva 2,5x.....	26
Figura 12.	Área central da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Partícula de osso autógeno circundada por neoformação óssea. Grupo 1, osso autógeno, 6 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	26
Figura 13.	Limite da cavidade cirúrgica. Observa-se: Tecido ósseo pré-existente e neoformação óssea. Grupo 1, osso autógeno, 6 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	26
Figura 14.	Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Projeções de tecido ósseo neoformado em direção centrípeta e tecido conjuntivo. Grupo 2, biomaterial, 6 semanas, H. E. Objetiva 2,5x.....	27
Figura 15.	Área central da cavidade óssea cirúrgica. Observa-se: Tecido ósseo neoformado bastante celularizado próximo a partícula de biomaterial quase totalmente reabsorvida. Grupo 2, biomaterial, 6 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	27
Figura 16.	Limite da cavidade cirúrgica. Observa-se: Tecido ósseo pré-existente e neoformação óssea. Grupo 2, biomaterial, 6 semanas, H. E. Objetiva 10x.....	27

I

Gráfico 1.	Resultados da histomorfometria após 3 e 6 semanas. Comparação de médias de neoformação óssea para osso autógeno e BoneSource, com indicação de desvio padrão para cada uma delas.....	30
Tabela 1.	Médias e desvios padrão dos dados originais, letras diferentes representam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ad libitum</i> =	À vontade.....	16
ANOVA =	Análise de Variância.....	21
CNPq =	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.....	21
Co. =	Company.....	12
<i>et al</i> =	e outros (abreviatura de <i>et lii</i>).....	13
EUA =	Estados Unidos da América.....	12
g =	Gramas.....	17
h =	Horas.....	19
H.E. =	Hematoxilina-eosina.....	23
mg =	Miligrama.....	17
mg/Kg =	Miligramas por Kilograma.....	17
mL =	Mililitro.....	17
mm =	Milímetros.....	17
µm =	Micrômetros.....	19
µm² =	Micrômetros quadrados.....	28
nº =	Número.....	17
® =	Marca registrada.....	18
SP =	São Paulo.....	17
UNICAMP =	Universidade Estadual de Campinas.....	16
% =	Por cento.....	17

RESUMO

Quando uma estrutura óssea apresenta um defeito em tamanho, forma, posição ou volume, a cirurgia reconstrutiva pode ser realizada para reconstruir a estrutura defeituosa. A extensão dos defeitos ósseos da região oral e maxilofacial varia desde pequenas reabsorções alveolares a grandes defeitos resultantes de patologias. Em cada uma dessas circunstâncias, a reabilitação da estrutura normal geralmente é possível com a utilização de enxertos ósseos, que têm sido utilizados há vários séculos, alcançando graus variados de sucesso, o que resulta em melhora estética e funcional. Os enxertos autógenos são considerados os melhores para a reconstrução óssea, porém causam desconforto para o paciente, pois necessitam de um segundo sítio cirúrgico para obtenção do enxerto. Substitutos ósseos sintéticos são uma boa opção para cirurgia de reconstrução óssea e o objetivo deste estudo é avaliar a reparação óssea utilizando o biomaterial aloplástico BoneSource (Stryker Co.,Michigan,EUA). Para isso foram utilizados 10 coelhos, fêmeas, da raça Norfolk. Foi realizado um defeito ósseo em cada osso parietal de cada coelho, sendo que um foi preenchido com o biomaterial e o outro com o enxerto autógeno particulado e compactado retirado do osso parietal obtido na confecção das lojas ósseas. O sacrifício dos animais foi realizado nos períodos de 3 e 6 semanas (5 em cada período). A análise das amostras sobre microscopia óptica revelou que tanto nas cavidade cirúrgicas preenchidas por osso autógeno quanto nas preenchidas pelo biomaterial era possível notar neoformação óssea. Os dados obtidos da análise histomorfométrica foram analisados estatisticamente pela Análise de variância e pelo teste de Tukey, sendo que houve diferença estatística entre os tratamentos executados em um mesmo período de tempo. Ambos os tratamentos apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo.

INTRODUÇÃO

Um tecido transplantado com o objetivo de se tornar parte do hospedeiro que o recebeu é conhecido como enxerto (Peterson *et al.*, 2000). Existe uma grande variedade de materiais para serem utilizados como substitutos ósseos, e podem ser de origem natural ou sintética (Hollinger & Battisone, 1986). Materiais sintéticos incluem certos metais, cerâmicas, ligas ou polímeros. Os naturais são os alogênicos (da mesma espécie) ou xenogênicos (de espécies diferentes) (Rabie, Chay & Wong, 2000). Os enxertos autógenos, por sua vez, são provenientes do mesmo indivíduo, mas de sítios diferentes (Peterson *et al.*, 2000).

A utilização de enxertos para reparar destruições ósseas é um desafio na odontologia moderna e a procura por substâncias osteogênicas tem acontecido por muitos anos (Mitchel & Shankwalker, 1958). O osso pode ter sido destruído como resultado de reabsorção fisiológica devido a perdas dentais ou devido a um trauma, neoplasia ou outras doenças (Rabie, Wong & Hägg, 2000). A reparação de um grande defeito ósseo com enxertos autógenos requer uma cirurgia de transferência da área doadora do enxerto para a área que receberá o enxerto, o que pode causar desconforto ao paciente (Peterson *et al.*, 2000).

O desenvolvimento e a popularização dos implantes dentais têm estimulado os estudos dos substitutos ósseos, uma vez que a estabilidade e o bom posicionamento do implante depende da quantidade de osso e sua qualidade. Em situações de pouca qualidade e/ou quantidade ósseas, é praticamente impossível colocar implantes sem enxertos ósseos (Widamrk, Anderson & Ivanoff, 1997; Waite, Sastravaha & Lemons, 2005).

Com o aumento da utilização e da sofisticação das técnicas de cirurgia bucomaxilofacial, a necessidade de materiais autógenos e aloplásticos para reconstrução

de defeitos complexos tem aumentado (Shand *et al.*, 2002). O uso de materiais aloplásticos para reconstrução de defeitos de ossos endocondrais tem sido reportada na literatura ortopédica (Kohler, *et al.*, 1990; Loty, *et al.*, 1990; Salkeld *et al.*, 2001). Constantino *et al.* (1992) demonstraram em estudo a eficácia na utilização de substituto ósseo sintético para reparação de defeitos ósseos em calvária de gatos. Enxertos sintéticos são também uma alternativa para pacientes que fazem uso de medicação que possa impedir a utilização de enxertos autógenos (Bidic, 2003). Estudos recentes analisaram e avaliaram a eficácia do substituto ósseo BoneSource para reparação de defeitos ósseos comparando a regeneração óssea, na calvária de coelhos, utilizando enxertos alogênicos e aloplásticos e o grupo controle foi um defeito preenchido apenas pelo coágulo, sendo o período de sacrifício de 6 e 12 semanas (Moghadam *et al.*, 2004; Clokie *et al.*, 2002).

Gomez *et al.*, 2005, mostrou que enxerto aloplástico é uma opção de tratamento para pacientes com malformação craniofacial, especialmente crianças, pois não afeta o crescimento craniofacial. Segundo Burstein *et al.*, 1999, um dos primeiros cimentos de hidroxiapatita utilizados BoneSource (Stryker Leibinger GmbH & Co KG, Freiburg, Germany), mostrou resultados positivos quando utilizado em cirurgia de reconstrução craniofacial. BoneSource mostrou excelente retenção de volume implantado, sem interferência no crescimento craniofacial num período de aproximadamente 3 anos de estudo. Os cimentos de fosfato de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade, são facilmente contornáveis *in situ* e possibilitam osteocondução (Turk & Parhiscar, 2000).

O substituto ósseo ideal deve ser forte, maleável, osteocondutivo, osteoindutivo, reabsorvível, de baixo custo e fácil utilização trans-cirúrgica, enquanto promove adesão, proliferação e diferenciação celular (Hollinger *et al.*, 1996; Schmitz, Hollinger & Milam, 1999; Burg, Porter & Kellam, 2000; Kurashina *et al.*, 1998).

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a reparação de defeitos ósseos realizados no osso parietal de coelhos, preenchidos com o substituto ósseo BoneSource (Stryker Co., Michigan, EUA).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob o protocolo **687-2**, a qual aprovou no dia 05 de Agosto de 2004 a realização do mesmo (**Anexo I**).

2. Seleção e manutenção dos animais

Para realização deste estudo foram utilizados 10 coelhos albinos da raça Norfolk, fêmeas, com idade de cinco meses e peso de aproximadamente 3 kg, que foram obtidos junto ao Departamento de Cunicultura da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu.

Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, com água e alimentação *ad libitum* e limpeza diária, sob responsabilidade dos realizadores do estudo e sob supervisão de funcionário designado para tal função.

3. Fase clínica: realização das lojas ósseas e enxertos

3.1. Profilaxia Antimicrobiana e Anestesia

Os animais receberam, 15 minutos antes da anestesia, uma injeção subcutânea de atropina 0,5 mg em uma dose de 0,08 mg/kg com o objetivo de prevenir a bradicardia provocada pelo anestésico e uma injeção intramuscular de 1mL do antibiótico Pentabiótico Veterinário (Wyeth, Itapevi SP, Brasil).

A indução anestésica foi realizada através da via intramuscular profunda, pela injeção de mistura em partes iguais de quetamina e solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6 xilidino)-5,6 diidro-4-H-1,3-tiazina, na dosagem de 0,1mL para cada 200g de peso vivo.

Foi realizada anestesia local complementar utilizando solução de cloridrato de lidocaína a 2%

3.2. Procedimento Cirúrgico

Após a anestesia, foi realizada tricotomia da parte superior da cabeça, na região dos ossos parietais, e antissepsia da região com solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodo a 10%. O campo operatório foi isolado através da aposição de campos esterilizados descartáveis. Foram utilizados gorro, máscara e luvas esterilizadas e roupa cirúrgica limpa. Os instrumentos foram autoclavados previamente. Foi realizada uma incisão na linha média da área que sofreu a tricotomia utilizando-se lâmina de bisturi nº 15, montada em cabo nº 3 seguida da divulsão dos tecidos subjacentes ao osso que foram mantidos afastados. Foi então realizado um defeito ósseo de 8 mm de diâmetro em cada osso parietal de cada coelho utilizando broca trefina montada em caneta de baixa rotação, com irrigação constante de solução salina esterilizada para evitar o aquecimento. O defeito do

lado esquerdo foi preenchido com o biomaterial, BoneSource (Stryker Co., Michigan, EUA) manipulado de acordo com as instruções do fabricante, e o do lado direito foi preenchido com o enxerto autógeno particulado e compactado retirado do osso parietal obtido na confecção das lojas ósseas (grupo controle) (**Figura 1**).

Após preenchimento das lojas ósseas a região foi coberta por membrana de colágeno, absorvível (Pro Tape®, Proline Biomédica, São Carlos, SP, Brasil), umedecida com solução salina esterilizada (**Figuras 2 e 3**). Depois os planos teciduais superficiais foram suturados em posição utilizando fio de sutura de nylon 4-0 (Ethicon, Johnson&Johnson, São Paulo, SP, Brasil).



Figura 1. Calvária de coelho apresentando um defeito de 8 mm de diâmetro em cada osso parietal. O defeito ósseo da direita foi preenchido com osso autógeno particulado e compactado e o defeito ósseo da esquerda foi preenchido com BoneSource (Stryker Co., Michigan, USA).



Figura 2



Figura 3

Figura 2 Defeito ósseo, preenchido por BoneSource, recoberto por membrana colágena.

Figura 3 Defeito ósseo, preenchido por osso autógeno particulado e compactado, recoberto por membrana colágena.

4. Sacrifício dos animais e preparo histológico

4.1. Períodos e forma de sacrifício

O sacrifício foi realizado através de overdose endovenosa de pentobarbital sódico, após o período de 3 e 6 semanas (5 coelhos em cada período). Os blocos contendo os enxertos foram removidos através de osteotomia realizadas com brocas tronco-cônicas nº 701 (KG Sorensen, Alphaville, SP, Brasil), sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

4.2. Preparo Histológico

As amostras foram então fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato, posteriormente foram lavadas por um período de 24 h, e descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais. As soluções foram trocadas a cada 24 h, por um período de aproximadamente 50 dias para obter-se a consistência adequada para o processamento.

Ao final do processo de descalcificação, cada fragmento contendo o enxerto foi submetido a seccionamento longitudinal ao meio (**Figura 4**), e a peça foi submetida ao processamento laboratorial. Cada peça foi lavada em água corrente durante 5 h, desidratada em soluções de concentração crescente de álcool etílico, diafanizada em xilol e incluída em parafina. Cortes seriados de 4µm de espessura foram realizados em micrótomo, corados com hematoxilina-eosina e analisados através de microscopia óptica.

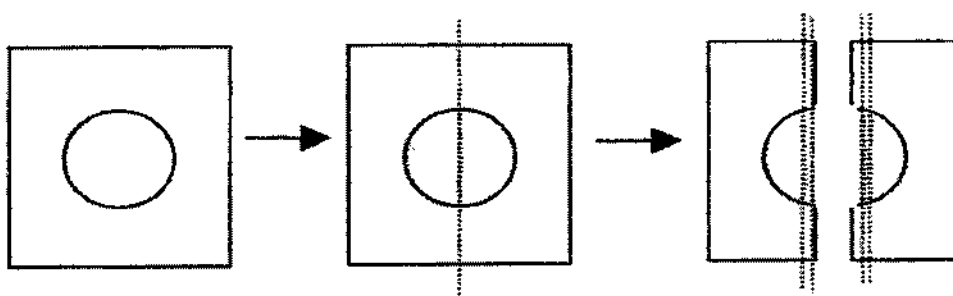


Figura 4 – Divisão das amostras para inclusão e corte

RESULTADOS

Análise dos resultados

Os dados qualitativos foram relatados de forma descritiva. Os dados quantitativos da análise histomorfométrica foram analisados utilizando o programa estatístico BioEstat 3.0 (Sociedade Civil Mamiarauá / MCT – CNPq) sendo os teste de escolha a análise de variância (ANOVA, dois - critérios) e o Teste de Tukey (**Anexo II**).

Análise histológica em microscópio óptico

As amostras histológicas foram analisadas comparando-se o defeito preenchido com o biomaterial com o defeito do grupo com osso autógeno. Através da análise em microscópio óptico (Carl Zeiss) foram avaliados descritivamente aspectos como a intensidade da reação inflamatória, atividade osteoclástica e osteoblástica, necrose, hemorragia, presença de tecido conjuntivo, aposição de tecido ósseo neoformado e presença de partículas de biomaterial.

PERÍODO DE TRÊS SEMANAS

Grupo 1 - Osso autógeno

Na porção periférica, o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente era facilmente identificado, e caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e vascularização. A cavidade óssea cirúrgica encontrava-se preenchida por partículas de osso autógeno envolvidas por tecido conjuntivo (**Figura 5**).

Era possível notar neoformação óssea a partir das partículas de osso autógeno (**Figura 6**). As margens do tecido ósseo pré-existente apresentavam áreas de remodelação e neoformação óssea (**Figura 7**).

Grupo 2 – Biomaterial

O limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, na região periférica da amostra podia ser facilmente identificado. A presença de duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade caracterizavam o osso pré-existente. A remodelação óssea das margens da cavidade ocorre com reabsorção e aposição óssea tendendo ao afilamento e crescimento em direção centrípeta (**Figura 8 e Figura 10**).

O centro da cavidade cirúrgica apresentava-se preenchido por tecido conjuntivo denso (**Figura 9**).

PERÍODO DE TRÊS SEMANAS

Grupo 1 - Osso autógeno

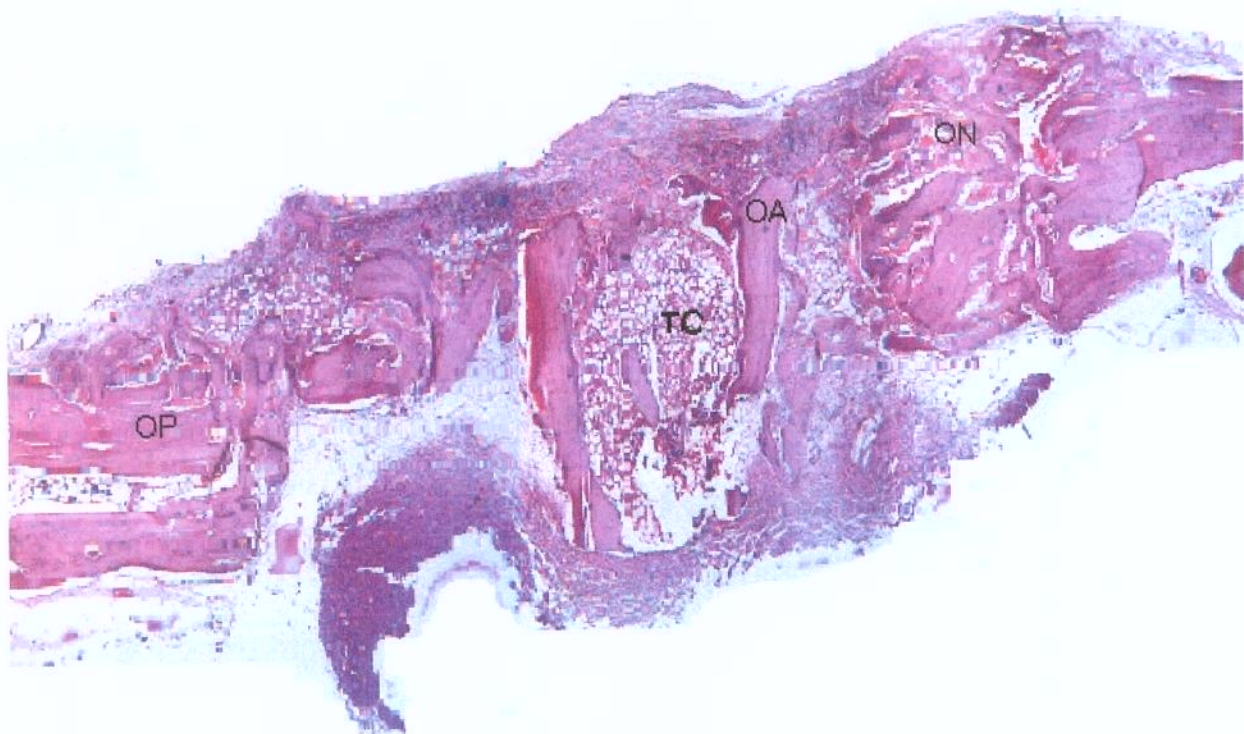


Figura 5. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar osso pré-existente (OP), osso neoformado (ON), partículas de osso autógeno no interior da cavidade óssea cirúrgica (OA) e presença de tecido conjuntivo (TC). Grupo 1 - osso autógeno, 3 semanas. H. E. objetiva 2,5x.

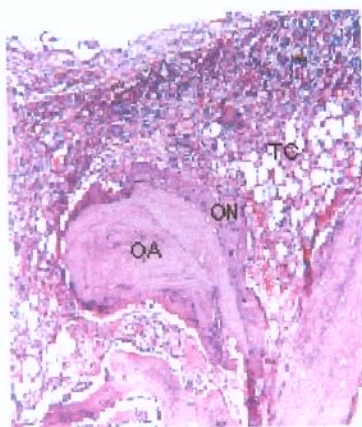


Figura 6

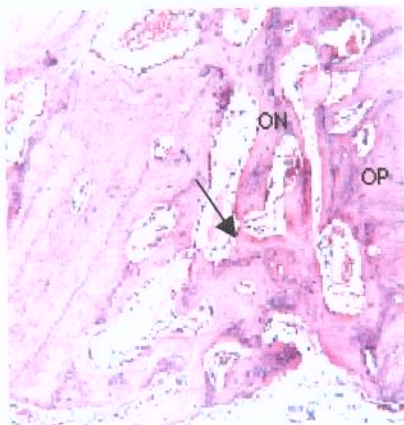


Figura 7

Figura 6. Área central da cavidade óssea cirúrgica. Observar neoformação óssea (ON) a partir de uma partícula de osso autógeno (OA) circundada por tecido conjuntivo (TC). Grupo 1 - osso autógeno, 3 semanas. H. E. objetiva 10x.

Figura 7. Notar alta atividade osteoblástica (seta) próximo à borda da cavidade óssea cirúrgica, neoformação óssea (ON) e tecido ósseo pré-existente (OP). Grupo 1 - osso autógeno, 3 semanas. H. E. objetiva 10x.

Grupo 2 – Biomaterial

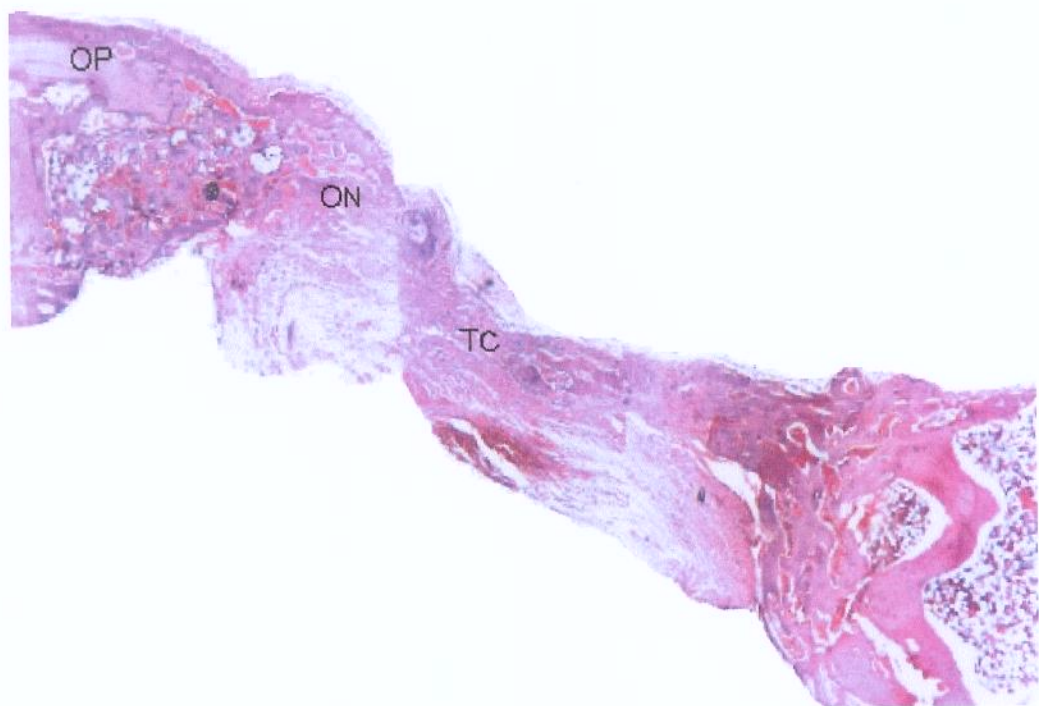


Figura 8. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar osso pré-existente (OP), projeções de tecido ósseo neoformado (ON) em direção centrípeta. A cavidade apresenta-se preenchida por tecido conjuntivo (TC). Grupo 2 - BoneSource, 3 semanas. H. E. objetiva 2,5x.

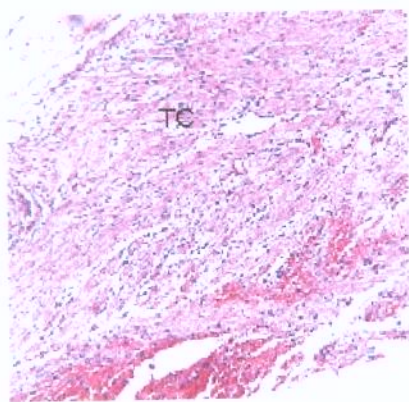


Figura 9

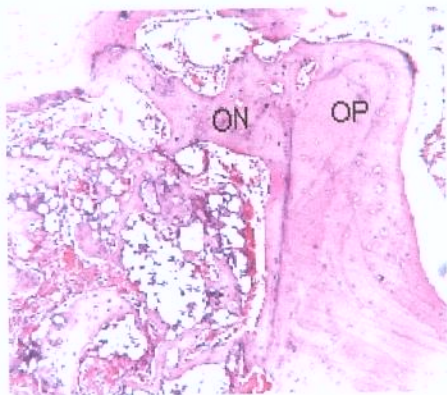


Figura 10

Figura 9 . Área central da cavidade cirúrgica. Observar tecido conjuntivo (TC) denso. Grupo 2 - BoneSource, 3 semanas. H.E. objetiva 10x.
Figura 10. Visão aproximada do limite da cavidade cirúrgica. Observa-se tecido ósseo neoformado (ON) e tecido ósseo pré-existente (OP). Grupo 2 - BoneSource, 3 semanas. H. E. objetiva 10x.

PERÍODO DE SEIS SEMANAS

Grupo 1 – Osso autógeno

A porção periférica da cavidade óssea cirúrgica é facilmente identificada e apresenta o osso pré-existente caracterizado pela presença de duas corticais bem nítidas e tecido medular constituído por tecido adiposo com rica celularidade e boa vascularização. O osso pré-existente apresenta áreas de remodelação e neoformação óssea unida a neoformação óssea proveniente das partículas de osso autógeno no interior da cavidade cirúrgica (**Figura 11 e Figura 13**).

Na área central da cavidade cirúrgica foi possível identificar partículas de osso autógeno envolvidas por neoformação óssea (**Figura 12**).

Grupo 2 – Biomaterial

Na porção periférica da amostra podia ser identificado o limite entre a cavidade óssea cirúrgica e o osso pré-existente, que se caracterizava pela presença de duas corticais bem nítidas, tecido medular constituído por tecido adiposo bem celularizado e vascularizado. A partir do osso pré-existente existiam áreas de remodelação e neoformação óssea crescendo em direção centrípeta (**Figura 14 e Figura 16**).

Em algumas partes da área central da cavidade cirúrgica já era possível notar neoformação óssea envolvida por tecido conjuntivo, porém não foi notado fechamento total da cavidade cirúrgica por tecido ósseo neoformado (**Figura 15**).

PERÍODO DE SEIS SEMANAS

Grupo 1 – Osso autógeno

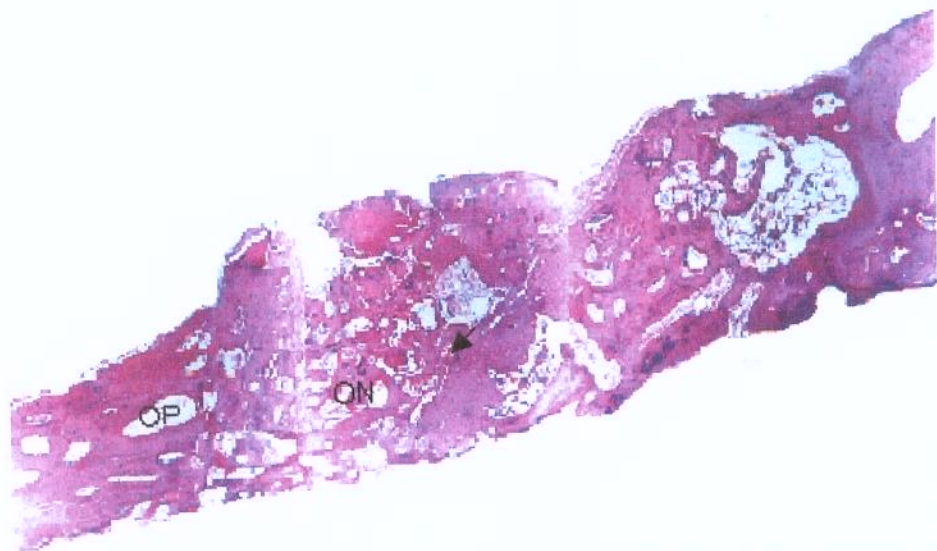


Figura 11. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar as projeções de tecido ósseo neoformado (ON) promovendo uma união entre as bordas do tecido ósseo pré-existente (OP) e o osso autógeno particulado (seta). Grupo 1 - osso autógeno, 6 semanas. H. E. Objetiva 2,5x.

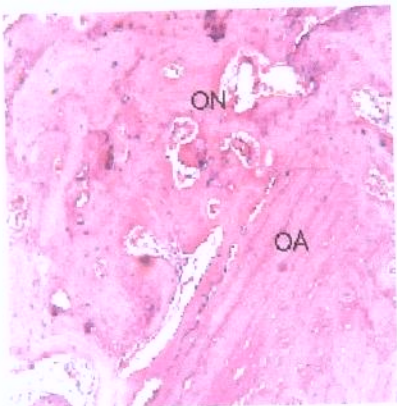


Figura 12

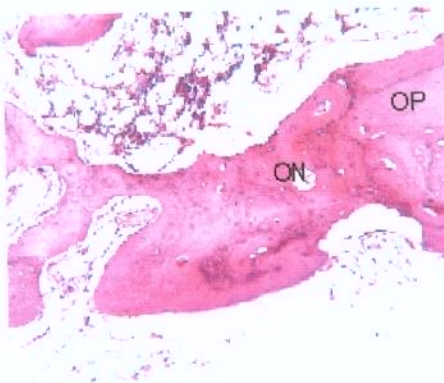


Figura 13

Figura 12. Área central da cavidade cirúrgica. Observar partícula de osso autógeno (OA) circundada por neoformação óssea (ON). Grupo 1 - osso autógeno, 6 semanas. H. E. objetiva 10x.

Figura 13. Limite da cavidade cirúrgica. Observa-se neoformação (ON) óssea e tecido ósseo pré-existente (OP). Grupo 1 - osso autógeno, 6 semanas. H. E. objetiva 10x.

Grupo 2 – Biomaterial

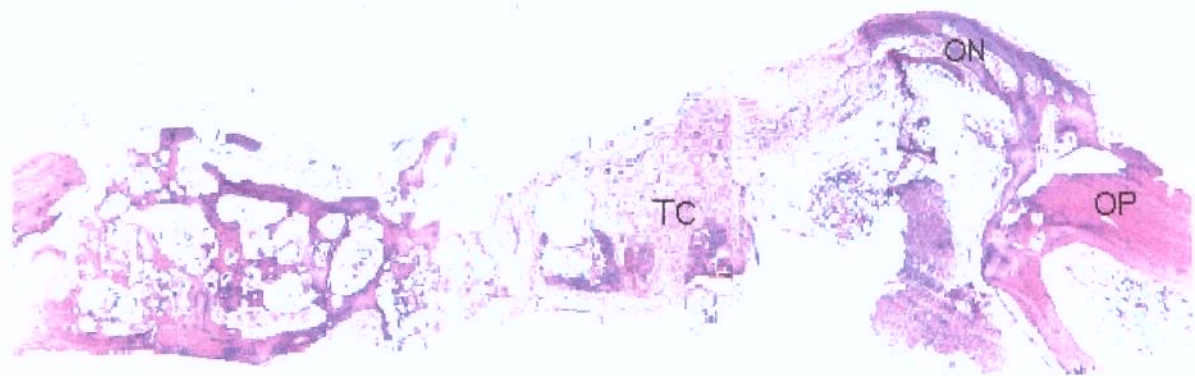


Figura 14. Visão panorâmica da cavidade óssea cirúrgica. Observar osso pré-existente (OP), projeções de tecido ósseo neoformado (ON) em direção centripeta. Notar presença de tecido conjuntivo (TC). Grupo 2 - BoneSource, 8 semanas. H. E. objetiva 2,5x.

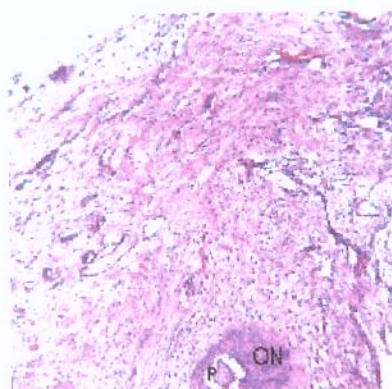


Figura 15

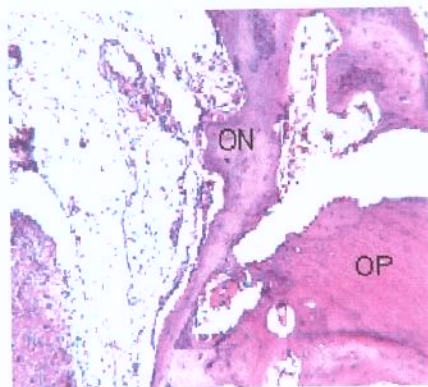


Figura 16

Figura 15. Área central da cavidade cirúrgica. Observar tecido ósseo neoformado (ON) bastante celularizado próximo a partícula (P) quase totalmente reabsorvida. Grupo 2 - BoneSource, 6 semanas. H. E. objetiva 10x.

Figura 16. Limite da cavidade cirúrgica. Notar osso pré-existente (OP) e tecido ósseo neoformado (ON). Grupo 2 - BoneSource, 6 semanas. H. E. objetiva 10x.

Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, foi utilizado um microscópio óptico (Carl Zeiss) com objetiva para aumento de 10x e uma ocular (PK 8x, Reichert) com grade quadriculada com 81 pontos, tendo a área observada $3.125\mu\text{m}^2$.

Para cada animal foram analisadas 3 lâminas histológicas em 3 pontos diferentes da cavidade cirúrgica um na borda direita, um na borda esquerda e um no centro do defeito.

O sistema empregado para análise foi a contagem de pontos que recaíam sobre o osso neoformado nas áreas de intersecção das linhas verticais e horizontais da grade quadriculada.

A cavidade cirúrgica preenchida com osso autógeno no período de 3 semanas teve uma média de 30,13% de neoformação óssea, no período de 6 semanas essa média foi de 45,86%. A cavidade cirúrgica preenchida com BoneSource no período de 3 semanas teve uma média de 18,70% de neoformação óssea, no período de 6 semanas essa média foi de 29,57% (**Gráfico 1**).

Análise estatística

Os dados mensurados da análise histomorfométrica foram transformados em porcentagem e foram obtidas as médias e desvios padrão de cada animal. Estes dados foram submetidos a análise de variância, dois critérios, e, posteriormente submetidos a uma comparação de médias, através do teste de Tukey (**Tabela 1**).

A análise de variância demonstrou que existe diferença estatística entre os tratamentos ($p = 0,000030$), ao nível de significância de 5%.

Pelo teste de Tukey existe diferença estatística entre o tratamento da cavidade cirúrgica com osso autógeno, no período de 3 semanas, e o tratamento com o biomaterial, no período de 3 semanas ($p < 0,01$), assim como existe diferença estatística entre o tratamento com osso autógeno, no período de 3 semanas, e o tratamento com osso autógeno no período de 6 semanas ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre o tratamento com osso autógeno, no período de 3 semanas, e o tratamento com o biomaterial, no período de 6 semanas ($p > 0,05$). Existe diferença estatística entre o tratamento com o biomaterial, no período de 3 semanas e o tratamento com osso autógeno, no período de 6 semanas ($p < 0,01$), existe diferença estatística entre o tratamento com o biomaterial, no período de 3 semanas e o tratamento com o biomaterial no período de 6 semanas ($p < 0,01$), também existe diferença estatística entre o tratamento com o biomaterial, no período de 6 semanas e o tratamento com osso autógeno, no período de 6 semanas ($p < 0,01$).

Porcentagem de neoformação óssea na cavidade cirúrgica

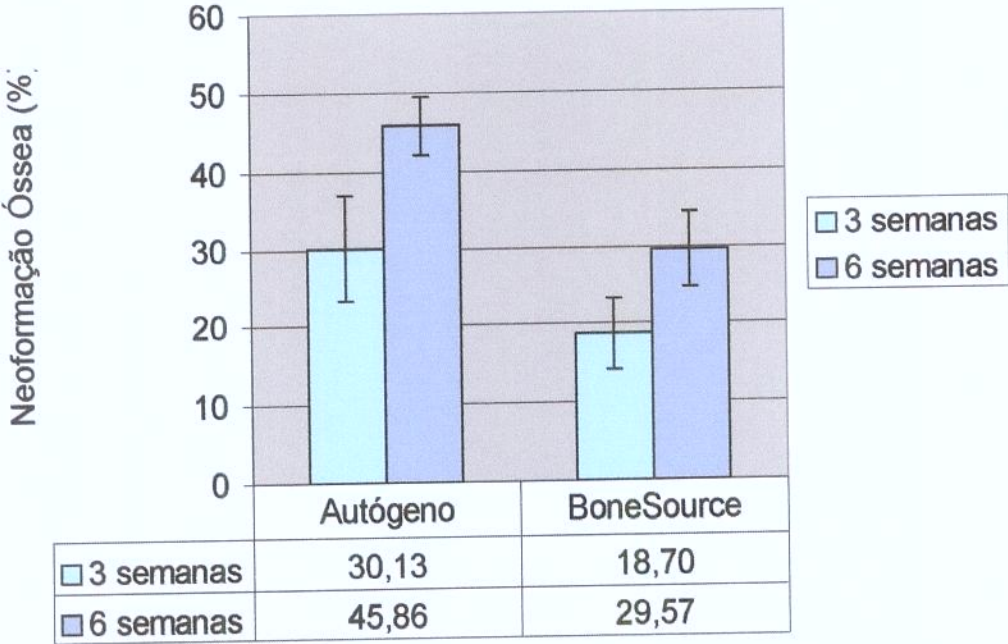


Gráfico 1. Resultados da histomorfometria após 3 e 6 semanas. Comparação de médias de neoformação óssea para osso autógeno e BoneSource, com indicação de desvio padrão para cada uma delas.

Tabela 1. Médias e desvios padrão dos dados originais, letras diferentes representam diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05.

		Média (%)	Desvio Padrão (%)	
3 semanas	Autógeno	30.13	6.83	B
	BoneSource	18.70	4.55	A
6 semanas	Autógeno	45.86	3.65	C
	BoneSource	29.57	4.92	B

DISCUSSÃO

Atualmente existe um grande interesse no desenvolvimento de materiais que sejam capazes de auxiliar o reparo ósseo em casos de defeitos, principalmente em função do surgimento de tratamentos como os implantes osseointegrados, que aumentaram a frequência com que os enxertos ósseos são necessários. Com o intuito de avaliar os diferentes materiais que vem sendo desenvolvidos para auxiliar o reparo ósseo, vários métodos de pesquisa são utilizados.

Segundo Frame, 1980, um modelo de animal ideal para pesquisa de enxertos ósseos deve ser barato, de fácil disponibilidade e manuseio, e também apresentar uma região adequada com osso cortical e esponjoso que permita o preparo de cavidades ósseas de tamanho suficiente para a pesquisa. A calvária de coelhos é um local que apresenta características similares aos maxilares, como a origem embriológica intramembranosa, a morfologia apresentando duas corticais separadas por osso esponjoso, e a fisiologia de reparo ósseo. No presente estudo, observamos que o modelo animal utilizado proporcionou bons resultados ao permitir a realização da comparação entre os dois métodos de tratamento de defeitos ósseos.

Barreiras biológicas ou membranas apresentam a capacidade de manter o espaço previamente ocupado pelo tecido ósseo, e impedem que células do epitélio e do tecido conjuntivo invadam a cavidade óssea antes da diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas (Kleinschmidt *et al*, 1993; Petit & Ripamonti, 1994; Becker *et al*, 1996). No presente estudo, optou-se pela utilização de membranas de colágeno, permitindo-se o processo de regeneração óssea guiada na região.

Moghadam *et al.*, 2004 e Clokie *et al.*, 2002, analisaram e avaliaram a eficácia de enxertos alogênicos e aloplásticos, inclusive BoneSource, na calvária de coelhos, sendo o

grupo controle um defeito preenchido apenas pelo coágulo o período de sacrifício foi de 6 e 12 semanas e o diâmetro do defeito foi de 15,0 milímetros sendo estes parâmetros diferentes dos utilizados nesta pesquisa. Moghadam *et al.*, 2004 obtiveram resultados histomorfométricos diferentes dos apresentados neste estudo. No período de 6 semanas a porcentagem de osso neoformado para o grupo tratado com BoneSource foi de 17,11% e neste estudo a porcentagem foi de 29,57%; o defeito realizado pelos autores era maior que o defeito realizado neste estudo sendo uma provável explicação para a maior porcentagem de neoformação óssea neste trabalho. Moghadam *et al.*, 2004 não trabalharam com o período de sacrifício de 3 semanas não sendo possível esta comparação, assim como neste estudo não foi avaliado o período de 12 semanas, afinal, para o coelho considera-se que o reparo do osso cortical estaria finalizado ao final de 6 semanas (Roberts, 1987). No entanto, assim como demais estudos na literatura, no presente estudo pôde-se observar uma porcentagem de neoformação compatível com a atuação dos materiais aloplásticos, a qual é basicamente osteocondução, ou seja, atuar como um arcabouço para o crescimento ósseo.

Diferentemente dos estudos previamente realizados e disponíveis na literatura, o presente estudo utilizou o enxerto autógeno como grupo controle, uma vez que esse tipo de enxerto é ainda hoje considerado o padrão ouro para reconstruções crânio-maxilofaciais, e a técnica com maior tempo e maior amplitude de utilização. Os melhores resultados em cirurgia de enxertos ósseos são credenciados ao osso autógeno pela ausência de antigenicidade, mínima reação inflamatória, fácil revascularização, grande quantidade de células viáveis presente, e alto potencial de osseocondução e osseoindução (Piatelli *et al.*, 1996; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Restrepo *et al.*, 1998; Kawcak *et al.*, 2000; Rabie & Chay, 2000). Todavia, sua fonte não é inesgotável e sua obtenção exige abordagem cirúrgica da zona doadora, com todos os riscos inerentes a uma operação (Yamamoto, Kawakami & Sakuda, 1993; Ignácio *et al.*, 1996). Estes dados

mostram a influência favorável da utilização de enxerto autógeno, porém também mostram a necessidade de desenvolvimento de outros tipos de enxerto como alternativa ao autógeno. O presente estudo corrobora os dados de que os enxertos autógenos apresentam resultados superiores como materiais reconstitutivos.

De forma geral, observamos, através da análise histológica e histomorfométrica, que ambos os materiais testados influenciaram positivamente na neoformação óssea dos defeitos, melhorando-a em qualidade e quantidade.

CONCLUSÕES

Dentro do propósito deste estudo, e com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 Ocorreu neoformação óssea em ambos os tratamentos.
- 2 Ambos os tratamentos apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo
- 3 Em períodos iguais de tratamento, a neoformação óssea foi estatisticamente maior nas cavidades cirúrgicas tratadas com enxerto autógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERIUS, P.; KLINGE, B.; ISAKSSON, S. Management of craniotomy in young rabbits. **Lab Anim.** v.23, n.1, p.70-2, Jan. 1989.
2. BECKER, W.; URIST, M.; BECKER, B. E.; JACKSON, W.; PARRY, D. A.; BARTOLD, M.; VINCENZZI, G.; DE GEORGES, D.; NIEDERWANGER, M. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. **J Periodontol.** v.67, n.10, p.1025-33, Oct. 1996.
3. BIDIC, S. M. S.; CALVERT, J. W.; MARRA, K.; KUNTA, P.; CAMPBELL, P.; MITCHEL, R.; HOLLINGEN, J. O.; WEISS, L.; MOONEY, M. P. Rabbit calvarial wound healing by means of seeded Caprotite® scaffolds. **J Dent Res.** v.83, n.2, p.131-5, Feb. 2003.
4. BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterials - developments for bone tissue engineering. **Biomaterials.** v.21, n.23, p. 2347-59, Dec. 2000.
5. BURSTEIN, F. D.; COHEN, S. R.; HUDGINS, R.; BOYDSTON, W.; SIMMS, C. The use of hidroxyapatite cement in secondary craniofacial reconstruction. **Plast Reconstr Surg.** v.104, n.5, p.1270-5, Oct. 1999.
6. CLOKIE, C. M.; MOGHADAM, H. D.; JACKSON, M. T.; SANDOR, G. K. Closure of critical sized with allogenic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg.** v.13, n.1, p.111-21, Jan. 2002.
7. CONSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D.; JANES, K.; CHOW, L. C.; SISSON, G. A. Experimental hidroxyapatite cement cranioplasty. **Plast Reconstr Surg.** v.90, n.2, p.174-85, Aug. 1992.
8. FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg.** V. 38, n.3, p.176-80, Mar. 1980.

9. GOMEZ, E.; MARTIN, M.; ARIAS, J.; CARCELLER, F. Clinical applications of Norian SRS (calcium phosphate cement) in craniofacial reconstruction in children: our experience at Hospital La Paz since 2001. **J Oral Maxillofa Surg.** v.63, n.1, p.8-14, Jan. 2005.
10. HOLLINGER, J. O.; BATTISONE, G. C. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. **Clin Orthop.** v.207, p.290-305, Jun. 1986.
11. HOLLINGER, J. O.; BREKKE, J.; GRUSKIN, E.; LEE, D. Role of bone substitutes. **Clin Orthop.** v.324, p. 55-65, Mar. 1996.
12. IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. Estudo sobre a aplicabilidade médica de poliuretano derivada da mamona. **Res Ortop.** v.2, n.1, p.10-5, Mar. 1996.
13. KAWCAK, C. E.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; TURNER, A. S. Comparison of bone matrix and autogenous cancellous bone in horses. **Vet Surg.** v.29, n.3, p.218-26, May-Jun. 2000.
14. KLEINSCHMIDT, J. C.; MARDEN, L. J.; KENT, D.; QUIGLEY, N.; HOLLINGER, J. O. A multiphase system bone implant for regenerating the calvaria. **Plast Reconstr Surg.** v.91, n.4, p.581-8, Apr. 1993.
15. KOHLER, R.; LORGE, F.; BRUNAT-MENTIGNY, M.; NOYER, D.; PATRICOT, L. Massive bone allografts in children. **Int Orthop.** v.14, n.3, p.249-53, 1990.
16. KURASHINA, K.; KURITA, H.; KOTANI, A.; KOBAYASHI, S.; KYOSHIMA, K.; HIRANO, M. Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. **Biomater.** v.19, n.7-9, p. 701-6, Apr-May, 1998.

17. LOTY, B.; COURPIED, J. P.; TOMENO, B.; POSTEL, M.; FOREST, M.; ABELANET, R. Bone allografts sterilised by irradiation. Biological properties, procurement and results of 150 massive allografts. **Int Orthop.** v.14, n.3, p.237-42, 1990
18. MITCHEL, D. F.; SHANKWALKER, G. B. Osteogenic potencial of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. **J Dent Res.** v.37, n.6, p.1157-63, Nov.-Dec. 1958.
19. MOGHADAM, H. G.; SA'NDOR, G. K. B; HOLMES, H. H. I.; CLOKIE, C. M. L. Histomorphometric evalution of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. **J Oral Maxillofac Surg.** v.62, n.2, p.202-13, Feb. 2004.
20. PETERSON, L. J.; ELLIS, E.; HUPP, J. R.; TUCKER, M. R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 3ed, 2000, 772p.
21. PETIT, J. C.; RIPAMONTI, U. Tissue segregation enhances calvarial osteogenesis in adult primates. **J Craniofac Surg.** v.5, n.1, p.34-43, Feb. 1994.
22. PIATTELLI, A.; SCARANO, M.; GORIGLIANO, M.; PIATTELLI, M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. **Biomater.** v.17, n.11, p.1127-31, Jun. 1996.
23. RABIE, A. B.; CHAY, S. H. Clinical applications of composite intramembranous bone grafts. **Am J Orthod Dentofac Orthop.** v.117, n.4, p.375-83, Apr. 2000.
24. RABIE, A. B. M.; LIE KEN JIE, R. K. P. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.25, n.4, p.311-8, Aug. 1996.
25. RABIE, A. B. M.; CHAY, S. H.; WONG, A. M. K. Healing of autogenous intramembranous bone in the presence and absence of homologous demineralized

- intramembranous bone. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** v.117, n.3, p.288-97, Mar. 2000.
26. RABIE, A. B. M.; WONG, R. M. K.; HÄGG, U. Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v.38, n.5 p.565-70, Oct. 2000.
27. RESTREPO, L. L.; MARZOLA, C.; CONSOLARO, A.; COSTA PEREIRA, A. A.; TOLEDO FILHO, J. L.; ANDREO, J. C. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond[®]" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. **Rev Bras Implant.** v.4, p.8, 1998.
28. ROBERTS, E. Bone physiology and metabolism. **J Calif Dent Assoc.** v.12, n.10, p. 54-61, 1987.
29. SALKELD, S. L.; PATRON L. P.; BARRACK, R. L.; COOK, S. D. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. **J Bone Joint Surg Am.** v.83-A, n.6, p.803-16, Jun. 2001.
30. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphste bone cements a critical review. **J Oral Maxillofac Surg.** v.57, n.9, p.1122-6, Sep. 1999.
31. SHAND, J. M.; HEGGIE, A. A.; HOLMES, A. D.; HOLMES, W. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.31, n.5, p.525-31, Oct. 2002.
32. TURK, J. B.; PARHISCAR, A. BoneSource for craniomaxillofacial reconstruction. **Facial Plast Surg.** v.16, n.1, p.7-14, 2000.
33. YAMAMOTO, T. T.; KAWKAMI, M.; SAKUDA, M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. **J Oral Maxillofac Surg.** v.51, n.8, p887-91, Aug. 1993.

34. WAITE, P. D.; SASTRAVAHA, P.; LEMONS, J. E.. Biologic mechanical advantages of 3 different cranial bone grafting techniques for implant reconstruction of the atrophic maxilla. **J Oral Maxillofac Surg.** v.63, n.1, p. 63-67, Jan. 2005
35. WIDMARK, G.; ANDERSSON, B.; IVANOFF, C. J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.26, n.2, p.106-9, Apr. 1997

ANEXO I



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



Comissão de Ética na Experimentação Animal CEE-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 687-2, sobre "ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE COELHOS" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira / Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti 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 (CEE-IB-UNICAMP) em reunião de 05 de Agosto de 2004

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 687-2, entitled "HISTOLOGIC & HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF A BONE SUBSTITUTE IN RABBIT CALVARIAL BONE", 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 August 5, 2004.

Prof. Dra. Liana Vannaud
Presidente

Campinas, 05 de Agosto de 2004.

Fátima Alonso
Secretária

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLÓGICA
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Anexo I. Parecer do comitê de ética em pesquisa animal.

ANEXO II

FONTES DE VARIAÇÃO	QL	SQ	QM
Tratamentos	3	1874.739	624.913
Blocos	4	208.123	
Erro	12	211.230	17.603
F (tratamentos) =	35.5013		
p (tratamenttos) =	0,0000		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 1) =	30,1320		
Média (Coluna 2) =	18,7020		
Média (Coluna 3) =	45,8640		
Média (Coluna 4) =	29,5740		
Tukey	Q	(p)	
Médias (1 a 2) =	6,0918	<0,01	
Médias (1 a 3) =	8,3846	<0,01	
Médias (1 a 4) =	0,2974	>0,05	
Médias (2 a 3) =	14,4764	<0,01	
Médias (2 a 4) =	5,7944	<0,01	
Médias (3 a 4) =	8,6820	< 0,01	

Anexo II. Resultados dos testes de análise de variância, dois critérios, e teste de Tukey pelo programa BioEstat 3.0.

ANEXO III

Anexo III. Artigo enviado ao Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

HISTOLOGIC AND HISTOMORPHOMETRIC ANALYSES OF A CALCIUM PHOSPHATE CEMENT IN

RABBIT CALVARIA

Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti^{*}

Cecília Luiz Pereira, DDS, MS^{*}

Renato Mazzonetto, DDS, MS, PhD[#]

Marcio de Moraes, DDS, MS, PhD[≈]

Roger William Fernandes Moreira, DDS, MS, PhD[§]

^{*} Undergraduate student

^{*} DDS, MSc, Graduate student in Oral and Maxillofacial Surgery

[#] DDS, MSc, PhD, Professor, Division of Oral and Maxillofacial Surgery.

[≈] DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Division of Oral and Maxillofacial Surgery.

[§] DDS, MSc, PhD, Associate Professor, Division of Oral and Maxillofacial Surgery.

Department of Oral Diagnosis (head: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves), Piracicaba Dental School, Campinas State University.

Corresponding author: Dr Roger Moreira, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp, Av Limeira 901, Piracicaba, SP, Brazil. E-mail: roger@fop.unicamp.br

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this investigation was to assess bone regeneration in critical sized defects in the rabbit calvarium, filled with bone substitute calcium phosphate cement.

Material and methods: 8 mm circular bone defects were made in both parietal bones of ten rabbits. One of the defects was filled with the calcium phosphate cement, and the other received autogenous bone graft from the calvaria. The animals were killed at 3 or 6 weeks (n=5). Data analysis included qualitative assessment of the calvarial specimens and histomorphometric analysis was used to quantify the amount of new bone within the defects.

Results: The microscopic analysis of the samples showed bone healing with both calcium phosphate cement and autogenous bone graft. Data obtained from the histomorphometric analysis were statistically analyzed using 2-way ANOVA and the Tukey test. Data analysis showed that autogenous bone graft had

significantly more new bone compared with calcium phosphate cement at 3 and 6 weeks. Calcium phosphate cement at 6 weeks presented similar results to autogenous bone at 3 weeks. Both treatments presented an increase in bone healing with time.

Conclusion: Treatments allowed bone regeneration that increased with time, however surgical cavities treated with the autogenous graft had more bone formation than calcium phosphate cement.

INTRODUCTION

There is a wide range of materials that can be used as bone substitutes, and they can be either natural or synthetic (Hollinger & Battisone, 1986). Autogenous bone, grafted from different sites of the same subject, are considered as the ideal bone graft (Rabie, Chay & Wong, 2000). Allogenic grafts are obtained from individuals of the same species of the receiver, and xenogenic grafts are obtained from other species. Metals, ceramics, alloys and polymers are some of the synthetic materials used as bone substitutes.

The use of grafts to repair bone loss is a challenge in modern dentistry and bone substitute substances have been sought in the past years (Mitchel & Shankwalker, 1958). Bone can be lost as a result of physiological resorption caused by dental losses, or due to trauma, bone pathology or infection (Rabie, Wong & Hägg, 2000). The reparation of a bone defect with autogenous grafts demands a donor site, with additional surgical risks and discomfort to the patient.

The development and popularization of dental implants has stimulated the study of bone substitutes, given that the stability and position of the implant depends on the quantity and quality of bone. In situations of poor quality and/or quantity of bone, the placement of dental implants in optimal position is often unfeasible without bone reconstruction (Widamrk, Anderson & Ivanoff, 1997; Waite, Sastravaha & Lemons, 2005).

The need for autogenous and alloplastic materials to repair complex bone losses has increased, as a result of the advancement of oral and maxillofacial surgery techniques (Shand *et al.*, 2002). The use of alloplastic materials for reconstruction of endochondral bone defects has been reported in orthopedic literature (Kohler, *et al.*, 1990; Loty, *et al.*, 1990; Salkeld *et al.*, 2001). Constantino *et al.* (1992) observed the efficacy of employing a synthetic bone substitute for repairing bone defects in cat calvaria.

Recent studies have evaluated the efficacy of calcium phosphate cements as a reconstructive material in rabbit calvaria, comparing bone regeneration when employing allogenic and alloplastic materials, and using a defect filled solely by the clot as the control group (Moghadam *et al.*, 2004; Clokie *et al.*, 2002). Gomez *et al.*, 2005, showed that this alloplastic material is an option for treatment of patients with craniofacial malformations, especially children, because it does not affect craniofacial growth. According to Burstein *et al.*

(1999), calcium phosphate cements have presented positive results when employed in craniofacial reconstruction surgery. It has also shown excellent retention of implanted volume, without any interference in the craniofacial growth for a period of approximately 3 years. The calcium phosphate cements show excellent biocompatibility, are easily moldable *in situ* and allow osteoconduction (Turk & Parhiscar, 2000).

Ideal bone substitutes should be strong, malleable, osteoconductive, osteoinductive, resorbable, inexpensive, and easy to use intra-operatively, while promoting cell adhesion, proliferation, and differentiation (Bidic *et al.*, 2003; Hollinger *et al.*, 1996; Schmitz, Hollinger & Milam, 1999; Burg, Porter & Kellam, 2000; Kurashina *et al.*, 1998).

The purpose of this investigation was to assess bone regeneration in critical sized defects in the rabbit calvarium, filled with a bone substitute of calcium phosphate cement.

MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas), protocol N° 687-2. Thirty adult female Norfolk White rabbits (weight 2.8 to 3.2 kg) of skeletal maturity were used in this study.

Each animal was premedicated according to their weight with an intramuscular injection of 80.000 IU / kg benzatin penicillin (Benzetacil®, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brazil) and 3 mg / kg ketoprofen (Ketofen 10%®, Merial Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) and also a subcutaneous injection of 0.08 mg/ kg atropine (Wyeth Laboratórios, Itapevi, SP, Brazil). General anesthesia was obtained by an intramuscular injection of 30 mg/kg of ketamine (Dopalen®, Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, SP, Brazil) and 6 mg/kg of xylazine (Rompun®, Bayer SA, São Paulo, SP, Brazil). Local anesthetic solution (2% lidocaine with adrenaline) was used for local hemostasia (Alphacaine®, DFL, São Paulo, SP, Brazil).

An incision was made along the midline of the scalp from a point midway between the base of the ears to approximately 5 cm anteriorly through full-thickness skin and galea. Sharp subperiosteal dissection reflected the pericranium from the outer table of the cranial vault, exposing the parietal bones. A 8,0mm wide trephine under copious saline irrigation was used to create bilateral full-thickness calvarial defects. Two 8-mm-diameter defects were created, one on each side of the midline.

The left defect was filled with a calcium phosphate cement (BoneSource, Stryker Co., Kalamazoo, Michigan, USA), prepared according to the manufacturer's instructions. The right defect was filled with particulated autogenous bone obtained from the two trephine sites (**Figure 1**). Autogenous bone graft was particulated using a Bone Mill (Neodent, Curitiba, PR, Brazil). Both filled defects were covered by a collagen membrane absorbable (Pro Tape®, Proline Biomédica, São Carlos, SP, Brazil) humidified with sterilized

saline solution. After placement of the materials, the pericranium and skin were closed in layers with nylon sutures (Ethicon, Johnson & Johnson, SP, Brazil).



Figure 1. Rabbit calvarium showing bilateral 8-mm diameter critical sized defect in parietal bone. The right defect was filled with autogenous bone and left defect was filled with Calcium phosphate cement.

Five animals were killed at 3 weeks and five were killed at 6 weeks. Once dead, bone blocks containing the samples were removed, fixed in 4% neutral formalin, washed for a period of 24 hours and immersed in a sodium citrate and formic acid solution for 50 days until adequate decalcification. Each block containing the grafted area was submitted to alcohol dehydration, embedded in paraffin and 4 μ m sections were obtained. The hematoxylin-eosin sections were randomly divided into four groups to perform histomorphometric and histologic analysis under light microscopy: Group 1 (n=5): autogenous bone graft at 3 weeks, Group 2 (n=5): Biomaterial at 3 weeks, Group 3 (n=5): autogenous bone graft at 6 weeks and Group 4 (n=5): Biomaterial at 6 weeks.

The qualitative data observed under optical microscopy, such as intensity of inflammatory reaction, osteoclastic and osteoblastic activity, necrosis, hemorrhage, presence of connective tissue, apposition of bone tissue and presence of particles of biomaterial are presented in a descriptive way. Histomorphometric results were analyzed using BioEstat 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq) statistical software. A 2-way ANOVA was performed to evaluate the data of histomorphometric analysis for statistical significance between the various groups. In this investigation, the Tukey test was used to determine statistical significance between each treatment. Statistical significance was established at $p < 0,05$.

RESULTS

GROUP 1: Autogenous bone graft at 3 weeks

At the peripheral zone, the limit between the surgical bone cavity and the pre-existing bone was easily identified by the presence of two very clear cortical layers and medullar tissue composed of adipose tissue rich in blood vessels and cells. The surgical bone cavity was filled with particles of autogenous bone

surrounded by connective tissue. It was possible to notice newly formed bone in the particles of autogenous bone. The margins of the pre-existing bone tissue showed areas of remodeling and bone formation (**Figure 2**).

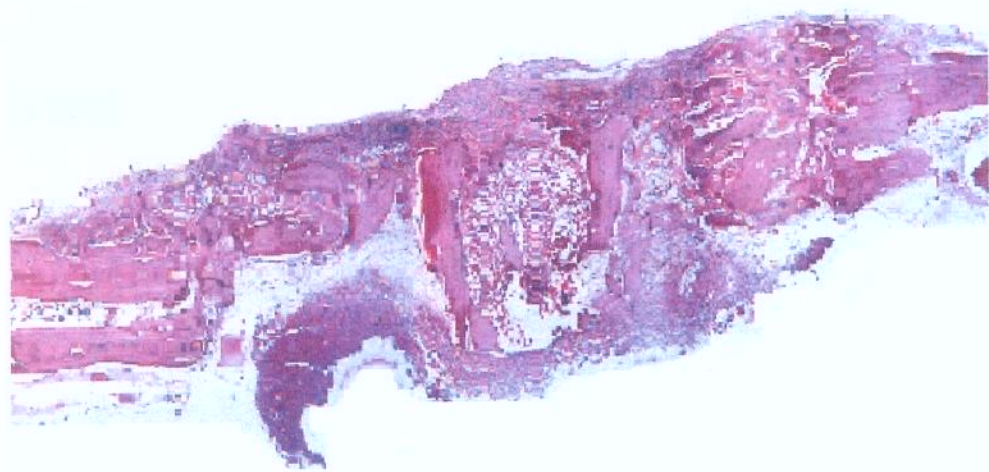


Figure 2. Group 1 photomicrograph of the autogenous bone graft at 3 weeks showing bone formation at the margins of the pre-existing bone tissue and bone formation in the particles of autogenous bone. (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 2,5).

GROUP 2: Biomaterial at 3 weeks

The limit between the surgical bone cavity and the pre-existing bone, in the peripheral area of the sample, could be easily noticed. The presence of two very clear cortical layers and medullar tissue composed by adipose tissue with rich cellularity characterized the pre-existing bone. The bone remodeling of the cavity margins occurred through bone resorption and apposition. The centre of the surgical cavity was filled by dense connective tissue (**Figure 3**).

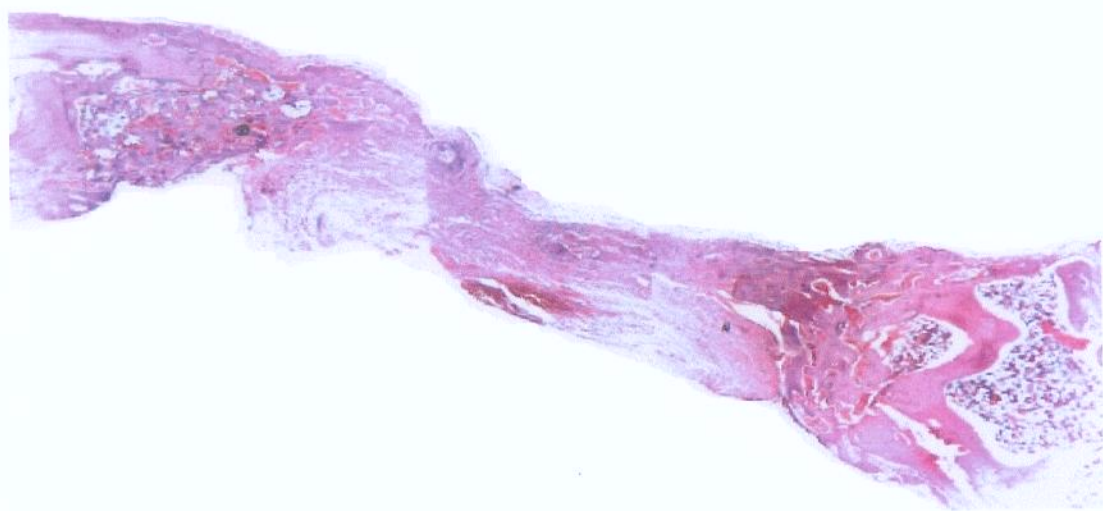


Figure 3. Group 2 photomicrograph of the biomaterial at 3 weeks showing bone formation at the margins of the pre-existing bone tissue. (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 2,5).

GROUP 3: Autogenous bone graft at 6 weeks

At the peripheral zone, the limit between the surgical bone cavity and the pre-existing bone was easily identified by the presence of two very clear cortical layers and medullar tissue composed of adipose tissue rich in blood vessels and cells. The pre-existing bone presented areas of bone remodeling and bone formation. The particles of autogenous bone also showed bone formation. There are areas showing union across the particles of autogenous bone by the new bone formation (**Figure 4**).

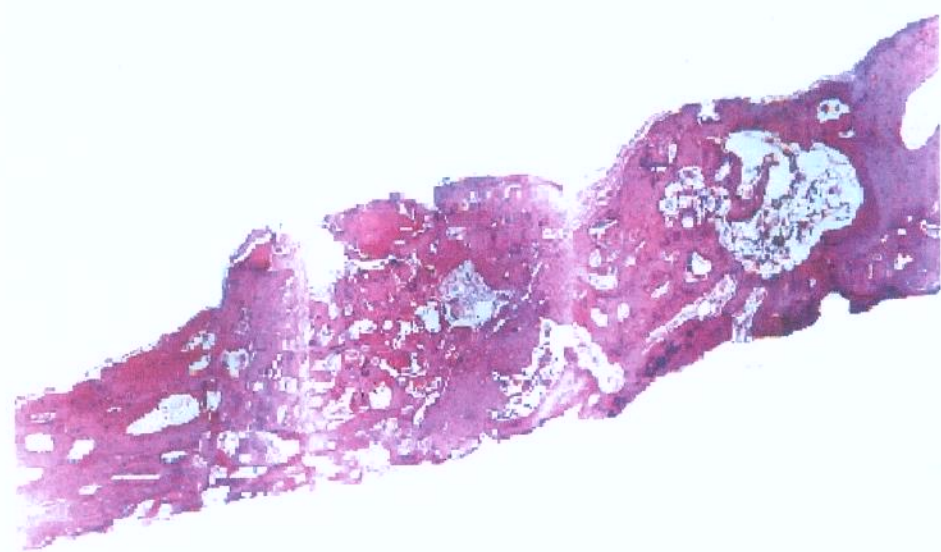


Figure 4. Group 3 photomicrograph of the autogenous bone graft at 6 weeks showing bone formation at the margins of the pre-existing bone tissue and bone formation in the particles of autogenous bone. (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 2,5).

GROUP 4: Biomaterial at 6 weeks

The limit between the surgical bone cavity and the pre-existing bone, in the peripheral area of the sample, could be easily noticed. The presence of two very clear cortical layers and medullar tissue composed by adipose tissue with rich cellularity characterized the pre-existing bone. There were areas of bone remodeling and apposition growing in centripetal direction. In some parts of the central area of the surgical cavity it was already possible to notice newly formed bone surrounded by connective tissue. However, it was not possible to observe total closing of the surgical cavity by bone tissue (**Figure 5**).



Figure 5. Group 4 photomicrograph of the biomaterial at 6 weeks showing bone formation at the margins of the pre-existing bone tissue. (hematoxylin and eosin stain, original magnification x 2,5).

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS

Histomorphometric analysis was performed first by viewing the hematoxylin-eosin sections under light microscopy (Leitz, Wetzlar, Germany) at x10 magnification, with an 81-point reticular ocular that allowed to quantify bone formation, by only one blind the investigator. The mean was calculated from analysis of 3 slides through this section: right edge, left edge and center of the defect. The following parameters were measured in terms of the percentage of the defect area they occupy: total defect area, area of new bone. This total area of new bone was expressed as a percentage of the total area of the defect.

At the 3 weeks, the defects treated with autogenous bone presented a 30.13 mean percentage of bone formation, and those treated with the calcium phosphate cement presented an 18.70 mean percentage. At the 6 weeks, autogenous bone presented a 45.86 mean percentage of bone formation; and those treated with the calcium phosphate cement presented a 29.75 percentage (**Figure 6**).

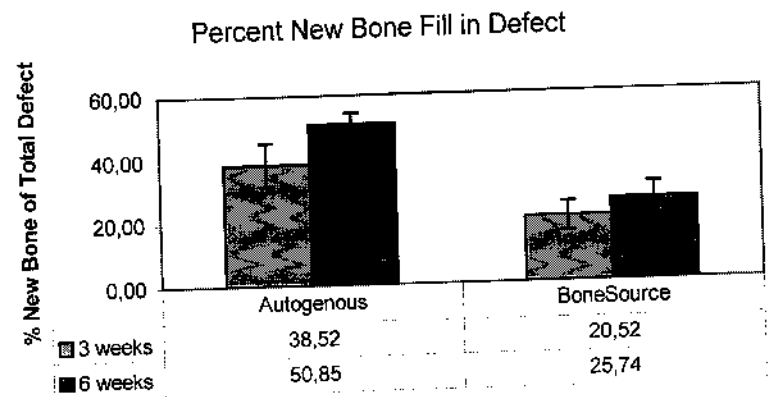


Figure 6. Histomorphometric results at 3 and 6 weeks. Total new bone is expressed as a percentage of the total region of the defect. Error bars represent standard deviations.

STATISTICAL ANALYSYS

The analysis of variance showed there was statistical difference between the treatments ($p=0.000030$). Tukey's test showed statistical difference between autogenous bone and the biomaterial, at both 3 and 6 weeks ($p < 0.01$). There was an increase of bone formation with time, when comparing both autogenous bone and the biomaterial at the periods of 3 weeks and 6 weeks ($p < 0.01$). There was no statistical difference between autogenous bone at 3 weeks and biomaterial at 6 weeks ($p>0.05$) (**Table 1**).

Table 1. Mean percentages and standard deviations, different letters means statistical difference between groups according Tukey's test ($p< 0,05$).

		Mean percentages	Standard deviations (%)	
3 weeks	Autogenous	30.13	6.83	B
	Biomaterial	18.70	4.55	C
6 weeks	Autogenous	45.86	3.65	A
	Biomaterial	29.57	4.92	B

DISCUSSION

There is currently a great interest in the development of materials capable of helping bone repair. The development of treatments such as endosseous dental implants has increased the necessity of bone grafts. With the purpose of evaluating different bone substitutes, numerous methodologies have been employed. According to FRAME (1980), animal models for bone grafting studies should be cheap, easy to obtain and handle and also to offer an adequate for the preparation of large bone cavities. The rabbit calvaria has similar characteristics to those of jawbones: the intramembranous embryologic origin, the presence of two cortical layers separated by cancellous bone and the physiology of bone repair. In the present study, this animal model provided good results, for it allowed comparison between the two different methods of treatment of bone defects.

Biological barriers or membranes feature the ability to maintain the space which was previously occupied by bone tissue and prevent cells from epithelium or connective tissue from invading the bone cavity before the differentiation of the mesenchimal cells into osteogenic cells (Kleinschmidt *et al*, 1993; Petit & Ripamonti, 1994; Becker *et al*, 1996). In the present study, collagen membranes were used to permit bone regeneration in the operated regions.

Moghadam *et al.*, 2004 and Clokie *et al.*, 2002, evaluated allogenic and alloplastic materials, including calcium phosphate cement, in rabbit calvaria, using blood cloth as control group in 15-millimeter circular defects. These authors obtained different results from those of the present study - at 6 weeks, the percentage of bone formation in the group treated with the biomaterial was lower (17.11%). The diameter of the defects may justify this difference.

Differently from previous reports, in the present study the autogenous graft served as the control group due to its status of ideal grafting material. Better results with autogenous bone graft are credited to its lack of immunogenicity, minimum inflammatory reaction and easy revascularization, great quantity of viable cells and high potential of osteoconduction and osteoinduction (Piatelli *et al.*, 1996; Rabie & Lie Ken Jie, 1996; Kawcak *et al.*, 2000; Rabie & Chay, 2000). The present results showed favorable influence on the use of autogenous graft, confirming the superiority of autogenous grafts as reconstructive materials. However,

both materials tested influenced positively the bone healing of the defects, improving it in quality and quantity.

Based on the results, it can be concluded that treatments allowed bone regeneration, that increased with time, however surgical cavities treated with the autogenous graft had more bone formation than calcium phosphate cement.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by PIBIC/CNPq - PRP/UNICAMP (State University of Campinas).