



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



AGNES SOARES DE SAMPAIO NASCIMENTO

**PROCESSO DE REPARAÇÃO ALVEOLAR APÓS EXODONTIA E
PREENCHIMENTO DO ALVÉOLO COM BIOMATERIAL BOVINO INORGÂNICO.**

Análise microscópica em ratos.

**ALVEOLAR HEALING PROCESS AFTER TOOTH EXTRACTION AND FILLING OF
DENTAL SOCKET WITH BIOMATERIAL INORGANIC BOVINE.**

Microscopic analysis in rats.

ARAÇATUBA- SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



AGNES SOARES DE SAMPAIO NASCIMENTO

**PROCESSO DE REPARAÇÃO ALVEOLAR APÓS EXODONTIA E
PREENCHIMENTO DO ALVÉOLO COM BIOMATERIAL BOVINO INORGÂNICO.
Análise microscópica em ratos.**

ALVEOLAR HEALING PROCESS AFTER TOOTH EXTRACTION AND FILLING OF
DENTAL SOCKET WITH BIOMATERIAL INORGANIC BOVINE.

Microscopic analysis in rats

Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista
"Julio de Mesquita Filho".

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Daniela
Ponzoni

ARAÇATUBA – SP

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por escutar meus pedidos e por estar sempre iluminando meu caminho, pois a caminhada nunca cessa.

Aos meus pais e familiares e ao Lucas pela doação constante de incentivo, apoio, confiança e amor.

Aos meus amigos especiais e verdadeiros da vida e da faculdade, por estarem sempre presentes e solícitos.

À minha orientadora Prof^a Ass Dr^a Daniela Ponzoni, por toda paciência, sutileza, sinceridade, assistência e transmissão de conhecimento dedicada durante nosso tempo de convivência.

À Prof^a Renata Bianco Consolaro e aos demais colaboradores (Prof^a Dr^a Ana Paula F Bassi , Prof^a Dr^a Alessandra M Aranega, D. Dirce e Gilmar, técnicos de laboratório) que tornaram a realização deste trabalho possível.

À banca examinadora pela disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À UNESP Araçatuba pela oportunidade de realização do curso de Odontologia.

EPÍGRAFE

O mestre disse a um dos seus alunos: Yu, queres saber em que consiste o conhecimento? Consiste em ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto de não a conhecer. Este é o conhecimento...

Confúcio, filósofo chinês (551 a.C. - 479 a.C.)

NASCIMENTO, ASS. **Processo de reparação alveolar após exodontia e preenchimento do alvéolo com biomaterial bovino inorgânico. Análise microscópica em ratos.** 2013. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Resumo

Diversos biomateriais bovinos surgem no mercado nacional para serem utilizados na clínica odontológica. O comportamento desses materiais necessita ser avaliado no interior de cavidades ósseas em animais para observações histológicas do seu potencial de reparação e geração de reações de corpo estranho. O alvéolo dentário é uma cavidade óssea que possui peculiaridades no seu processo de reparação. O processo de reparo alveolar deve culminar com a formação de tecido ósseo no seu interior visando futuras reabilitações com implantes osseointegráveis ou por meio de próteses convencionais. Quando alguma das paredes alveolares é danificada, há a necessidade de reconstrução e para isso, uma das opções é a utilização dos biomateriais. Os biomateriais de origem bovina são disponíveis e não exigem acesso a áreas doadoras dos pacientes, embora se espere deles apenas o potencial osteocondutor. Este trabalho teve como objetivo analisar a dinâmica da reparação de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e com biomaterial bovino inorgânico (BoneFill®) em ratos por meio de técnica histológica. Para tanto foram utilizados 54 ratos Wistar, machos, com peso entre 200-240g divididos em 2 grupos: Grupo I (grupo controle, 27 ratos), Grupo II (grupo teste, 27 ratos). Todos os animais tiveram o incisivo superior direito extraído. No grupo controle os animais tiveram o alvéolo preenchido com coágulo sanguíneo. No grupo tratado os animais tiveram o alvéolo preenchido pelos grânulos do biomaterial. Todos os animais tiveram os alvéolos suturados com fio de seda 4.0. Os períodos experimentais foram de 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Foi realizada análise histológica qualitativa e quantitativa. Na análise qualitativa os resultados observados foram a presença de tecido de granulação/tecido conjuntivo fibroso jovem, vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos, osteoblastos e matriz óssea mineralizada tanto no grupo controle como

no grupo teste em todos os tempos do experimento, e a ausência de granuloma do tipo corpo estranho, macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias, também em todos os tempos. Na análise quantitativa usaram-se escores crescentes de 1 a 5 para quantificar os fenômenos de natureza reacional e reparatória relacionados à organização celular e tecidual e observou-se que no grupo controle houve presença de tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea (escore 5) em todos os espécimes de todos os tempos analisados. No grupo teste foi analisado a neoformação óssea entre as partículas e na superfície das partículas do biomaterial. Neste grupo observou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea em todos os espécimes de todos os tempos, com exceção de alguns espécimes no tempo de 7 dias. Embora a presença de neoformação óssea em todos os tempos do grupo com BoneFill[®], este quando comparado ao grupo controle observou-se uma quantidade menor de neoformação óssea. Por meio dos resultados chegou-se à conclusão que o BoneFill[®] atrasou o processo de reparação alveolar em comparação ao grupo controle ao mesmo tempo que desempenhou função de osteocondutividade e biocompatibilidade, apresentando ausência de reações do tipo corpo estranho.

Palavras Chave: Biomateriais. Implantodontia. Reparo alveolar.

NASCIMENTO, ASS. **Alveolar healing process after tooth extraction and filling of dental socket with biomaterial inorganic bovine. Microscopic analysis in rats.** 2013. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

Abstract

Several biomaterials bovine arise in the domestic market to be used in clinical dentistry. The behavior of these materials needs to be evaluated within bone cavities in animals for histological observations of their repair potential and generation of foreign body reactions. The dental socket is a bone cavity that has peculiarities in its repair process. The alveolar repair process should culminate in the formation of bone tissue inside aiming future rehabilitation with dental implants or through conventional prostheses. When any of the alveolar walls is damaged, there is the need for reconstruction and for this, one option is the use of biomaterials. Biomaterials bovine are available and do not require access to donor sites of patients, although it is expected of them just the osteoconductive potential. This study aimed to analyze the dynamics of the repair of alveoli filled with blood clot and biomaterial inorganic bovine (BoneFill®) in rats using histological techniques. Therefore, we used 54 male Wistar rats weighing between 200-240g divided into 2 groups: Group I (control group, 27 rats), Group II (test group, 27 rats). All animals had their right upper incisor extracted. In the control group the animals had the alveoli filled with blood clot. In the group treated the animals had the alveoli filled with the biomaterial granules. All animals had the alveoli sutured with 4.0 silk. The experimental periods of 7, 14 and 28 days postoperatively. Histological analysis was performed qualitative and quantitative. Qualitative analysis results observed were the presence of granulation tissue / fibrous connective tissue young, newly formed blood vessels, fibroblasts, osteoblasts and mineralized bone matrix in both the control group and in the group BoneFill® at all times of the experiment, and the absence of foreign body granuloma, macrophages and inflammatory

multinucleated giant cells, also at all times. The quantitative analysis used scores were growing 1-5 to quantify the phenomena of nature reactive and reparative related to the cellular and tissue organization and was observed in the control group the presence of fibrous connective tissue with bone formation (score 5) in all specimens of all periods analyzed. In the group BoneFill® was analyzed bone formation between the particles and the surface of the particles of biomaterial. In this group we observed the presence of fibrous connective tissue with bone formation in all specimens of all time, with the exception of a few specimens in 7 days time. Although the presence of new bone formation at all times the group BoneFill®, this compared to the control group showed a smaller amount of new bone formation. Through the results arrived at the conclusion that the BoneFill® delayed alveolar healing process in comparison to the control group while served as osteoconductivity and biocompatibility, with no foreign body reactions.

Keywords: Biomaterials. Implantology. Alveolar repair.

Lista de Figuras

Figura 1	Sindesmotomia	17
Figura 2	Luxação	17
Figura 3	Exodontia	17
Figura 4	Incisivo superior direito extraído	17
Figura 5	Incisivo superior direito	18
Figura 6	Alvéolo do incisivo superior direito	18
Figura 7	Introdução do biomaterial no alvéolo	18
Figura 8	Alvéolo preenchido	18
Figura 9	Sutura	18
Figura 10	Padrões morfológicos mensurados em escores de 2 a 5 da reação tecidual <i>ao redor</i> das partículas dos materiais testados	21
Figura 11	Padrões morfológicos mensurados em escores de 1 a 5 da reação tecidual <i>na interface</i> com as partículas dos materiais testados	22
Figura 12	Grupo experimental controle aos 7 dias	23
Figura 13	Grupo Experimental Bonfill aos 7 dias	24
Figura 14	Imagem comparativa do período experimental 7 dias	25
Figura 15	Grupo Experimental Controle aos 14 dias	26
Figura 16	Grupo Experimental Bonfill aos 14 dias	27
Figura 17	Imagem comparativa do período experimental 14 dias	28
Figura 18	Grupo Experimental Controle aos 28 dias	29
Figura 19	Grupo Experimental Bonfill aos 28 dias	30
Figura 20	Imagem comparativa do período experimental 28 dias	31
Figura 21	Imagem comparativa do Grupo Controle nos	32

Figura 22	períodos experimentais 7,14 e 28 dias Imagem comparativa do Grupo Bonefill nos períodos experimentais 7,14 e 28 dias	33
-----------	--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Escore - grupo controle	34
Tabela 2	Escore: grupo bonefill – Análise microscópica entre as partículas	35
Tabela 3	Escore: grupo bonefill - Análise microscópica na superfície das partículas	36
Tabela 4	Análise qualitativa - grupo controle	37
Tabela 5	Análise qualitativa - grupo bonefill	38

Sumário

1	Introdução	12
2	Proposição	15
3	Materiais e métodos	16
3. 1	Grupos experimentais	16
3. 2	Procedimentos cirúrgicos realizados	16
3. 3	Obtenção das lâminas para análise histológica	19
3. 4	Análise microscópica	20
3. 4. 1	Critérios aplicados na análise microscópica	20
4	Resultados	23
4. 1	Grupo Experimental Controle aos 7 dias	23
4. 2	Grupo Experimental Bonefill aos 7 dias	24
4. 3	Grupo Experimental Controle aos 14 dias	26
4. 4	Grupo Experimental Bonefill aos 14 dias	27
4. 5	Grupo Experimental Controle aos 28 dias	29
4. 6	Grupo Experimental Bonefill aos 28 dias	30
4. 7	Tabelas do critério de mensuração para quantificar a reação tecidual ao redor ou na interface das partículas	34
5	Discussão	39
6	Conclusão	43
	Referências	44
	Anexos	48

1- INTRODUÇÃO

Os materiais chamados substitutos ósseos constituem biomateriais que tem o objetivo de, ao serem utilizados, diminuir a morbidade que a obtenção do osso autógeno proporciona ao paciente ^{1,2}. No entanto, as propriedades biológicas dos materiais homogêneos, heterogêneos e aloplásticos diferem dos autógenos por serem predominantemente osteocondutivos e não osteoindutivos ou osteogênicos como o osso autógeno ³.

Desta forma, os substitutos ósseos devem ser indicados em situações onde a neoformação óssea não deva ocorrer às suas expensas, como nos casos de preenchimento de cavidades onde há paredes ósseas remanescentes, para melhorar o contorno de rebordo ou ainda para proteger implantes parcialmente expostos e que apresentam a tábua óssea vestibular fenestrada³. Nestas condições, os substitutos ósseos teriam sua expectativa de função plenamente coerente com o que apresentam de propriedade biológica.

Entre os substitutos ósseos heterogêneos existentes no mercado nacional, encontra-se o osso desmineralizado, o osso mineralizado, o osso composto e a proteína óssea morfogenética, todos de origem bovina.

Os materiais de origem bovina constituem materiais teoricamente biocompatíveis ^{4,5,6,7} e que devem ser estudados objetivando conhecer melhor suas propriedades biológicas já que são largamente utilizados na clínica. É importante salientar que a estrutura da hidroxiapatita é similar entre as espécies ⁸. Inúmeros trabalhos na literatura demonstram a biocompatibilidade da matriz bovina como material para enxerto ósseo ^{8,9,10,11}. Trata-se de um material obtido de uma fonte abundante, de custo acessível, sendo também seguro quanto ao risco de transmissão de doenças. O processo de tratamento ao qual é submetido elimina qualquer risco de resposta imunogênica ^{12,13}.

O material é considerado desmineralizado quando a parte inorgânica do osso é removida e, conforme URIST (1965)¹⁴ e TAGA et al.⁴ (1997) são materiais que podem apresentar, dependendo do doador, potencial osteoindutivo devido a presença de fatores de crescimento solúveis no seu interior; enquanto que os materiais mineralizados geralmente apresentam apenas capacidade osteocondutora quando no interior do tecido ósseo.

Tosta et al. (2007)¹⁵ avaliou clínica e histologicamente a utilização de substituto ósseo (Bonefill[®] - xenoenxerto bovino inorgânico) como material de preenchimento ósseo em cirurgias de levantamento de seio maxilar em humanos. Cinco pacientes cuidadosamente selecionados foram submetidos a cirurgias de aumento ósseo sinusal bilateral, sendo um lado enxertado com osso bovino inorgânico e o outro com enxerto ósseo autógeno removido de área doadora intrabucal. Após nove meses de reparação óssea sem complicações, realizaram-se as cirurgias para colocação de implantes osseointegrados nas áreas enxertadas de cada paciente, momento em que foram colhidas amostras do tecido neoformado para avaliação histológica. Clinicamente, o osso bovino inorgânico originou um tecido de consistência amolecida, diferente do tecido ósseo normal. Histologicamente, o osso bovino inorgânico foi incapaz de propiciar neoformação óssea previsível entre suas partículas mineralizadas, as quais se encontravam completamente envoltas por um tecido conjuntivo denso fibroso. Concluiu-se, portanto que, clínica e histologicamente, o osso bovino inorgânico não foi eficaz como material de enxerto ósseo em humanos.

O trabalho de Carbonari et al. (2010)¹⁶, teve por objetivo avaliar e caracterizar com ensaios laboratoriais o Bonefill, material produzido pela Bionnovation Biomedical S/A, a partir de osso cortical bovino. Teste de hipersensibilidade, avaliação do potencial de citotoxicidade, ensaio de toxidez aguda sistêmica, teste de irritação cutânea, ensaio de implante, teste de mutação gênica reversa e avaliação histológica de defeitos ósseos foram realizados para caracterização do material atendendo a exigência da ISO 10993. Os resultados demonstraram a eficácia do osso bovino Bonefill como material para preenchimento de defeitos ósseos em animais. O estudo mostrou ser um material biocompatível e dentro das normas de biossegurança, podendo ser utilizado como substituto ósseo em tratamentos regeneradores.

O processo de reparo alveolar é um interessante modelo para estudar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente. Os eventos histológicos que ocorrem no processo de reparo alveolar foram investigados em várias espécies animais, assim como em humanos. Esses estudos utilizaram diferentes técnicas como fluorescência microscópica¹⁷, autoradiografias^{18,19}, histoquímica²⁰ e técnica histológica²¹ e

mostraram que o processo de reparação alveolar ocorre de forma dinâmica, e envolve várias etapas celulares, iniciando-se pela proliferação fibroblástica, principalmente, a partir do ligamento periodontal remanescente, originando um tecido conjuntivo sobre o qual ocorre a deposição de cálcio, levando à formação de trabéculas ósseas, que preencherão o alvéolo^{21,22}. No entanto, só é considerado completo quando o alvéolo encontra-se totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar adjacente remodelada, o que ocorre, em ratos, aos 28 dias pós-exodônticos²¹ e aos 64 dias em humanos²³.

Além de sustentar o elemento dentário, o processo alveolar da maxila e da mandíbula permite a sustentação das reabilitações protéticas, como os implantes osseointegráveis e as próteses parciais removíveis. Já se sabe que o sucesso desses tratamentos está relacionado com a qualidade óssea do processo alveolar.

Em algumas situações, após exodontias observa-se perda parcial da tábua óssea alveolar, o que precisa ser reconstruído principalmente após da instalação imediata de implantes osseointegráveis. É preciso compreender o comportamento desses biomateriais de origem bovina quando no interior do alvéolo dentário, uma vez que esses defeitos ósseos possuem suas particularidades em relação a outros defeitos ósseos no organismo.

Dentro de nossa linha de pesquisa de biomateriais, este trabalho tem por objetivo estudar histologicamente e histometricamente o comportamento no interior do alvéolo dentário do osso bovino inorgânico (Bonefill, Bionnovation[®], Bauru, São Paulo, Brasil) comparado ao coágulo sanguíneo em ratos. Espera-se que esta composição de material possa efetivamente atuar como um condutor de formação óssea nos alvéolos dentários e não gere reações de corpo estranho significativas.

2- PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar microscopicamente de forma qualitativa e quantitativa a neoformação óssea em alvéolos de dentes de ratos preenchidos com osso bovino inorgânico, considerando a cronologia do reparo ósseo.

3- MATERIAL E METÓDOS

Essa pesquisa foi realizada a partir da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo envolvimento de animais, e foi conduzida de acordo com os seus princípios.

3. 1 Grupos experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 54 ratos (*Rattus, norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso corporal entre 200 e 240 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e mantidos em gaiolas coletivas do biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com ração sólida triturada e água à vontade.

Durante a realização dos trabalhos os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos experimentais. Basicamente, os animais do Grupo I (controle, 27 animais) tiveram o leito cirúrgico preenchido com coágulo sanguíneo e sutura coaptando os bordos da ferida cirúrgica; os animais do Grupo II (teste, 27 animais) tiveram o leito cirúrgico preenchido com o biomaterial Bonefill® e sutura coaptando os bordos da ferida cirúrgica. No transcurso deste experimento, 12 ratos foram descartados, resultando nos seguintes números finais de espécimes: Grupo I (controle, 19 animais), Grupo II (teste, 26 animais).

O Bonefill® (Bionnovation) é um substituto ósseo natural, biocompatível, acelular, não citotóxico, não imunogênico, não pirogênico e de alto grau de pureza com ação principal osteocondutora (informações do fabricante). Apresenta-se na forma de microgrânulos.

3. 2 Procedimentos cirúrgicos realizados

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de quetamina (Dopalen), solução anestésica, e cloridrato de xilasina (Anasedan), solução sedativa e relaxante muscular, por via intraperitoneal, na dosagem de 0,05 ml/100 g de peso animal para cada substância citada. A anestesia foi realizada com o auxílio de uma seringa descartável para insulina.

Após a anestesia o incisivo superior direito dos animais foi extraído. Para o grupo controle, após observação de formação de coágulo estável, a aproximação das margens e sua síntese com pontos simples, com fios de seda 4.0 (Ethicon Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda) foi feita, procurando-se coaptar bem as margens. Para o Grupo 2, o biomaterial foi proporcionado e manipulado em cuba estéril adicionando ao mesmo soro fisiológico a 0,9% (Frenesius Kobi Brasil Ltda., Brasil). O material foi então inserido no alvéolo com um micro-porta-amálgama metálico em três porções. Após a inserção de cada porção o mesmo foi compactado para que o material alcançasse o terço médio do alvéolo. Posteriormente, a coaptação dos bordos e sutura foi feita semelhantemente ao explicando acima para o grupo controle.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam dose única de 0,1 ml de Pentabiótico Veterinário (benzilpenicilina benzatina, procaína, potássica e sulfato de diidroestreptomicina e estreptomicina base), por via intramuscular, na parte posterior da coxa traseira, logo após o término do procedimento cirúrgico.

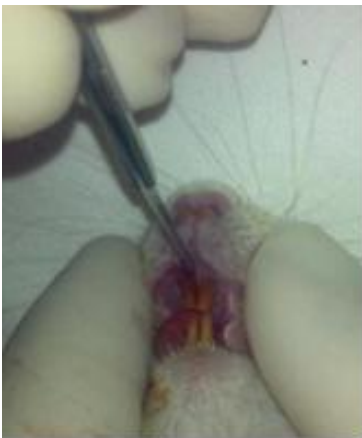


Figura 1–Síndesmotomia.



Figura 2 – Luxação



Figura 3 - Exodontia.



Figura 4- Incisivo superior direito extraído.



Figura 5 - Incisivo superior direito.



Figura 6 – Alvéolo do incisivo superior direito.



Figura 7 - Introdução do biomaterial no alvéolo.



Figura 8 -Alvéolo preenchido.



Figura 9- Sutura.

3. 3 Obtenção das lâminas para análise histológica

Os animais foram sacrificados aos 7, 14 e 28 dias, por meio de uma dose excessiva de anestésico (Pentobarbital sódico 100mg/Kg de peso) via intraperitoneal. Portanto, dos 27 animais inicialmente distribuídos em cada grupo, nove foram utilizados em cada um dos períodos mencionados.

As maxilas contendo os alvéolos em reparação foram removidas através de um corte tangenciando a sutura intermaxilar realizado com lâmina de bisturi e outro corte junto à face distal do último molar realizado com tesoura. A peça foi recortada removendo-se os excessos de tecido mole.

As amostras obtidas dos alvéolos dentários foram armazenadas imediatamente em frascos individuais, devidamente identificados, em formalina 10% para fixação, tamponada, com pH neutro, por 7 dias. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente durante vinte e quatro horas. Posteriormente as amostras foram desmineralizadas em solução de EDTA 4,3%, e pH 7,2, renovando-se a mesma semanalmente até que se constatou a total desmineralização. As peças foram então desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina, para então serem cortadas (espessura de 6µm) em micrótomo, produzindo-se 5 lâminas por peça, com 3 cortes teciduais cada. As lâminas produzidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina para estudo em microscópio de transmissão de luz.

3. 4 Análise microscópica

Para a análise microscópica foram usados os critérios de análise elaborados por LEAHY (2012)²⁴, devido à morte de alguns espécimes e invalidação de algumas lâminas por defeito de confecção.

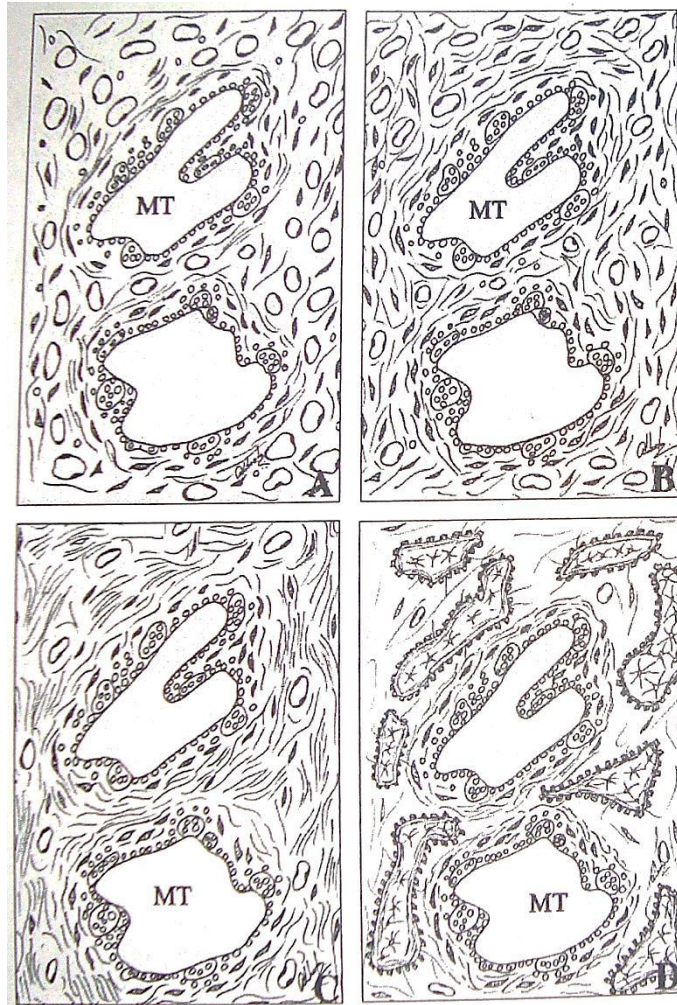
3. 4. 1 Critérios aplicados na análise microscópica

Todas as análises morfológicas deste trabalho foram realizadas em fotomicroscópio (JENAMED 2, Zeiss, Germany) com lentes 6,3x, 12,5x, 25x e 40x e câmera fotográfica acoplada (AxioCam ICc 1, Zeiss, Germany) para o registro das imagens dos cortes teciduais.

O campo microscópico analisado foi o terço cervical lingual do interior do alvéolo dentário, onde os materiais utilizados ficaram localizados em maior intensidade. A análise qualitativa foi realizada por meio de observação dos aspectos referentes a presença ou ausência dos seguintes constituintes: tecido de granulação/tecido conjuntivo fibroso jovem (TCFJ), vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos, osteoblastos e matriz óssea mineralizada (MOM), granuloma do tipo corpo estranho (CE), macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMI), registrados em tabelas. Para a consideração da presença ou ausência das estruturas acima citadas, não consideramos a quantidade de partículas ou a extensão por elas ocupada. Mesmo que a quantidade e extensão da presença da estrutura ou fenômenos fossem pequenos, o mesmo foi considerado presente. Os cortes analisados também foram submetidos à análise quantitativa, seguindo os critérios elaborados por LEAHY (2012)²⁴, determinando escores para as reações teciduais observadas na superfície e ao redor do material implantado, registrando-os em tabelas. Usou-se escores crescentes de 1 a 5 para quantificar os fenômenos de natureza reacional e reparatória relacionados à organização celular e tecidual. Esta progressiva gradação no processo de neoformação óssea, segue abaixo demonstrada:

- A. Granuloma do tipo corpo estranho(GTCE) = ESCORE 1**
- B. Tecido de granulação imaturo(TGI) = ESCORE 2**
- C. Tecido de granulação maduro(TGM) = ESCORE 3**
- D. Tecido conjuntivo fibroso maduro(TCFM) = ESCORE 4**
- E. Tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea....(TCFNO) = ESCORE 5**

Figura 10- Padrões morfológicos mensurados em escores de 2 a 5 da reação tecidual ao redor das partículas dos materiais testados



- Padrões morfológicos mensurados em escores de 2 a 5 da reação tecidual ao redor das partículas dos materiais testados. Na interface com o material nota-se um granuloma do tipo corpo estranho.

A = tecido de granulação imaturo com exuberante número de vasos, fibroblastos jovens e raras fibras colágenas (escore 2);

B = tecido de granulação maduro com menor número de vasos, mais fibroblastos jovens e numero maior de fibras colágenas (escore 3);

C = tecido conjuntivo jovem com poucos vasos, menor número de fibroblastos e muitas fibras colágenas em feixes bem definidos (escore 4);

D = tecido conjuntivo com neoformação óssea (escore 5).

○	macrófagos
⊗	células gigantes
▭	fibroblastos
⊙	osteoblastos
⋈	osteócitos
—	fibras colágenas
▬	aposição óssea

Figura 11- Padrões morfológicos mensurados em escores de 1 a 5 da reação tecidual *na interface* com as partículas dos materiais testados



4. RESULTADOS

Resultados da análise microscópica descritiva

4. 1 Grupo Experimental Controle aos 7 dias

Nos cortes examinados observamos no espaço intra alveolar, em seu terço cervical, preenchimento por tecido de granulação maduro com exuberante neoformação de tecido ósseo primário ou imaturo, ou ainda, osso embrionário (Figura 1A). As trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se irregulares, aleatoriamente distribuídas (Figura 1B) e ricamente celularizadas por numerosos osteócitos (Figura 1D) e vasta quantidade de osteoblastos colonizando a sua superfície. Periféricamente da antiga tábua óssea alveolar partem trabéculas de osso osteóide, evidenciando a neoformação óssea. Em permeio ao tecido ósseo, notam-se tecido de granulação bem vascularizado e rico em fibroblastos (Figura 1C).

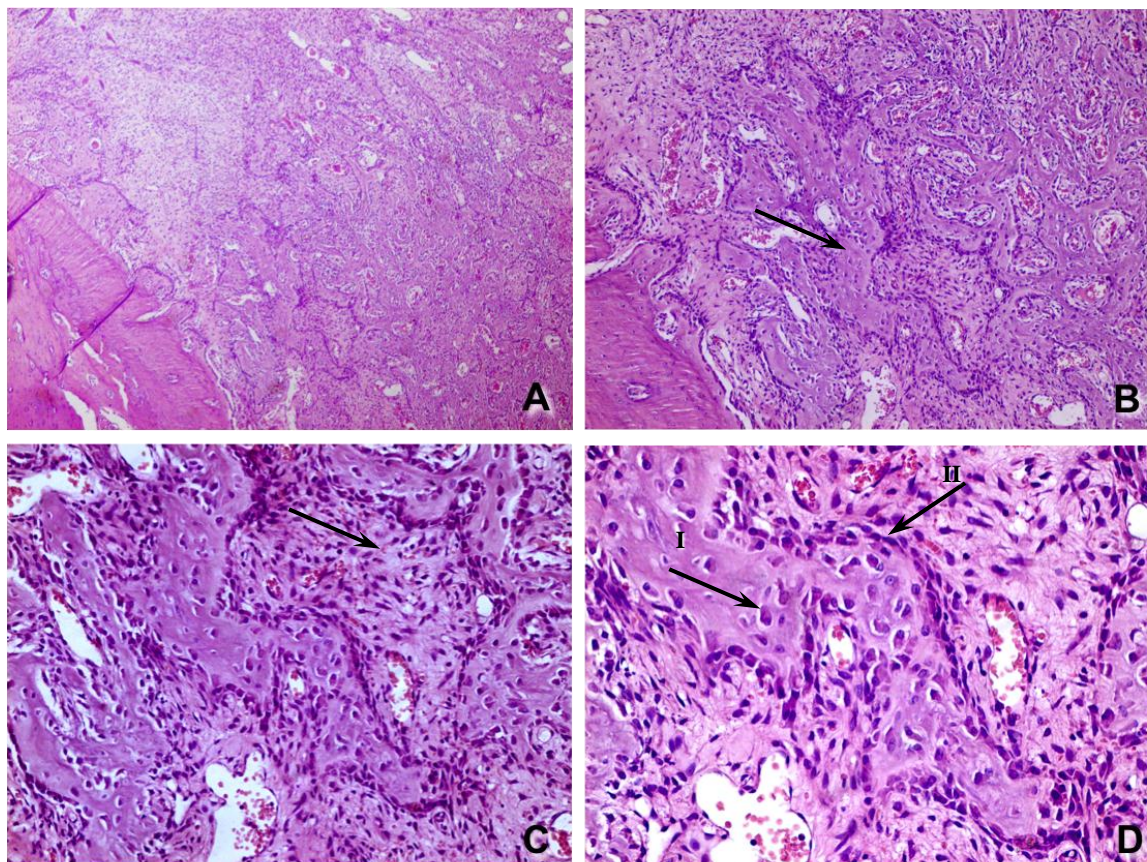


Figura 12 - Grupo Controle 7 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Trabéculas ósseas neoformadas (Figura 1B - seta), tecido de granulação bem vascularizado e rico em fibroblastos (Figura 1C - seta), osteócitos (Figura 1D – seta I) e osteoblastos (Figura 1D – seta II)

4. 2 Grupo Experimental Bonefill aos 7 dias

No espaço intra alveolar da região cervical selecionada, nota-se tecido de granulação maduro, ricamente celularizado e preenchido por numerosos fragmentos de material particulado Bonefill (Figura 2A). As partículas do biomaterial caracterizam-se por sua forma e superfície mais ou menos irregulares, tamanhos variáveis, coloração basofílica e osteoplastos vazios em seu interior (Figura 2B). Observa-se ainda, que os espaços entre as partículas estão preenchidos por exuberante neoformação de tecido ósseo de padrão primário ou imaturo (Figura 2C). O osteoide neoformado apresenta-se bem vascularizado, ricamente celularizado por osteócitos, com trabéculas aleatoriamente distribuídas e inclusive na superfície do material implantar (Figura 2D). Periféricamente, da antiga tábua óssea alveolar partem trabéculas de osso osteoide, evidenciando a neoformação óssea.

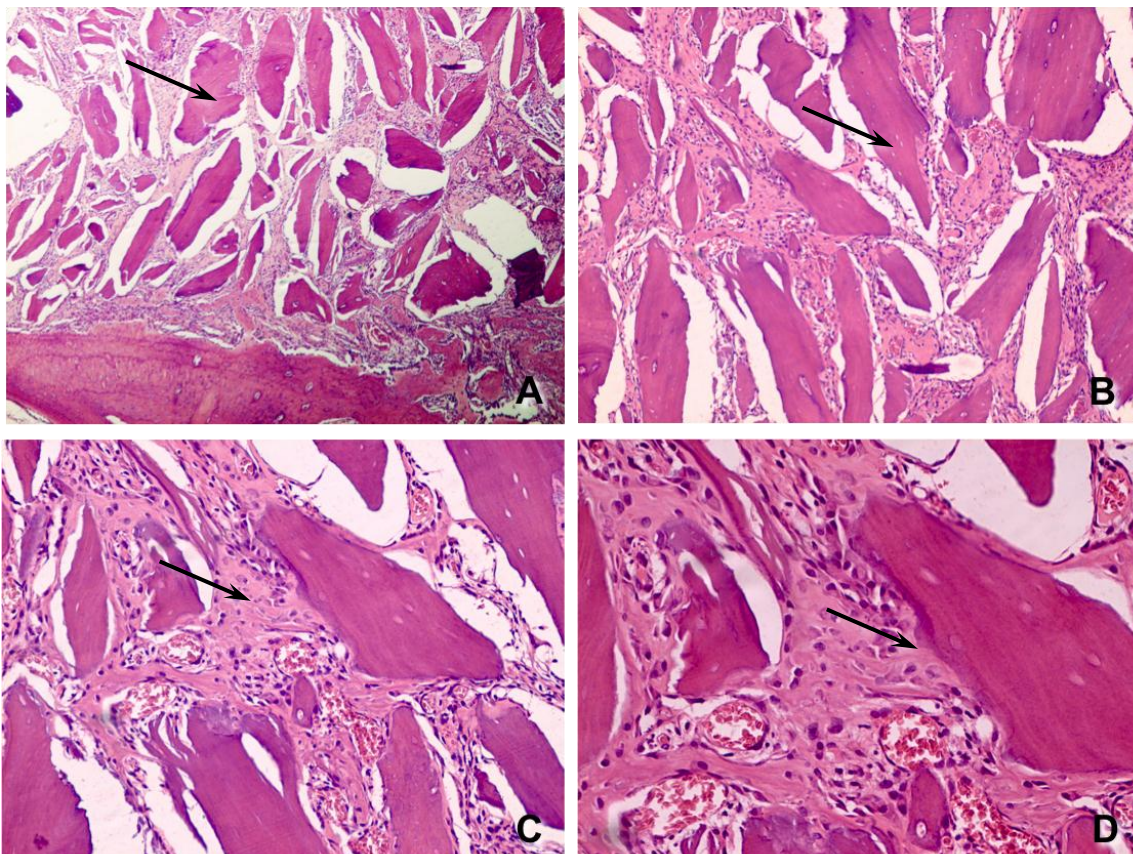


Figura 13 - Grupo Bonefill 7 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Material particulado, Bonefill (Figura 2A e 2B - seta), neoformação de tecido ósseo de padrão primário ou imaturo (Figura 1C - seta), tecido ósseo colonizando a superfície do material implantar (Figura 1D - seta)

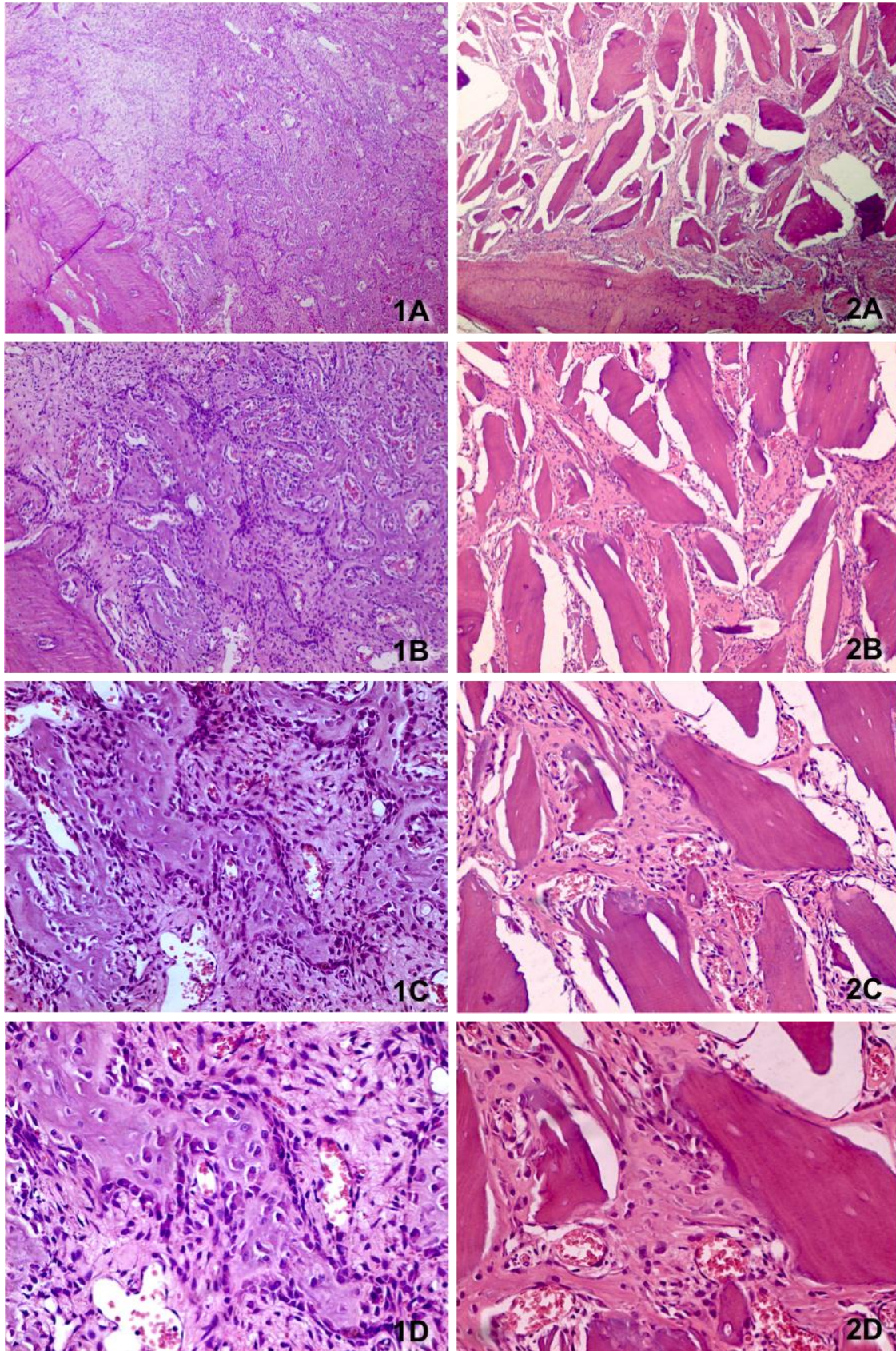


Figura 14 – Imagem comparativa do período experimental 7 dias, terço cervical, entre o Grupo Controle 1A, 1B, 1C e 1D e o Grupo Bonefill 2A, 2B, 2C e 2D. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x).

4. 3 Grupo Experimental Controle aos 14 dias

O espaço intra alveolar, em seu terço cervical, está preenchido por tecido de granulação maduro com exuberante neoformação de tecido ósseo primário (Figura 4A). Contudo, quando comparado ao grupo controle de 7 dias, as trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se mais espessas, regulares e preenchendo uma maior quantidade de espaço. Estão ricamente celularizadas com osteócitos (Figura 1D) e recobertas superficialmente por numerosos osteoblastos. Permeando o tecido ósseo neoformado, observa-se tecido de granulação muito maduro ou tecido conjuntivo jovem constituídos por fibroblastos e feixes de fibras colágenas. (Figura 1C).

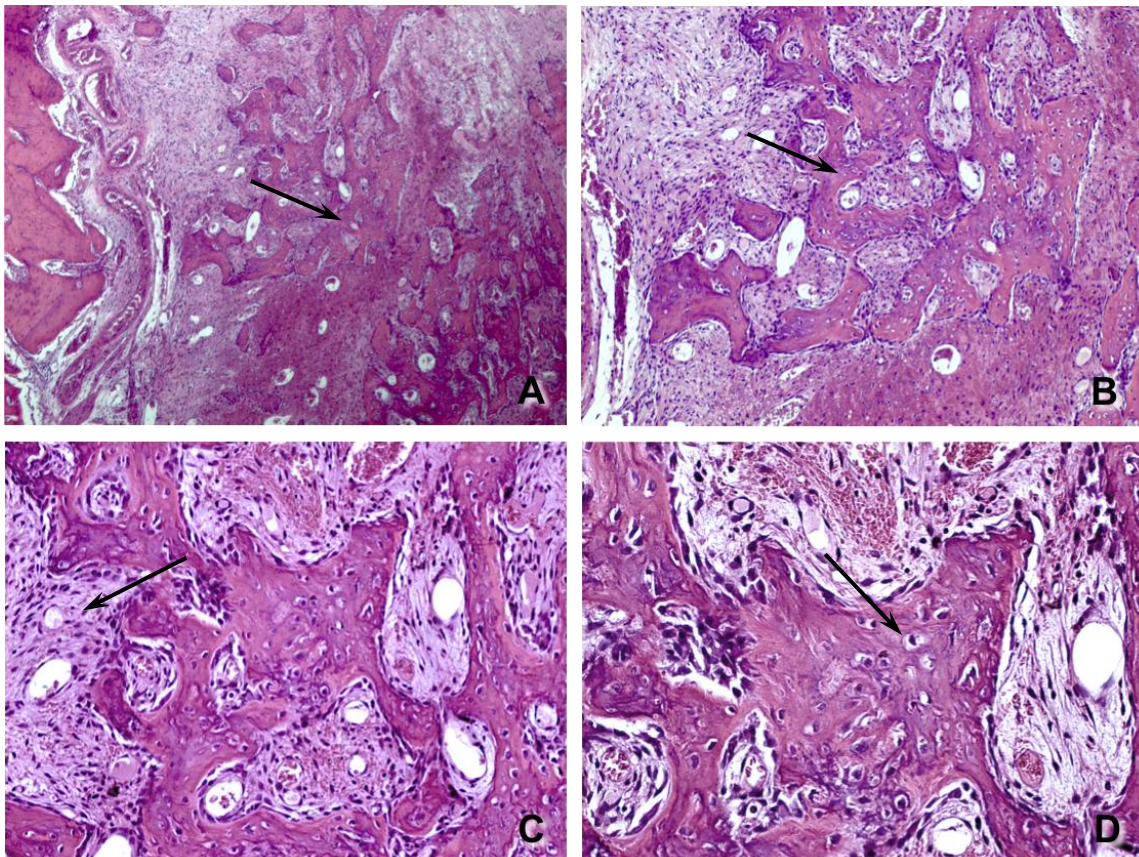


Figura 15 - Grupo Controle 14 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Trabéculas ósseas neoformadas (Figura 4A - seta), trabéculas ósseas espessas e regulares (Figura 4B - seta), tecido de granulação muito maduro ou tecido conjuntivo jovem rico em fibroblastos e feixes de fibras colágenas (Figura 4C - seta), osteócitos (Figura 4D - seta I).

4. 4 Grupo Experimental Bonefill aos 14 dias

O espaço intra alveolar da região cervical selecionada, apresentava-se com numerosos fragmentos de material particulado Bonefill, caracterizando-se com forma e tamanhos heterogêneos, poliédricos e com ângulos retos, superfície irregular, coloração basofílica e osteoplastos vazios em seu interior (Figura 5A) Entre as partículas há exuberante neoformação de tecido ósseo primário, mais maduro quando comparado com o período experimental de 7 dias (Figura 5B), ricamente celularizado por osteócitos, aleatoriamente distribuído e em continuidade a superfície do material implantar (Figura 5D), nota-se ainda, nítida diferenciação entre osso maduro das partículas do material e o osso primário neoformado. Observou-se também, lacunas de Howship e clastos indicando remodelação óssea (Figura 5C).

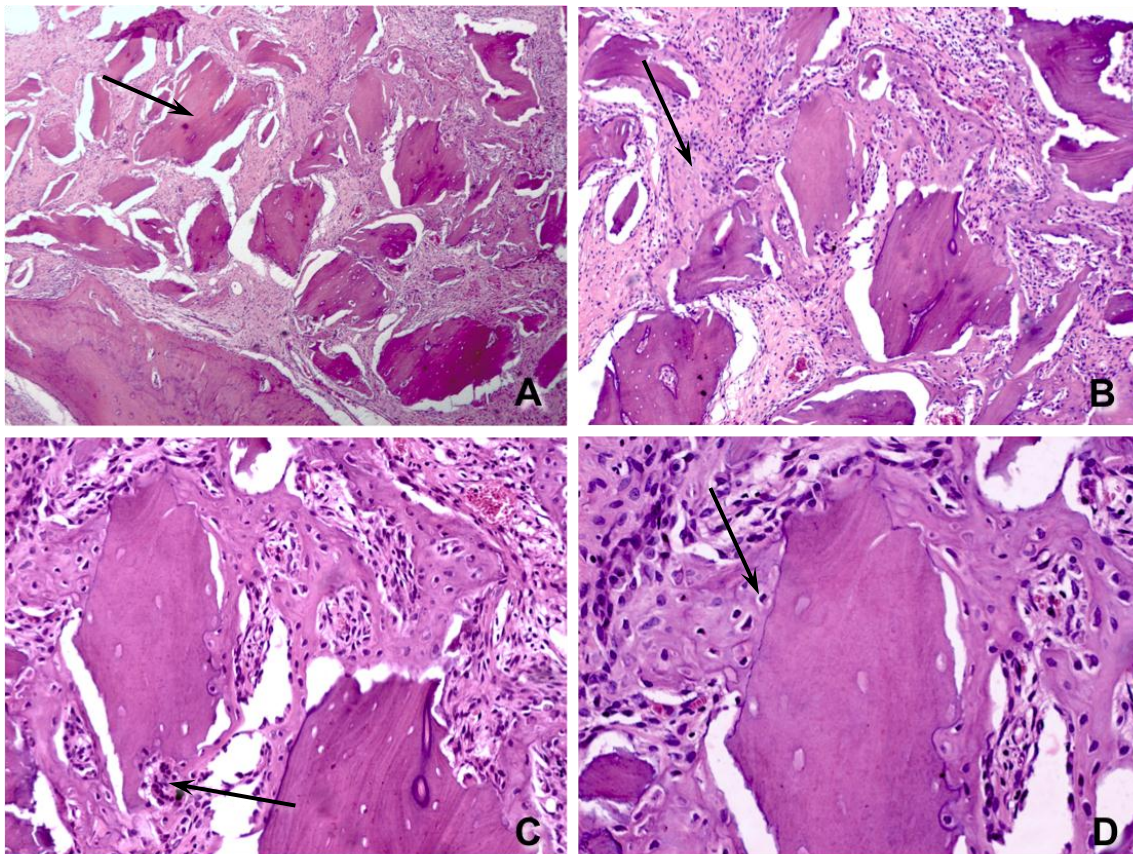


Figura 16 - Grupo Bonefill 14 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Material particulado, Bonefill (Figura 5A - seta), neoformação de tecido ósseo de padrão primário ou imaturo (Figura 5B - seta), lacunas de Howship e clastos (Figura 5C - seta), tecido ósseo colonizando a superfície do material implantar (Figura 5D - seta).

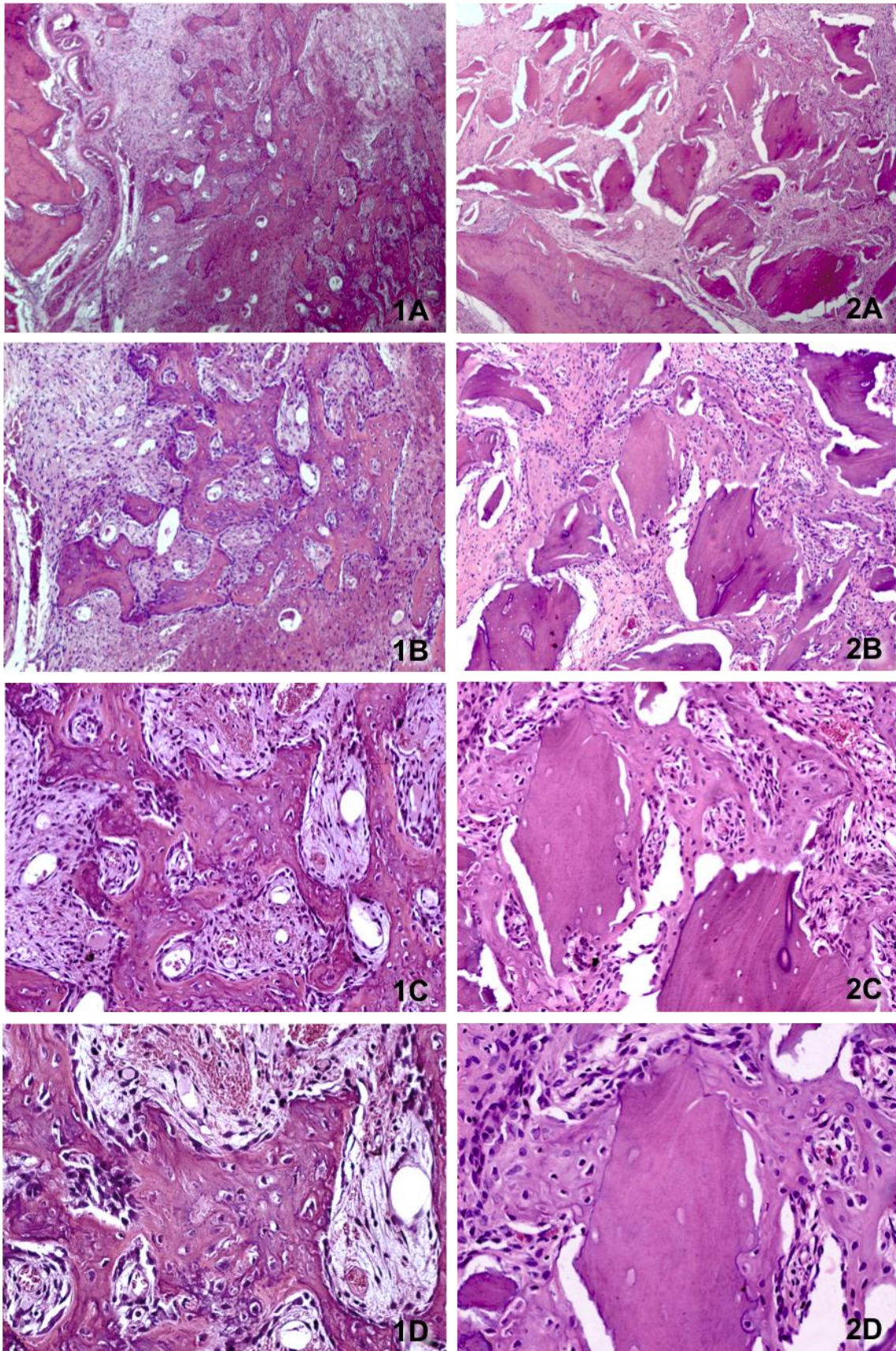


Figura 17 – Imagem comparativa do período experimental 14 dias, terço cervical, entre o Grupo Controle 1A, 1B, 1C e 1D e o Grupo Bonefill 2A, 2B, 2C e 2D. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x).

4. 5 Grupo Experimental Controle aos 28 dias

Microscopicamente, o terço cervical do espaço intra alveolar estava preenchido por exuberante quantidade de tecido ósseo primário, porém muito maduro (Figura 7A). Contudo, quando comparado aos demais tempos experimentais do grupo controle, o tecido ósseo neoformado preenchia a maioria dos espaços em reparo, sendo suas trabéculas muito espessas, com distribuição regular (Figura 7B), bem celularizadas com osteócitos (Figura 7D) e recobertas superficialmente por uma quantidade menor de osteoblastos em relação aos períodos anteriores. Nos espaços entre as trabéculas ósseas nota-se tecido conjuntivo fibroso, com fibroblastos e feixes colágenos bem organizados em fascículos (Figura 7C).

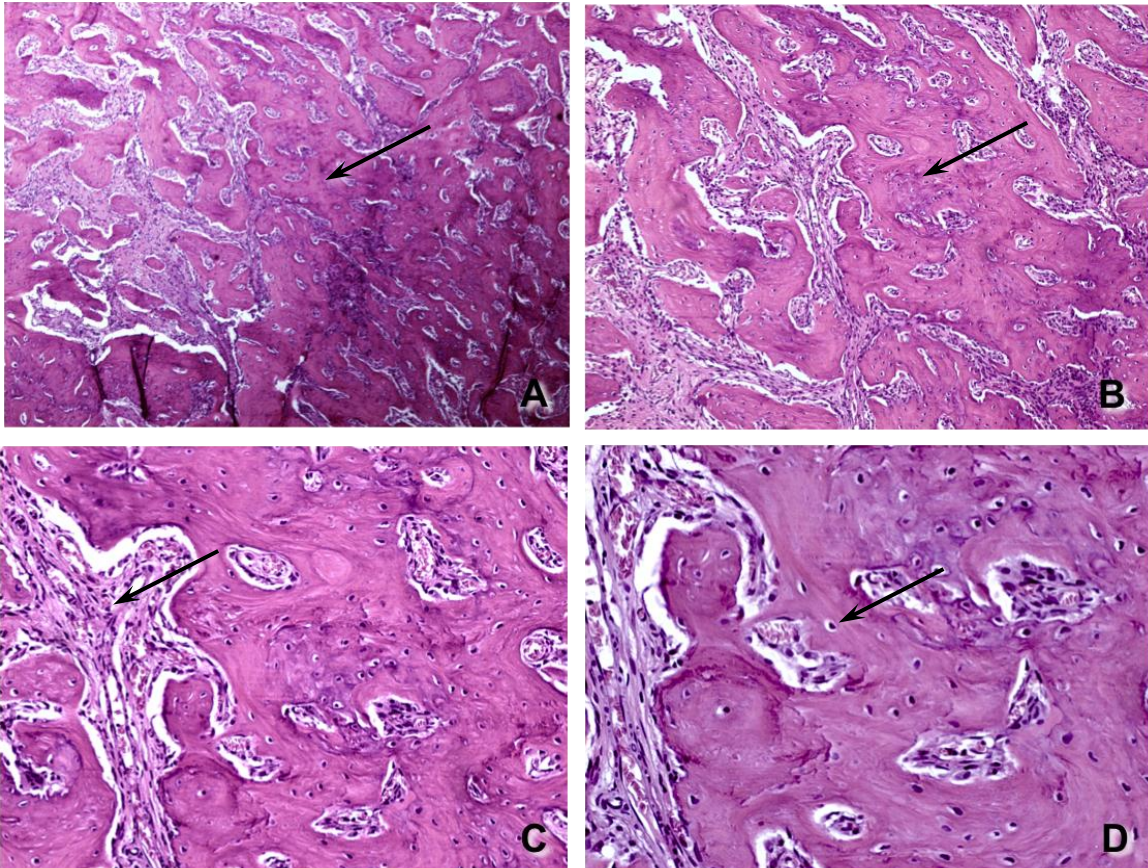


Figura 18 - Grupo Controle 28 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Trabéculas ósseas neoformadas (Figura 7A - seta), trabéculas ósseas espessas e regulares (Figura 7B - seta), tecido conjuntivo fibroso com feixes de fibras colágenas (Figura 7C - seta), osteócitos (Figura 7D - seta).

4. 6 Grupo Experimental Bonefill aos 28 dias

Neste período experimental, observou-se que na maioria do material particulado havia neoformação óssea na superfície e/ou nos espaços entre as partículas. Quando comparado aos demais tempos experimentais do grupo Bonefill, o tecido ósseo neoformado, embora ainda primário, apresentava-se mais maduro e com menor quantidade de osteócitos e osteoblastos. Nos espaços entre as trabéculas ósseas, nota-se um tecido conjuntivo fibroso, com fibroblastos e feixes colágenos bem organizados em fascículos (Figura 7C).

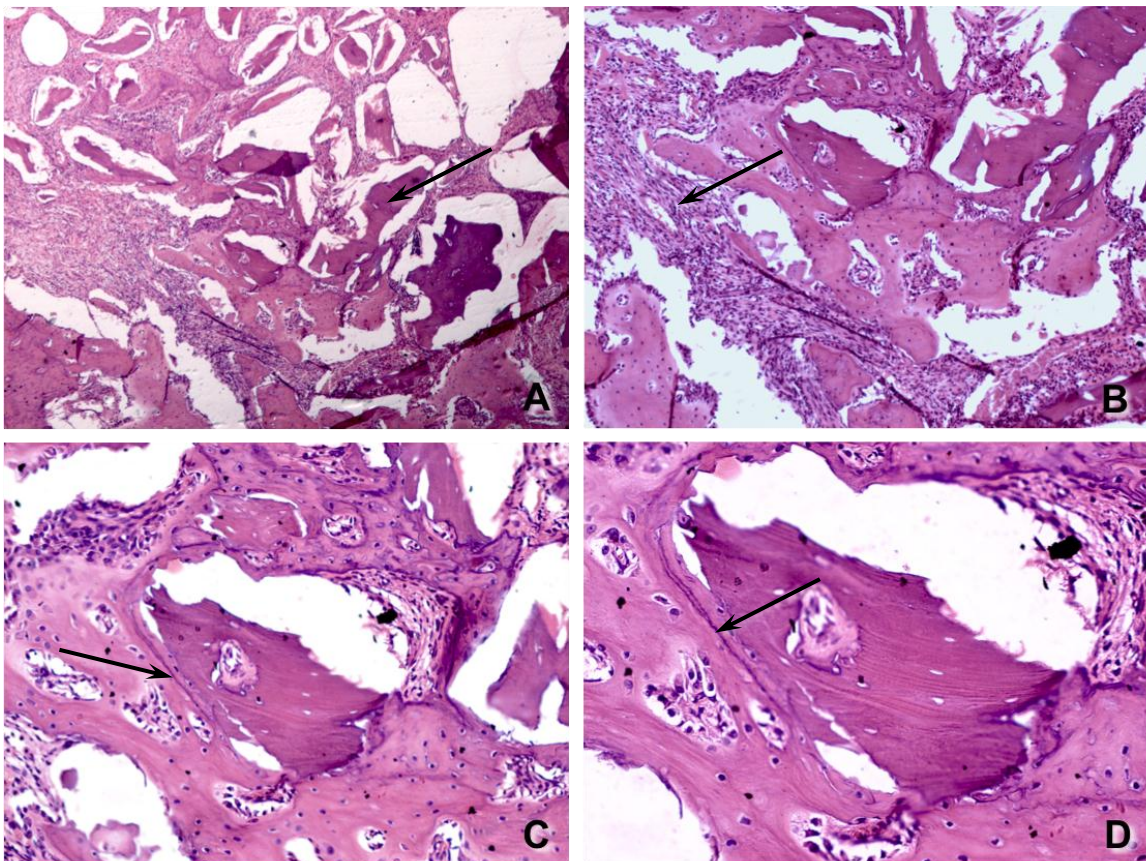


Figura 19 - Grupo Bonefill 28 dias, terço cervical. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x). Material particulado, Bonefill (Figura 8A - seta), tecido ósseo de padrão primário (Figura 8B e 8D - seta), tecido ósseo colonizando a superfície do material implantar (Figura 8C - seta).

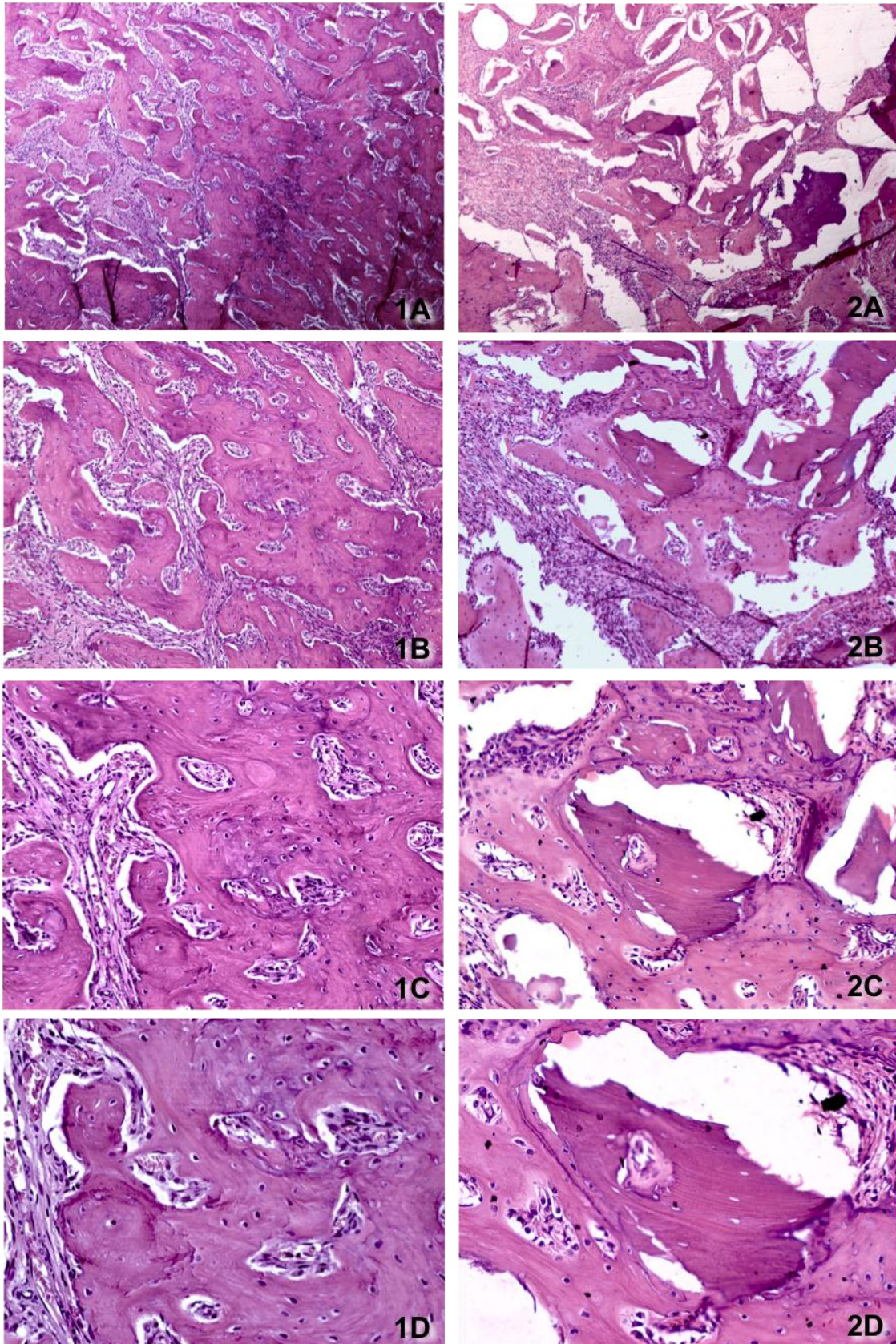


Figura 20 – Imagem comparativa do período experimental 28 dias, terço cervical, entre o Grupo Controle 1A, 1B, 1C e 1D e o Grupo Bonefill 2A, 2B, 2C e 2D. (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x).

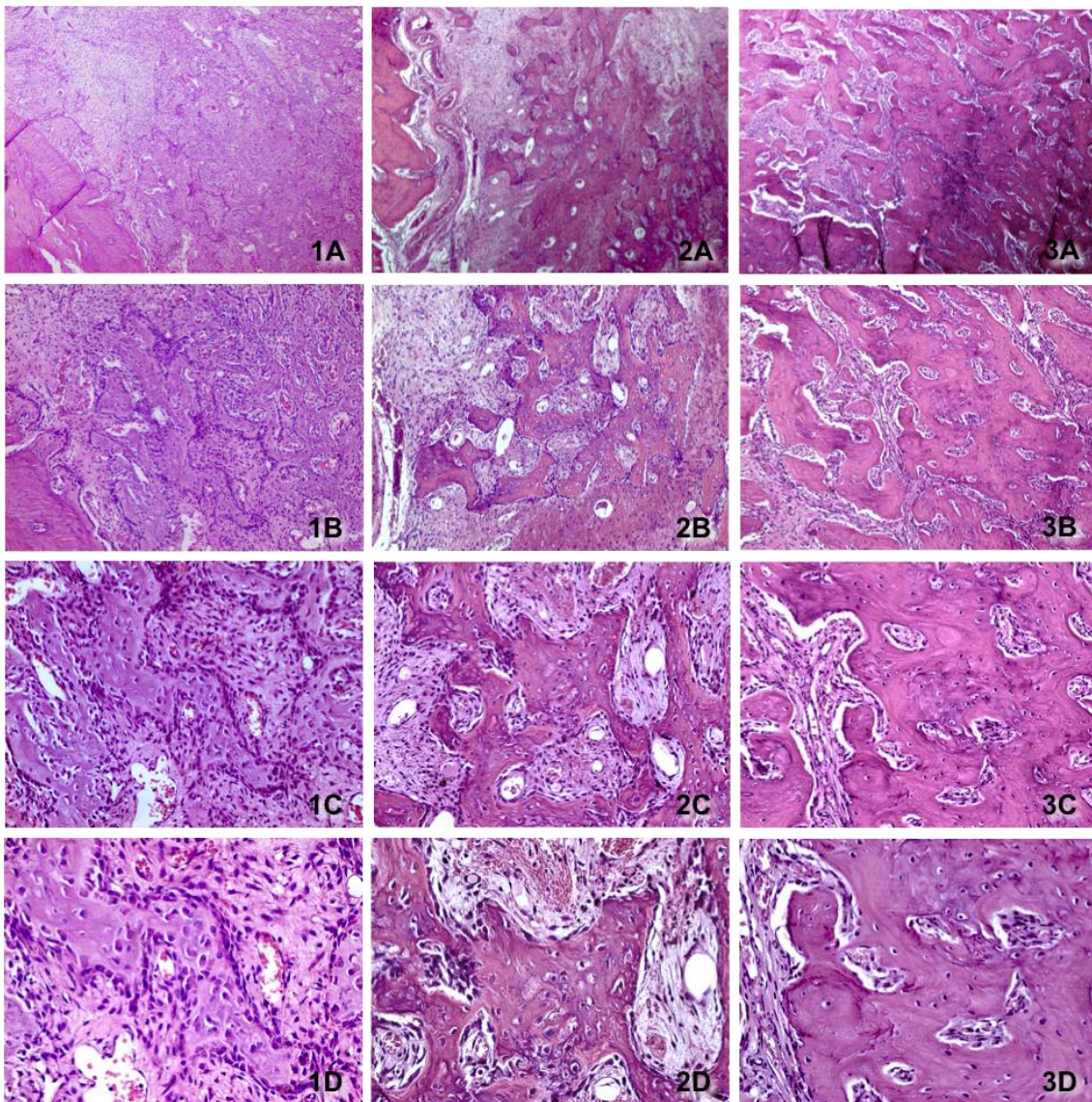


Figura 21 – Imagem comparativa do Grupo Controle nos períodos experimentais 7,14 e 28 dias (coluna 1,2 e 3 respectivamente), terço cervical intra alveolar (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x).

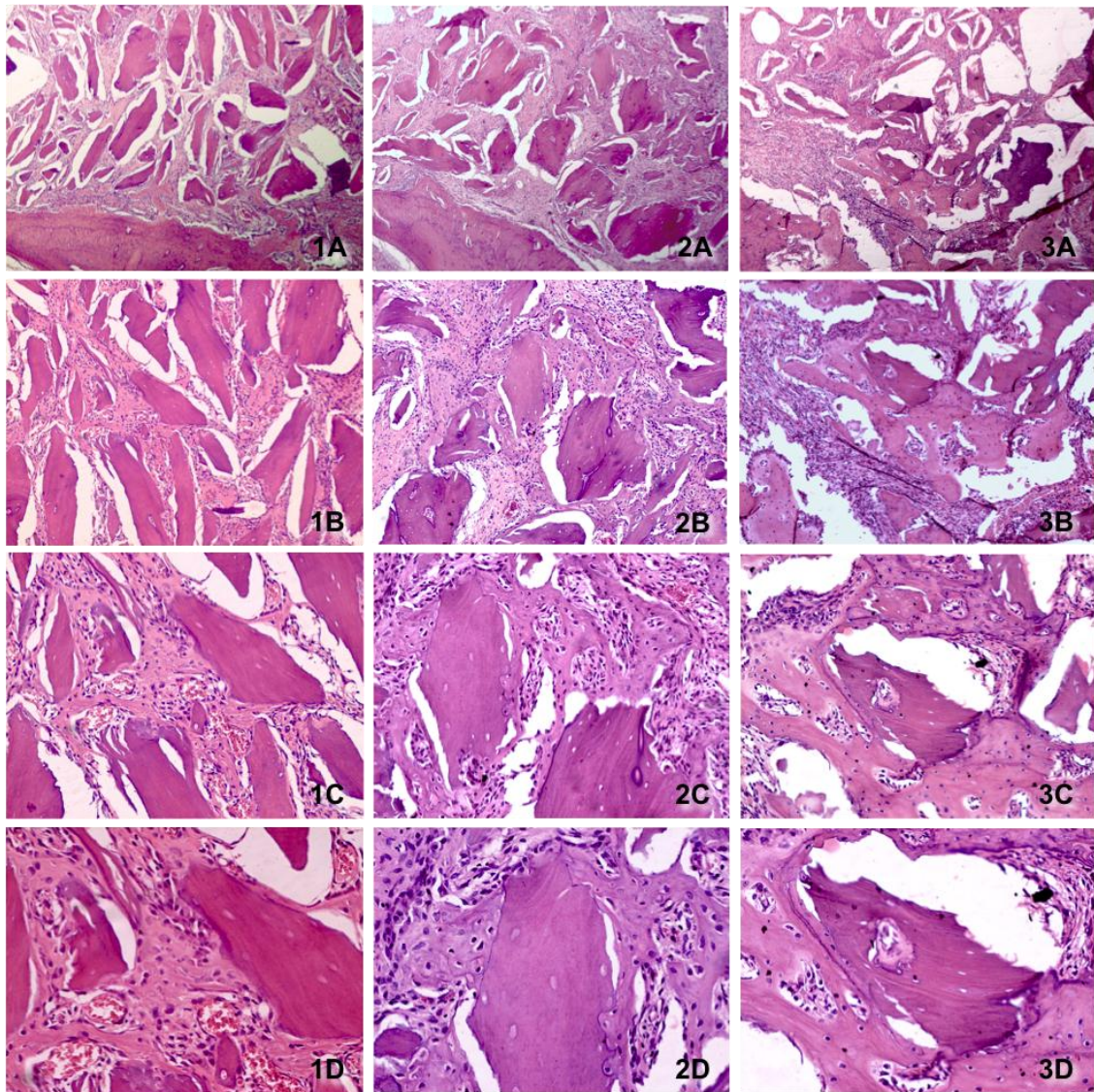


Figura 22 – Imagem comparativa do Grupo Bonefill nos períodos experimentais 7,14 e 28 dias (coluna 1,2 e 3 respectivamente), terço cervical intra alveolar (HE, aumentos A:6,3x, B:12,5x, C:25x, D:40x).

4. 7 Tabelas do critério de mensuração para quantificar a reação tecidual ao redor ou na interface das partículas

Tabela 1: Análise quantitativa da presença de fenômenos observados em alvéolo de ratos preenchidos com coágulo sanguíneos em 7, 14 e 28 dias experimentais (grupo controle).

TABELA 1 - ESCORE - GRUPO CONTROLE																						
Períodos experimentais	7 dias									14 dias					28 dias							
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	2	4	8	T	2	3	4	5	6	7	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) ESCORE 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Tecido de Granulação Imaturo (TGI) ESCORE 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Tecido de Granulação Maduro (TGM) ESCORE 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Tecido Conjuntivo Fibroso Maduro (TCFM) ESCORE 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) ESCORE 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	45	⊖	+	+	+	15	+	+	+	+	+	+	30

T= total; **GTCE**= Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI**= Tecido de Granulação Imaturo; **TGM**= Tecido de Granulação Maduro; **TCFM**= Tecido Conjuntivo Fibroso Maduro; **TCFNO**= Tecido Conjuntivo Fibroso com Neoformação Óssea; **ESCORE 1,2,3,4,5** = critério numérico crescente que mensura a reação tecidual quantificando a neoformação óssea correspondente; **⊖**= espécime descartado

Tabela 2: Análise quantitativa da presença de fenômenos observados entre as partículas em alvéolo de ratos preenchidos com biomaterial em 7, 14 e 28 dias experimentais (grupo teste).

TABELA 2 - ESCORE: GRUPO BONEFILL – ANÁLISE MICROSCÓPICA ENTRE AS PARTÍCULAS																													
Períodos experimentais	7 dias										14 dias										28 dias								
Espécimes Critérios / Escores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	3	4	5	6	7	8	9	T
Granuloma do Tipo Corpo Estranho (GTCE) ESCORE 1	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
Tecido de Granulação Imaturo (TGI) ESCORE 2	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
Tecido de Granulação Maduro (TGM) ESCORE 3	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) ESCORE 4	-	-	⊖	+	-	+	⊖	+	⊖	12	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea (TCFNO) ESCORE 5	+	+	⊖	-	+	-	⊖	-	⊖	15	+	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	25	⊖	⊖	+	⊖	+	+	+	⊖	20

T= total; **GTCE**= Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI**= Tecido de Granulação Imaturo; **TGM**= Tecido de Granulação Maduro; **TCFM**= Tecido Conjuntivo Fibroso Maduro; **TCFM**= Tecido Conjuntivo Fibroso com Neoformação Óssea; **ESCORE 1,2,3,4,5** = critério numérico crescente que mensura a reação tecidual quantificando a neoformação óssea correspondente; **⊖**= espécime descartado

Tabela 3: Análise quantitativa da presença de fenômenos observados na superfície das partículas em alvéolo de ratos preenchidos com biomaterial em 7, 14 e 28 dias experimentais (grupo teste).

TABELA 3 - ESCORE: GRUPO BONEFILL – ANÁLISE MICROSCÓPICA NA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS																													
Períodos experimentais	7 dias										14 dias										28 dias								
	Espécimes										Espécimes										Espécimes								
Critérios / Escores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	3	4	5	6	7	8	9	T
Granuloma do Tipo Corpo Estranho (GTCE) ESCORE 1	-	-	⊙	-	-	-	⊙	-	⊙	0	-	-	-	⊙	⊙	-	⊙	⊙	-	0	⊙	⊙	-	⊙	-	-	-	⊙	0
Tecido de Granulação Imaturo (TGI) ESCORE 2	-	-	⊙	-	-	-	⊙	-	⊙	0	-	-	-	⊙	⊙	-	⊙	⊙	-	0	⊙	⊙	-	⊙	-	-	-	⊙	0
Tecido de Granulação Maduro (TGM) ESCORE 3	-	-	⊙	-	-	-	⊙	-	⊙	0	-	-	-	⊙	⊙	-	⊙	⊙	-	0	⊙	⊙	-	⊙	-	-	-	⊙	0
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) ESCORE 4	-	-	⊙	+	-	+	⊙	+	⊙	12	-	-	-	⊙	⊙	-	⊙	⊙	-	0	⊙	⊙	-	⊙	-	-	-	⊙	0
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea (TCFNO) ESCORE 5	+	+	⊙	-	+	-	⊙	-	⊙	15	+	+	+	⊙	⊙	+	⊙	⊙	+	25	⊙	⊙	+	⊙	+	+	+	⊙	20

T= total; **GTCE**= Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI**= Tecido de Granulação Imaturo; **TGM**= Tecido de Granulação Maduro; **TCFM**= Tecido Conjuntivo Fibroso Maduro; **TCFM**= Tecido Conjuntivo Fibroso com Neoformação Óssea; **ESCORE 1,2,3,4,5** = critério numérico crescente que mensura a reação tecidual quantificando a neoformação óssea correspondente; **⊙**= espécime descartado

Tabela 4: Análise qualitativa da presença de fenômenos observados em alvéolo de ratos preenchidos com coágulo sanguíneo em 7, 14 e 28 dias experimentais (grupo controle).

TABELA 4 – ANÁLISE QUALITATIVA - GRUPO CONTROLE																							
Períodos experimentais	7 dias									14 dias					28 dias								
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	2	4	8	T	2	3	4	5	6	7	T	
Fenômenos																							
Tecido de granulação/TCFJ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	⊖	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	6
Vasos sanguíneos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	⊖	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	6
Fibroblastos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	⊖	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	6
Osteoblastos / MOM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	⊖	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	6
Granuloma CE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
Macrófagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
CGMI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	⊖	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0

T= total; **TCFJ**= tecido conjuntivo fibroso jovem; **MOM**= matriz óssea mineralizada; **CE**= corpo estranho; **CGMI**= células gigantes multinucleadas inflamatórias; **⊖**= descartado; **X** = presença fenômeno; **-** = ausência fenômeno

Tabela 5: Análise qualitativa da presença de fenômenos observados em alvéolo de ratos preenchidos com biomaterial em 7, 14 e 28 dias experimentais (grupo controle).

TABELA 5 – ANÁLISE QUALITATIVA - GRUPO BONEFILL																													
Períodos experimentais	7 dias										14 dias										28 dias								
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	T	1	3	4	5	6	7	8	9	T
Fenômenos																													
Tecido de granulação/TCFJ	+	+	⊖	+	+	+	⊖	+	⊖	6	+	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	5	⊖	⊖	+	⊖	+	+	+	⊖	4
Vasos sanguíneos	+	+	⊖	+	+	+	⊖	+	⊖	6	+	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	5	⊖	⊖	+	⊖	+	+	+	⊖	4
Fibroblastos	+	+	⊖	+	+	+	⊖	+	⊖	6	+	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	5	⊖	⊖	+	⊖	+	+	+	⊖	4
Osteoblastos / MOM	+	+	⊖	+	+	+	⊖	-	⊖	5	+	+	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	+	5	⊖	⊖	+	⊖	+	-	-	⊖	2
Granuloma CE	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
Macrófagos	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0
CGMI	-	-	⊖	-	-	-	⊖	-	⊖	0	-	-	-	⊖	⊖	-	⊖	⊖	-	0	⊖	⊖	-	⊖	-	-	-	⊖	0

T= total; **TCFJ**= tecido conjuntivo fibroso jovem; **MOM**= matriz óssea mineralizada; **CE**= corpo estranho; **CGMI**= células gigantes multinucleadas inflamatórias; **⊖**= descartado; **+** = presença fenômeno; **-** = ausência fenômeno

5- DISCUSSÃO

Para a reabilitação bucal com implantes osseointegrados é imperativo a existência de osso vital em quantidade e qualidade²⁵. Após a perda de um dente observa-se uma reabsorção paulatina e contínua do processo alveolar tanto na maxila quanto na mandíbula²⁶. Nos casos em que há quantidade insuficiente de osso alveolar, procedimentos cirúrgicos para enxertia de osso ou biomateriais podem ser realizados a fim de tentar recuperar o volume ósseo perdido. A aplicação dos biomateriais classificados como substitutos ósseos em situações clínicas tem de obedecer a um planejamento com relação aos resultados que se pretende obter. Não se deve exigir respostas biológicas que os biomateriais não proporcionam. E este é o ponto fundamental das pesquisas experimentais, ou seja, proporcionar o conhecimento das respostas biológicas dos diversos materiais que estão à disposição no mercado e aplicá-los de forma consciente em situações clínicas¹¹. Todo substituto ósseo funciona como material de preenchimento que serve de arcabouço para a migração do tecido conjuntivo para facilitar a angiogênese e possibilitar a invasão e fixação das células ósseas ou células em diferenciação óssea culminando com a produção da matriz óssea²⁵.

No presente trabalho, os resultados forneceram um conhecimento sobre o comportamento do biomaterial Bonfill[®] na reparação óssea do alvéolo dental de ratos após exodontia em comparação com o alvéolo preenchido apenas com o coágulo sanguíneo. A cronologia do processo de cura que se segue à extração dentária tem sido bem estabelecida em humanos e em diferentes espécies animais. Pouco após a extração de dentes, devido à ruptura de vasos sanguíneos a partir da região apical e do ligamento periodontal, o alvéolo está cheio de sangue, o qual imediatamente coagula. Formação de capilares e fibroblastos originário do ligamento periodontal e tecidos circundantes invadem o coágulo, e, como a cicatrização de feridas progride, o coágulo de sangue é gradualmente absorvido e substituído por tecido conjuntivo imaturo (tecido de granulação), que torna-se progressivamente mais denso ao mesmo tempo que a quantidade de células inflamatórias e vasos sanguíneos diminuem e osteoblastos tornam-se evidentes. Os osteoblastos inicialmente sintetizam uma matriz óssea imatura (osteóide), que é ainda mais mineralizado por deposição de cálcio como cristais de hidroxiapatita. A neoformação óssea alveolar ocorre a partir das paredes apical e lateral em direção ao centro do

alvéolo, e o processo de cicatrização culmina com o preenchimento do alvéolo dental por trabéculas ósseas²⁷.

Fazendo-se uma comparação dos resultados do grupo controle e do grupo com o biomaterial, primeiramente considerando os grupos dos 7 dias, observou-se no grupo controle, no terço cervical do alvéolo, uma cicatrização dentro do padrão normal de reparação descrito pela literatura²¹, com uma exuberante presença de tecido conjuntivo fibroso bastante vascularizado, rico em fibroblastos osteócitos e osteoblastos que levam à neoformação de tecido ósseo primário. No 14º dia após a exodontia, o grupo controle apresenta o tecido de granulação maduro com neoformação de tecido ósseo primário, contudo, quando comparado ao grupo controle de 7 dias, as trabéculas ósseas neoformadas apresentam-se mais espessas, regulares e preenchendo uma maior quantidade de espaço, o que caracteriza uma cicatrização óssea regular, com boa neoformação óssea. Já no 28º dia, seguindo a cronologia do reparo alveolar em ratos, o alvéolo encontrava-se quase totalmente preenchido por tecido ósseo primário, porém bem maduro, o qual se distingue pela presença de trabéculas espessas, regulares e celularizadas pelos osteócitos e poucos osteoblastos em sua superfície. O pouco tecido conjuntivo fibroso que se encontrava entre as trabéculas exibia feixes colágenos bem organizados em fascículos. Observou-se também que em nenhum dos tempos houve a presença de granuloma do tipo corpo estranho nem a presença de células gigantes multinucleadas inflamatórias, o que mostra que não houve em nenhum momento formação de granuloma. Já a presença de tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea estava presente em todos os espécimes em todos os tempos experimentais, o que significa que a formação óssea ocorreu conforme a cronologia de alvéolos ocupados por coágulo sanguíneo.

No entanto, Okamoto (1994) afirma que o alvéolo dentário é uma cavidade que se comporta de forma especial frente aos substitutos ósseos. Materiais que em outros sítios podem não influenciar o reparo ósseo, quando colocados no alvéolo podem influenciar negativamente o processo de reparo²⁸. Logo, pode-se através deste estudo confirmar esta afirmação, pois ao analisar o grupo Bonefill® observou-se um atraso na reparação óssea em comparação ao grupo controle. Analisando o reparo aos 7 dias após exodontia, observou-se grande presença do biomaterial, assim como a grande presença de tecido de granulação maduro celularizado rico em vasos sanguíneos. Observou-se ainda, que os espaços entre as partículas estão

preenchidos por exuberante neoformação de tecido ósseo de padrão primário ou imaturo. O osteóide neoformado apresentou-se bem vascularizado, ricamente celularizado por osteócitos, com trabéculas aleatoriamente distribuídas e inclusive na superfície do material implantar. Periféricamente da antiga tábua óssea alveolar partem trabéculas de osso osteóide, evidenciando a neoformação óssea. No 14º dia, o espaço intra alveolar da região cervical selecionada, apresentou-se com numerosos fragmentos do biomaterial e poucos osteoclastos o que significa que o material foi pouco reabsorvido. No entanto, ao redor do biomaterial houve bastante neoformação de tecido ósseo primário, que ao ser comparado com o grupo de 7 dias, apresentava-se mais maduro, mais rico em osteócitos e mais organizado. Notou-se também que o osso presente na superfície do biomaterial estava nitidamente diferenciado e mais maduro que o osso neoformado localizado entre as partículas, porém com menos formação óssea quando comparado ao grupo controle. Já aos 28 dias, ainda existia bastante presença do biomaterial, porém um pouco menos quando comparado com o de 14 dias. Também não se pode observar a atividade de osteoclastos, o que indica que o biomaterial é muito lentamente substituído pelo tecido ósseo. Em relação à neoformação óssea, embora ainda primário, o osso apresentava-se mais maduro e com menor quantidade de osteócitos e osteoblastos, e entre as trabéculas ósseas, ainda existia uma quantidade tecido conjuntivo fibroso, com fibroblastos e feixes colágenos bem organizados em fascículos. Importante salientar que a presença do biomaterial não causou uma reação de corpo estranho, pois em nenhum momento foi notada a formação de granuloma nem a presença de macrófagos, o que constata sua biocompatibilidade e a presença de neoformação óssea na superfície do biomaterial confirma sua ação osteocondutora.

Em um estudo feito em alvéolos de ratos onde foram enxertados matriz óssea liofilizada bovina inorgânica (Genox®, Genius®; Baumer, São Paulo, Brasil) e de vidro bioativo (PerioGlas®; USBiomaterials Corp, Jacksonville Beach, FL)²⁷, os pesquisadores chegaram à conclusão que os dados histométricos no estudo revelaram que o enxerto de osso inorgânico teve um efeito deletério mais pronunciado sobre a cicatrização do osso alveolar, comparado com o enxerto de partículas de vidro bioativo durante o período das 2 primeiras semanas de reparação, embora o oposto resultado foi observado durante o período de 9 semanas. No mesmo estudo, lacunas de absorção foram observadas em apenas algumas partículas de osso inorgânico e do vidro bioativo até a 9ª semana após a

implantação, confirmando taxa absorção extremamente lenta do material enxertado; também a biocompatibilidade, assim como o osteointegração e osteocondução, propriedades atribuídos ao osso bovino inorgânico, foram confirmados. Todos estes dados vem a concordar com as observações do presente estudo com o Bonefill®.

Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) é um enxerto ósseo bovino inorgânico quimicamente e estruturalmente comparável aos enxertos utilizados nos estudo citados, e tem sido testado em clínicas médicas e dentárias, desde a década de 1990 com relatos de propriedades de biocompatibilidade, osseointegração, osteocondução. Tanto análises clínicas e histológicas em humanos têm sugerido que se trata de um material adequado para a preenchimento de alvéolos dentário após a extração, correção da crista alveolar e defeitos ósseos periodontais. Stavropoulos et al²⁹, no entanto, têm enfatizado que a maior parte dos relatórios clínicos são descritivos e vagos, sem adequados controles, e alertaram que as conclusões baseadas apenas em critérios clínicos e estudos radiográficos podem ser imprecisas²⁷.

Um estudo realizado com Bio-Oss® onde este foi comparado com o fosfato tricálcico (um derivado inorgânico sintético que tem propriedades osteointegradoras e osteocondutora da marca Cerasorb® (Curasan, Kleinstheim, Alemanha) em diferentes períodos de cura (3, 6, 12 e 24 meses pós-operatórios) em defeitos ósseos realizados em mandíbula de cães³⁰, constatou que nos locais enxertados com Bio-Oss®, a completa cicatrização óssea foi evidente em 12 e 24 meses, mas as partículas do enxerto dominavam o local, já nos defeitos ósseos enxertados com fosfato tricálcico os restos de partículas apenas permaneceram até os 12 meses de cicatrização, além de que a porcentagem óssea em 24 meses, com o fosfato tricálcico(86,5%), foi significativamente maior do osso bovino inorgânico(55,6%).

Portanto, por meio dos bons resultados obtidos no presente estudo, os autores sugerem novos experimentos com o mesmo biomaterial (Bonefill®) em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de ratos.

6- CONCLUSÃO

O reparo alveolar aos 28 dias se completou nos grupos tratado e controle. O Bonafill[®], nos tempos analisados, atrasou o processo de reparação alveolar quando comparado ao grupo controle, desempenhou funções de osteocondutividade e biocompatibilidade evidenciada através da neoformação óssea em contato com as suas partículas dentro do alvéolo, ausência de reações do tipo corpo estranho e ausência de reabsorção das partículas.

Referências

01	Raghoobar GM, Louwerse C, Kalk WWI, Vissink A. Morbidity of chin bone harvesting. Clin Oral Implant Res. 2001; 12(5): 503-7.
02	Joshi A. An investigation of post-operative morbidity following chin graft surgery. Br Dent J. 2004; 196(4): 215-8.
03	Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAV. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. Implant News. 2004; 1(3): 255-60.
04	Taga R, Cestari TM, Silva TL, Stipp ACM. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de Osseobon. Rev Bras Implant. 1997; 3(1):13-20.
05	Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira, DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Efeito da temperatura da desproteínização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. Rev Fac Odontol Bauru. 1999; 7(3/4):85-93.
06	Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. Rev Fac Odontol Bauru. 2000; 8(1/2): 1-10.
07	Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Kina JR, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo do osso xenógeno. Rev Bras Ortop. 2003; 38(9):551-60.
08	Herculani PP et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. Rev Bras Implant. 2000;7(2):7-14.
09	Lindhe TB. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®: an experimental study in dog. Clin Oral Implant Res. 1997; 8(2):117-24.
10	Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and

	histometric study in rat tibias. <i>Clin Oral Implants Res.</i> 2005 Dec;16(6):683-91.
11	Mendes SM, Fonseca CE, Bassi APF, Ponzoni D, Carvalho PSP. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso desmineralizado ou por osso composto com sem proteína morfogenética do osso (BMP). <i>Revista Odontológica de Araçatuba</i> , 2006; 27: 34-40.
12	Carbonari M, Ludtke J, Santos PCV, Carvalho NTA, Gehrke SA. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios – Parte 1. <i>Implant News.</i> 2010; 7 (1):103-110.
13	Cordioli, G. et al. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement: clinical and histological findings. <i>Clin Oral Implants Res.</i> 2001;12(3):270-8.
14	Urist MR. Bone: formation by autoinduction. <i>Science.</i> 1965;150(698):893-9.
15	Tosta M, Saraceni CHC, Barbosa J, Guerra L, Ferraz P, Moura Filho GS, Tosta M, Tumenas I, Katchburian E. Avaliação clínica e histológica da eficácia de um substituto ósseo em enxertos no seio maxilar em humanos. <i>ImplantNews</i> , 2007 4 (5):479-489.
16	Carbonari M, Ludtke J, Santos PCV, Carvalho NTA, Gehrke SA. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios – Parte 1. <i>ImplantNews</i> 2010 7 (1):103-110.
17	Åstrand P, Carlsson GE. Changes in the alveolar process after extractions in the white rat: a hystologic and fluorescence microscopic study. <i>Acta Odontol Scand</i> 69;27:113-127.
18	Johansen JR, Gilhuus-Moe O. Repair of the post-extraction alveolus in the guinea pig: a histological and autoradiographic study. <i>Acta Odontol Scand</i> 1969;27:249-262.
19	Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. <i>Acta Odontol Scand</i> 1970;28:441-461.
20	Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. <i>J Am Dent Assoc</i> 1960;61:32-44.
21	Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. <i>Rev Fac Odontol Araçatuba</i> 1973;2:153-169.

22	Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana; 1987.
23	Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. <i>Oral Surg Oral Med Oral Pathol</i> 1969; 27 :309-318.
24	LEAHY, F M. Análise microscópica da organização celular e tecidual na interface e ao redor das partículas de Bio-oss®, Genox inorg® e Bone fill®) em defeitos ósseos em calvárias murinas. Campinas/SP, 2012. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pós-graduação da São Leopoldo Mandic.
25	Avaliação microscópica da ação do osso autógeno associado ou não ao PRP em cavidades ósseas de cães. Microscopic evaluation of the action autogenous bone associated or not to PRP in bone cavities of dogs Djalma P. Nunes Filho, Fernando Luppino, Renato Yassutaka Faria Yaedú Paulo Sérgio Perri de Carvalho. <i>REVISTA IMPLANTNEWS</i> 2007;4(3):263-9
26	Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos Wistar preenchido com osso autógeno particulado após exodontia. Alexandre de Melo. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007
27	Grafting of Tooth Extraction Socket With Inorganic Bovine Bone or Bioactive Glass Particles: Comparative Histometric Study in Rats Romeu Felipe Elias Calixto, PhD,* Juliana Mazzone Teófilo, PhD,† Luiz Guilherme Brentegani, PhD,‡ and Teresa Luícia Lamano-Carvalho, PhD‡ <i>IMPLANT DENTISTRY / VOLUME 16, NUMBER 3, 2007.</i>
28	Okamoto T. Implante de osso anorgânico associado ou não a hidroxiapatita em alvéolo dental após exodontia: estudo histológico em ratos. <i>BCI</i> 1994;1:17-25.
29	Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, et al. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): An experimental study in the rat. <i>J Clin Periodontol.</i> 2003;30:636-643.
30	Biomaterial Resorption Rate and Healing Site Morphology of Inorganic Bovine Bone and Tricalcium Phosphate in the Canine: A 24-month Longitudinal Histologic Study and Morphometric Analysis. Zvi Artzi, DMD1/Miron Weinreb,

<p>DMD2/Navot Givol, DMD3/Michael D. Rohrer, DDS, MS4/ Carlos E. Nemcovsky, DMD1/Hari S. Prasad, BS, MDT5/Haim Tal, DMD, PhD6 The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, Volume 19, Number 3, 2004.</p>
--

ANEXO A - Certificado da Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal.



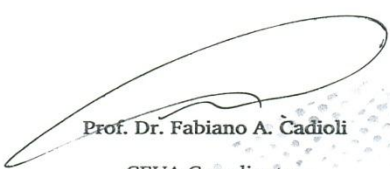
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Processo de reparo alveolar após exodontia e preenchimento do alvéolo com biomaterial bovino inorgânico" sob responsabilidade do Pesquisador DANIELA PONZONI e colaboração de Agnes Soares de Sampaio Nascimento está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00251-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Alveolar healing process after tooth extraction and filling of dental socket with biomaterial inorganic bovine. A histological and histometric study in rats", protocol number 00251-2012, under responsibility of DANIELA PONZONI and with collaboration of Agnes Soares de Sampaio Nascimento agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabiano.cadioli@fmva.unesp.br