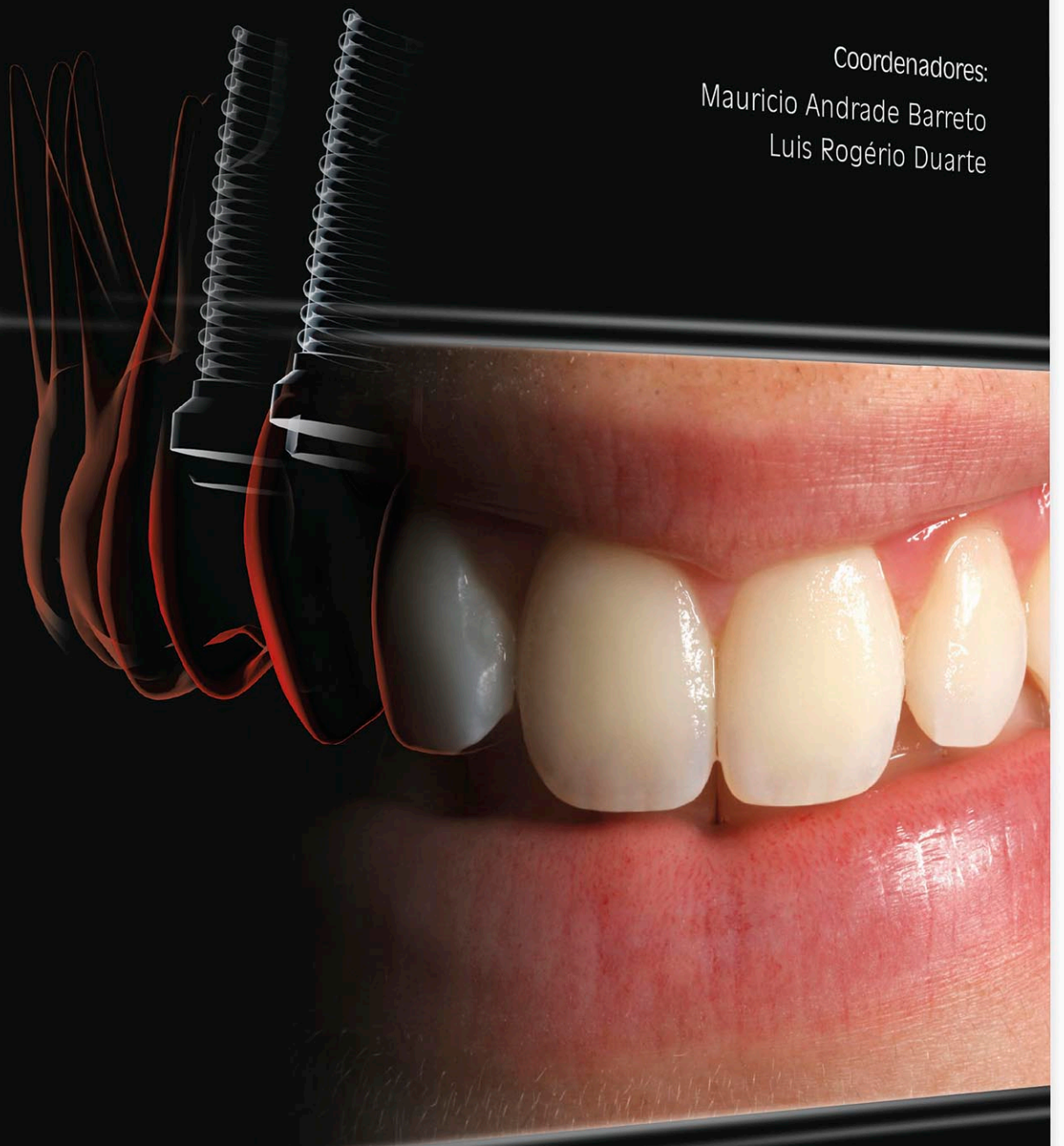


EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS em Estética e Osseointegração

Coordenadores:
Maurício Andrade Barreto
Luis Rogério Duarte



EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS
em Estética e Osseointegração

Coordenadores:
Maurício Andrade Barreto
Luis Rogério Duarte



E

C
A
P
Í
T
U
L
O

VII



**SUBSTITUTOS ÓSSEOS DE ORIGEM ANIMAL:
Análise microscópica para mensurar as
reações biológicas teciduais frente aos
enxertos particulados**

Autores:

Franklin Moreira Leahy

Dario Augusto Miranda

Luis Rogério Duarte

Alberto Consolaro

Carlos Eduardo Francischone



Carlos Eduardo Francischone

Graduado pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (1971), obteve os títulos de Mestre (1976), Doutor (1978), Livre docente (1984) e Professor Titular (2000) pela mesma instituição, onde exerce atividades junto ao Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários desde 1972. Atua nas áreas clínicas de estética, implantes e osseointegração. Atualmente é editor das Revistas: Dental Press Periodontia e Implantologia (Maringá) e Dental Press Implantology e Coordenador do Programa de Mestrado em Implantologia da Faculdade São Leopoldo Mandic. Membro da Academia Brasileira de Odontologia e Membro do International College of Dentists - USA.



Alberto Consolaro

Possui graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1977), mestrado em Biologia Patologia Buco Dental pela Universidade Estadual de Campinas (1983) e doutorado em Odontologia Patologia Bucal Bauru pela Universidade de São Paulo (1987). Atualmente é professor colaborador da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP e professor titular da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Odontologia, com ênfase em Anatomia Patológica, atuando principalmente nos seguintes temas: reabsorções dentárias, reabsorção dentária, movimentação dentária, ortodontia e reabsorção radicular. Editor da Revista Dental Press Implantology (2012).



Luis Rogerio Duarte

Possui graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana (1991), Especialização em Implantodontia pela ABO - BA, mestrado em Implantologia pela Universidade do Sagrado Coração (2005) e Doutorado em Odontologia, área de concentração: Implantodontia pela Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic (2009). Atualmente é cirurgião - dentista do Instituto Pedro Ribeiro de Administração Judiciária, Implantodontista do Instituto Renaissance e docente da Universidade Federal da Bahia. Tem experiência na área de Odontologia, com ênfase em Implantodontia.



Franklin Moreira Leahy

Foto Graduado em Odontologia pela UFBa, especialista em Implantodontia pela USP/SP. Atua na Odontoclínica Especializada Franklin Leahy - Salvador - BA.



Dario Augusto Oliveira Miranda

Possui graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana (1995), mestrado em Periodontia Implante - University Of Illinois Chicago (2002) e sagrou-se Diplomata em periodontia pela American Board of Periodontology no ano de 2004. Atualmente é professor assistente da Universidade Estadual de Feira de Santana e professor do curso de especialização em implantodontia e coordenador do curso de atualização em implantes dentários da Associação Brasileira de Odontologia (ABO) secção Bahia, e professor do curso em implantodontia da ABO secção Alagoas. Tem experiência na área de Odontologia, com ênfase em Periodontia, Implantes e cirurgia oral menor, atuando principalmente nos seguintes temas: engenharia tecidual, exames por imagens, cirurgia guiada, implantes dentários, fatores de crescimento, rhBMP-2, biomaterias de reparo ósseo

Evidências Científicas em Estética e Osseointegração

Este capítulo tem por objetivo avaliar a resposta biológica associada ao poder osseogênico de três diferentes tipos comerciais de matrizes ósseas orgânicas de origem bovina, aplicadas sobre defeitos ósseos induzidos em calvária de ratos, por intermédio da análise de cortes teciduais microscópicos. Esta criteriosa análise é importante parte de uma proposição de parâmetros direcionados a *quantificar* e *mensurar* as reações biológicas teciduais no processo de osseogênese, onde determinamos graduações crescentes para cinco fases distintas do reparo ósseo. Para esta classificação, levamos em conta fenômenos inflamatórios ocorridos *nas superfícies* das partículas, assim como no *intermeio* das partículas de cada um dos três biomateriais xenógenos utilizados, em períodos de 30 e 60 dias de observação. Antes, porém, é oportuna uma revisão geral sobre o osso, as bases biológicas do reparo ósseo e os variados tipos de enxertos ósseos amplamente estudados na literatura e disponíveis no mercado como alternativas terapêuticas, com suas respectivas classificações.

Em razão da perda de um tecido, o organismo reage no intuito de substituí-lo de forma a assemelhar-se ao máximo com o tecido original. O tecido ósseo apresenta grande potencial de reparo, entretanto, em casos de perdas extensas, isso pode não acontecer⁴¹.

As reconstruções craniofaciais e a correção de defeitos ósseos, provenientes de traumas cirúrgicos ou acidentais e/ou doença periodontal, têm sido tema de grandes pesquisas, discussões e controvérsias na literatura, principalmente em razão do rápido crescimento de tecido conjuntivo, o qual impede ou dificulta a neoformação de tecido ósseo no defeito²³.

A recomposição estrutural óssea pode ser feita por tecido ósseo igual ao original, ou a região pode ser preenchida por tecido conjuntivo fibroso sem restabelecer a função nem a anatomia, deixando marcas, sinais ou cicatriz na região. A este último fato denominamos *cicatrização*. É importante esclarecer neste momento que o osso ou tecido ósseo *não* se regenera! A regeneração é característica própria de glândulas, epitélio e vísceras. O osso sofre *reparação*^{8,9,17}!

Uma ferramenta básica para a reparação do osso é a presença de tecido de granulação. Se este tecido estiver permeado por células indiferenciadas de linhagem fibroblástica, teremos como resultado final *tecido fibroso*. Se o tecido de granulação for invadido por células de linhagem osteoblástica, progredirá para um *tecido conjuntivo ósseo* ou, simplesmente, osso propriamente dito^{8,9,17} (Figura 01).

O advento dos biomateriais intensificou as pesquisas e aumentou o número de cirurgias reconstrutivas, entre as quais se enquadram aquelas que se referem aos implantes dentários⁷.

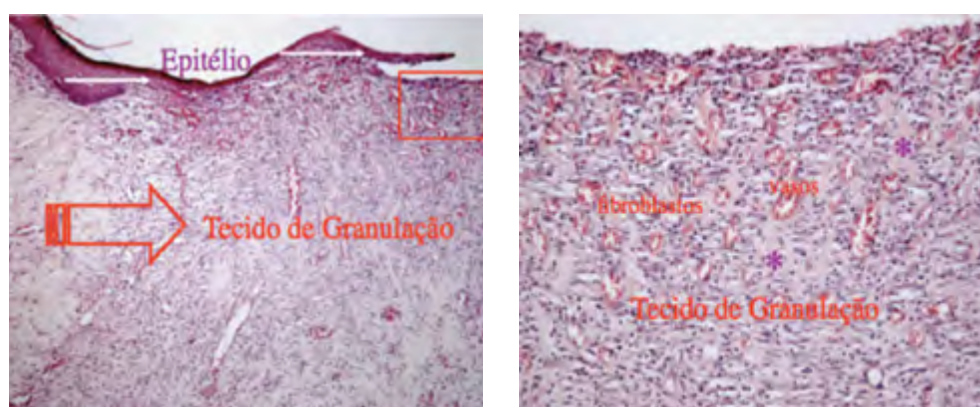


FIG.01 A,B Tecido de granulação depois de 7 dias de ferida cirúrgica na pele sem sutura em reparação. Destaca-se o componente vascular e celular fibroblástico do tecido de granulação com formação de matriz extracelular (*). O epitélio remanescente prolifera e migra sobre o tecido de granulação pelo processo da regeneração (HE; A=4X e B=25X).

Diversos fatores podem influenciar diretamente no sucesso dos enxertos: higiene oral, morfologia e extensão do defeito ósseo, técnica operatória associada à habilidade do operador e o biomaterial utilizado⁷.

O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e gradualmente substituído por novo tecido ósseo, além de possuir propriedade *osteointutiva* ou *osteocondutiva*²⁷ (Figura 02).

Os enxertos ósseos podem ser obtidos a partir de diferentes origens, que exemplificaremos mais adiante. Adiantamos, contudo, que os enxertos autógenos são considerados “padrão ouro” em cirurgias maxilofaciais, craniofaciais, orais, ortopédicas e em cirurgias plásticas³⁸. No entanto, o principal problema relacionado a esse procedimento é a morbidade da qual o paciente é acometido²⁹, assim como a quantidade limitada de material coletado³³.

Tentando superar estes obstáculos, pesquisas foram dirigidas para a obtenção de um substituto adequado para o enxerto ósseo autógeno²⁵. Nesta linha, os enxertos alógenos, aloplásticos e xenógenos têm sido usados em locais de defeitos ósseos, como auxiliares ou substitutos aos enxertos autógenos. A demanda para esses chamados biomateriais aumentou de forma logarítmica nos EUA, assim como houve um aumento significativo no Brasil nos últimos 10 anos. A indústria médica é uma das maiores protagonistas desse aumento.

Enxertos alo gênicos de ossos humanos liofilizados desmineralizados (DFD-BA) são os mais comumente usados pelos dentistas quando são necessários materiais alternativos de enxerto. Após o osso removido da área doadora ser

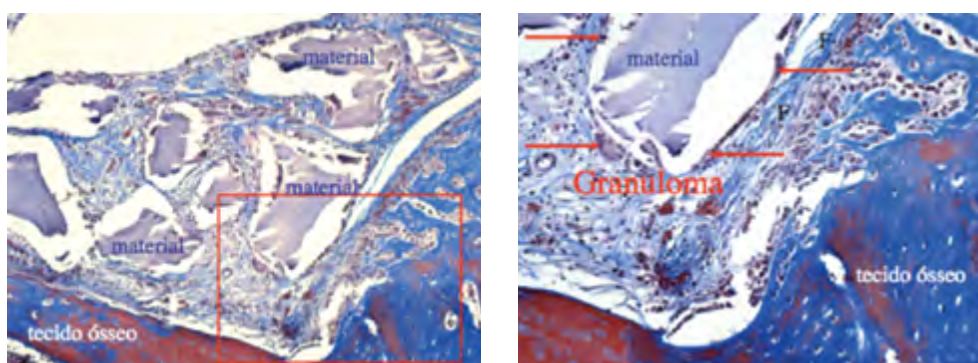


FIG.02 A,B Granuloma do tipo corpo estranho na superfície de cada partícula de biomaterial particulado inserido em defeitos ósseos induzidos experimentalmente em ratos para avaliação de sua compatibilidade tecidual. Destaca-se o aglomerado de macrófagos (setas) na interface do material com o tecido vizinho, inclusive com células gigantes multinucleadas inflamatórias (setas). Em torno de cada granuloma nota-se fibrosamento periférico (F). (Tricômico de Masson: A=4X e B=25X).



desmineralizado, a matriz óssea e as proteínas são liofilizadas, processo que favorece uma vida útil longa para as partículas de osso cortical e a redução da antigenicidade do enxerto^{24,19}. O DFDBA é prontamente disponível, é seguro para o uso, e, em algumas pesquisas, ele é osteoindutor, embora outros estudos contradigam esses achados^{26,30}.

Na dificuldade ou limitação para adquirir osso autógeno, e na falta de material alo-gênico, os enxertos aloplásticos têm sido foco de considerável atenção para o tratamento de defeitos ósseos periodontais. Estes materiais são utilizados em quantidades ilimitadas, não necessitam de local doador, são não antigênicos e são estéreis^{31,35}. Os enxertos sintéticos justificam-se em virtude de não exigirem intervenção cirúrgica em mais de uma área. Portanto, ausência de morbidade de uma área doadora, um menor tempo cirúrgico e um maior volume de enxerto, que são fatores conseguidos com sucesso quando da utilização de alguns substitutos do osso autógeno.

Os materiais aloplásticos usados incorporam as formas sintéticas de fosfato de cálcio, incluindo a hidroxiapatita, e outros tipos de materiais, como os vidros bioativos.

Enxertos xenógenos são aqueles colhidos de espécies não humanas, onde as espécies mais típicas e comumente usadas são as bovinas. Os ossos colhidos são processados para remover propriedades antigênicas usando variadas técnicas de preparação química. Tais materiais têm sido utilizados com sucesso para preservar o osso no local pós-extração; contudo, a literatura relata¹ que por um período de até quatro meses as partículas dos enxertos estão presentes sem sinal de reabsorção ou substituição.

Para reduzir as reações celulares adversas na implantação de osso mineralizado e possibilitar tanto o acesso quanto a obtenção mais fáceis do que o material humano, o osso bovino desproteínizado, ou DBB, foi desenvolvido para ser usado como um biomaterial substituto aos enxertos ósseos autógenos.

Os modelos de defeitos produzidos na calvária de ratos têm sido usados em experimentos direcionados para o reparo ósseo^{34,10,18,4,3,22}.



TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é considerado uma forma especializada de tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular é mineralizada, o que lhe confere a característica de rigidez. Além de proporcionar suporte às estruturas orgânicas, o tecido ósseo representa o maior reservatório de cálcio do organismo, o qual participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como também na transmissão e condução dos impulsos elétricos em nervos e músculos. Dessa forma, o tecido ósseo apresenta uma grande capacidade de remodelação, principalmente em resposta às necessidades metabólicas do corpo e à manutenção da estabilidade da calcemia²¹.

Microestruturalmente, o osso pode ser categorizado em três componentes: células, matriz orgânica e matriz inorgânica. Esses são integrados em duas hierarquias macroestruturais: osso cortical e osso esponjoso².

As células encontradas no osso são de três tipos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo os dois primeiros tipos celulares derivados das células mesenquimais denominadas células osteoprogenitoras. Os **osteoblastos** são células completamente diferenciadas cuja principal função é a formação óssea (osteogênese). São responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos, da matriz óssea (colágeno do tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas), bem como dos componentes inorgânicos¹⁹ (Figura 03).

Os **osteócitos** são células maduras (anteriormente osteoblastos) que se situam dentro da matriz por eles formada (osteoplastos) e desempenham um importante papel no controle dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo³² (Figura 04).

Os **osteoclastos** são células gigantes multinucleadas, derivadas dos monócitos do sangue. Estas células participam da reabsorção da matriz mineralizada e orgânica do tecido ósseo, participando dos processos de remodelação e reabsorção óssea¹⁵ (Figura 05).

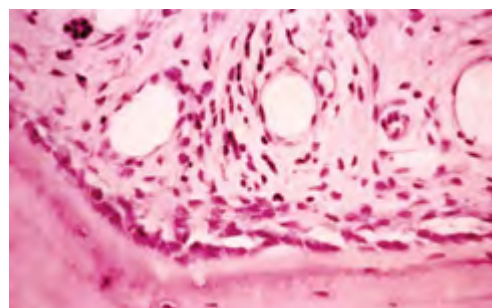


FIG.03 Osteoblastos.

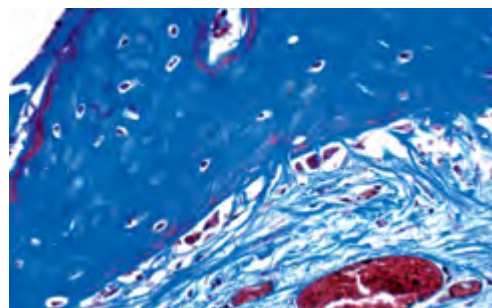


FIG.04 Osteócitos.

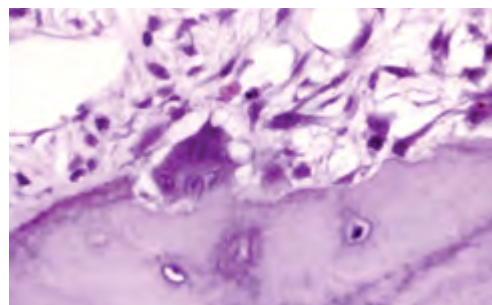


FIG.05 Osteoclastos.



BASES E MECANISMOS BIOLÓGICOS

PARA O REPARO ÓSSEO

A formação de tecido ósseo durante o desenvolvimento do esqueleto pode ocorrer de uma forma direta, por meio de uma membrana, sendo denominada de ossificação intramembranosa, ou de uma forma indireta, através de um estágio intermediário de cartilagem, denominado de ossificação endocondral²⁰.

A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário, no interior de uma membrana conjuntiva, onde as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos para iniciar a formação de tecido ósseo. Como exemplo desse tipo de ossificação podemos citar alguns ossos do crânio, alguns ossos faciais e parte da clavícula e da mandíbula²⁰.

Os ossos associados a uma maior sobrecarga formam-se pela ossificação endocondral. Nesses tecidos, o mesênquima embrionário transforma-se em cartilagem, comportando-se como um modelo para a formação óssea¹⁵.

Os enxertos ósseos podem atuar por 3 diferentes mecanismos para o processo de formação óssea: osteogênese, osteoindução ou osteocondução, ou por meio de uma combinação desses mecanismos.

Osteogênese

Trata-se de um termo que denota os elementos celulares do enxerto que sobreviveram ao transplante e estão ativamente produzindo osso novo^{24,16}. O osso autógeno é o único material de enxerto disponível com propriedade osteogênica¹².

Osteoindução

O termo refere-se ao processo pelo qual as células-tronco mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao local do enxerto são induzidas à diferenciação em células de linhagem osteogênica⁵.

A osteoindução é caracterizada como a formação de novo osso por novos osteoblastos diferenciados de células mesenquimais indiferenciadas sob a influência de agentes indutores, como a BMP e os fatores de crescimento^{16,19}.



Osteocondução

É o processo que favorece a proliferação, migração e maturação de osteoblastos e a aposição do osso diretamente sobre o material¹⁶. Os materiais osteocondutores servem, portanto, como arcabouço para a proliferação do tecido ósseo perdido⁷, sustentando uma estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo então, os componentes necessários para a formação óssea¹⁴. Os materiais osteocondutores não apresentam reação tóxica, e os mais comuns são os enxertos xenógenos e os enxertos aloplásticos¹².

BIOMATERIAIS PARA ENXERTO ÓSSEO

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

Os enxertos ósseos estão assim classificados¹⁰:

Enxertos autógenos ou auto-enxertos

Quando o tecido é transferido de uma posição para outra, de um mesmo indivíduo, não provocando, conseqüentemente, reação imune, podendo ser osso cortical ou medular, quando é transplantado.

Enxertos alogênicos, homogêneos ou homoenxertos

São tecidos enxertados entre indivíduos da mesma espécie com genes não idênticos, como o osso fresco, congelado, liofilizado (FDBA), desmineralizado e liofilizado (DFDBA).

Enxertos aloplásticos

São corpos inertes, utilizados para implantação nos tecidos, como fosfato de cálcio, hidroxiapatita, biocerâmica, além de outros tipos.





Xenoenxertos, heteroenxertos ou heterólogos

Enxertos realizados entre indivíduos de espécies diferentes, onde se inclui o osso bovino.

A reconstrução ideal do tecido ósseo depende, principalmente, da atividade de células osteoprogenitoras²⁸. O número dessas células é limitado e a sua ação depende de estímulos, como os promovidos pelos fatores de crescimento. Dessa forma, foi demonstrada a importância de se encontrar técnicas e materiais que estimulem a sua proliferação e diferenciação a fim de auxiliar no reparo de grandes defeitos ósseos³⁵. Atualmente, diversos materiais têm sido utilizados com o propósito de favorecer o reparo ósseo, como os enxertos autógenos, aloplásticos ou xenógenos, assim como os fatores de crescimento e a morfogênese, seja de forma isolada ou em combinações.

ENXERTOS XENÓGENOS

Os enxertos xenógenos são biomateriais obtidos de doadores de outras espécies, sobretudo bovinos, caprinos e suínos. Trata-se de um material^{37,36} com grande potencial osteocondutor e, química e fisicamente, semelhante ao osso humano.

Os enxertos xenógenos, por eliminar riscos cirúrgicos e reduzir a possibilidade de infecções, são importantes alternativas ao uso de osso autógeno, além de poder ser obtidos de fontes virtualmente inesgotáveis, apresentando resultados previsíveis quanto aos princípios cirúrgicos. Entretanto, a utilização de enxertos de origem bovina poderá incluir, ainda que com riscos reduzidos, a possibilidade de transmissão de doenças e a reação imune do hospedeiro ao material enxertado, em casos onde o enxerto apresente remanescente de matriz orgânica, o que contribui para diminuir a aceitação da utilização desses materiais pelos pacientes e pelos profissionais⁶.

Os xenoenxertos podem ser indicados para diversos procedimentos reconstrutivos, os quais podemos destacar os defeitos ósseos, os defeitos periodontais, os enxertos de seio maxilar, as deiscências ósseas ao redor de implantes e o reparo ósseo guiado^{40,39}.



BASES SOBRE INFLAMAÇÃO E REPARO

Toda inflamação crônica, necessariamente, advém da fase aguda classicamente descrita como de sintomatologia intensa, duração curta de alguns dias e preponderância de fenômenos vasculares e exsudativos permeados por migração celular rica em leucócitos polimorfonucleares do tipo neutrófilos. No entanto, a grande maioria das inflamações agudas é subclínica, evoluindo rapidamente para a reparação sem que percebamos qualquer desconforto^{9,17}.

Se o agente agressor for destruído e eliminado pelas substâncias e células da inflamação aguda, evolui-se para a *resolução* do processo. A **resolução** implica em um processo de reparo e cura dos danos da lesão tecidual promovida, reconstruindo-se o tecido conjuntivo pelo processo da **reparação**, mas isto requer uma formação prévia de tecido de granulação. A reparação pode ser mencionada como reparo ou processo de reparo e representa os últimos capítulos de uma inflamação bem sucedida^{9,17}.

O processo inflamatório representa um mecanismo de defesa dos tecidos conjuntivos como fibroso, ósseo, cartilaginoso e outros. Os demais tecidos não conjuntivos lesados, como epitélios e nervos periféricos, são reconstruídos a partir da **regeneração** caracterizada pela proliferação celular dos seus remanescentes nas áreas vizinhas, sem necessitar de formação prévia de tecido de granulação^{9,17}.

A reparação e a regeneração são mecanismos biológicos distintos de reconstrução tecidual e podem ser simultâneos para restaurar a anatomia e a fisiologia de uma área lesada, mas nem sempre isto significa uma completa recuperação estrutural e funcional. Alguns sinais conhecidos como marcas ou cicatrizes podem ser permanentes. A reparação e/ou a regeneração representam **a cura de uma agressão tecidual**^{9,17}.

Quando os remanescentes dos tecidos não conjuntivos não são suficientes para reconstruí-los em virtude da maior extensão da lesão, parte ou todo o espaço ocupado anteriormente por eles poderá ser preenchido por tecido conjuntivo neoformado a





partir das áreas vizinhas. Os tecidos conjuntivos para serem formados ou reconstruídos precisam, antes, organizarem no local um tecido, quase que embrionário, para lhe dar origem, e receber o nome de **tecido de granulação**^{9,17}.

Os tecidos conjuntivos estão quase sempre presentes na vizinhança dos demais pois têm a função de preenchimento e sustentação e, como tal, fazem parte do estroma de todos os órgãos. A parte celular nobre e especializada dos órgãos e das vísceras tem o nome de parênquima. Quando o parênquima lesado não consegue se reconstruir por si mesmo pelo processo da regeneração, o tecido conjuntivo vizinho formará no local um tecido de granulação, que ocupará o espaço – pela função de preenchimento – e dará origem a uma nova área de tecido conjuntivo. Esta ocorrência faz parte do que se chama de processo da reparação, mas em uma região onde não havia um tecido conjuntivo e sim um tecido mais diferenciado e especializado. Agora esta área de tecido conjuntivo em local incomum será denominada de *fibrose cicatricial*^{9,17}.

A impossibilidade de interação de alguns agentes faz os neutrófilos “desistirem” e migrar do local em 24 horas em média e/ou entrarem em apoptose sem derramar suas enzimas proteolíticas. A chegada dos macrófagos e sua predominância na região ocorre simultaneamente e, mesmo que não consigam interagir com o agressor ou fagocitá-lo, estas células são persistentes e têm longo tempo de vida. Esta circunscrição ou delimitação macrofágica vai caracterizando uma assembleia, reunião ou aglomerado ao redor do agressor, e que receberá o nome de *granuloma*^{9,17}.

O termo granuloma foi criado por Virchow, aproximadamente em 1878, para descrever certos crescimentos de “tecido de granulação” em áreas ulceradas formando pequenos botões ou tumores em forma de ilhas ou grãos. Grânulo representa o diminutivo de grão. A confusão terminológica vem desde a sua origem já que a sua criação não levou em consideração os aspectos microscópicos e sim os aspectos clínicos. O termo tumor, de forma precisa, é sinônimo de qualquer tumefação^{9,17}.





O objetivo da instalação de um granuloma é localizar e circunscrever o agente agressor a fim de impedir sua proliferação e disseminação via sanguínea, linfática e pelos espaços teciduais.

Por fim, a inflamação crônica indica persistência do agente agressor e pode ser:

Granulomatosa

A forma clássica pelo qual o infiltrado inflamatório crônico ou mononuclear se distribui em aglomerados mais ou menos organizados que recebem o nome de granuloma.

Difusa intersticial

Implica em uma distribuição aleatória e desorganizada do infiltrado inflamatório mononuclear em consequência da irregular e persistente ação de um agressor nem sempre acessível às células e ao exsudato como, por exemplo, o trauma repetitivo^{9,17}.

AMOSTRA UTILIZADA NO EXPERIMENTO

Uma amostra inicial de 80 ratos *Rattus norvegicus*, machos, adultos de 4 meses de idade, da linhagem Wistar, variante albina, com peso aproximado de 430g, sem doenças clinicamente manifestadas, primeiramente foi dividida em 4 grupos de 20 animais cada, e imediatamente redistribuídos em subgrupos iguais de 10 espécimes, que correspondiam aos períodos experimentalmente avaliados de 30 e 60 dias. À exceção do grupo azul (Controle), os grupos amarelo, verde e rosa foram respectivamente implantados com os materiais particulados *Bio-Oss*, *GenOx* e *Bonefill* nos defeitos cirurgicamente induzidos. No transcurso deste experimento, foram excluídos animais dentro dos quatro grupos, ou por terem morrido ao não resistirem no pós-operatório do experimento, ou por simples descarte de lâminas contendo cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis, resultando nos números finais de espécimes abaixo ilustrados no quadro 01.

80 RATOS								
GRUPOS	Controle		Bio-Oss		Gen-Ox		Bone-Fill	
PERÍODOS	30	60	30	60	30	60	30	60
ESPÉCIMES	7	8	8	6	6	6	6	5

QUADRO 01 Espécimes estudados em cada grupo e período experimental de 30 e 60 dias, já excluídos os animais mortos por não resistirem ao pós-operatório do experimento, ou por descarte de lâminas contendo cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis.



ANÁLISE MICROSCÓPICA

Utilizando critérios de mensuração para quantificar as reações teciduais na superfície ou ao redor das partículas do material enxertado

Para a realização da análise descritiva quatro grupos foram utilizados para diferenciar, morfologicamente, do ponto de vista microscópico, o tipo de organização celular e tecidual de natureza reacional e reparatória que possa ter ocorrido *na interface* e *ao redor* das partículas de três diferentes marcas comerciais de biomateriais considerados enxertos xenógenos de origem bovina: *Bio-Oss*[®], *GenOx Inorg*[®] e *Bonefill*[®] quando implantados em defeitos ósseos induzidos na calvária murina.

O método criado para mensurar o biomaterial empregado, o osso neoformado, o tecido fibroso e o espaço remanescente de cada defeito crítico produzido (com uma trefina de 8mm de diâmetro), orientaram a seguinte sequência: para cada corte tecidual microscópico analisado, foi traçada sobre a imagem gerada uma figura geométrica retangular medindo 8mm em sua base, por 1mm altura, delimitando uma área compreendida entre a extensão do defeito crítico (base maior do retângulo) e a espessura das bordas ósseas remanescentes deste mesmo defeito, utilizando-se, sempre como ponto referencial padrão a linha média do cérebro do rato.

O encontro dos dois hemisférios do cérebro forma a linha mediana que se posiciona perpendicularmente à metade da base do retângulo traçado para a avaliação quantitativa do defeito crítico. Desta forma, foram levantados dados histomorfométricos.

Para cada grupo e tempo experimental elaborou-se uma descrição do quadro microscópico encontrado, no qual se procurou caracterizar o padrão morfológico reacional ou reparatório. Embora se procurasse uma caracterização de cada grupo e tempo experimental, em cada uma destas descrições, destacou-se especificamente algum detalhe encontrado em apenas um dos espécimes, desde que não fosse considerado artefato de técnica. As características morfológicas das partículas do ponto de vista do microscópio óptico também foram descritas.



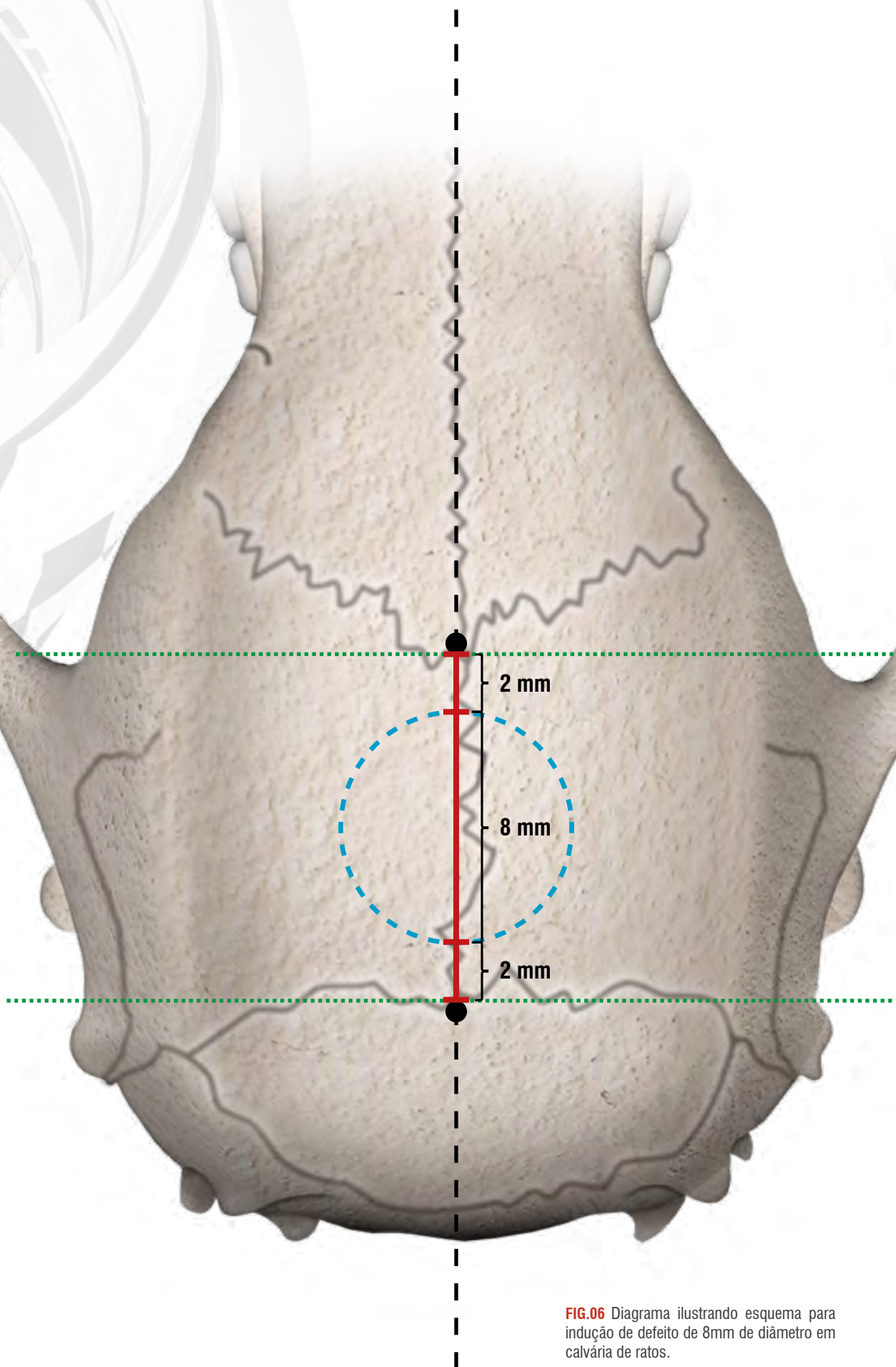


FIG.06 Diagrama ilustrando esquema para indução de defeito de 8mm de diâmetro em calvária de ratos.

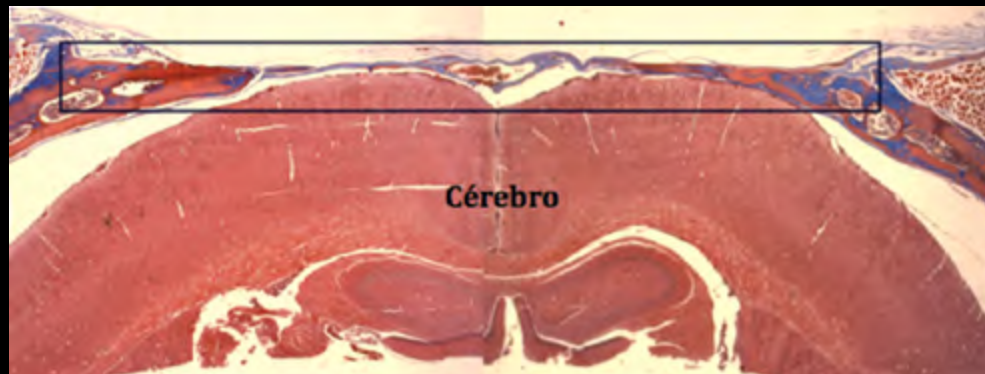


FIG.07 Corte tecidual microscópico ilustrando defeito produzido em calvária murina (Grupo Controle).

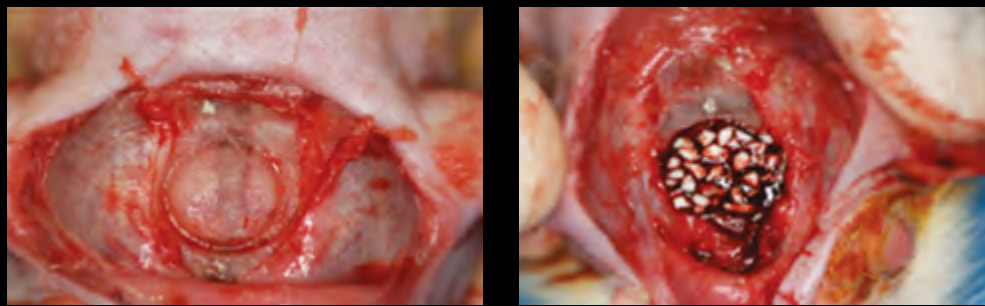


FIG.08 Perímetro do defeito crítico (A); e defeito preenchido com xenoenxerto particulado (B).

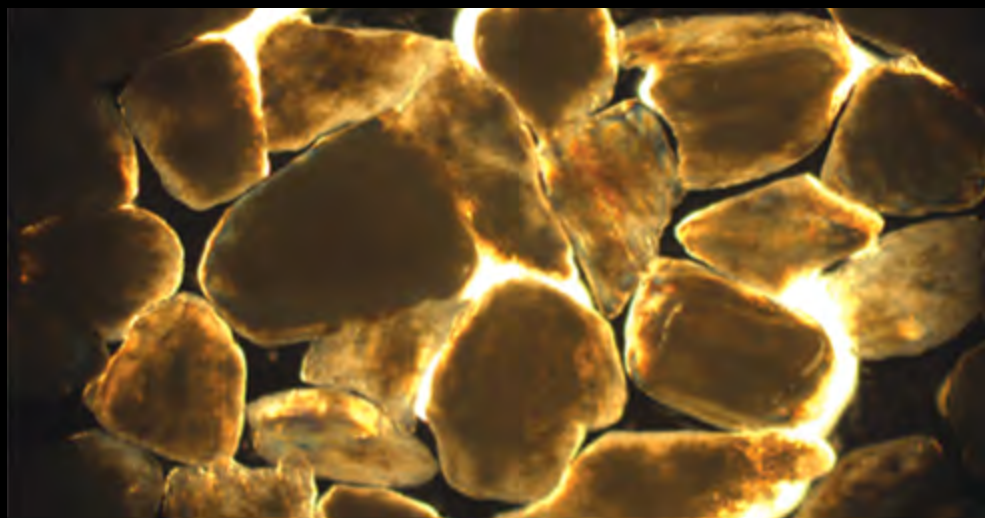
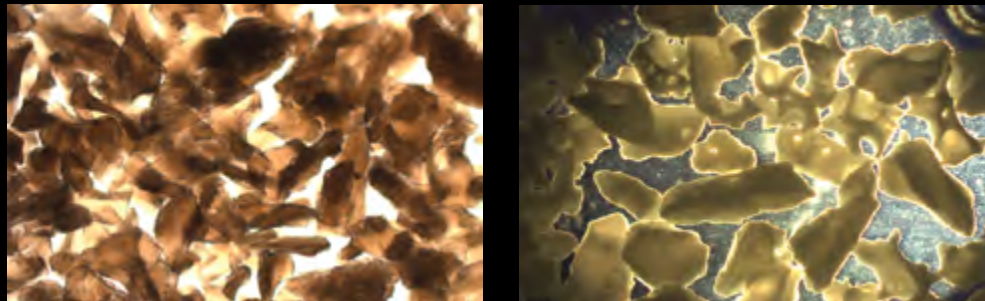


FIG.09 A-C Partículas de *Bio-Oss*; Fotomicroscópio 10x (A). Partículas de *GenOx*; Fotomicroscópio 10x (B). Partículas de *Bonefill*; Fotomicroscópio, 10x (C).



Os padrões morfológicos que determinaram os parâmetros e critérios de avaliação microscópica diante de cada um dos substitutos ósseos utilizados valeram-se de escores numéricos crescentes de 1 a 5, atribuídos aos fenômenos biológicos relacionados à organização celular e tecidual observados nas reações reparatórias ocorridas na **superfície** do material implantado e em sua **periferia** (ao redor).

(As ilustrações das figuras 10 e 11, foram modificadas a partir de desenhos originais elaborados para a Dissertação de Mestrado em Implantologia, LEAHY, F. M.; Faculdade SLMandic, Campinas, São paulo, p.50-51,2011.¹⁷)

NAS SUPERFÍCIES DAS PARTÍCULAS

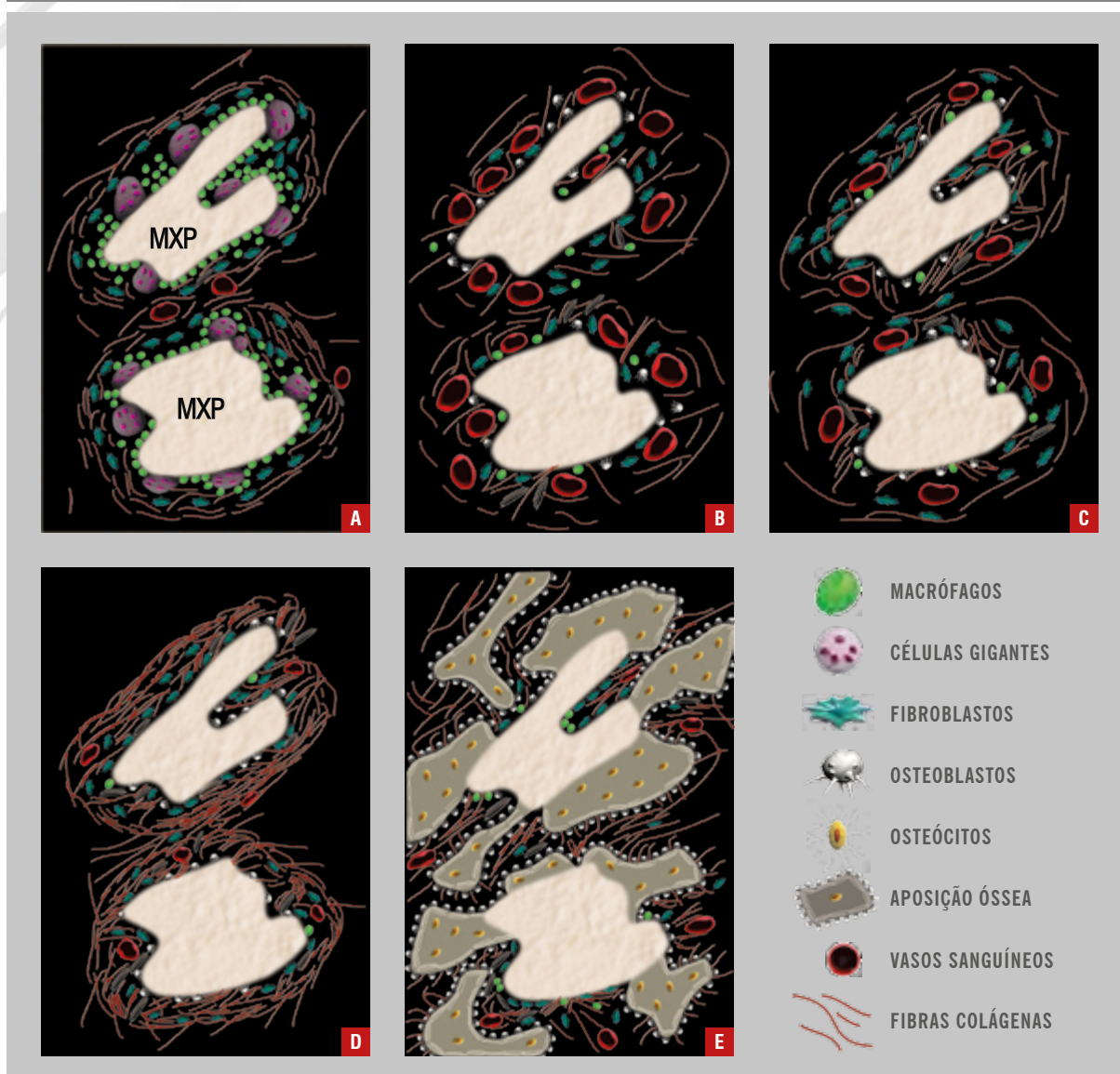


FIG.10 A-E Padrões morfológicos mensurados em escores de 1 a 5 relativos à reação tecidual ocorrida **na superfície** das partículas dos materiais testados. Granuloma do tipo corpo estranho - **ESCORE 1** (A). Tecido de granulação imaturo com exuberante número de vasos, fibroblastos jovens e raras fibras colágenas - **ESCORE 2** (B). Tecido de granulação maduro com menor número de vasos, mais fibroblastos jovens e número 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 em contato com as partículas - **ESCORE 5** (E). MXP = Material Xenógeno Particulado.





Progressiva gradação no processo de neoformação óssea:

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

AO REDOR DAS PARTÍCULAS

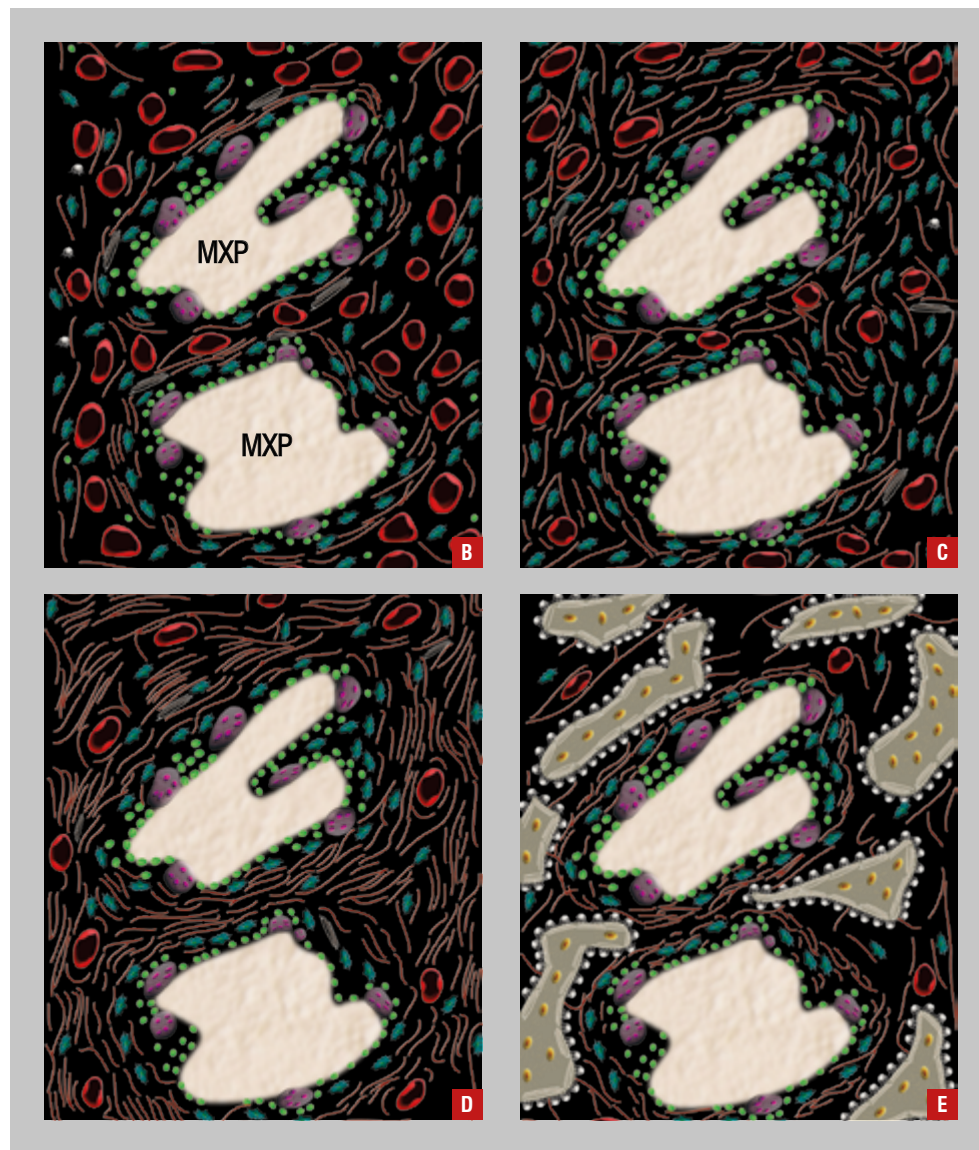


FIG.11 B-E Padrões morfológicos mensurados em escores de 2 a 5 da reação tecidual **ao redor** das partículas dos materiais testados. Na superfície do material nota-se um granuloma do tipo corpo estranho. Tecido de granulação imaturo com exuberante número de vasos, fibroblastos jovens e raras fibras colágenas - **SCORE 2** (B). Tecido de granulação maduro com menor número de vasos, mais fibroblastos jovens e número maior de fibras colágenas - **SCORE 3** (C). Tecido conjuntivo jovem com poucos vasos, menor número de fibroblastos e muitas fibras colágenas em feixes bem definidos - **SCORE 4** (D). Tecido conjuntivo com neoformação óssea em contato com as partículas - **SCORE 5** (E). MXP = Material Xenógeno Particulado.



TABELAS DOS RESULTADOS - Análise quantitativa das reações celulares e teciduais (nas superfícies e ao redor das partículas)

GRUPO A - CONTROLE (SEM IMPLANTAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO) / NA SUPERFÍCIE																						
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS										60 DIAS											
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1							∅	∅	∅								∅	∅				
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2							∅	∅	∅								∅	∅				
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3							∅	∅	∅								∅	∅				
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4							∅	∅	∅								∅	∅				
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5							∅	∅	∅								∅	∅				

GRUPO A - CONTROLE (SEM IMPLANTAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO) / AO REDOR																							
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS										60 DIAS												
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	
Critérios / Escores																							
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1							∅	∅	∅								∅	∅					
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2							∅	∅	∅								∅	∅					
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3	x		x		x		∅	x	∅	∅	12						∅	∅					
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4		x		x		x	∅				12	x	x	x	x	x	∅	x	∅	x	x	32	
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5							∅	∅	∅								∅	∅					

T = total; **GTCE** = Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI** = Tecido de Granulação Imatura; **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; **∅** = espécimes mortos no transcurso do experimento, ou excluídos por fazer parte de cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis.

QUADRO 02 Presença de fenômenos observados em defeitos ósseos produzidos em calvárias murinas sem a implantação de qualquer biomaterial, em 30 e 60 dias experimentais (GRUPO A – CONTROLE).





GRUPO B - BIO-OSS (NA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS)																						
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS											60 DIAS										
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1	x	x	x	x	x	x	x	x	∅	∅	8	x	x	∅	x	x	x	∅	x	∅	∅	6
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2									∅	∅				∅				∅		∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3									∅	∅				∅				∅		∅	∅	
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4									∅	∅				∅				∅		∅	∅	
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5									∅	∅				∅				∅		∅	∅	

GRUPO B - BIO-OSS (AO REDOR DAS PARTÍCULAS)																						
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS											60 DIAS										
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1									∅	∅				∅				∅		∅	∅	
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2									∅	∅				∅				∅		∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3		x	x				x		∅	∅	9	x		∅		x		∅		∅	∅	6
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4	x			x	x	x		x	∅	∅	20	x	∅	x		x	∅	x	∅	∅	∅	16
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5									∅	∅				∅				∅		∅	∅	

T = total; **GTCE** = Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI** = Tecido de Granulação Imatura; **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; **∅** = espécimes mortos no transcurso do experimento, ou excluídos por fazer parte de cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis.

QUADRO 03 Presença de fenômenos observados na **superfície** e **ao redor** das partículas de osso xenógeno *Bio-Oss* implantados em defeitos ósseos de calvárias murinas em 30 e 60 dias experimentais (GRUPO B - BIO-OSS).





GRUPO C - GEN-OX (NA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS)																						
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS											60 DIAS										
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1	∅	∅	x	x	x	∅		x		∅	5	x		∅	x	x	∅		x	∅	∅	4
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2	∅	∅				∅				∅				∅			∅			∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3	∅	∅				∅				∅				∅			∅			∅	∅	
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4	∅	∅				∅				∅				∅			∅			∅	∅	
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5	∅	∅				∅	x		x	∅	10	x	∅				∅	x		∅	∅	10

GRUPO C - GEN-OX (AO REDOR DAS PARTÍCULAS)																						
PERÍODOS EXPERIMENTAIS	30 DIAS											60 DIAS										
Espécimes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Critérios / Escores																						
Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1	∅	∅				∅				∅				∅			∅			∅	∅	
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2	∅	∅				∅				∅				∅			∅			∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3	∅	∅	x	x		∅				∅	6			∅			∅			∅	∅	
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4	∅	∅			x	∅		x		∅	8	x		∅	x		∅	x		∅	∅	12
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5	∅	∅				∅	x		x	∅	10	x	∅			x	∅		x	∅	∅	15

T = total; **GTCE** = Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI** = Tecido de Granulação Imatura; **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; **∅** = espécimes mortos no transcurso do experimento, ou excluídos por fazer parte de cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis.

QUADRO 04 Presença de fenômenos observados **na superfície** e **ao redor** das partículas de osso xenógeno *Gen-Ox* implantados em defeitos ósseos de calvárias murinas em 30 e 60 dias experimentais (GRUPO C – GEN-OX).



GRUPO D - BONEFILL (NA SUPERFÍCIE DAS PARTÍCULAS)																							
PERÍODOS EXPERIMENTAIS		30 DIAS										60 DIAS											
Espécimes	Critérios / Escores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
		Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅	∅	
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4			∅			x	∅		∅	∅	4				x	∅	∅	∅		∅	∅	4	
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5	x	x	∅	x	x		∅	x	∅	∅	25	x	x	x		∅	∅	∅	x	∅	∅	20	

GRUPO D - BONEFILL (AO REDOR DAS PARTÍCULAS)																							
PERÍODOS EXPERIMENTAIS		30 DIAS										60 DIAS											
Espécimes	Critérios / Escores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
		Granuloma do Tipo Corpo Estranho / (GTCE) - Escore 1			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅
Tecido de Granulação Imatura (TGI) - Escore 2			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅	∅	
Tecido de Granulação Maduro (TGM) - Escore 3			∅				∅		∅	∅							∅	∅	∅		∅	∅	
Tecido Conjuntivo Fib. Maduro (TCFM) - Escore 4			∅	x	x		∅		∅	∅	8						∅	∅	∅		∅	∅	
Tec. Conjunt. Fib. com neofor óssea / (TCFNO) - Escore 5	x	x	∅			x	∅		∅	∅	20	x	x	x	x	∅	∅	∅	x	∅	∅	25	

T = total; **GTCE** = Granuloma do Tipo Corpo Estranho; **TGI** = Tecido de Granulação Imatura; **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; **∅** = espécimes mortos no transcurso do experimento, ou excluídos por fazer parte de cortes teciduais microscópicos tecnicamente inviáveis.

QUADRO 05 Presença de fenômenos observados **na superfície** e **ao redor** das partículas de osso xenógeno *BoneFill* implantados em defeitos ósseos de calvárias murinas em 30 e 60 dias experimentais (GRUPO D – BONEFILL).



RESULTADOS DA ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

Os resultados serão apresentados de forma descritiva quanto à presença e ausência de estruturas e componentes teciduais reacionais na interface ou ao redor das partículas do material implantado nos defeitos ósseos na calvária de ratos.

Grupo Experimental A ou Controle aos 30 dias (Figuras 12 e 13)

Na área do defeito ósseo, o Grupo Controle revelou a substituição do tecido ósseo por uma fina membrana de tecido fibroso, bem colagenizada, com feixes paralelos à superfície. Nas margens, em uma pequena faixa, o tecido ósseo se neoformou com padrão primário ou imaturo, também conhecido como osso embrionário. O tecido fibroso membranoso que se formou no defeito continuava-se naturalmente com a margem óssea e com o periósteo sobrejacente.

O tecido ósseo imaturo já revelava, aos 30 dias, um recobrimento com o periósteo, em continuidade com a área vizinha, assim como uma substituição focal por osso maduro com formação de novos sistemas de Havers. Neste tecido ósseo embrionário, os osteócitos estão presentes em grande número e interligados por evidentes canalículos e prolongamentos citoplasmáticos. Periféricamente ao novo osso, no tecido conjuntivo membranoso neoformado, destaca-se a ausência de infiltrado inflamatório, quer seja mono ou polimorfonuclear.

Nas margens cirúrgicas do defeito ósseo, a superfície mostrou neoformação óssea exuberante, caracterizando uma periostite ossificante.

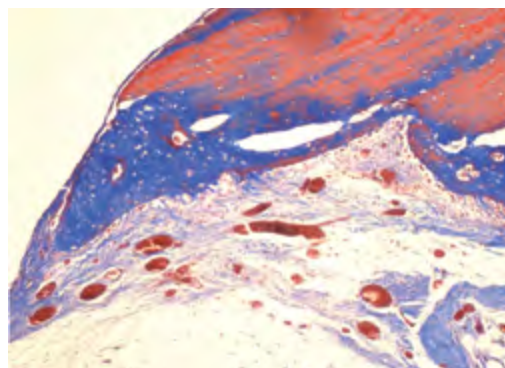


FIG.12 Neoformação óssea periférica no grupo controle. Em azul, destaca-se o osso imaturo, embrionário ou primário aos 30 dias (Tricrômico de Masson, 10X).

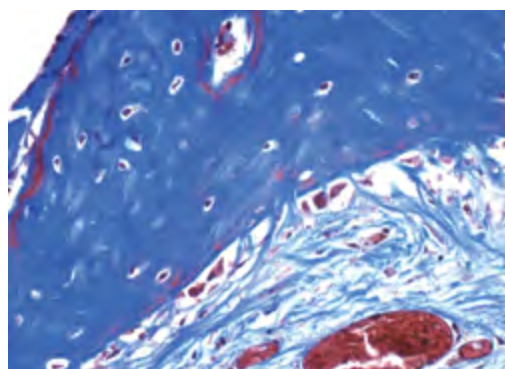


FIG.13 Maior aumento de uma das áreas da figura anterior (Tricrômico de Masson, 40X).





Grupo Experimental A ou Controle aos 60 dias (Figuras 14 e 15)

Aos 60 dias, aproximadamente um terço do defeito ósseo estava recoberto por uma lingueta de tecido ósseo neoformado apresentando inclusive discretos sistemas de Havers. Este tecido ósseo era regularmente distribuído quanto à sua espessura e organização; contrastava com o osso original pela sua rica celularidade. Na parte ainda recoberta pelo tecido ósseo, o defeito estava preenchido por um tecido conjuntivo fibroso, livre de inflamação, com seus feixes colágenos bem organizados em fascículos.

Grupo Experimental B ou *Bio-Oss*[®] aos 30 dias (Figuras 16 e 17)

As partículas identificáveis do material caracterizavam-se por uma textura finamente granular e basofílica, que aos cortes executados pela lâmina do micrótomo enrugava-se e assumia um aspecto periquimatoso. Elas se apresentavam com contorno poliédrico e/ou ovoide, sem formar ângulos retos.

Nas margens do defeito ósseo a neoformação óssea é menor do que no grupo controle, muito embora houvesse uma mínima formação na maior parte dos espécimes. No entanto, em alguns deles, a neoformação óssea nas margens do defeito foi insignificante.

Em lugar da membrana de tecido conjuntivo fibroso que recobria o defeito ósseo no grupo controle, observaram-se as partículas do *Bio-Oss*. Entre estas partículas havia tecido conjuntivo frouxo e desorganizado, com fibras colágenas aleatoriamente distribuídas. Periféricamente ao material inserido no defeito ósseo, em sua parte mais externa, notava-se tecido conjuntivo fibroso bem organizado e membranoso.

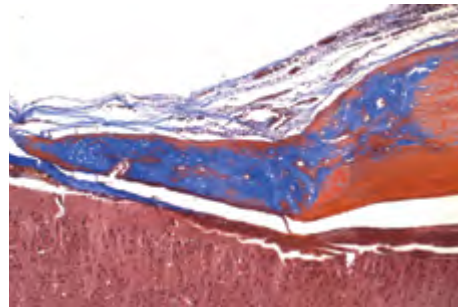


FIG.14 Neoformação óssea em forma de lingueta no grupo controle aos 60 dias (Tricrômico de Masson, 10X).

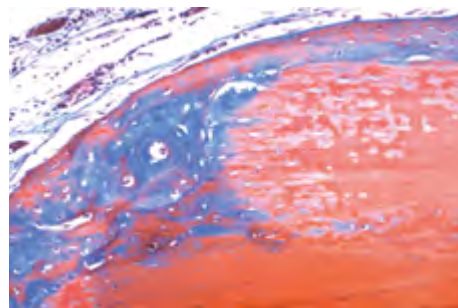


FIG.15 Maior aumento de uma das áreas da figura anterior (Tricrômico de Masson, 40X).

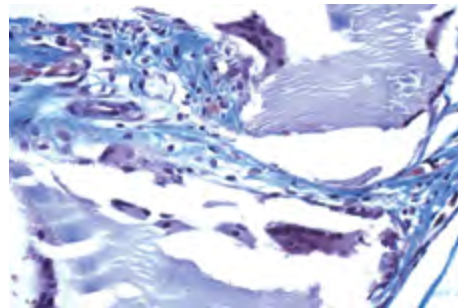


FIG.16 Reação tecidual na superfície das partículas de *Bio-Oss* após 30 dias (Tricrômico de Masson, 40X).

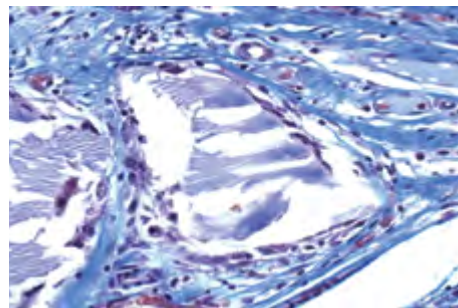


FIG.17 Reação tecidual na superfície das partículas de *Bio-Oss* após 30 dias. Observa-se o tecido de granulação maduro ao redor/periferia das reações da interface (Tricrômico de Masson, 40X).



As partículas do *Bio-Oss* estavam constituídas por estruturas ósseas como lamelas do tipo cortical óssea, assim como sistema de Havers. Nestas partículas, notava-se ainda osteoplastos vazios. A superfície destas partículas e o seu contorno são irregulares. Ao redor de cada grânulo do *Bio-Oss* nota-se a concentração de macrófagos e células gigantes multinucleadas e inflamatórias, circundadas no todo por fibras colágenas delicadas, circunscrevendo este acúmulo celular na periferia das partículas. Esta organização ao redor das partículas do *Bio-Oss* caracteriza os granulomas inflamatórios do tipo corpo estranho.

Entre as partículas do *Bio-Oss*, à distância ou na interface de sua superfície não foi detectada atividade osteogênica, mesmo que incipiente. Eventualmente, nos tecidos peri e inter partículas, o conjuntivo revelou presença de células inflamatórias polimorfonucleares difusamente distribuídas, sem áreas de abscedação.

Pode-se afirmar pelos fenômenos observados que o defeito ósseo foi preenchido pelo material sem que tenha havido formação óssea no defeito experimentalmente obtido.

Grupo Experimental B ou *Bio-Oss*® aos 60 dias (Figuras 18 e 19)

Aos 60 dias as partículas de *Bio-Oss* apresentam sinais de morfologia óssea como osteoplastos e estrutura lamelar tipo deposição.

Na periferia destas partículas predominam na interface o acúmulo de macrófagos e células gigantes multinucleadas constituindo granulomas tipo corpo estranho. Na periferia dos fragmentos o tecido conjuntivo capsular se apresenta bem constituído. Em dois dos dez espécimes examinados algumas raras partículas apresentavam-se associadas, indiretamente, com áreas de neoformação óssea, mas não na interface de forma direta, e assim mesmo na região mais periférica do defeito ósseo.

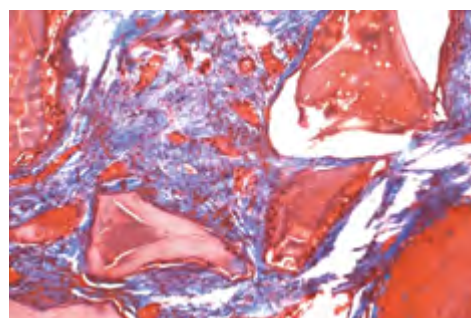


FIG.18 Reação tecidual na superfície das partículas e no seu intermeio após 30 dias de implantação do *Bio-Oss* (Tricrômico de Masson, 4X).

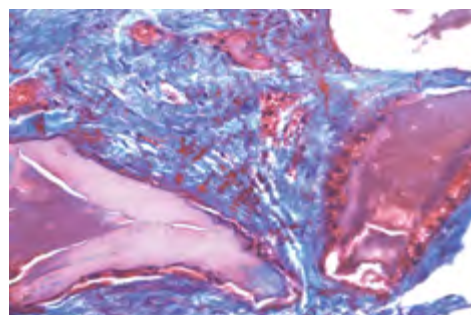


FIG.19 Reação tecidual na superfície e ao redor de partículas de *Bio-Oss* após 60 dias (Tricrômico de Masson, 40X).





Grupo Experimental C ou *GenOx*[®] ao 30 dias (Figuras 20 e 21)

Tal como nas partículas de *Bio-Oss*, as partículas identificáveis do material *GenOx* caracterizavam-se por uma matriz finamente granular e basofílica, que aos cortes produzidos pela lâmina do micrótomo enrugava-se e assumia um aspecto periquimatoso. Elas se apresentavam com contorno poliédrico e/ou ovoide, sem formar ângulos retos.

Aos 30 dias, na margem lateral do defeito ósseo cirúrgico, notou-se osteogênese com grande quantidade de osso ricamente celularizado, caracterizando uma periostite ossificante reacional periférica. No centro do defeito cirúrgico as partículas do material estavam presentes, circundadas por tecido fibroso. Na interface com o material, notaram-se células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, assim como macrófagos. Eventualmente se observou neoformação óssea em alguns raros pontos sobre suas partículas. O osso neoformado intercalava-se com uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho. Não foram observados sinais morfológicos significantes nas porções centrais do defeito. Morfologicamente a osteocondução incipiente nas margens periféricas sugere mais o fenômeno osteogênico reacional do que adaptativo à presença das partículas do material analisado. Comparativamente, este fenômeno osteogênico periférico não estava presente no mesmo período experimental do *Bio-Oss*.

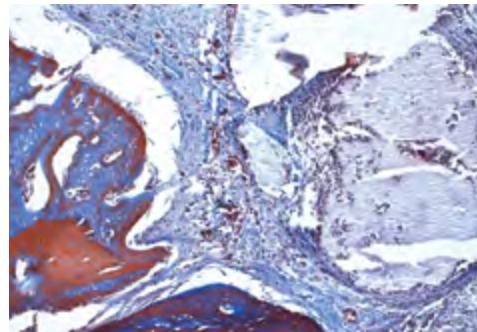


FIG.20 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *GenOx* após 30 dias (Tricrômico de Masson, 25X).

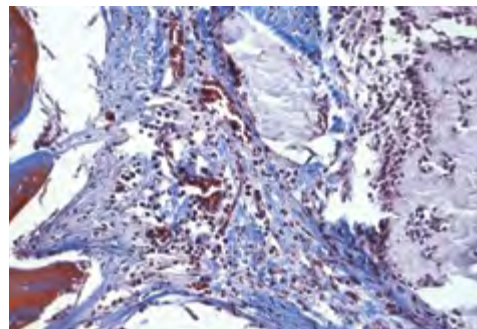


FIG.21 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *GenOx* após 30 dias em aumento maior da figura anterior (Tricrômico de Masson, 25X).





Grupo Experimental C ou *GenOx*[®] ao 60 dias (Figuras 22 e 23)

Neste período experimental, não foram detectadas diferenças morfológicas significantes no padrão reacional e reparatório comparativamente ao período experimental de 30 dias realizado com o mesmo material. Eventualmente, em alguns pontos de algumas partículas do material notaram-se pontos de osteogênese na interface. Na maioria das partículas, as mesmas eram circunscritas por macrófagos, células gigantes multinucleadas inflamatórias e, mais periféricamente, tecido conjuntivo fibroso com organização capsular. Na margem do defeito cirúrgico o padrão reacional osteogênico foi o mesmo observado aos 30 dias. As partículas do material com pontos osteogênicos estavam localizadas na periferia do defeito ósseo.

Grupo Experimental D ou *BoneFill* aos 30 dias (Figuras 24 e 25)

As partículas do material se apresentavam como fragmentos ósseos carcomidos, com osteoplastos, canais de sistemas de Havers e de tamanhos uniformes de formatos heterogêneos. Em sua maioria eram poliédricos e havia formação de ângulos retos em seus contornos. As lamelas de deposição óssea e os canais de Volkman também eram identificados com facilidade. Os espaços dentro dos fragmentos se apresentavam, neste período, colonizados por células de morfologia fibroblástica e fibras colágenas tal qual o tecido circundante a estes fragmentos. Neste período experimental observaram-se lacunas de Howship e clastos, indicando remodelação.

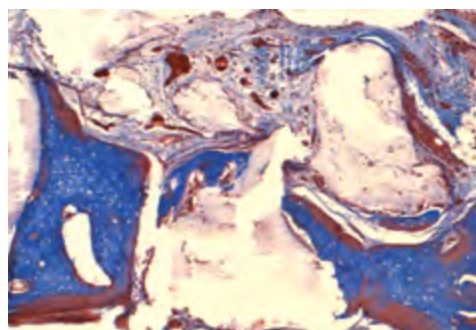


FIG. 22 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *GenOx* após 60 dias (Tricrômico de Masson, 25X).

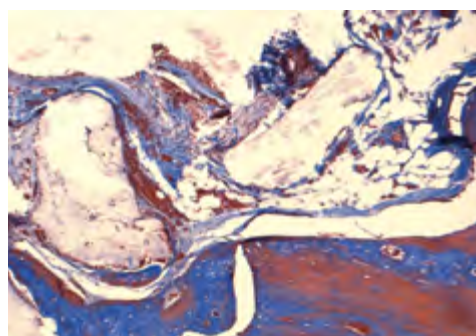


FIG. 23 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *GenOx* após 60 dias (Tricrômico de Masson, 40X).

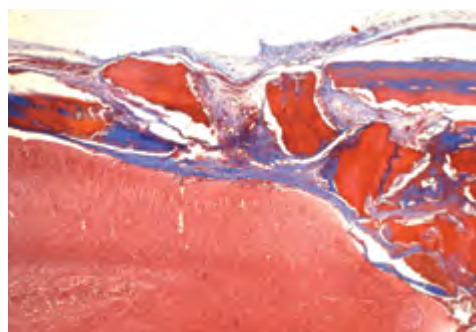


FIG. 24 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *BoneFill* após 30 dias (Tricrômico de Masson, 25X).

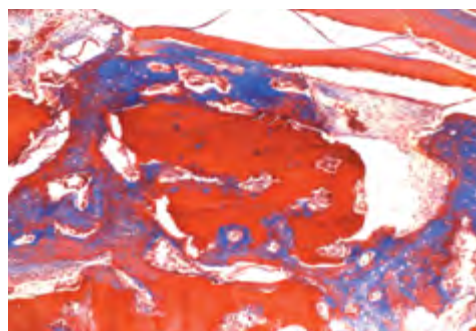


FIG. 25 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *Bonefill* após 30 dias (Tricrômico de Masson, 25X).



Aos 30 dias as partículas do material se apresentavam em continuidade pontual com o osso neoformado, ricamente celularizado, depositado no tecido conjuntivo circundante. Havia uma nítida diferenciação visto que o osso das partículas do material era do tipo maduro, enquanto que no osso neoformado era do tipo primário ou imaturo.

Destaca-se a presença de múltiplas unidades osteorremodeladoras ou BMUs em áreas nas quais o tecido ósseo neoformado se misturava com as partículas do *Bonefill*. Esta neoformação óssea inter e intra partículas, por vezes, se continuava com as margens do defeito ósseo.

Grupo Experimental D ou *BoneFill* aos 60 dias (Figuras 26 e 27)

Neste período experimental, em aproximadamente metade dos fragmentos identificáveis nos cortes teciduais havia neoformação óssea na superfície e/ou nos espaços das partículas do material. Essas partículas, associadas à osteogênese, estavam mais próximas da margem do defeito ósseo, embora muitas delas próximas ao centro do defeito. As partículas sem associação direta com a osteogênese e ainda circundadas por tecido conjuntivo fibroso eram mais comumente observadas na porção central do defeito cirúrgico. A extensão das áreas constituídas por osso neoformado era consideravelmente maior do que aos 30 dias.

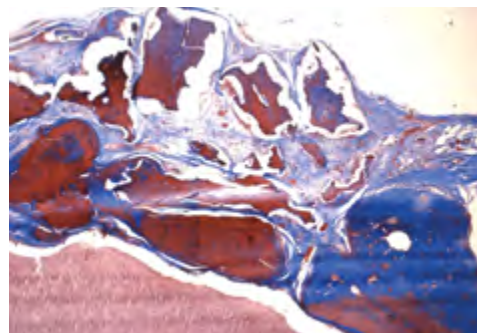


FIG.26 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *Bonefill* após 60 dias (Tricrômico de Masson, 25X).

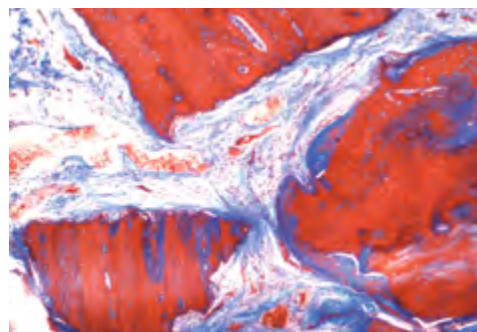


FIG.27 Reação tecidual na superfície e no intermeio das partículas de *Bonefill* após 60 dias em aumento maior da figura anterior (Tricrômico de Masson, 25X).



ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos dados totalizados e contextualizados foi aplicado o teste estatístico *Shapiro Wilk* para análise da normalidade dos resultados. Posteriormente, aplicaram-se os testes estatísticos de *Kruskal-Wallis* e, para a verificação das possíveis diferenças intergrupos e tempos experimentais, o teste de *Dunn*.

Para cada grupo e tempo experimental elaborou-se uma descrição do quadro microscópico encontrado no qual se procurou caracterizar o padrão morfológico reacional ou reparatório. Embora se procurasse uma caracterização de cada grupo e tempo experimental, em cada uma destas descrições destacou-se, especificamente, algum detalhe encontrado em apenas um dos espécimes, desde que não fosse considerado artefato de técnica. As características morfológicas das partículas do ponto de vista do microscópio óptico também foram descritas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODO DE AVALIAÇÃO	
	30 Dias (Média ± Desvio Padrão)	60 Dias (Média ± Desvio Padrão)
Grupo <i>Bio-Oss</i>	1.00 ± 0.00 (A)	1.00 ± 0.00 (A)
Grupo <i>Genox</i>	1.89 ± 1.76 (A)	2.33 ± 2.00 (A)
Grupo <i>BoneFill</i>	4.88 ± 0.354 (B)	4.88 ± 0.354 (B)

QUADRO 06 Valores das médias e desvio padrão dos escores nos períodos de avaliação de 30 e 60 dias **na superfície** das partículas do material.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODO DE AVALIAÇÃO	
	30 Dias (Média ± Desvio Padrão)	60 Dias (Média ± Desvio Padrão)
Grupo Controle	3.50 ± 0.535 (A)	4.00 ± 0.00 (A)
Grupo <i>Bio-Oss</i>	3.63 ± 0.518 (A)	3.75 ± 0.463 (A)
Grupo <i>Genox</i>	3.89 ± 0.782 (A)	4.33 ± 0.500 (B)
Grupo <i>Bone-Fill</i>	4.63 ± 0.518 (B)	5.00 ± 0.00 (C)

QUADRO 07 Valores das médias e desvio padrão dos escores nos períodos de avaliação de 30 e 60 dias **ao redor** das partículas do material.





GRÁFICOS REPRESENTATIVOS - REAÇÕES TECIDUAIS NA SUPERFÍCIE E AO REDOR DAS PARTÍCULAS DOS MATERIAIS TESTADOS

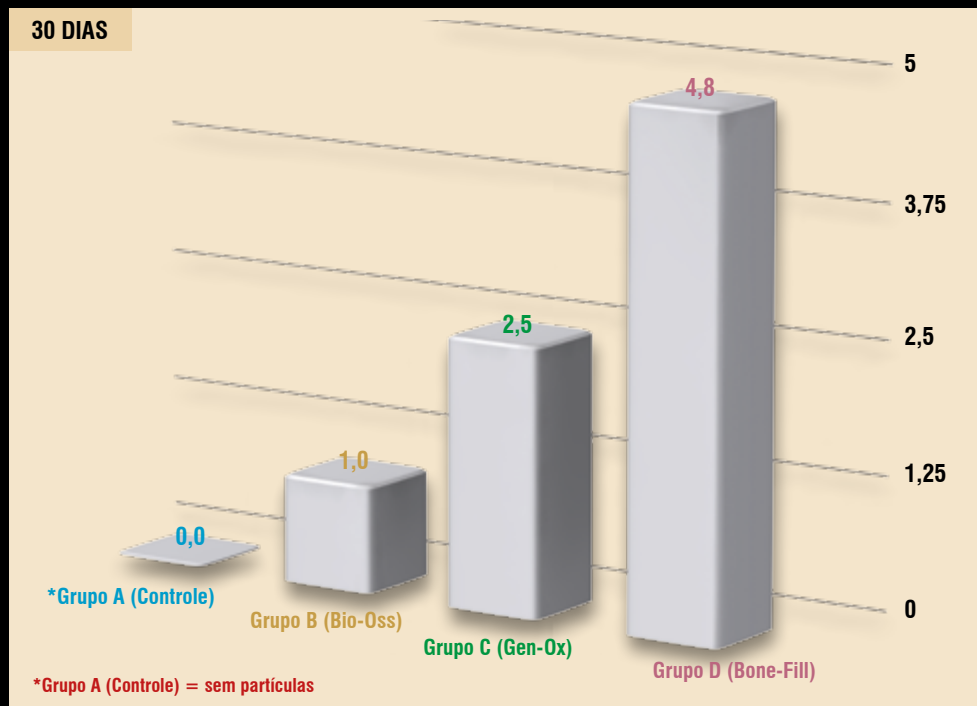


GRÁFICO 01 Resultados obtidos na superfície das partículas dos materiais testados / Histograma / 30 dias.

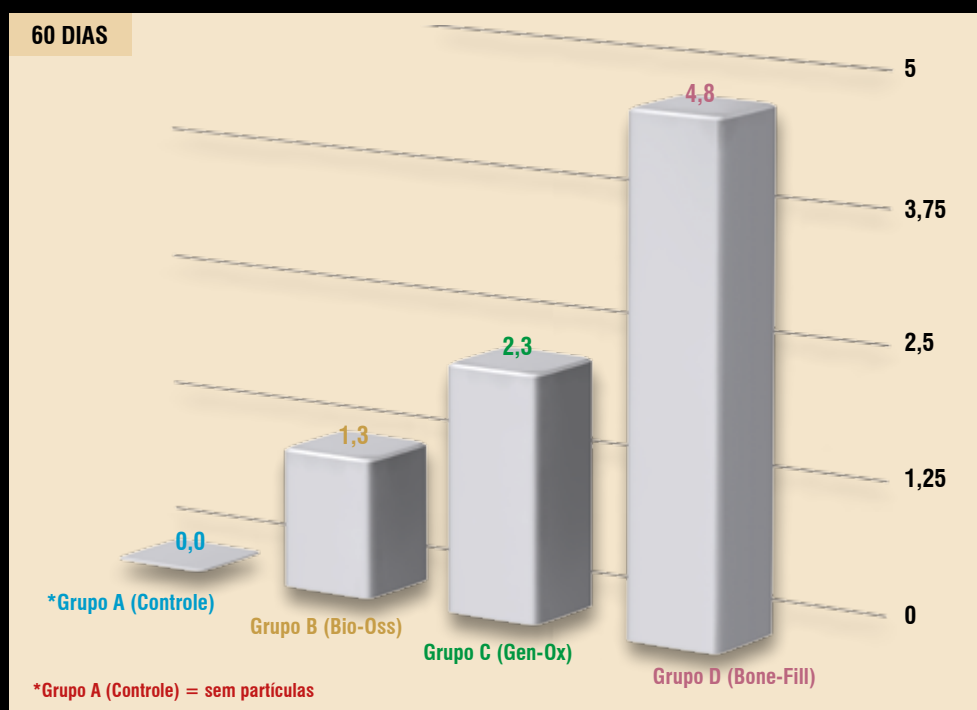


GRÁFICO 02 Resultados obtidos na superfície das partículas dos materiais testados / Histograma / 60 dias.



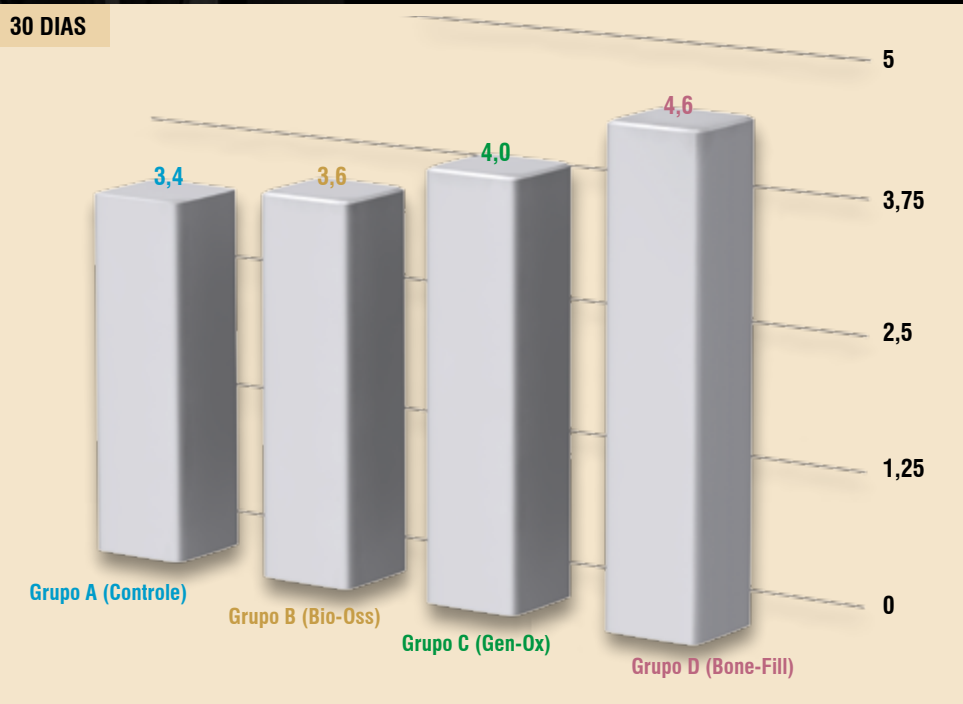


GRÁFICO 03 Resultados obtidos ao redor das partículas dos materiais testados / Histograma / 30 dias.

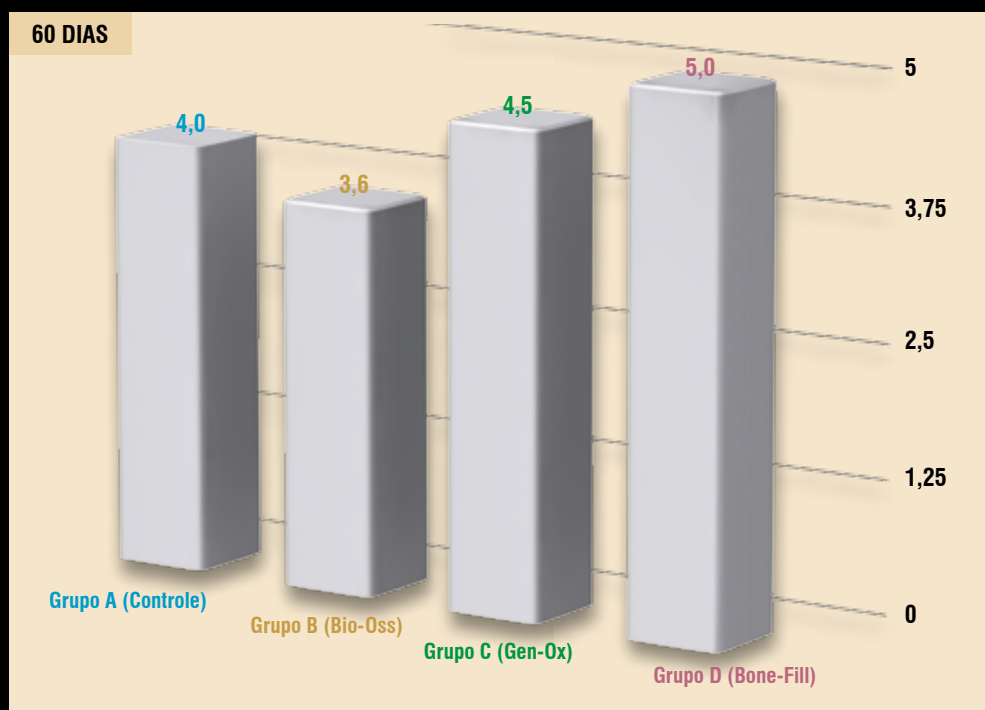


GRÁFICO 04 Resultados obtidos ao redor das partículas dos materiais testados / Histograma / 60 dias.





DISCUSSÃO

Depois da cirurgia óssea, o coágulo sanguíneo deve preencher a cavidade pois a rede de fibrina serve como uma matriz de ancoragem para que as células vizinhas estimuladas a proliferar invadam e colonizem o espaço a ser reparado por um novo tecido. Os mediadores inflamatórios, derivados principalmente das plaquetas e dos macrófagos depois que o agressor foi controlado ou eliminado, estimulam a proliferação, diferenciação, migração e síntese celular. O reparo ósseo teve o seu início: a colonização da rede de fibrina representa um dos primeiros fenômenos para compor o tecido de granulação que evoluirá para um novo tecido maduro na área.

As primeiras células estimuladas a proliferarem e migrarem para o local são as endoteliais ou angioblásticas e que, em forma de brotos nas paredes dos vasos vizinhos, formam uma trama de novos vasos por entre a rede de fibrina. Esta angiogênese permite uma fonte rica e extensa de nutrição para as novas células que irão chegar para refazer o tecido destruído. Uma vez ancoradas na fibrina e nutridas pelos novos vasos formados, as células migrantes iniciam a síntese de uma matriz bem organizada para restabelecer as funções do tecido conjuntivo que foi destruído na área.

Se as células que colonizam o coágulo forem de origem e natureza fibroblástica, produzirão uma matriz fibrosa colagênica e formarão um tecido conjuntivo fibroso. Caso as células colonizadoras sejam células de linhagem osteoblástica, derivadas do periósteo e endósteo adjacentes, teremos a síntese de matriz colagênica óssea, com formação de trabéculas mineralizadas de osso primário ou imaturo, que depois serão reabsorvidas e substituídas por osso secundário ou maduro, integrando-se aos tecidos duros vizinhos da região.

Ao se colocar partículas de material ou biomaterial no coágulo sanguíneo, estamos procurando ajudar na ancoragem da rede de fibrina para que não ocorra a retração do coágulo. Esta retração diminui a área da matriz a ser colonizada pelas células vizinhas, com grande possibilidade de reduzir-se o nível ósseo superficial a ser restabelecido pelo reparo. A essência das indicações de biomaterial em cirurgias ósseas está representada pelo aumento de ancoragem da rede de fibrina, a matriz primária a ser utilizada como arcabouço para a reconstrução tecidual.



Na superfície ou interface das partículas do material implantado podem acontecer os seguintes eventos celulares e teciduais

1º) O coágulo e sua rede fibrina podem se fixar na superfície das partículas e deixar os neutrófilos interagirem com as moléculas do material. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos que chegam, em grande número, em qualquer agressão e decorrente inflamação. Como estas células são especializadas em interagirem quase que exclusivamente com bactérias, em poucas horas migram do local, se não as encontrarem. Gradativamente, ao longo das horas, serão substituídas por macrófagos com capacidade para interagir com quase todos os produtos que adentram o organismo, daí a sua denominação.

Na superfície dos biomateriais implantados os macrófagos podem interagir e se fixarem na superfície ou interface na tentativa de fagocitar ou reabsorver, mas em geral não têm sucesso em tais produtos. A grande maioria dos materiais não são fagocitáveis ou reabsorvíveis pelos macrófagos ou pelas células gigantes multinucleadas inflamatórias. Estas células gigantes são formadas pela fusão de membranas de macrófagos jovens e velhos, em uma tentativa de prolongar sua vida celular: são os macrófagos multinucleados. Estas células são estruturalmente diferentes dos clastos, muito embora tenham origem na mesma linhagem de células macrófágicas. No entanto, não se tem relatos ou evidências dessas células darem origem a clastos em qualquer situação tecidual.

Não conseguindo fagocitar ou reabsorver, os macrófagos, que naturalmente têm vida longa, não migram e persistem indefinidamente ao redor da partícula do material implantado. Ao longo de dias e semanas, e depois que morrem, são substituídos naturalmente por novos macrófagos do sangue para o local. Ao tentar fagocitar as partículas do material, os macrófagos liberam mediadores que estimulam a fibroplasia, ou formação de fibras colágenas, pelos fibroblastos vizinhos, para criar uma circunscrição periférica e assim isolar o processo do resto do organismo.

Este tipo de organização dos macrófagos e das células derivadas ao redor de algo que não conseguem eliminar e persistem chama-se granuloma do tipo corpo estranho. Os corpos estranhos são materiais “estranhos” ao nosso organismo mas que, por não apresentarem proteínas estranhas conhecidas como antígenos em sua composição, não induzem resposta imunológica, promovendo unicamente





respostas inflamatórias inespecíficas como os tais granulomas que assim permanecem indefinidamente. Se os produtos particulados também apresentassem proteínas estranhas seriam considerados antigênicos e induziriam granulomas imunogênicos; entre os biomateriais não se conhecem produtos com características imunogênicas determinantes.

2º) Uma segunda situação que pode ocorrer na superfície das partículas dos biomateriais implantados difere muito da primeira. A superfície do material particulado, após interagir com a fibrina e outros componentes do coágulo sanguíneo, pode ser povoada rapidamente por neutrófilos e macrófagos. Mas, como estas células não reconhecem nenhum grau de estranheza no material, abandonam e migram das superfícies, deixando-as para serem colonizadas por fibroblastos do tecido de granulação em formação ao seu redor. Depois de alguns dias, na superfície das partículas dos biomateriais, pode se formar um tecido conjuntivo fibroso jovem e maduro, sem a formação de granulomas, e em íntimo contato com estas superfícies.

3º) Em geral, o reparo com biomateriais representa um processo em um ambiente ósseo, o coágulo e sua rede fibrina, que tendem a ser colonizados por células de linhagem osteoblástica do endóstio e/ou do perióstio. Após a rápida colonização por neutrófilos e macrófagos, já que não há nenhum grau de estranheza no material, abandonam e migram das superfícies das partículas, e o tecido de granulação jovem e maduro cede lugar nestas superfícies aos osteoblastos que iniciam o depósito de matriz extracelular óssea a ser mineralizada. Nestes casos, teremos neoformação óssea na interface ou superfície do biomaterial.

Um dos pontos mais importantes está em descobrir se as características físicas e químicas do biomaterial determinam, ou se induzem à formação de granulomas, tecido de granulação, tecido conjuntivo e/ou tecido ósseo na sua superfície quando implantado em lojas ósseas cirúrgicas. Quais seriam as razões para alguns materiais permitirem a colonização de suas superfícies por fibroblastos, mas não por osteoblastos? Será que esta diferenciação celular é induzida pelo material utilizado? Será importante inferir que o tamanho e a forma tridimensional destas partículas podem ser fatores determinantes para a possibilidade ou não de neoformação óssea nas superfícies de cada grânulo do material enxertado? As explicações devem passar por características físicas e químicas destes produtos.



Após a formação de tecido ósseo na superfície do biomaterial, as células ósseas que realizam e estimulam a remodelação constante deste tecido mineral tendem a fazer o mesmo com o material implantado. Em alguns casos, como nas partículas de osso autógeno, estas células têm competência para promover a remodelação óssea conjuntamente e envolver o material ao longo de alguns meses depois, devolvendo a normalidade óssea à região. Em alguns outros materiais as células ósseas não conseguem fagocitar ou reabsorver o produto, e a remodelação se limita aos componentes ósseos que estão em sua superfície ou interface, e ao seu redor.

Mesmo considerando o fato de serem biomateriais naturais e minerais de uma mesma origem, a xenógena, admitindo ainda processos distintos de fabricação, ao analisarmos as partículas de cada material testado neste trabalho (Figuras 23-25), sob luz polarizada de microscopia ótica, com 10 vezes de aumento, houve nítida diferença entre as partículas de *Bio-Oss*, *GenOx* e *Bonefill*, quanto à forma, ao contorno, à superfície e à textura. Nesta avaliação, os tamanhos das partículas (granulometria) de cada produto e comparativamente entre eles não foram relevados pelo fato de corresponderem, aproximadamente, àqueles indicados nos rótulos das respectivas embalagens.

Observou-se, nos grânulos de *Bio-Oss* e *GenOx* contornos irregulares, pontiagudos ou serrilhados, superfícies com texturas aparentemente mais porosas e escamosas. Ao serem colocados sobre lamínulas destinadas ao exame microscópico, verificou-se que os grânulos não se agrupavam casualmente em superposições aleatórias que sugerissem boa acomodação ou adaptação entre si.

O material *Bonefill* apresentou grânulos com contornos arredondados, regulares e superfícies aparentemente mais lisas, com encaixes aleatórios inter partículas mais harmoniosos e coordenados.

A possibilidade de haver ou não interferência como componente facilitador do processo biológico de remodelação óssea, decorrente de encaixes casuais e formatos anatômicos destas partículas quando enxertadas em defeitos ósseos para, na sequência, serem permeadas completamente pelo coágulo sanguíneo e funcionarem como importante agente de ancoragem para a rede de fibrina, é uma hipótese que não deve ser descartada. Ao final deste experimento, os resultados demonstraram um melhor desempenho do biomaterial *Bonefill* no quesito neoformação óssea na superfície e ao redor das partículas.





Na periferia das reações teciduais ou ao redor das partículas do material podem acontecer os seguintes eventos

Ao redor ou na periferia da reação tecidual que ocorre no intermeio das partículas dos biomateriais implantados o coágulo sanguíneo vai inicialmente preencher o espaço com fibrina a ser colonizado, quase que imediatamente, por neutrófilos. Ao não encontrar bactérias para interagir, os neutrófilos, em poucas horas, migram do local e deixam este e as funções para os macrófagos e para as plaquetas liberarem grandes quantidades e variedades de mediadores para estimular a migração, diferenciação, proliferação e síntese celular das células vizinhas como as endoteliais, as indiferenciadas e os osteoblastos, atraindo-as por quimiotaxia.

Neste espaço do coágulo e tecido de granulação jovem, os macrófagos e vasos sanguíneos do tecido de granulação logo serão substituídos por:

1º) células de linhagem fibroblástica para dar origem a um tecido conjuntivo fibroso sem qualquer nível de neoformação óssea;

2º) mais frequentemente, o local seria invadido por células de linhagem osteoblástica, visto que a cavidade promove um ambiente ósseo isolado pelo periósteo sobrejacente, com neoformação óssea por entre as partículas, mas não necessariamente em sua superfície ou interface.

A presença de neoformação óssea por entre os granulomas e/ou tecido conjuntivo localizado nas superfícies das partículas dos biomateriais indica diferença de comportamento nas induções de reações teciduais desses biomateriais e nos leva a questionamentos como:

1. Quais seriam os fenômenos químicos e físicos que induziriam à osteogênese ao redor ou na periferia das partículas em alguns materiais e não em outros?
2. O processo de osteogênese decorreria da qualidade das margens ósseas que seriam responsáveis pela migração de fibroblastos ou de osteoblastos?
3. Ou seria decorrente de fatores ou mediadores ou condições específicas intrínsecas ao biomaterial?



4. A composição química e os produtos liberados por estas partículas poderiam ser um destes fatores? Mas como ocorreria apenas uma indução à distância?

5. Se promovem neoformação óssea na periferia ou ao redor de suas partículas, por que não induzem neoformação óssea diretamente sobre a sua própria superfície, como ocorre em alguns casos?

6. Por que na superfície e ao redor de uma mesma partícula de um mesmo biomaterial podem ser observados granulomas do tipo corpo estranho, tecido conjuntivo fibroso e neoformação óssea? Seria falta de homogeneidade relacionada com a forma, com o tamanho, com a textura e superfície no processo de granulação do material?

Para a evolução de boa parte dos procedimentos que incluem o uso dos biomateriais, o melhor seria que houvesse formação óssea nas superfícies das partículas, assim como por entre elas, ou seja, ao seu redor, perifericamente, ou no seu intermeio. Melhor ainda seria que, no natural e progressivo curso de remodelação óssea, as partículas dos biomateriais fossem normalmente incluídas no processo ao longo dos meses.

Proposta de critérios e parâmetros de análise das reações teciduais frente aos biomateriais particulados

Em muitos trabalhos investigativos há uma dificuldade em se estabelecer parâmetros mensurativos das reações teciduais frente aos biomateriais implantados. Neste estudo propõe-se dividir as análises da toxicidade celular e tecidual do produto, a capacidade de irritabilidade dos tecidos e a capacidade indutiva e favorecedora de um reparo tecidual em dois distintos critérios:

1^a) Análise das reações teciduais nas superfícies diretas das partículas do biomaterial implantado e;

2^a) Análise das reações teciduais ao redor, no entorno, nos intermeios, na periferia das partículas ou à distância do produto.





Avaliar o que a formação de granuloma do tipo corpo estranho ou tecido conjuntivo fibroso e/ou ósseo nas superfícies das partículas poderá indicar: os tecidos aceitam passivamente o produto e são ativados por ele, ou o organismo está indicando, com a presença de granulomas do tipo corpo estranho, que o produto está exercendo um certo grau de irritabilidade tecidual.

Ao mesmo tempo, determinar se a neoformação de tecido conjuntivo fibroso ou ósseo ao redor ou na periferia da reação tecidual da superfície indica que, pelo menos à distância, o material não oferece irritabilidade. Caso o tecido de granulação jovem e imaturo não evolua e persista neste grau incipiente de evolução, sem dar origem a um tecido conjuntivo maduro ou ósseo, pode indicar uma maior toxicidade do material.

Assim, sugerimos que as análises ou avaliações da aceitação dos biomateriais pelos tecidos seguissem os parâmetros estipulados em 5 escores crescentes, partindo de uma maior irritabilidade e imaturidade reacional para uma recomposição tecidual mais próxima da normalidade.

A formação de granuloma tipo corpo estranho representa um resultado inflamatório indicativo de “agressividade” do material, sem resposta imunológica. Uma reação inespecífica indicadora de agressão tecidual. Por isto, seu escore é o mais baixo, ou seja, **um (1)**. Se **na superfície** ou **ao redor** tem algum tecido de granulação, pelo menos é um indicador de evolução para um reparo, ainda que seja às custas de tecido conjuntivo fibroso jovem, mas que seria ideal em uma neoformação óssea.

A neoformação óssea apenas ao redor do material, longe da superfície também pode ser interessante; entretanto, na presença do granuloma do tipo corpo estranho, isto se perpetua e não teremos retorno à normalidade a não ser que os macrófagos e as células gigantes multinucleadas inflamatórias consigam fagocitar/reabsorver as partículas do material lenta e progressivamente, deixando espaço para que um tecido de granulação forme tecido conjuntivo fibroso, que evoluirá para uma ossificação, atingindo-se no transcurso do tempo o padrão de **Escore 5**.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os critérios e parâmetros sugeridos para este estudo analisam e quantificam, microscopicamente, o tipo de organização celular e tecidual na superfície e ao redor das partículas de cada um dos três materiais xenógenos particulados utilizados (*Bio-Oss*[®], *GenOx Inorg*[®] e *Bonefill*[®]).
- Esta quantificação mensura o grau de **irritabilidade** ou **toxidade**, **aceitação** ou **biocompatibilidade** dos materiais particulados implantados em cavidades ósseas, atribuindo-lhes escores numéricos progressivos em distintas fases do reparo ósseo, que auxiliam a estabelecer parâmetros comparativos de desempenho entre os materiais testados.
- Estes critérios poderão ser estendidos e aplicados na utilização de qualquer outro tipo de material destinado ao enxerto ósseo onde, por meio de análise microscópica, é permitido avaliar a formação de tecido de granulação e de granulomas **nas superfícies** das partículas e **ao redor** das mesmas, desde que o **mesmo protocolo proposto de escores numéricos** (de **1** a **5**) neste experimento seja utilizado.
- Neste estudo, o grupo experimental que utilizou o material particulado xenógeno *Bonefill* apresentou maiores escores, apontando melhor desempenho osteogênico e de biocompatibilidade, do que os dois outros materiais testados, *Bio-Oss* e *GenOx*, tanto no que se refere às reações celulares e teciduais na superfície, quanto ao redor das partículas, em ambos os períodos de avaliação (30 e 60 dias).





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Block, M.S.; Finger, I.; Lytle, R. Human mineralized bone in extraction sites before implant placement: Preliminary results. *JADA*, v. 133, p. 1631-1638, 2002.
2. Bogliolo, M. C. et al. *Patologia Básica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
3. Bosh, C.; Melsen, B.; Vargervik, K. Importance of the critical-size bone defects in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*.v.9, p. 310-316,1998.
4. Bosh, C.; Melsen, B.; Vargervik, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membrane. *Cleft Palate Craniofac J*. v. 32, p. 311-317, 1995.
5. Boyan, B.D.; Ranly, D.M.; McMillan, J. et al. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol.*, v. 77, p.1555-1563, 2006.
6. Callan, D. P. Rohrer, M.D. Use of hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report. *J Periodontology*, v. 64, n. 6, p.575-582, 1993.
7. Carvalho, P.S.P.; Bassia, A.P.F.; Violin, L.A. " Revisão e Proposta de nomenclatura para os biomateriais". *Implant News*. v.1, n. 3, p.255-259, 2004.
8. Consolaro, A.; *Inflamação e Reparo: Um silabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas*. Dental Press, Maringá, 2009.
9. Consolaro, A.; Leahy, F.M.; *Tecido de granulação e granuloma: dois termos com significados muitos diferentes*. *Dental Press Implantology*, 2011 Oct-Dec; 5(4): 16-22.
10. Costa, O.R.; Veinstein, F.J.; *Injertos oseos em regeneración periodontal*. *Rev Asoc Odont Argent*. 1994;82(2):117-25.
11. Dahlin, C.; Alberius, P.; Linde, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrande technique. *J Neurosurg*. v. 74, p. 487-491, 1991.
12. Dalapícola, S.S. *Caracterização físico química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena*. Duque de Caxias, 2007. 103p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Grande Rio. Rio de Janeiro.
13. Figueiredo, A.S. *Estudo morfológico comparative entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo bovino autógeno, em coelhos*. Dissertação (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2000, 75p.



14. Gatti, A.M.; Monari, E.; Poli, G. et al. Clinical Long-term evaluation of hydroxyapatite granules implantation in Periodontal Defects. *Key Engineering Materials*, 2002; 192-195: 921-24.
15. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*, 10 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.
16. Lane, J.M. Bone Graft Substitutes. *West J Med.*, v. 163, n. 6, p.565-566, Dec. 1995.
17. Leahy, F.M.; Análise microscópica da organização celular e tecidual na superfície e ao redor das partículas de três tipos comerciais de osso xenógeno enxertados em defeitos induzidos em calvárias murinas: “uma proposta de critérios e parâmetros de análise das reações teciduais frente a materiais particulados”. Dissertação (Mestrado em Implantologia), Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo, p.16-19, 34-39, 2011.
18. Linde, A.; Thorende, C.; Dahlin, C.; Sandberg, E. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. v. 51, p.892-897, 1993.
19. Lindhe, J.; Karring, T., Lang, N.P. 2005. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*, 4ª Edição. São Paulo, Guanabara Koogan.
20. Marks, R.E.; Garg, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*, n.7, v. 4, p. 267-76, 1998.
21. Marks Jr, S.C.; Odgreen, P.R. Structure and development of the skeleton. In.: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A. *Principles of bone Biology*. 2ed. San Diego. Academic Press. Cap 1, p. 3-15, 2002.
22. Matzenbacher, S.A.; Mailhot, J>M.; McPherson, J.C. et al. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in rat calvarium. *J Periodontol*, v.74, p. 1641-1646, 2003.
23. Mellonig, J.T. et al. Comparison of decalcified freeze-dried bone allograft and porous particulate hydroxyapatite in human periodontal osseous defects. *J Periodontol*, v. 60, p. 647-654, 1989.
24. Misch, C.E. *Biomateriais utilizados em implantes dentários. Implantes Dentários Contemporâneos*. Editora Santos, 2ª Edição, São Paulo, 271-302, 2000.
25. Moreira, A. S. B. et al. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. *Acta ortop bras*. v. 11, n.4, p.240-250, 2003.
26. Niederwanger, M.; Urist, M.R. Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rh-BM 2. A substitute for autogeneic bone grafts. *J Oral Implantol*. v.22, p.210-215, 1996.
27. Oliveira, R.C.; Sicca, C.M.; Silva, T.L. et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. *Rev. Bras. Ortoped*, v. 38, n. 9, p. 551-560, Set, 2003.





28. Oreffo, R.O.C.; Trifft, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone*. v. 25, n. 2, p. Aug. 1999. 5S-9S.
29. Orr, T.E. et al. Compressive properties of cancellous bone defects in rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, n.22, p.1953-1959, 2001.
30. Paul, B.F.; Horning, G.M.; Hellstein, J.W.; Schafer, D.R. The osteoinductive potential of demineralized freeze-dried bone allografting human non- orthotopic sites:a pilot study. *J Periodontol*, v.72, p. 1064-1068, 2001.
31. Pruss , A.; Seibold, M.; Benedix, F. et al. Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermoinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores. *Biologicals*, v.31, n.4, p. 287-94, Dec. 2003.
32. Sauerssig, F. Avaliação Microscópica do Processo de Reparo Ósseo na Presença de Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado e esmineralizado e Membrana de Cortical Bovina em Calota Craniana de Ratos. 2005, 122p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
33. Schimming, R.; Schelzeisen, R. Tissue engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Ral Maxillofac Surg.*, v.62, n.6, p.724-729, June, 2004.
34. Schimitz, J.P.; Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Orthop*. v. 205, p. 299-308, 1986.
35. Sicca, C. M. Análise tomográfica e histomorfométrica comparativa entre enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo xenógeno em cirurgia de levantamento de seio maxilar em coelho. Bauru, 2005.61p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
36. Simion, M.; Fontana, F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. Literature review. *Minerva Stomatol.*, v. 53, n. 5, p. 191-206, may, 2004.
37. Tadjoeidin, E.S.; De Lange, G.L.; Bronkers, A.L.J.J. et al. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol*, v. 30, n. 3, p. 261-70, 2003.
38. Tsonis, P.A. Regenerative Biology: The emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiations*, v. 70, n. 8, p.397-409, 2002.
39. Wallace, S.S.; Froum, S.J.; Tarnow, D.P. et al. Sinus augmentation utilizing anorganic bovine boné (Bio-oss) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over the lateral window: Histomorphometric and clinical analyses. *Int. Journal of Periodontis & Restorative Dentistry*, v. 25, n. 6, p. 551-559, 2005.
40. Worth, A.; Mucalo, M.; Horne, G. et al. The evaluation of precessed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin Oral Impl. Res.*, v. 16, p. 379-386, 2005.

