

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

TARCILA MOREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM ENXERTIAS DE OSSO LIOFILIZADO
HUMANO, OSSO LIOFILIZADO BOVINO E VIDRO BIOATIVO: ESTUDO
HISTOLÓGICO EM CÃES.**

São Paulo
2004

TARCILA MOREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM ENXERTIAS DE OSSO LIOFILIZADO
HUMANO, OSSO LIOFILIZADO BOVINO E VIDRO BIOATIVO: ESTUDO
HISTOLÓGICO EM CÃES.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de Santo Amaro para obtenção do título de
Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia
Orientador: Prof. Dr. Nelson Villa

São Paulo
2004

B. 2012.4010
Class. 0617.69
Cutter 009.07
Patri nº 22
Tipo entrada 01691
Nota Fiscal
Data rec. 02/10/2012
Preço
Origem

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

Santos, Tarcila Moreira

S239x Avaliação da reparação óssea em enxertias de osso liofilizado Humano, osso liofilizado bovino e vidro bioativo: estudo histológico em cães/ Tarcila Moreira dos Santos.. Orientação do Prof. Dr. Nelson Villa.-- São Paulo: 2004.
105p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

1. cães 2. histologia 3. materiais biocompatíveis

I. Título

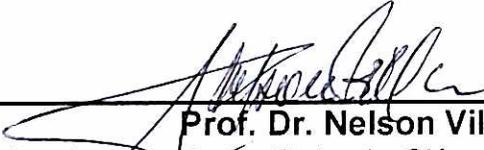
TARCILA MOREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM ENXERTIAS DE OSSO LIOFILIZADO HUMANO, OSSO LIOFILIZADO BOVINO E VIDRO BIOATIVO: ESTUDO HISTOLÓGICO EM CÃES.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia. Orientador: Prof. Dr. Nelson Villa

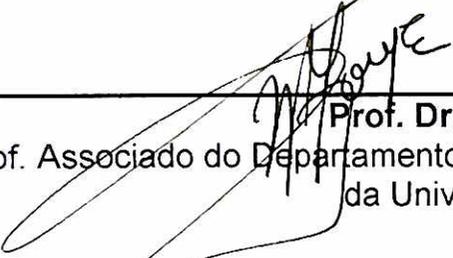
Aprovada em __/__/__

Banca Examinadora



Prof. Dr. Nelson Villa

Livre docente em Histologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge

Prof. Associado do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Doutor em Periodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nota: _____ Observação: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: PERICLES MOREIRA DOS SANTOS e LIBÂNIA DE FARIA MOREIRA DOS SANTOS por terem me dado apoio, exemplos de amor, paciência e honestidade e por sempre terem lutado pela minha formação intelectual e moral.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sempre me orientar e pelas oportunidades constantes colocadas em meu caminho.

Ao professor Dr. NELSON VILLA pela orientação desta pesquisa, pelo apoio, exemplos de seriedade e dedicação profissional, que nos serve de estímulo constante para o aperfeiçoamento, o meu eterno reconhecimento e gratidão.

A todos os professores do Curso de Mestrado pelos ensinamentos transmitidos durante minha formação em Implantodontia e em especial ao Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo.

A LUIZ FERNANDO MARTINS ANDRÉ, meu namorado, por toda a ajuda durante a realização deste trabalho, pela força e coragem para nunca desanimar e pelo carinho, amor, respeito, apoio, atenção e amizade que sempre teve comigo. Muito obrigado.

Ao veterinário LUIZ HENRIQUE CARDOSO CIPOLOTTI e sua equipe pelo auxílio durante a realização das cirurgias e pelos cuidados dispensados aos cães durante o experimento.

Aos colegas MAURÍCIO MATEUS MONTANARI, VALDIR GONÇALVES FERREIRA e ANDRÉ SORATTO pelo auxílio dispensado durante a realização das cirurgias experimentais e pela amizade.

Ao colega MARCELO SAN JUAN pelo incentivo durante a fotografia das lâminas.

A funcionária MARÍLIA SANTOS do laboratório de técnica cirúrgica da UNISA pelo auxílio e atenção durante o experimento.

Ao Sr. JOÃO VAIANO da empresa Conexão Sistemas de Próteses pela doação dos parafusos de fixação de enxerto e pelo apoio durante toda a pesquisa.

Ao Sr. GILBERTO MOSCAREDO da empresa Dentoflex pela doação das trefinas utilizadas neste trabalho.

Ao coordenador do mestrado em Implantodontia, Dr. WILSON ROBERTO SENDYK, pela oportunidade do curso e incentivos durante a pesquisa.

A KAY ADIRR ROGERS BRAGES do laboratório de Histologia pelo preparo das lâminas e ajuda durante a leitura destas.

As secretárias SABRINA MORAIS e JULIANA SELMA DE OLIVEIRA pelo apoio e atenção durante o curso de mestrado.

As bibliotecárias LUCIANA CRISTINA COSTA MARANGONI e RENATA SANTOS DA SILVA por toda a paciência e ajuda científica dispensada durante o curso.

À MARIA APARECIDA SARNO, pela correção ortográfica de toda a tese.

E a todos aqueles que colaboraram nesta pesquisa e que contribuíram de alguma forma para a minha formação profissional e humana, cujos nomes, involuntariamente foram omitidos.

RESUMO

Na clínica odontológica diária, a reabilitação oral através de implantes osseointegrados é um fato muito comum; porém, os requisitos básicos são quantidade e qualidade óssea satisfatórias, o que nem sempre encontramos em todos os pacientes. Diante deste fato, podemos lançar mão de materiais para aumentar o volume do osso receptor, em locais escolhidos para inserção destes implantes. Este trabalho teve como objetivo realizar uma pesquisa histológica de três tipos de biomateriais de grande utilização no mercado: o osso liofilizado humano, o osso liofilizado bovino e o vidro bioativo comparados com o coágulo sanguíneo, em cães da raça Beagle. Foram produzidos dois defeitos ósseos padrão, em cada tibia dos cães utilizados. Três defeitos foram preenchidos com biomateriais e o quarto defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo, todos de forma randomizada e recobertos com uma membrana de colágeno reabsorvível. Os cães foram divididos em dois grupos; no primeiro grupo, foi feita a coleta do material após sete dias e, no segundo grupo, após 28 dias. Os resultados foram avaliados histologicamente e permitiram concluir que tanto o osso bovino como o osso humano tiveram uma reparação próxima ao coágulo e o vidro bioativo mostrou ser um material com menor atividade neoformadora.

Palavras-chave: cães, histologia, materiais biocompatíveis

ABSTRACT

Oral rehabilitation in conjunction with osteointegrated implants is commonly practiced in Dentistry; however, the basic requirements, bone quality and quantity, might not be seen in all patients. Accordingly, some materials are used to accomplish the necessary increase in the bone volume of implant-recipient areas. The aim of this work was the histological research of three biomaterials, with large use currently: lyophilized human bone, lyophilized bovine bone, and bioactive glass in comparing to the blood-clot in Beagle dogs. Two standard bony defects were created on both tibia of each dog, resulting in four defects, three of which were randomly filled with biomaterials, and one with blood-clot, and then, covered by a collagen absorbable membrane. Animals were divided in two groups; samples were taken, at 7 days, from one group, at 28 days, from the other group, and results, were histologically evaluated. It was concluded that either, bovine or human bones, promoted similar healing as the blood-clot, while the glass induced less pronounced bone formation.

Key-words: dogs, histology, biologically compatible materials

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1A	Fotografia da exposição cirúrgica da tíbia	71
Figura 1B	Fotografia do início da produção do defeito ósseo	71
Figura 1C	Fotografia da última broca para produzir o defeito ósseo ..	71
Figura 1D	Fotografia dos dois defeitos ósseos produzidos para enxertia e para inserção dos parafusos	71
Figura 1E	Fotografia dos defeitos produzidos com os parafusos inseridos nos leitos	72
Figura 1F	Fotografia da inserção de um dos materiais de enxerto o vidro biativo	72
Figura 1G	Fotografia do defeito preenchido	72
Figura 1H	Fotografia das membranas posicionadas	72
Figura 2A	Fotografia da reabertura após 28 dias	78
Figura 2B	Fotografia da trefina colhendo o material	78
Figura 2C	Fotografia do material trefinado	78
Figura 2D	Fotografia da cavidade óssea após o uso da trefina	78
Figura 2E	Fotografia do material coletado	78
Figura 3	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sanguíneo - 07 dias - aumento de 10x	81
Figura 4	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sanguíneo - 07 dias – aumento de 40x	81

Figura 5	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sanguíneo - 28 dias - aumento de 10x	82
Figura 6	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sanguíneo - 28 dias - aumento de 40x	83
Figura 7	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino - 07 dias - aumento de 10x	84
Figura 8	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino - 07 dias e - aumento de 40x	84
Figura 9	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino - 28 dias - aumento de 10x	85
Figura 10	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino - 28 dias - aumento de 40x	86
Figura 11	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano - 07 dias - aumento de 10x	86
Figura 12	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano - 07 dias - aumento de 40x	87
Figura 13	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano - 28 dias - aumento de 10x	88
Figura 14	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano - 28 dias - aumento de 40x	88
Figura 15	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro bioativo - 07 dias - aumento de 10x	89
Figura 16	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro bioativo - 07 dias - aumento de 40x	90
Figura 17	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro	

	bioativo - 28 dias - aumento de 10x	90
Figura 18	Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro	
	bioativo - 28 dias - aumento de 40x	91

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ca cálcio

CaO óxido de cálcio

cc centímetro cúbico

DBM osso humano inativo

DFDBA osso desmineralizado congelado seco

e-PTFE membrana de politetrafluoretileno

EUA Estados Unidos da América

Fig figura

g grama

H hidrogênio

hBMP / NCP proteína óssea morfogenética humana incluindo proteínas não
colagenosas

HCl ácido clorídrico

HE hematoxilina e eosina

kg quilograma

MFDBA osso mineralizado congelado seco

Na₂O óxido de sódio

O oxigênio

P₂O₂ dióxido de fósforo

POM proteína ostoemorfogenética

PRP plasma rico em plaquetas

SiO₂ sílica amorfa

mg miligrama

ml mililitro

mm milímetro

nº número

UNISA Universidade de Santo Amaro

X aumento

µm micrômetro

= igual

% porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	14
2. PROPOSIÇÃO	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Regeneração óssea	19
3.2 Membranas.....	23
3.3 Substitutos ósseos	29
3.3.1 Osso liofilizado humano.....	29
3.3.2 Osso liofilizado bovino	44
3.3.3 Vidro bioativo.....	54
3.3.4 Estudos comparativos	62

4. MATERIAL E MÉTODO	66
4.1 Manutenção dos animais	67
4.2 Procedimentos de anestesia	68
4.3 Acesso cirúrgico aos campos	69
4.4 Obtenção e preparo dos materiais para enxerto	73
4.5 Aplicação dos materiais de enxerto	74
4.6 Cuidados pós-operatórios	76
4.7 Acesso cirúrgico para obtenção das peças e análise histológica.....	77
4.8 Preparo histológico	79
5. RESULTADOS	80
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

O contingente de pacientes com deformidades e perdas ósseas alveolares, originadas por perda de elementos dentais devido a problemas periodontais de longa duração, e de pacientes, que apresentam também esta perda como resultado de trauma e processos infecciosos, é muito grande e, muitas vezes, a reabilitação convencional por próteses totais, fixas ou removíveis acabam não satisfazendo o paciente, tanto na parte funcional, quanto na estética.

Até alguns anos atrás, os pacientes aceitavam a reabilitação convencional como a melhor solução; porém, com o desenvolvimento da Implantodontia, estas soluções tidas como ideais passaram a ser questionadas em termos de estética e função.

Durante um período, a colocação de implantes onde existia quantidade óssea era satisfatória; porém, à medida que a Implantodontia foi se firmando como uma técnica consagrada, os profissionais começaram a ousar mais, indo em busca de técnicas para repor a estrutura óssea perdida, abrindo novos horizontes para a Odontologia, na área de Cirurgia, impulsionando as pesquisas para o desenvolvimento de técnicas e materiais para o aumento ósseo.

Há muito se comenta que o osso autógeno é o material ideal para o aumento do volume ósseo, por suas propriedades biológicas e ausência de rejeição. Mas, tal procedimento é muito desgastante, tanto para o profissional, quanto para o paciente, que pode apresentar considerável dor pós-operatória.

Assim, uma grande variedade de materiais de enxerto foi empregada nos estudos experimentais, ou na prática clínica, desde o osso trabecular ou cortical

humano autogênico, enxertos ósseos xenogênicos, enxertos alogênicos, até materiais substitutos como hidroxiapatita natural e sintética, compostos de fosfato de cálcio e cerâmicas de vidro.

Brugnami et al. (1996), realizaram um estudo para avaliar a nova formação óssea em alvéolos humanos, após exodontia, tratados com DFDBA e membrana, e seus achados demonstram que o DFDBA tem potencial para ser um foco de aposição para um novo crescimento ósseo em humanos (osteocondutividade).

Berglundh (1997) estudou, também, a cicatrização de defeitos ósseos, preenchidos com osso bovino ao redor de implantes, comparando com osso normal em cinco cães Beagle e concluiu que este osso age como material osteocondutivo e, durante a cicatrização, é substituído por osso normal.

Entre os estudos experimentais, podemos citar Nevins et al. (2000), que avaliaram a cicatrização de defeitos ósseos, ao redor de elementos dentários, com cerâmica bioativa, através de mensurações clínicas, observações radiográficas e análises histológicas, após seis meses de cirurgia, e constataram que há diminuição de 2,7 mm da profundidade da bolsa periodontal e ganho de inserção de 0,5 mm, em média, em todos os casos analisados.

Diante destes fatos, qual o biomaterial que pode influenciar benéficamente a cicatrização, para aumentar a previsibilidade dos resultados clínicos?

2. PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho é comparar, por análise histológica, o processo de reparação em cavidades ósseas (produzidas em tibia de cães Beagle), preenchidas com osso liofilizado humano, osso liofilizado bovino e vidro bioativo, tendo como controle a regeneração natural de cavidades preenchidas com coágulo sangüíneo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os implantes osseointegrados vieram solucionar problemas e otimizar resultados na Odontologia moderna. A quantidade e a qualidade ósseas remanescentes do paciente são requisitos necessários para seguirmos com a instalação destes implantes no meio bucal. No entanto, sabemos que, muitas vezes, o remanescente é insuficiente para nossos objetivos. Então, partimos para utilização de biomateriais que possam nos auxiliar na reconstrução do rebordo alveolar do paciente.

A história mostra, na área médica – odontológica, incansáveis pesquisas na busca por substâncias naturais, ou sintéticas, que possam substituir tecidos corpóreos perdidos, moles ou duros. Antigos registros mostram a utilização de substâncias como marfim, osso seco, ouro, fio de ouro, ligas de prata, entre outros materiais. (LEMONS; NATIELA, 1986).

A partir de 1800, quando pesquisadores implantaram a utilização do sulfato de cálcio em defeitos ósseos, observa-se o emprego de compostos sintéticos para substituição óssea (CARVALHO; LUPPINO; MENDES, 2002).

Desta maneira, atualmente, uma grande variedade de biomateriais é empregada em estudos experimentais e podem ser chamados de substitutos ósseos, devendo apresentar propriedades biocompatíveis, não provocar reações imunes ou alérgicas, além de serem bem tolerados e integrados pelos tecidos receptores e proporcionar um arcabouço adequado para o novo osso crescer. Foi postulado que devem ser substituídos, gradativamente, por osso recém-formado. Sua estrutura tridimensional deve lembrar ao máximo a do osso natural, no que se

refere, a macro e microporosidades. Finalmente, devem transformar defeitos maiores em fragmentos menores e comparáveis aos do osso humano natural (BURCHARDT, 1983; GROSS, 1997).

3.1 Regeneração óssea

Ribeiro; Amstalden; Izatto (1996) realizaram um trabalho com o objetivo de criar um modelo biológico experimental de regeneração óssea espontânea. Utilizaram treze animais, e provocaram dois defeitos em cada um, nas metáfises proximais de tíbias e distais dos fêmures dos cães. Estes defeitos tinham diâmetro de 5,55mm perpendicular ao plano sagital dos ossos, onde perfurou-se a cortical medular e a metáfise, respeitando-se a cortical lateral. Após hemostasia, a ferida foi suturada em um único plano. Os animais foram sacrificados e obtidos os seguintes resultados após análise histológica:

- segundo dia: verificaram que a cavidade estava preenchida com sangue;
- quinto dia: encontraram o terço externo da cavidade ocupado por tecido de granulação constituído de células mesenquimais, fibroblastos, vasos capilares e, na periferia, proliferação óssea imatura e incipiente formada a partir de traves ósseas pré-existentes e do próprio estroma. Observaram, também, traves ósseas pré-existentes necróticas e com aposição óssea recente do tipo "trepadeira". O restante da cavidade estava preenchido com coágulo;
- primeira semana: houve aumento da área de cicatrização, que passou a ocupar cerca dos dois terços externos da cavidade . A proliferação óssea primária tornou-se mais evidente, principalmente na porção mais periférica e apresentou-se com disposição radiada e composta por traves de tecido ósseo imaturo, não lamelar, rico em lacunas com osteócitos. Essas traves mostraram-se margeadas por rima de osteoblastos e dos primeiros osteoclastos. No centro, o coágulo apareceu como uma rede de fibrina frouxa;

- segunda e terceira semanas: aqui, os achados foram semelhantes. Houve maior organização cicatricial do coágulo, na parte central da cavidade, e este passou a ocupar menor área. A proliferação óssea das traves mais periféricas mostrou-se exuberante, com sinais de maturação, evidenciada pelo arranjo lamelar de suas fibras colágenas, vista por meio da luz polarizada. No estroma de permeio, encontraram-se vasos capilares congestionados e de paredes delgadas;

- quarta semana: havia cicatriz fibrosa colágena na porção central da cavidade. Perifericamente, a maioria das traves ósseas mostrou sinais expressivos de amadurecimento, caracterizados pela presença de osso de padrão lamelar, além de certo grau de alargamento. Ao seu redor, foi observada rima de osteoblastos e osteoclastos ativos. No estroma, notou-se a presença dos primeiros adipócitos;

- sexta semana: houve proliferação óssea, na parte central da cavidade ocupada por cicatriz colágena. Houve rarefação do tecido ósseo, nos dois terços externos da perfuração, caracterizada pelo adelgaçamento das traves ósseas e grande distanciamento entre elas. Encontrou-se, também, acentuado aumento da medula óssea adiposa com vasos capilares dilatados e focos de hematopoese;

- oitava e décima semanas: havia também, achados histológicos semelhantes. Toda a cavidade foi ocupada por abundante estroma medular adiposo, com focos de hematopoese em meio de traves ósseas delgadas de padrão osteoporótico, à semelhança do quadro anterior. A atividade osteoclástica permaneceu presente, porém discreta;

- décima segunda semana: o aspecto histológico observado foi homogêneo. Encontrou-se tecido ósseo maduro, lamelar, com traves mais espessas em relação ao quadro anterior. Houve dificuldade na delimitação da cavidade cirúrgica, que se igualou ao tecido ósseo envolvente. Conclusão: o modelo de regeneração mostrou

preenchimento completo da cavidade por tecido ósseo, em 12 semanas de observação, com evidências histológicas de maior expressão na primeira, terceira, sexta e décima segunda semanas de evolução.

Cordioli; Pustiglioni; Georgetti (2000) demonstraram as características histológicas da reparação óssea em cães. Os autores selecionaram seis cães, dos quais foram extraídos os segundos e terceiros incisivos inferiores. Em um dos lados (experimental), foi colocada uma membrana não-reabsorvível e, do outro lado (controle), não foi colocada nenhuma barreira. Os cães foram sacrificados após duas semanas e as peças removidas, para análise histológica. Clinicamente, observou-se que as áreas que receberam a membrana mostraram algum grau de exposição da mesma; no lado controle, as feridas repararam normalmente e estavam completamente fechadas. Já histologicamente, o lado experimental mostrou lacunas de Howship, com células gigantes multinucleadas, nas proximidades do topo da crista óssea, e, na porção central, ainda havia tecido conjuntivo. As trabéculas de osso imaturo encerravam osteócitos irregularmente distribuídos e estavam circundadas por osteoblastos; entre as trabéculas havia tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. Já nas espécimes que tiveram exposição da membrana, houve invasão do tecido conjuntivo, para dentro da ferida, pouco osso imaturo e o osso alveolar residual apresentava-se com áreas de reabsorção e muitas lacunas de Howship. No lado controle, a reparação evoluiu normalmente. O tecido conjuntivo e o osso alveolar residual apresentaram-se semelhantes ao experimental, onde as membranas se mantiveram em posição. Havia também osso imaturo, com variações nos padrões de preenchimento ósseo. A neoformação óssea quase preencheu o alvéolo por completo, chegando-se à conclusão que, para reparações ósseas, com ou sem membrana, o tecido ósseo neoformado tem características de osso imaturo

e que os defeitos com deslocamento de membrana sofrem um retardo na reparação, quando comparados aos demais.

3.2 Membranas

Um obstáculo para o sucesso da cicatrização óssea e a formação de novo tecido ósseo é a formação rápida do tecido conjuntivo. Assim, a invaginação do tecido mole pode impedir que ocorra a osteogênese, em um defeito ou área de uma ferida (LINDE et al. 1993).

A utilização de membranas biológicas impede que as células do epitélio bucal e do tecido conjuntivo participem da cicatrização do defeito ósseo, deixando que as células osteoblásticas tenham a prioridade de se conduzirem para a área. Estas membranas criam um meio propício para melhorar a regeneração funcional, através do potencial biológico natural, que inclui fatores como a prevenção da inflamação conseqüente à presença bacteriana, a estabilidade mecânica do coágulo, a criação e manutenção do espaço por ele preenchido, além do isolamento dos tecidos indesejáveis do local de regeneração.

O aumento do rebordo, utilizando enxertos ósseos sem membranas, está sujeito à reabsorção extensa do enxerto (BRUGGENKATE, et al. 1992). A perda de volume do enxerto foi relatada em 50%, durante o período cicatricial de seis meses (HAMMERLE; KARRING, 2004).

Atualmente, as membranas se dividem em dois grandes grupos: as não reabsorvíveis e as reabsorvíveis, que podem ser subdivididas em bioabsorvíveis, que são degradadas por simples hidrólise e em biodegradáveis, nas quais há uma ação enzimática. São várias as desvantagens das membranas não reabsorvíveis, como a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção, pela ausência de incorporação ao tecido hospedeiro, além da tendência à infecção pós-operatória e recessão gengival.

Campbell; Bassett (1959) e Ashley et al. (1959) relatam que o princípio de selar fisicamente uma cavidade anatômica, para melhorar a cicatrização de um certo tipo de tecido e direcionar a regeneração deste tecido para algum tipo de estrutura membranosa, tem sido utilizado dentro da reconstrução cirúrgica e da regeneração de tecidos nervosos, desde 1950. Um exemplo disto é o uso de filtros de acetato de celulose microporosa para regeneração de nervos e tendões.

Linde et al. (1993), em um experimento, criaram defeitos padronizados de 5 mm, nos dois ângulos mandibulares de ratos. Do lado direito, inseriram uma membrana de politetrafluoretileno, tanto do lado interno, quanto do lado externo do defeito. Do lado esquerdo, não utilizaram nenhum tipo de barreira. Através de análise morfológica, observaram que, com seis semanas, o lado com membrana tinha cicatrização óssea completa; prosseguindo com o experimento, após 22 semanas, o lado sem membrana estava totalmente preenchido com tecido conjuntivo, sem ainda apresentar ossificação.

Sandberg; Dahlin; Linde (1993) realizaram um estudo comparativo histológico do potencial de osteopromoção de três tipos de membranas reabsorvíveis e um tipo de membrana não reabsorvível. Com esta finalidade, utilizaram 35 ratos, nos quais produziram defeitos padrões de 5 mm, nos dois ângulos mandibulares, indo de vestibular para lingual. As membranas foram inseridas de forma randomizada, sendo que cada animal recebeu os quatro tipos de membrana. Para obtenção dos resultados, os animais foram divididos em 5 grupos e sacrificados com 1, 2, 3, 6 e 12 semanas. Observaram que tanto as membranas reabsorvíveis como as não reabsorvíveis apresentaram uma pronunciada resposta inflamatória, depois de 1 semana do ato operatório. Depois da segunda semana, um infiltrado inflamatório menor ainda estava presente. Nas reabsorvíveis, um menor infiltrado de células

inflamatórias foi visto, ao longo da superfície da membrana e no tecido. Depois disso, nenhum sinal de inflamação foi detectado na área ferida. A membrana não reabsorvível foi bem tolerada e, a partir da terceira semana, células inflamatórias foram vistas apenas ocasionalmente. As reabsorvíveis mostraram uma tendência ao colapso ou de serem atraídas para dentro dos defeitos. Esta pequena tendência ao colapso não foi visualizada na membrana não reabsorvível. Quase 80% dos sítios cobertos com a membrana não reabsorvível estavam presentes pequenas ilhas de cartilagem, dentro da estrutura da membrana. Este caminho foi detectado em todos os sítios, com 3 semanas, mas também foi visto, em alguns casos, em períodos precoces de observação. Em contraste, isto não ocorreu nas membranas reabsorvíveis. Entretanto, em metade dos defeitos tratados com esta última, a cartilagem não foi encontrada dentro da cicatrização dos defeitos durante as três primeiras semanas. Concluindo, os autores mostraram que, para melhorar a regeneração óssea, as membranas reabsorvíveis são uma alternativa válida para substituir as não reabsorvíveis.

Zellin; Gritlhi-Linde; Linde (1995) fizeram uma investigação para explorar o potencial de osteopromoção, em torno de dez diferentes membranas biodegradáveis e não-biodegradáveis, através da análise por microscopia eletrônica. A investigação foi estudada em vinte e cinco ratos, nos quais foi produzido um defeito ósseo de 5mm, bilateral no ângulo da mandíbula, tendo sido inserida, tanto do lado lingual, quanto bucal, uma membrana de forma randomizada. As membranas utilizadas tinham a seguinte composição:

GTAM = não – biodegradável, composta de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE);
Guidor = biodegradável, composta de ácido polilático; Millipore = não-biodegradável,
composta de acetato de celulose; NYT = não – biodegradável, composta de celulose

americana, com componentes inespecíficos; Periogen = biodegradável, composta de colágeno bovino; Resolut LT = biodegradável, composta de ácido poliglicólico e polilático, para ter longevidade nos tecidos; Resolut ST = biodegradável, composta de ácido poliglicólico e polilático, para permanecer por período reduzido nos tecidos; Ti-foil = não – biodegradável, composta de titânio; Vicryl C = biodegradável, composta de copolímero de poliglicóide e polilático, coberta com colágeno bovino tipo I e III; Vicryl PM = biodegradável, composta de copolímero de poliglicóide e polilático. Após seis semanas de cicatrização, foi colhido o material e analisado ao microscópio e os autores concluíram, diante dos resultados, que a investigação dos diferentes tipos de membranas de diferentes materiais, tem seu potencial individual de osteopromoção. O estudo sustenta os resultados anteriormente encontrados de que membranas biodegradáveis podem ser osteopromotoras como e-PTFE (não biodegradável) se projetadas para este fim. Membranas biodegradáveis podem apresentar similaridade química, porém diferem, fortemente, na sua eficácia de osteopromoção. O pré-requisito é que a membrana seja resistente o bastante e permaneça tempo suficiente no local do defeito, para manter o espaço em que o novo osso será formado.

Marcantonio Júnior et al. (1996) avaliaram o efeito do uso da membrana de colágeno bovino em defeitos ósseos criados próximos a implantes osseointegrados em mandíbula de cães. Foram utilizados dois cães, que receberam oito implantes cada um, quatro em cada hemimandíbula, após a extração e cicatrização dos pré-molares, que foi realizada somente em função da pesquisa. Os defeitos foram criados e os implantes inseridos. Quatro implantes foram recobertos com uma membrana de colágeno bovina reabsorvível, sendo estes o grupo teste. Os quatro implantes que foram inseridos nos demais defeitos, que não receberam cobertura,

foram chamados de grupo controle. Após 12 meses, os animais foram sacrificados e as amostras colhidas para análise histométrica. Os resultados mostraram diferenças estatísticas significantes no aumento da altura óssea do defeito (grupo teste = 2.34 mm e o grupo controle = 1.17 mm) e a área do defeito foi diminuída (grupo teste = 1.82 mm² e grupo controle = 0.70 mm²), demonstrando os autores que a membrana de colágeno aumenta a regeneração em defeitos ósseos associados com implantes osseointegrados.

Proussaefs e Lozada (2003) realizaram um estudo para avaliar clínica, radiográfica e histologicamente, o uso de membrana reabsorvível de colágeno, em conjunto com enxerto de osso autógeno, misturado ao osso bovino, em defeitos de rebordo alveolar. Foram selecionados sete pacientes, que apresentavam defeitos em região de maxila, os quais após o preenchimento destes defeitos, com material de enxerto, e, sua regeneração, receberam implantes osseointegrados. Todos os pacientes receberam o mesmo tipo de enxerto: osso autógeno misturado ao osso bovino, recobertos com membrana de colágeno bovino. Todos os pacientes realizaram tomografia linear antes do enxerto e antes da colocação de implantes. Após seis meses, foram colhidas as amostras, para análise histológica. Os resultados clínicos encontrados, pelos autores, foram: os pacientes não apresentaram dor ou desconforto na área operada; não houve exposição da membrana em nenhum dos casos e, também, não houve sinais de inflamação ou infecção. Radiograficamente, a análise das tomografias, revelaram um aumento adequado do rebordo suficiente para inserção dos implantes. E histologicamente, em todas as espécimes, havia tecido conjuntivo e partículas de osso bovino residual. Não houve sinais de reabsorção ou atividade inflamatória, em nenhuma das espécimes. A média da área ocupada pelo novo osso, foi de 34,28%. Segundo os

autores, o uso de uma membrana reabsorvível de colágeno, recobrimdo os enxertos referidos, não mostra alterações clínicas importantes. Já, radiograficamente, há aumento suficiente de volume ósseo para inserção de implantes, sem sinais de inflamação ou reabsorção.

Stavropoulos et al. (2004) investigaram a regeneração óssea guiada, através do uso de dois tipos de membrana, de maneira comparativa, histologicamente. Foram utilizados cinco cães adultos, onde treze semanas antes do procedimento principal do estudo, foram extraídos os elementos dentais da região de pré-molar inferior, bilateralmente. Após a cicatrização, foram produzidos três defeitos ósseos, em cada região desdentada, com aproximadamente 8 mm de profundidade e 10 mm de largura. Estes defeitos, foram preenchidos com osso canino desmineralizado, nos quais, quatro foram recobertos com a membrana reabsorvível, Gore Resolut Adapt (PGA:TMC) de diferentes porosidades; dois foram recobertos com outra membrana reabsorvível, a Bio-Guide (membrana de colágeno); e dois defeitos foram preenchidos somente com o osso canino desmineralizado. Após três meses, foram colhidas as amostras, para análise histológica. Em geral, os sítios analisados com membrana, não apresentaram respostas inflamatórias, porém um novo osso formou-se próximo à superfície das membranas, em quantidade significativamente maior nos sítios com PGA:TMC do que nos sítios com a membrana de colágeno. No sítio sem membrana, houve deformação no perfil da nova formação óssea. Concluindo os autores, que o uso da membrana PGA:TMC oferece uma alternativa viável no tratamento de defeitos ósseos localizados.

3.3 Substitutos Ósseos

3.3.1 Osso liofilizado humano

O osso pode ser preparado congelado e seco ou congelado e seco desmineralizado (liofilizado). Os tecidos são liofilizados em alto vácuo, para que seja removida a maior parte da água. O osso desmineralizado é produzido por um processamento adicional de congelamento e posterior secagem para remoção da maior parte do cálcio e de minerais.

O osso é obtido de ossos longos de órgãos doadores. Os dados afirmam que os tecidos são obtidos somente de doadores que estejam livres de doenças contagiosas, malignas e doenças osseodegenerativas.

O processamento básico, de acordo com Garbin (1994), ocorre da seguinte maneira: obtenção do osso cortical e esterilização, imersão em solução antibiótica, desengorduramento em álcool etílico 100% por uma hora, congelamento a menos 80 graus Celsius; o material é moído e imerso em álcool etílico 100%, agora por 24 horas, para decantação e lavagem, imerso em 0,6 N de ácido clorídrico (HCL), a 4 graus Celsius, processado por radiação Gama, passa por lavagem e segue para empacotamento.

Nunca é demais lembrar que o DFDBA é representado pelos enxertos de osso humano, retirados de doadores (pós-morte cerebral), previamente selecionados, processados e estocados em bancos de tecidos humanos. Estes são rigorosamente controlados e, nos EUA, são credenciados no American Association of Tissue Banks e devem seguir todas as normas e regras para que os enxertos

possam ser aprovados. As experiências com este produto demonstram ser seguro e efetivo, estando associado a rápida formação óssea (MISH; DIETSH, 1993).

Uma breve revisão da literatura mostra que grande importância foi dada ao osso liofilizado humano.

Bowers et al. (1989) compararam, em seus estudos, a cicatrização de defeitos intraósseos com e sem inserção de DFDBA, em humanos. O nível mais apical do cálculo, em raízes de doze pacientes selecionados, serviu como ponto de referência histológica para delinear as superfícies das raízes expostas no meio bucal e mensurar a nova inserção do aparelho periodontal e formação de novo componente tecidual. Enxertos de gengiva livre foram colocados sobre trinta e dois defeitos intraósseos enxertados com DFDBA e 25 não enxertados com o biomaterial, para retardar a migração epitelial para dentro dos defeitos. Biópsias foram obtidas seis meses após a regeneração e avaliadas histometricamente. Diante dos resultados, os autores tiveram uma significativa nova inserção de 1.21 mm do aparelho, medido a partir da referência do cálculo que só foi observada nos defeitos enxertados com o DFDBA. Na realidade, foi encontrado 1.24 mm de nova formação de cemento, 0.13 mm de tecido conjuntivo e 1.75 mm de nova formação óssea. O epitélio juncional foi localizado 1.36 mm coronariamente a referência marcada no sulco. A porcentagem da regeneração positiva indicava que um novo aparelho de inserção, novo cemento, novo tecido conjuntivo, e novo osso se formaram mais freqüentemente em defeitos enxertados do que nos não enxertados com DFDBA e o ligamento periodontal foi mais freqüentemente orientado perpendicularmente ao dente. Formação de novo aparelho de inserção não foi observado, em nenhum dos 25 sítios não enxertados, depois da colocação de enxerto gengival livre, e também não foram observadas: extensiva reabsorção radicular , anquilose ou morte pulpar em ambos os casos,

concluindo os autores que é possível a formação de novo aparelho de inserção periodontal em defeitos intraósseos preenchidos com DFDBA.

Becker; Becker e Caffesse (1994) testaram a capacidade de formação óssea, através de análise histológica do DFDBA e do osso autógeno, enxertados em alvéolos humanos. Para este estudo, foram selecionados sete pacientes, com pelo menos dois elementos dentais comprometidos, nos quais, após exodontia e debridamento da loja, de maneira sorteada, foram enxertados os materiais. Entre três e treze meses após a cicatrização, os pacientes passaram pelo segundo tempo cirúrgico, para colocação de implantes e, nesse momento foi colhido o material para biópsia. E assim seguiram os resultados histológicos. Para o DFDBA, a avaliação de todas as biópsias pareceram similares. Partículas de DFDBA foram circundadas por tecido conjuntivo, não inflamatório. O osso implantado foi usualmente desprovido de osteócitos e as bordas das partículas do enxerto pareciam irregulares. Houve presença de lascas de osso não vital, em algumas seções, e de uma espécime de osso vital, que pode ser identificado adjacente a partículas de DFDBA. Nesta seção, as partículas de DFDBA estavam circundadas por osso do hospedeiro; entretanto, não houve evidência de atividade osteogênica ou osteoclástica, nos alvéolos enxertados com o DFDBA. Já para o osso autógeno, encontraram, em algumas biópsias, presença de osteócito, dentro das suas lacunas, vasos sanguíneos, e formação secundária de osteon. Outras biópsias também continham vasos, osso trabecular e lamelar, e canais de reabsorção. Em geral, estas espécimes representavam a presença de osso viável, com sinais de atividade de formação óssea. Os autores questionam, então, os resultados desse estudo clínico e histológico, para continuidade do uso do DFDBA, para regeneração tecidual, já que todas as seções histológicas do DFDBA mostraram partículas não vitais, que não

evidenciaram qualquer atividade osteoblástica ou osteoclástica. Tiveram também como resultados a retenção das lascas de osso não vital, que parecem atrasar a formação de osso normal dentro dos alvéolos e podem enfraquecer o osso do hospedeiro, e finalmente concluem, também, que enxertos nos alvéolos com osso autógeno cicatrizaram com tecido vital e osso lamelar.

Becker et al. (1995) testaram as propriedades osteoindutoras de partículas de DFDBA originadas de quatro bancos de osso, com idade dos doadores variando entre 25 e 65 anos e com granulação de 200 a 500 μm . Foram utilizados oito camundongos para o experimento; dois eram os controles, um era o positivo, com hBMP/NCP inclusa em partículas de DFDBA, e o outro era o negativo, com DBM. Todos receberam duas amostras de cada banco, no quadríceps esquerdo e direito, e foram inseridas em cápsulas gelatinosas previamente à cirurgia. Após 21 dias, os animais foram sacrificados e coletadas as amostras, que passaram por procedimento histológico e obtiveram as sessões para análise histológica, apresentando os seguintes resultados:

DFDBA – todas as sessões foram avaliadas quanto à presença ou ausência de formação óssea e retenção de partes pequenas de DFDBA. A característica mais marcante da maioria das sessões foi de um grande volume de osso não vital, de pequenas partes de DFDBA, relacionando-se com formação óssea aposicional. Muitas sessões demonstraram pequenas ilhas com novo osso e com osteócitos dentro das lacunas;

DBM – essas amostras fracassaram em mostrar evidências de nova formação óssea. A lacuna ficou vazia e os canais vasculares não foram revascularizados.

Pequenas partes de osso não vital estavam entre o tecido muscular;

hBMP/NCP – nesta coleta, todas as sessões mostraram quantidade de formação ativa de osso. Condroblastos e osteoblastos foram identificados em muitas delas. Em todas as sessões, medula hematopoiética foi vista. Linhas de osteócitos, com suas lacunas, e canais vasculares foram lineados com medula hematopoiética. Pequenas partes de osso não vital foram observadas em todas as sessões. Os resultados deste estudo piloto fazem os autores concluírem que o DFDBA induz quantidade de osso clinicamente insignificante e questionarem a continuidade do uso deste enxerto para defeitos periodontais e adjacentes a implantes.

Becker et al. (1996) reportaram, clínica e histologicamente, o resultado de enxertos com osso autógeno, DFDBA, MFDBA e osso autógeno + DFDBA + membrana, enxertados em sítios de extração dentária ou inserção de implantes de quinze pacientes. Biópsias foram feitas de quatro a treze meses depois da implantação. Para obter o resultado final, foi feita uma tabela de pontos para avaliar as sessões de partículas não vitais implantadas ou a presença de osso vital. E os pontos foram classificados da seguinte forma:

0 = sessões consistiam de osso não vital implantado dentro do tecido conjuntivo do hospedeiro, onde também estava presente tecido de granulação;

1 = Osso maduro e vital do hospedeiro estava presente, partículas de osso implantado não vital estavam também presentes e não estavam unidas ao osso do hospedeiro;

2 = pequenas partes de osso implantado não vital presente; partículas de osso implantadas foram encontradas unidas por linhas de cimento ao osso maduro do hospedeiro; tecido de granulação estava presente;

3 = fragmentos ósseos não vitais implantados, osso do hospedeiro maduro, vasos sangüíneos, cartilagem, osteoblastos, e nova formação óssea estavam presentes;

4 = ausência de partículas implantadas, com total restituição do defeito pelo osso do hospedeiro. A média de pontos ósseos de cada sítio que recebeu osso autógeno foi de 2.33, DFDBA 0.98, MFDBA 0.18. As características soberanas da histologia dos sítios implantados com DFDBA ou MFDBA foram retenção de partículas de osso não vital dentro de fibras do tecido conjuntivo. Biópsias adjacentes feitas ao osso hospedeiro demonstraram incorporação do osso alógeno (osteocondução). Sítios enxertados com pequenas partes de osso autógeno também demonstraram pequenas partes de osso não vital circundado pelo osso vital do hospedeiro (osteocondução). Sítios que receberam membranas como barreiras não aparentaram melhora ou prejuízo na cicatrização óssea de sítios aumentados. Os autores concluíram que pequenos pedaços de osso autógeno, coletados de dentro da cavidade oral tão bem como osso alógeno, podem servir como preenchedores biológicos, mas não aparentemente contribuem para a osteoindução. Enxertos alógenos, aparentemente, não são reabsorvidos por osteoclastos.

Brugnami et al. (1996) realizaram um estudo para avaliar a nova formação óssea em alvéolos humanos, tratados com DFDBA e membrana, após exodontia. Seis pacientes com pelo menos um elemento dental indicado para exodontia foram selecionados. Todos foram tratados cirurgicamente (realizada a exodontia), enxertia de DFDBA e colocação de membrana e, após a cicatrização, as amostras do material enxertado foram colhidas, com o uso de uma trefina prévia, as perfurações onde foram inseridos implantes nestes mesmos sítios enxertados. E as amostras foram colhidas entre quatorze semanas e treze meses. Estas foram preparadas e coradas, com hematoxilina e eosina, e um total de 38 sessões foram analisadas histologicamente. As sessões descalcificadas mostraram focos de DFDBA demarcados ao redor por tecido intimamente aposicionado e osso lamelar por linha

de cimento distinta. O enxerto exibiu uma notável falta de encapsulamento fibroso e pequenos osteoclastos. O novo osso medular demonstrou um suave grau de fibrose, sem reação inflamatória visível. Concluíram os autores que, dentro da descrição deste estudo, não se pode traçar respostas sobre a osteoindutividade do DFDBA. Entretanto, os achados demonstram claramente que o DFDBA disponível tem potencial de função física, podendo ser um foco de aposição para um novo crescimento ósseo em humanos (osteocondutividade).

Schwartz et al. (1996) determinaram a capacidade de indução de formação óssea do DFDBA de diferentes bancos de tecido ósseo e dentro dos bancos, de diferentes lotes deste enxerto, sendo que estes apresentavam diferentes tamanhos de partículas. Um total de quatorze amostras foram disponibilizadas para avaliação, e a idade dos doadores variou de 17 a 73 anos, num total de 11 homens e 3 mulheres. O experimento foi desenvolvido em ratos. Foram inseridos 20 mg de DFDBA subcutâneo, na região do tórax, e 10 mg intramuscular, na perna do animal. As amostras subcutâneas foram colhidas com quatro semanas e as amostras intramusculares foram colhidas com oito semanas. Foram fixadas, coradas e cortadas no micrótomo. A partir dos cortes, a capacidade de induzir nova formação óssea do DFDBA foi qualitativamente avaliada, com o seguinte critério: ponto 1 = presença de partículas de DFDBA sem novo osso ou cartilagem; ponto 2= produção de novo osso e cartilagem que cobria menos que 40% da área examinada; ponto 3= produção de novo osso e cartilagem que cobria mais de 40% da área examinada. Tendo o resultado qualitativo para os implantes inseridos subcutâneos com média para 4 semanas de **ponto 2** e para os intramusculares metade apresentou **ponto 2** e outra metade **ponto 3**. Histologicamente, em algumas amostras de DFDBA não houve formação de osso ou cartilagem em torno dos implantes subcutâneos e

nenhuma das amostras produziram uma resposta inflamatória. Em todos os instantes, as partículas foram circundadas por tecido conjuntivo denso e nenhuma atividade de reabsorção das partículas foi observada. Uma grande variedade no tamanho e na forma das partículas implantadas foi evidente nas seções histológicas. A quantidade de osso e de cartilagem formada em torno dos implantes intramusculares variou de acordo com a origem da partícula. Depois de quatro semanas, não houve nova formação óssea ou tecido de cartilagem em torno das partículas de três bancos diferentes. Enquanto não houve aparente resposta imunológica destas partículas, elas foram circundadas por tecido conjuntivo denso. Até com partículas de implante do mesmo banco, a capacidade individual dos lotes para suportar osso ou cartilagem variou. Os resultados mostraram que partículas de DFDBA de diferentes marcas e diferentes tamanhos apresentam uma capacidade de induzir nova formação óssea, mas as duas não estão relacionadas. O estudo também indicou que dentro da ampla variação das preparações dos bancos de tecido de DFDBA, existe também, uma ampla variação na capacidade de induzir nova formação óssea também.

Becker et al. (1998) avaliaram a formação óssea, que ocorre após implantação de DFDBA, matriz de osso bovino anorgânico, osso autógeno e hBMP/NCP em alvéolos humanos. Foram selecionados cinco pacientes, que possuíam pelo menos um elemento dental indicado para extração. Os materiais foram enxertados logo após as extrações; inseridos microparafusos e, após um intervalo de cicatrização, que variou de três até sete meses, foram feitas biópsias dos sítios implantados, para relatar a quantidade de osso novo e osso não vital de cada amostra e também a formação óssea em torno dos microparafusos. E o resultado revelou, primariamente, partículas de osso não vital de DFDBA retidas em

tecido fibroso, similarmente aos achados para o osso bovino anorgânico. Já para o osso autógeno, as biópsias revelaram uma combinação de osso novo e tecido conjuntivo retido em chips de osso não vital. E o hBMP/NCP demonstraram grande quantidade de osso lamelar viável, incluindo canais vasculares e pequena quantidade de tecido ósseo. Concluíram os autores que o DFDBA, o osso bovino anorgânico ou o osso autógeno não contribuem para a reparação de alvéolos e que somente o hBMP/NCP demonstrou significantes quantidades de nova formação óssea.

Schwartz et al. (1998) examinaram se o gênero ou a idade do doador de DFDBA contribuem para a variação da capacidade de formação óssea, como as variações de preparação, que ocorrem dependendo do banco e do lote, como já citado em artigo deste mesmo autor, anteriormente. Neste estudo, vinte e sete lotes de um mesmo banco de tecidos foi analisado e a metodologia foi semelhante à do artigo já citado, utilizando ratos, onde partículas de DFDBA, de sete homens e vinte mulheres, foram implantadas, aleatoriamente, sob a forma de cápsulas gelatinosas, intramuscularmente (10 mg), nas duas pernas, por um período de cinquenta e seis dias (oito semanas). O material foi recolhido para análise histológica, e dois observadores classificaram o material, através de análise microscópica, em pontos:

1 = presença de partículas de DFDBA sem qualquer osso; 2= presença de novo osso num sitio e coberto menos de 40% da superfície da área examinada; 3=presença de novo osso em mais de um sitio cobrindo mais que 40% da superfície da área examinada.

Foi obtido o seguinte resultado:

Cinco lotes tiveram pequena ou nenhuma capacidade de induzir osso (pontos < 1.5); Onze lotes demonstraram moderada capacidade de induzir osso (pontos 1.5 a 2.0); Sete lotes demonstraram ótima capacidade de indução (pontos 2.0 a 2.5); e quatro lotes tiveram excelente capacidade de indução (pontos >2.50). Histologicamente, lotes de DFDBA, que tinham pontos igual a 1, não exibiram formação óssea, e as partículas de DFDBA estavam circundadas de tecido conjuntivo denso. Em contraste, lotes de DFDBA, que demonstraram altos pontos, induziram o novo osso, que inclui um ou mais ossículos (tecido como osso circundando uma área de tecido ósseo como medula). Os ossículos foram circundados por tecido conjuntivo e músculo. Os lotes também foram divididos em três grupos, conforme a idade do doador: a. 0 a 29 anos; b. 30 a 49 anos; e c. 50 anos, tendo como resultado que o DFDBA de doadores acima de 50 anos mostrou, significativamente, menor indução óssea. Em conclusão, os autores afirmam que os resultados deste estudo indicam que, apesar de a capacidade do DFDBA ser osteoindutora, a atividade pode variar consideravelmente entre as amostras do mesmo banco, dependendo da idade do doador. Desta forma, parece que deve ser usado DFDBA de doadores abaixo de 50 anos. O gênero do doador não afeta a capacidade osteoindutora do DFDBA e estes resultados sugerem que o potencial osteogênico de cada lote de DFDBA deve ser determinado antes do uso clínico pelos bancos de tecido.

Paul et al. (2001) avaliaram histologicamente o potencial do DFDBA em induzir nova formação óssea em sítios não capazes de possuir atividade osteogênica. Foram selecionados sete pacientes, que possuíam defeitos periodontais, que iriam usar membranas não-reabsorvíveis, para tratamento destes

defeitos e, para o experimento, foram inseridas cápsulas de propileno, contendo 0.25 cc de DFDBA abaixo das membranas. Cinco pacientes receberam o tratamento diretamente em defeitos de furca e os outros dois em defeitos de rebordo alveolar, sendo que num destes defeitos foi realizada perfuração, com brocas no leito para aumentar a irrigação. O material foi colhido para análise histológica, após oito semanas, pois foi o tempo necessário para remoção das membranas. Histologicamente, todas as espécimes foram primariamente dominadas por tecido conjuntivo denso fibroso. Numerosas lacunas circulares, lobulares, e cilíndricas foram vistas por todo o tecido. Macrófagos e células de tecido gigantes foram notadas. As partículas de DFDBA estavam entremeadas por todo tecido conjuntivo e, geralmente, observadas como osso lamelar não vital, com formas irregulares, e não mostrando nenhuma evidência de mineralização e de reabsorção. Em geral, uma nova formação osteóide ou nova formação óssea foi notada, adjacente ou intimamente associada com o enxerto implantado. Ocasionalmente infiltrados, linfocitários foram notados, mas estes infiltrados foram células singulares dispersas; eles não pareciam estar associados com o material birrefringente ou com DFDBA. O padrão de vasos sanguíneos estava dentro de uma linha normal, apresentando-se bem formados, apesar de células do epitélio endotelial terem sido notadas, sugerindo possivelmente uma formação de vasos casuais. Já as duas espécimes removidas do defeito de rebordo mostraram diferenças de valores notórios; no geral, apresentaram menor quantidade de elementos inflamatórios, apesar de os infiltrados terem sido perivasculares evidentes em outras amostras. Um pouco de fragmentos de osso vital foi visto, tanto em cápsulas preenchidas com DFDBA, como em uma cápsula vazia. Houve, também, um único instante de aparente produção osteóide em contato com as partículas de DFDBA. Embora ambos exibissem traços de

quantidade do osso vital, o osso foi geralmente não contínuo com as partículas de DFDBA. As partículas de DFDBA mostraram-se dispersas, com falta de inflamação e relativa celularidade de tecido conjuntivo ao redor delas. Na verdade, as partículas são notadas pela separação das fibras colágenas das bordas; isso indica a falta (ou mínima presença) de união coesiva entre as partículas e o tecido conjuntivo colágeno. Houve uma única área por toda a espécime, na qual a formação osteóide nova foi notada e diretamente associada com partículas de DFDBA. Diante disto, os autores concluíram que os resultados deste estudo piloto não deram respaldo ao potencial osteoindutor do DFDBA, quando utilizados em quantidades normalmente associadas com enxerto ósseo periodontal.

Garcia e Albergaria-Barbosa (2002) realizaram um estudo para avaliar a capacidade de regeneração óssea de um enxerto ósseo desmineralizado e liofilizado de origem humana, em calvária de coelhos. Foi utilizado um total de nove coelhos e em cada um foram preparadas quatro cavidades ósseas, com trefina de 10 mm de diâmetro, duas cavidades do lado direito, que foram preenchidas com o enxerto ósseo, sendo este o grupo de estudo, e duas cavidades do lado esquerdo, que foram utilizadas como grupo controle e preenchidas apenas com sangue do animal. Os animais foram sacrificados após três, sete e quinze semanas, obtendo-se o seguinte resultado:

- na terceira semana havia tecido conjuntivo nas cavidades do grupo controle, alguns vasos, discreta reação inflamatória, e remodelação óssea nas bordas da cavidade. Já no grupo de estudo, as cavidades estavam preenchidas com muitas partículas do material e tecido conjuntivo denso com intensa reação inflamatória, apresentando, em uma das amostras, células na superfície das partículas que sugeriam atividade osteoblástica, com aposição de osso neoformado.

- na sétima semana, as cavidades do grupo controle estavam preenchidas com tecido conjuntivo, tendo tecido ósseo neoformado, a partir das bordas da cavidade. Já o grupo de estudo apresentou remodelação nas bordas da cavidade e algumas partículas recobertas por osso neoformado. Havia, também, tecido conjuntivo denso, com discreto infiltrado inflamatório no meio da cavidade e algumas partículas em reabsorção com osteoclastos na sua superfície. Por outro lado, outras partículas se apresentavam ao lado de tecido ósseo neoformado.

- na décima quinta semana, o grupo controle apresentava tecido conjuntivo denso envolvendo ilhotas de osso neoformado, próximo às bordas da cavidade que se desenvolviam em direção ao centro. O limite entre a cavidade óssea e o osso pré-existente no grupo de estudo ainda podia ser identificado. Uma ponte de tecido ósseo neoformado ocupava quase toda a extensão da cavidade. Entretanto, no centro, havia tecido conjuntivo denso e algumas partículas reabsorvidas. As ilhas de tecido ósseo formavam uma ponte entre as bordas da cavidade, tendendo a fechá-la com uma espessura menor que as bordas do osso pré-existente. Os autores concluem que o enxerto melhorou a neoformação óssea nos defeitos criados cirurgicamente que, mesmo após quinze semanas, não houve regeneração óssea completa e algumas amostras apresentavam material residual, demonstrando que apenas parte do material é substituído por tecido ósseo, enquanto a maior parte é reabsorvida.

Boëk-Neto et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar, histológica e histometricamente, a formação óssea, após cirurgia para levantamento de seio maxilar, com enxerto do osso autógeno, misturado, tanto com DFDBA como com hidroxiapatita. Foram selecionados dez pacientes que tinham, no mínimo, 4 mm de altura óssea entre o assoalho do seio maxilar e o rebordo alveolar. Os pacientes

foram divididos em dois grupos: cinco pacientes receberam osso autógeno com DFDBA na proporção de 1:1, para o levantamento de seio maxilar, os outros pacientes, receberam osso autógeno com hidroxiapatita, também, na proporção de 1:1. Os resultados foram obtidos após dez meses de cicatrização e, revelaram, presença de osso maduro, com alta densidade óssea, nos dois grupos. Partículas de hidroxiapatita foram parcialmente ou totalmente circundadas por tecido fibroso e as partículas de DFDBA, apresentaram-se integradas na massa óssea. Estas partículas estavam presentes na proporção de 8.24% para o DFDBA e 6.85% para a hidroxiapatita. O processo de formação óssea foi identificado pela presença de osteoblastos e pela presença do sistema Harvesiano. Concluindo os autores que, tanto o DFDBA, como a hidroxiapatita, são biocompatíveis e permitem osteocondução. Os materiais, não foram totalmente reabsorvidos, após dez meses e o remanescente ficou integrado ao osso neoformado.

Kimble et al. (2004) avaliaram clinicamente o uso de DFDBA como um material de enxerto, inserido sob uma membrana de colágeno, no tratamento de recessões gengivais. Selecionaram vinte pacientes, cada um, com pelo menos um elemento dental apresentando recessão gengival maior ou igual a 3mm, sendo este: incisivo, canino ou um pré-molar, os quais, foram tratados com uma membrana de colágeno e um retalho posicionado apicalmente. Em dez pacientes, foi inserido DFDBA sob a membrana. Foram realizadas medidas clínicas da: profundidade da recessão, largura da recessão, nível de inserção clínica e profundidade de sondagem, antes e após seis meses das cirurgias. Os dois tipos de tratamento foram efetivos, sendo que a média de recobrimento das raízes foi de 15.2% à 68.4% para os pacientes tratados somente com utilização da membrana e 11.7% à 74.3% para os pacientes tratados com membrana e DFDBA. Concluindo os autores que, houve

uma diferença nos tratamentos, apresentando melhores resultados com o uso da membrana e do DFDBA, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

3.3.2 Osso liofilizado bovino

Melcher (1962) relata que o osso liofilizado bovino é um osso não inorgânico, com a parte orgânica removida por meio de diamineoetileno, peróxido de hidrogênio e detergentes fortes, sendo posteriormente esterilizado em autoclave. Este osso, apresenta, na sua composição básica, 70% de fosfocarbonato de cálcio e magnésio na forma natural, e 30% de proteínas. A matriz mineral (composta de fosfocarbonato de cálcio e magnésio) é mantida na forma natural, e a matriz orgânica é destruída por digestão enzimática. Após a separação da fase mineral, o osso bovino se apresenta com alto teor de pureza e composição exatamente próxima da matriz mineral do osso humano. Num segundo passo, é devolvido à matriz mineral obtida o mesmo teor de proteínas que foi retirado, só que, agora, na forma de uma condição não imunogênica. A esterilização é feita por raios gama.

Taga et al. (1997) avaliaram o potencial de uma matriz óssea bovina no reparo de defeitos ósseos perenes provocados em crânios de cobaias. Um total de vinte e quatro defeitos ósseos de oito mm de diâmetro foi produzido com trefina cirúrgica na calvária de doze cobaias machos e adultos. Em cada animal, um defeito foi preenchido com partículas de osso aglutinadas com sangue do próprio animal e o outro somente com coágulo sanguíneo. As calvárias de quatro cobaias, foram coletadas após um, três e seis meses. Os espécimes foram analisados histologicamente e indicaram que: **a.** todos os defeitos ósseos preenchidos somente com coágulo sanguíneo estavam totalmente abertos e continham tecido conjuntivo fibroso; e **b.** nos defeitos ósseos preenchidos com osso, as partículas foram reabsorvidas, em quase sua totalidade, já após três meses. Aos seis meses, o espaço da lesão estava totalmente ocupado por tecido ósseo em estado avançado

de organização; em um caso deste grupo, permaneceu uma pequena abertura lateral. Os autores concluíram que a matriz óssea possui capacidade de estimular a formação de novo tecido ósseo em defeitos como os preenchidos neste experimento.

Camelo et al. (1998) avaliaram a reação clínica, radiográfica e histológica do osso bovino, quando usado isoladamente ou em combinação com uma membrana de colágeno, em defeitos periodontais, em quatro dentes anteriores, em humanos. Antes da cirurgia, os pacientes passaram por raspagem e alisamento dos dentes e por mensurações de profundidade de sondagem da bolsa e do nível de inserção. No ato cirúrgico, foram realizadas perfurações nos defeitos, com brocas, e os defeitos foram preenchidos com osso bovino; dois dos quatro defeitos receberam, além do osso bovino, a membrana de colágeno. Entre seis e nove meses após a cirurgia, foram realizadas radiografias e novas mensurações clínicas e, então, foi realizada a cirurgia, para remoção do elemento dental e do defeito original. E os resultados mostram: no **caso 1** (lesão de 6 mm na mesial do elemento 23) – tratado somente com osso bovino – clinicamente, o nível de inserção aumentou 4mm, não ocorreu recessão e não foi visto nenhum sinal de inflamação. Radiograficamente, havia uma radiopacidade e, histologicamente, as partículas do osso bovino estavam completamente inclusas em um composto lamelar denso e em tecido ósseo e próximo das superfícies radiculares algumas partículas estavam cercadas de tecido conjuntivo. No **caso 2** (lesão de 6 mm na distal do elemento 32) – tratado somente com osso bovino – clinicamente, apresentou ganho de inserção de 5 mm; radiograficamente, aos seis meses, o defeito original era quase invisível e, histologicamente, o novo osso havia invadido as partículas de mineral ósseo das paredes e da borda apical do defeito e, na porção coronal estavam inclusas em

tecido conjuntivo; no **caso 3** (lesão de 7 mm na distal do elemento 43) – tratado com osso bovino e membrana – depois de sete meses apresentou um ganho de inserção de 7 mm e, radiograficamente, parecia haver um preenchimento completo da lesão original. Histologicamente, houve uma formação densa de novo osso, na maior parte do local enxertado e a barreira de colágeno estava intacta, apesar de uma reabsorção estar começando. As partículas do enxerto apresentaram-se quase completamente inclusas no novo osso e este novo osso parecia começar na superfície das partículas. Havia um novo osso denso, adjacente às paredes ósseas do defeito; no **caso 4** (lesão de 7 mm na mesial do elemento 13) – tratado com osso e membrana – depois de nove meses, tinha um ganho de inserção clínica de 4 mm e, radiograficamente, havia uma radiopacidade crescente; porém, o enxerto ainda podia ser percebido. Já histologicamente, a membrana apresentou-se parcialmente degradada e o defeito estava completamente preenchido com partículas de enxerto, que haviam crescido internamente com o novo osso na extensão apical da lesão. Parte do material do enxerto estava cercado por tecido conjuntivo e uma reação inflamatória moderada foi observada. Os autores concluíram que o osso bovino parece agir como uma verdadeira matriz osteocondutora, capaz de estimular a formação de osso e que esta capacidade é enfatizada quando é usado em conjunto com uma membrana de colágeno.

Araújo; Machado; Isolan (2000) realizaram um estudo histológico do enxerto de osso bovino em defeitos padronizados em mandíbula de cães. Para este fim, foram utilizadas dez cachorras, nas quais foram produzidos dois defeitos ósseos, no corpo da mandíbula, correspondente à região de 1º molar inferior, até 3º molar inferior esquerdo, que tinham 16mm², distantes 4 mm um do outro. E em um defeito, foi inserido o osso bovino (grupo experimental) e o outro defeito foi somente

preenchido com coágulo (grupo controle) . Cada grupo possuía duas cachorras, que foram assim sacrificadas: grupo I – 15 dias; grupo II – 30 dias; grupo III – 45 dias; grupo IV – 60 dias e grupo V – 90 dias. Ao microscópio, foram encontrados estágios de neoformação óssea, similares tanto no grupo controle, como no grupo experimental, e também observou-se que em ambos os grupos não ocorreu preenchimento total das lojas óssea. Aos 15 dias, a loja com osso bovino apresentou intenso processo inflamatório e o material estava sendo reabsorvido por células gigantes de corpo estranho. Já com 30 dias, o processo inflamatório já era mais discreto, e o material estava sendo reabsorvido por células gigantes de corpo estranho e em menor número. Aos 90 dias, a loja com osso bovino continha osso remanescente na periferia, osso neoformado adjacente ao primeiro e tecido conjuntivo fibroso, na região inferior. No controle, temos osso remanescente na periferia, osso neoformado adjacente ao primeiro e tecido conjuntivo fibroso. Concluíram os autores que o material mostrou biocompatibilidade parcial e que, também, não houve ganho na ossificação com a presença do material .

Herculiani et al. (2000) estudaram o processo de reparo ósseo, com a utilização de membrana bovina, associada ou não a enxerto de osso bovino, através da confecção de defeitos cirúrgicos de 12 mm de diâmetro na calvária de trinta e sete cobaias. Os animais foram divididos em dois grupos de quinze animais cada, um grupo controle com cinco; e um grupo 0 hora com dois animais. No primeiro grupo, a lesão foi preenchida com coágulo sanguíneo do próprio animal e recoberta com membrana; no segundo, a lesão foi preenchida com osso bovino, aglutinado com coágulo, e recoberta com membrana; no grupo controle e no 0 hora não foi utilizado nenhum tratamento, somente preenchida a lesão com coágulo sanguíneo do próprio animal. As calvárias dos grupos experimentais, em subgrupos de cinco

animais, foram coletadas um, três e seis meses após as cirurgias; as do grupo controle, após seis meses e as do grupo 0 hora, logo após a cirurgia. As peças obtidas foram submetidas à análise radiográfica e histológica. A análise dos resultados mostrou que todos os animais do grupo controle apresentavam o defeito preenchido com menor quantidade de tecido ósseo, formado a partir da sua borda, do que nos grupos experimentais e grande quantidade de tecido conjuntivo, no espaço da lesão. O grupo recoberto apenas com membrana apresentou significativo crescimento ósseo na borda, chegando, ao final de seis meses, com 52% da área da lesão ocupada por tecido ósseo. No grupo tratado com osso bovino e membrana, a formação óssea periférica, a partir da borda, foi menor que o do grupo anterior. No entanto, ao final de seis meses, 62% do espaço da lesão estava preenchido por novo tecido ósseo. Neste caso, o crescimento ósseo ocorreu principalmente em forma de ilhas, no interior da lesão. Embora em nenhum dos casos tenha ocorrido o fechamento completo da lesão, a formação de maior quantidade de tecido ósseo no grupo tratado com enxerto bovino e membrana em relação ao controle, mostrou que este tipo de tratamento pode ser uma alternativa no tratamento cirúrgico de lesões ósseas perenes de menor tamanho.

Sicca et al. (2000) realizaram um estudo com o propósito de avaliar, comparativamente, a resposta celular em subcutâneo de sessenta ratos ao enxerto de osso bovino na forma microgranular (250 – 1000 μ m) e macrogranular (1000 – 2000). Os animais foram divididos em três grupos de cinco: grupo I – controle, com cápsulas de colágeno vazias; grupo II – com partículas de osso cortical microgranular; grupo III – com partículas de osso cortical macrogranular. As biópsias foram feitas após 10, 20, 30 e 60 dias da implantação do material, através do sacrifício dos animais e remoção das peças. A análise microscópica mostrou para

ambos uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação, contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material. A partícula microgranular induziu uma resposta celular pouco mais exuberante, após 10 dias da implantação, diferença que não foi mais observada após 60 dias. A análise bioquímica não acusou diferenças substanciais entre os grupos testados: atividade específica da fosfatase ácida total foi mais acentuada no início do processo, em resposta à forma microgranular mas, praticamente, igualou-se ao grupo macrogranular, depois de 60 dias. Os autores puderam concluir que osso bovino macro ou microgranular pode ser usado como material de preenchimento osteosubstituto.

Batista e Sant'ana Filho (2001) avaliaram o uso do osso bovino em defeitos produzidos em trinta ratas, distribuídas em três grupos (cada um com 10 animais) conforme o tempo do sacrifício. Com o uso de uma broca esférica, foram confeccionadas duas cavidades, uma proximal e outra distal, no fêmur esquerdo de cada animal, sendo que a cavidade proximal foi preenchida com o osso bovino e, na cavidade distal, nenhum material foi implantado. Os animais foram sacrificados em 7, 14 e 28 dias e divididos pelos três grupos já citados. A avaliação da resposta tecidual consistiu em análise histomorfométrica, pela mensuração das áreas de trabéculas ósseas, do tecido conjuntivo e do número de células gigantes multinucleadas presentes no campo. Os resultados obtidos mostraram que o osso bovino não provocou aumento significativo do trabeculado ósseo, quando comparados, com as amostras nas quais não foi utilizado o enxerto, sendo estas pertencentes ao grupo controle, e que o material implantado promoveu aumento do trabeculado ósseo, com o passar do tempo, especialmente após 28 dias da realização do implante. Os autores também encontraram como resultado que

nenhuma diferença significativa foi observada na proporção de tecido conjuntivo entre os grupos de 7, 14 e 28 dias, nem entre as amostras experimentais e de controle. O material induziu o aumento do número de células gigantes multinucleadas, quando comparados com os grupos de 7, 14 e 28 dias. Os autores concluíram que o osso bovino auxilia o processo de reparo nas cavidades ósseas, sendo facilitado pelo mecanismo de osteocondução, com tendência a ser reabsorvido e substituído, com o tempo, por tecido ósseo do organismo receptor.

Oliveira; Brito; Fonseca (2001) avaliaram a reparação óssea em cavidades preenchidas com osso liofilizado bovino em tíbias de ratos. No experimento, utilizaram dez ratos da espécie *Whistar* e realizaram duas trepanações, com 1,5 mm de diâmetro e também 1,5 mm de profundidade, uma em cada tíbia do animal, usando a cavidade da tíbia direita como experimental, na qual inseriram o enxerto xenógeno; na cavidade da tíbia esquerda, como controle, ficou somente o coágulo. Os animais foram sacrificados após vinte e um dias e as peças foram analisadas histologicamente. Na análise do microscópio, observaram que a formação óssea encontrada no grupo experimental foi mais intensificada pela presença do material, formando um tecido ósseo do tipo trabeculado, predominando entre moderado e intenso, enquanto no grupo controle houve uma total ausência de trabeculado com uma ossificação centrípeta, do tipo cortical. O tipo de ossificação centrípeta foi predominante no grupo controle, enquanto no experimental não se pode observar esta relação de osteogênese. Assim, os autores concluíram que o material implantado provoca aumento significativo do número de trabéculas ósseas, quando comparadas às do grupo controle, e que crescimento ósseo, no grupo controle, realiza-se a partir das corticais (osteogênese centrípeta). No grupo experimental predomina a formação de tecido ósseo do tipo trabeculado, ao longo do material

implantado reabsorvível na cavidade (osteogênese trabecular) e, por fim eles observaram não haver qualquer reação de corpo estranho provocada pelo material.

Consolaro et al. (2002) realizaram a avaliação de implantes de osso bovino liofilizado e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado no reparo de defeitos ósseos provocados em tíbias de ratos. Para isto foram utilizados vinte ratos machos, nos quais foram realizados quarenta defeitos ósseos de aproximadamente 3 mm de diâmetro, através de uma broca de fissura 701, nas tíbias direita e esquerda dos animais. Em cada animal, um defeito foi preenchido com osso bovino e membrana reabsorvível (sendo este o grupo experimental) e o outro somente recoberto com coágulo sanguíneo do animal (sendo este o controle); em seguida, as feridas foram suturadas. Foram divididos em cinco grupos de quatro animais cada e sacrificados nos tempos de 3, 7, 10, 20 e 40 dias; foi removida a tíbia, preservando o periósteo, contendo a cavidade simples e a cavidade onde o osso bovino foi enxertado. As peças foram fixadas e foram obtidos os cortes histológicos. Na análise, tanto o controle como o experimental, aos 7 dias, haviam áreas iniciais de neoformação óssea, na periferia das lojas cirúrgicas, com grande quantidade de osteoblastos e tecido osteóide. Nos tempos de 10, 20, e 40 dias, o grupo controle apresentou um padrão de neoformação óssea, que se manteve uniforme, culminando com o preenchimento da loja cirúrgica já a partir do período de 20 dias. Já no experimental com 20 dias, a formação óssea teve seu início junto à cortical oposta, da periferia para o centro, preenchendo parcialmente a loja cirúrgica. E, aos 40 dias, as lojas cirúrgicas encontravam-se praticamente reparadas com tecido ósseo pouco trabeculado, com a formação óssea preenchendo a loja cirúrgica, não ultrapassando, contudo, seu limite externo. Os autores concluíram que os materiais são reabsorvíveis, dispensam um segundo procedimento cirúrgico, favorecem um

preenchimento adequado de toda a loja óssea e são eficazes no reparo de lesões ósseas.

Furlani; Konig Júnior; Nogueira (2002) avaliaram histológica e ultraestruturalmente, a neoformação óssea de enxertos bovinos implantados em tíbias de coelhos. Para este fim, utilizaram seis coelhos, nos quais foram produzidos dois defeitos de 5 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade, em cada tíbia; a seguir o material foi enxertado e depois disto os animais foram sacrificados, após um período 8 semanas. Foram removidas as peças, para análise histológica, e observou-se ocorrência de processos ósseos emitidos pelo osso cortical do hospedeiro, unindo o enxerto à cortical, principalmente na base do enxerto, seguindo em direção ao centro do enxerto, mostrando que o material agiu como osteocondutor; na microscopia eletrônica de varredura, foram reforçados os achados da microscopia de luz, e observou-se, em uma vista panorâmica, o aspecto superficial do material enxertado no interior da cavidade medular, com presença de microporosidades de osso cortical adjacentes ao material. Concluíram os autores que o enxerto bovino comporta-se como material biocompatível com os tecidos circunjacentes, com propriedades potencialmente osteocondutoras, apresentando neoformação óssea mais evidente no interior do enxerto e nas áreas onde havia uma maior proximidade do enxerto com a camada cortical. Os resultados na microscopia de luz e eletrônica de varredura indicam que este tipo de enxerto obteve uma boa osseointegração, devido a presença de zonas de continuidade com a cortical do osso do hospedeiro e a presença de processo ósseos.

Ersanli; Olgac; Leblebicioglu (2003) realizaram um estudo histológico de defeitos enxertados, com osso bovino e membrana de colágeno bovino. Foram selecionados para este estudo, onze pacientes que possuíam áreas desdentadas

em maxila e mandíbula. Em vinte e sete defeitos foram realizados enxertos, e após sete meses, os locais foram reabertos, para inserção de implantes osseointegrados, neste ato cirúrgico, foi coletado material para a análise histológica. Os autores encontraram, o seguinte resultado: 70% de vascularização e 67% de atividade osteoclástica, comprovada por células osteoblásticas e osteoclásticas, nas 27 amostras colhidas após 7 meses de cicatrização. Havia material residual em todas as amostras e, este material, ocupava em média 22% da área regenerada. A porcentagem do novo osso formado, foi de 46% à 29% para amostras da maxila e 75% à 21% para amostras da mandíbula. Os autores concluíram que a osteogênese foi completada e a proporção de vascularização e atividade osteoclástica, foi reduzida nos 7 meses. Além disto, a maxila teve: formação óssea, vascularização e quantidade de material residual, significativamente diferente da mandíbula.

3.3.3 Vidro bioativo

Há duas formas de vidro bioativo disponíveis no mercado, atualmente, em relação ao tamanho da partícula: 90-710 μm e 30 – 320 μm . O vidro bioativo é composto de CaO , Na_2O , SiO_2 , P_2O_5 e une-se ao osso através do desenvolvimento de uma camada de carbonato de hidroxapatita. Quando exposto a fluídos dos tecidos, o vidro bioativo fica coberto por uma dupla camada composta de gel de sílica e uma rica camada de fosfato de cálcio. A camada de fosfato de cálcio promove adsorção e concentração de proteínas utilizadas pelos osteoblastos para formar a matriz extracelular mineralizada. É bem conhecido, na literatura, que ele promove osteogênese e permite rápida formação de tecido ósseo.

Perioglas apresenta um tamanho de partícula de 90 até 710 μm , que facilita a sua introdução nos defeitos ósseos. Observações deste material sugerem que ele apresenta boa manipulação, propriedades hemostáticas e a possibilidade de não ser somente osteocondutor, mas também de agir como uma barreira para atrasar a invasão do tecido epitelial.

Schepers et al. (1993) realizaram um estudo clínico e radiográfico em oitenta e sete pacientes que possuíam cento e seis defeitos, entre eles: áreas de apicetomia, sítios alveolares recém extraídos, defeitos de rebordo alveolar e defeitos provocados por cistos, nos quais enxertaram partículas de vidro bioativo para correção destas áreas. Os controles clínicos e radiográficos foram realizados imediatamente após a cirurgia, após dois, três, quinze e vinte e quatro meses. Apresentaram como resultado mínimas mudanças de contorno das partículas de vidro em dois meses de pós operatório e, depois de três meses, os sítios pareciam estar estáveis. O tecido mole acima do defeito pareceu estar clinicamente saudável

e a palpação dos sítios cirúrgicos indicaram que as áreas tratadas estavam sólidas. As análises radiográficas mostraram uma integração das partículas de vidro nas lesões ósseas, sendo que, depois de seis meses, radiograficamente, a diferença entre as partículas de vidro e osso haviam desaparecido. Depois deste tempo nenhuma mudança no contorno do preenchimento dos defeitos e suas radiografias pareceram apresentar alguma mudança. A avaliação clínica foi no geral satisfatória. Os autores concluíram que partículas de vidro bioativo são eficientes no tratamento de defeitos ósseos orais e nas investigações clínicas e radiográficas realizadas.

Furusawa; Mizunuma (1997), através de estudo histológico e radiográfico, avaliaram a reabsorção e a formação óssea que o vidro bioativo pode ter em levantamento de seio de humanos. Foram selecionados vinte e cinco pacientes, que passaram por cirurgia de levantamento de seio e, após 7 meses foram realizadas radiografias e tomografias, e também passaram pela reabertura do local enxertado de onde foram colhidas amostras para biópsia. Um total de cinquenta amostras foram analisadas. Radiograficamente, houve um aumento, em média, de 3mm em altura óssea. E, histologicamente, as biópsias indicam que o mecanismo de formação óssea do vidro bioativo enxertado difere, dependendo do local da observação da coleta. Amostras que foram feitas próximas a um osso pré-existente mostraram crescimento ósseo envolvendo os grânulos. Amostras feitas da porção central do sítio enxertado, que não estavam em contato com o tecido ósseo, mostraram crescimento ósseo, iniciando de núcleos escavados daqueles grânulos que desenvolveram fissuras. Células inflamatórias não foram vistas na matriz óssea do vidro bioativo. Os autores sugerem que o vidro bioativo como material de enxerto ósseo promove crescimento ósseo. As propriedades biomecânicas da nova formação óssea foram próximas do tecido ósseo normal.

Johnson et al. (1997), em um estudo em coelhos, avaliaram, histologicamente, a interface formada entre o vidro bioativo, tecido ósseo e implantes de titânio. Para isto, realizaram a colocação de quatro implantes de titânio, dois em cada tibia do animal, provocando defeitos ósseos ao redor de três dos implantes, servindo o quarto implante de controle. Dois defeitos foram preenchidos com vidro bioativo e o terceiro não foi preenchido para poder ser utilizado como controle. Os animais foram sacrificados com uma, duas, três, seis, doze e vinte e quatro semanas. As espécimes foram analisadas ao microscópio e os resultados encontrados pelos autores foram:

- na primeira semana, o defeito controle foi preenchido com tecido fibrovascular, com mínima formação de osso novo. Entretanto os defeitos preenchidos com vidro bioativo mostraram uma abundante formação osteóide em torno do material;
- na segunda semana, as amostras de vidro bioativo demonstraram intermitente calcificação, com formação osteóide por todo o defeito. E novamente o controle mostrou mínima formação óssea e não contato com o implante;
- na terceira semana, o controle mostrou pequena mudança com mínima formação óssea, mas o vidro bioativo apresentou-se próximo de um completo preenchimento com osso imaturo;
- com seis semanas, o controle estava próximo do preenchimento, mas o vidro bioativo estava completamente preenchido com osso imaturo cortical;
- na décima segunda semana, havia osso maduro, preenchendo completamente o defeito controle e o defeito preenchido com vidro bioativo. A nova formação óssea, nos defeitos preenchidos com vidro bioativo, pareceu mais densa ao microscópio, com melhor adaptação à superfície do implante;

- na vigésima quarta semana as espécimes apresentaram-se similares, mas a densidade do osso, no defeito com vidro bioativo, parecia subjetivamente superior. Os resultados histomorfológicos confirmaram estas observações. Concluíram os autores que o vidro bioativo pode ser utilizado como material de preenchimento de defeitos ósseos.

Schmitt et al. (1997) compararam a regeneração óssea promovida histológica e radiograficamente por dois materiais considerados substitutos ósseos: vidro bioativo e osso poroso mineral. O experimento foi realizado através de defeitos padrões criados no rádio de vinte e quatro coelhos, sendo que doze animais tiveram seus defeitos preenchidos com osso poroso mineral e os outros doze animais tiveram os defeitos preenchidos com vidro bioativo, e divididos em 2 grupos, um sacrificado com quatro semanas e o outro sacrificado com oito semanas. Radiograficamente, o osso poroso mineral apresentou-se mais radiopaco, tanto na 4ª como na 8ª semana, em relação ao vidro bioativo. E, histologicamente, na 4ª semana, os defeitos tratados com osso poroso não mostraram desenvolvimento. Já os tratados com vidro bioativo, tinham osso primariamente progredindo centripetamente das margens, e as partículas ou foram circundadas por tecido ósseo em regeneração ou estavam envolvidas por tecido fibroso. E a formação óssea poderia estar induzida a partir de numerosos osteoblastos observados no osso trabecular misturado com o vidro. Já o osso poroso pareceu estar distribuído, eventualmente, por todo o defeito com novo osso nas partículas e ao seu redor. Não ocorreram evidências de reabsorção osteoclástica em nenhuma partícula, nem em nenhum dos dois tipos de tratamento. Houve, porém mais significativa formação óssea nos defeitos tratados com osso poroso do que nos tratados com vidro bioativo. Já na 8ª semana, os achados histológicos mostraram mais completa

renovação do contorno ósseo (em cinco das seis amostras) no osso do que o vidro bioativo (1 de 6 amostras). Novamente, não houve resposta osteoclástica em nenhum dos tratamentos. Porém, as trabéculas de osso foram mais robustas nas amostras do osso poroso com evidentes canais de Havers desenvolvidos. No geral, houve mais formação de novo osso nos tratados com osso poroso do que com vidro. Entretanto, a quantidade de novo osso promovida pelo osso poroso, em oito semanas foi menor que em quatro semanas, enquanto não houve diferenças na quantidade de vidro bioativo formado na 4ª e na 8ª semanas. E a quantidade de osso poroso residual na 4ª e 8ª semanas não foi diferente; mas, já houve menos vidro bioativo na 8ª que na 4ª semana. Concluíram os autores que ambos materiais apresentam osteocondução; porém, ocorreu maior regeneração óssea em cavidades tratadas com osso poroso do que nas tratadas com vidro bioativo.

Wheeler et al. (1998) avaliaram, mecânica e histologicamente, a regeneração óssea, que ocorre em fêmur de coelhos, utilizando vidro bioativo com partículas de granulações diferentes. Um material chamado P tinha partículas que variavam de 90 a 710 μm e o chamado B partículas que variavam de 300 a 360 μm . A pesquisa foi realizada em vinte e dois coelhos; em doze foi provocado um defeito de 6 mm em cada fêmur e preenchido o lado direito com o material P e o lado esquerdo com material B. Deste grupo seis foram sacrificados com quatro semanas e os outros seis foram sacrificados com doze semanas. E os dez restantes não tiveram defeitos provocados e foram utilizados como referência de osso normal. A porcentagem e a proporção de osso encontrado no P e osso normal foi maior que em B, para ambos os tempos operatórios: quatro e doze semanas. Não houve diferença significativa na proporção de reabsorção das partículas de P e B; porém, havia mais partículas de P dentro do defeito, quando comparadas com B. Nenhuma diferença na

proporção de aposição mineral foi encontrada entre P , B e osso normal. Não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros mecânicos de comparação, ou seja, o módulo de compressão e o módulo de rigidez dos materiais P e B comparados com osso normal, foram muito semelhantes.

Nevins et al. (2000) determinaram, histologicamente, o tipo de cicatrização que ocorre em defeitos intraósseos de humanos, quando preenchidos com vidro bioativo , a biocompatibilidade deste material e o seu potencial de osteocondução, e, por fim, realizou também avaliações clínicas e radiográficas dos resultados deste processo de regeneração. Foram analisados cinco pacientes, cada um com apenas um defeito ósseo; primeiramente, passaram por terapia periodontal e, após quatro semanas, foram medidos os níveis de inserção clínica, recessão relativa, profundidade de bolsa, tendo cada paciente um guia de resina personalizado para que cada uma destas medidas fossem realizadas no mesmo ponto, nos novos tempos de pós-operatório. Foi criado, também, um guia para padronizar as radiografias realizadas. O procedimento cirúrgico foi realizado com degranulação do defeito, as paredes corticais foram perfuradas e seguiram com a colocação de vidro bioativo neste defeito, tendo sido colocada, ainda, uma membrana reabsorvível antes da sutura. Após seis meses, foram realizadas novas mensurações clínicas, e os resultados obtidos mostraram redução de 2,7 mm de profundidade de bolsa, 2,2 mm de ganho de inserção e 0,5 mm de recessão. A análise histológica foi realizada com biópsias retiradas dos locais enxertados, após sete meses em 3 casos e após doze meses em 2 casos, e os novos defeitos foram preenchidos com osso autógeno, alógeno ou uma combinação destes, sempre com uma barreira, para, posteriormente, serem instalados implantes nestes pacientes, revelando-nos cicatrização ao longo do epitélio juncional, com um mínimo de novo tecido

conjuntivo. As partículas do material estavam misturadas ao tecido conjuntivo com um mínimo de infiltrado inflamatório, mostrando, assim, sua biocompatibilidade. E houve mínima formação óssea nova, limitada à borda mais apical dos defeitos. Já a avaliação radiográfica não mostrou resultado conclusivo, pois houve dificuldades na interpretação, já que o material apresentou-se radiopaco, desde o momento de sua inserção até o tempo de recuperação.

Knapp et al. (2003) avaliaram clínica e histologicamente a reparação de defeitos de rebordo alveolar tratados com partículas de vidro bioativo, utilizando 12 pacientes sem espessura de rebordo alveolar, por ausência de um elemento dental, que necessitavam da colocação de implantes, neste local. Os pacientes passaram por terapia periodontal, exames imageológicos e confecção de um guia de acrílico. O aumento foi programado para depois da completa terapia periodontal. Foram realizadas radiografias panorâmicas, periapicais e tomografias, no pré - operatório. O guia foi posicionado e uma sonda periodontal foi utilizada para medidas verticais a 0.5 mm de um sulco confeccionado no guia. A largura do rebordo foi mensurada a 4.0 mm apical da crista. A cortical foi perfurada até expor o sangramento do osso medular. O vidro foi colocado de forma a aumentar a largura do rebordo em pelo menos 6 mm, para posterior colocação dos implantes. E uma barreira de titânio (TR e-PTFE) foi utilizada, por cima do material e fixada por tachinhas. Aproximadamente 2 mm de espaço foi deixado entre os elementos dentais adjacentes e a membrana. Houve exposição prematura da barreira, em seis dos doze pacientes e foram removidas, antes da cirurgia, para colocação dos implantes. Sítios sem exposição da barreira apresentaram uma variação de 0 a 4.5 mm no ganho de largura óssea, e os sítios com exposição da barreira apresentaram uma variação de menos 1 mm a 1 mm, de largura. Foram cinco defeitos mandibulares e sete maxilares, e não houve

diferença significativa entre as medidas. Na maxila, a largura do rebordo variou de menos 1mm para 4.5 mm e, na mandíbula, a variação na largura foi de 0 a 2.5 mm. A mudança na altura do rebordo variou de uma perda de 2mm a um ganho de 0.5 mm. Somente oito pacientes receberam implantes nos sítios enxertados. Destes, quatro implantes expuseram as roscas, requerendo uma nova cirurgia de enxerto. Quatro pacientes não receberam implantes, pois não havia largura de rebordo suficiente. Na média, 80% dos sítios dos implantes com barreiras não expostas receberam implantes, enquanto 50% dos sítios com exposição da barreira receberam implantes. Todas as biopsias foram feitas, pelos menos, em seis meses. Houve um amplo achado histológico, onde a porcentagem de osso formado variou de 0 a 79%. Seis das dez biópsias tinham 10%, ou menos, de osso. O osso observado variou de um tecido ósseo imaturo para um osso lamelar, com linhas reversas e ósteons bem definidos. Somente duas espécimes demonstram formação óssea em torno das partículas de vidro. A porcentagem de material residual variou de 0 a 38%. O restante das espécimes exibiram tecido conjuntivo, encapsulando as partículas. Partículas residuais variaram em forma e tamanho. Somente uma espécime exibiu vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. Os autores concluíram que, na maioria das espécimes biopsiadas, partículas de vidro bioativo residuais estavam encapsuladas por tecido conjuntivo. Muito material residual não reabsorvido foi visto circundando o novo osso. A falta de significância clínica no aumento da largura do rebordo, combinada com o tecido conjuntivo encapsulando a maioria das partículas do material residual, levam os autores a sugerir que o vidro bioativo com uma membrana não reabsorvível não pode ser usado para defeitos localizados, com a finalidade de promover aumento do tecido ósseo, para posterior colocação de implantes.

3.3.4 Estudos comparativos

Diès et al. (1996) estudaram histologicamente a eficácia da restauração de deiscências ósseas, após a extração de elementos dentais, em alvéolos enxertados, com osso bovino ou DFDBA, recobertos com membrana de e-PTFE. Foram selecionados doze pacientes que tinham sinais, clínicos e radiográficos, de avançada perda óssea, causada por doença periodontal ou fratura de algum elemento dental. Esses pacientes foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo era constituído de seis pacientes, que foram tratados somente com membrana; no segundo grupo, quatro pacientes, foram tratados com DFDBA e membrana e, os outros dois, foram tratados com osso bovino e membrana. Após seis a nove meses, as biópsias foram colhidas e somente onze, das doze biópsias, foram processadas. Os resultados histológicos, do grupo tratado somente com membrana, revelaram um osso trabecular maduro, no qual os osteócitos estavam envoltos em osso mineralizado e os osteoblastos lineavam a superfície, indicando, andamento no processo de mineralização. Já no grupo tratado com DFDBA e membrana, histologicamente, houve uma variação na reabsorção das partículas de material, comparando as quatro amostras, e apesar das partículas estarem presentes, havia tecido ósseo circundando-as. Era um tecido ósseo lamelar maduro, com numeroso espaços medulares. Os resultados histológicos do grupo tratado com osso bovino e membrana apresentaram, uma excelente formação óssea, onde as partículas do material estavam, circundadas por tecido ósseo, com numerosos osteócitos dentro da matriz óssea. Os autores concluíram que a regeneração das deiscências ósseas ocorre, tanto com o uso somente de membrana ou com o uso de membrana e

enxertos, no entanto, essa regeneração parece ocorrer em maior tempo, quando usamos algum tipo de material de enxerto.

Tal (1999) avaliou a sobrevivência de um enxerto autógeno de tecido conjuntivo sobre alvéolos recém-extraídos enxertados com DFDBA ou osso bovino. Participaram do estudo vinte e quatro pacientes, que tinham pelo menos um elemento dental anterior superior com indicação para extração. Um total de quarenta e dois elementos dentais anteriores foram extraídos e os alvéolos, foram preenchidos com os enxertos. Os enxertos de conjuntivo foram classificados em vitais, parcialmente vitais e não-vitais. Após uma semana de pós-operatório 43% eram vitais, 31% parcialmente vitais e 26% não-vitais. Os alvéolos preenchidos com DFDBA apresentaram uma porcentagem de tecido conjuntivo vital de 57%, enquanto os preenchidos com osso bovino apresentaram uma porcentagem de 29% de tecido conjuntivo vital. O autor concluiu que os enxertos de conjuntivo autógeno sobre alvéolos recém-extraídos, têm sua cicatrização ligada a vascularização tecidual, no entanto, cicatrizam tanto sobre enxertos de DFDBA como de osso bovino.

Carvalho et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar, histologicamente o potencial de reparação óssea e a osteocondução de um osso bovino e um vidro bioativo, após 3, 10, 20 e 30 dias, em cavidades preparadas em tíbias de ratos. Para isso, foram utilizados vinte ratos. Após anestesia geral, incisão e divulsão tecidual, duas cavidades, com cerca de 3 mm de diâmetro, foram preparadas em cada tíbia. As cavidades mais próximas da articulação foram preenchidas apenas por coágulo (controle) e as mais distais receberam os materiais, sendo que, na tíbia direita, colocou-se osso bovino e, na esquerda, vidro bioativo. Como resultado, os autores encontraram, aos três dias, tecido conjuntivo rico em fibroblastos e com poucas células inflamatórias, nas cavidades preenchidas pelos materiais. No entanto,

observou-se que, aos dez dias, a porção cortical estava completamente reparada nos três grupos, sendo possível notar neoformação óssea em todos eles, além de o tecido ósseo encontrar-se em íntimo contato com os materiais implantados. Essa observação tornou-se mais evidente, após vinte ou trinta dias, concluindo os autores que o osso bovino e o vidro bioativo não foram absorvidos e promoveram o reparo integral das cavidades ósseas.

Froum et al. (2002) avaliaram, histologicamente, a cicatrização óssea que ocorre em alvéolos humanos preenchidos pós exodontia com vidro bioativo e DFDBA. Selecionaram dezenove pacientes com trinta elementos dentários perdidos e realizaram a exodontia desses elementos, preenchendo assim, dez alvéolos com vidro bioativo, dez alvéolos com DFDBA e em dez alvéolos somente se realizou o debridamento. Após seis a oito meses de cicatrização, os pacientes foram novamente chamados para colocação de implantes, nos locais onde os materiais haviam sido enxertados. Seguiu-se, então, com a reabertura, e utilizou-se um guia, com a posição exata do enxerto, colhendo-se o material, com uma trefina, para análise histológica e histométrica. Os autores encontraram, então, uma porcentagem maior de osso vital (59.5%) para as amostras cicatrizadas com vidro bioativo e porcentagens semelhantes para o DFDBA (34.7%) e controle (32.4%), concluindo que o vidro bioativo apresenta efeito positivo na cicatrização de alvéolos dentários.

Stavropoulos et al. (2003) avaliaram, histologicamente, a regeneração tecidual guiada a longo prazo, produzida por osso bovino e vidro bioativo, em ratos. Foram utilizados dezoito ratos e o procedimento, consistiu em uma incisão ao longo da borda inferior da mandíbula, expondo o ramo da mandíbula e a inserção de uma cápsula rígida de Teflon (6 mm de diâmetro), sendo que a porção aberta, ficou voltada para a face da superfície lateral do ramo. No grupo um, a cápsula era

preenchida com osso bovino; no grupo dois com vidro bioativo e no grupo três (grupo controle) a cápsula era inserida sem nenhum preenchimento. A incisão foi suturada e os ratos foram controlados durante doze meses. Após este período, as cápsulas foram removidas e foram analisadas histologicamente. Como resultado o autor encontrou formação óssea limitada nos grupos um e dois. A maior parte do espaço originalmente criado pelas cápsulas, estava ocupado, por partículas de enxerto envoltas em tecido conjuntivo. O volume do novo osso formado, nos animais que receberam o osso bovino, foi de 23%. Já nos animais que receberam o vidro bioativo, o volume do novo osso era de 12,6%. No grupo controle, a porcentagem do novo osso, foi de 88,2%. Não houve sinais de nova formação óssea em andamento em nenhum dos três grupos experimentais no tempo de doze meses. Os autores concluíram que, tanto o osso bovino, como o vidro bioativo, são, um adjunto na regeneração tecidual guiada, estimulando a nova formação óssea.

4. MATERIAL E MÉTODO

Nesta pesquisa experimental, foram utilizados seis cães adultos, machos da espécie Beagle, com boas condições de saúde. Os cães foram pesados e tinham peso médio de 14 kg.

O método experimental constituiu de observação e descrição histológica da anatomia das regiões submetidas a enxertos, utilizando-se osso liofilizado humano ¹, com partículas de 500 µm, osso liofilizado bovino orgânico ², com micropartículas de 250 a 1.000 µm, vidro bioativo ³, com partículas de 90 a 710 µm, coágulo sanguíneo e membrana de colágeno bovino reabsorvível de 1mm de espessura e formato 2cm por 3cm ⁴.

Para cada animal, foram preparados quatro campos extra-orais, duas feridas na face anterior de cada tibia, sendo que, na tibia direita, o defeito produzido proximal ao fêmur foi chamado de A; o mais distal de B e, na tibia esquerda, o defeito proximal à tibia foi chamado de C e o distal D. Estes receberam enxertos com osso liofilizado humano, osso liofilizado bovino, vidro bioativo e o defeito restante ficou sem qualquer tipo de material de enxerto, apenas com coágulo sanguíneo, de forma randomizada em ambos os grupos. Todos foram cobertos com membrana de colágeno bovino, sendo um grupo de três cães acompanhado por sete dias e o outro por 28 dias.

-
- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. DFDBA Ohio Valley, Cincinnati, Ohio | 2. Genox, Mogi Mirim, São Paulo |
| 3. Perioglas, Aluchua, Flórida | 4. USP, São Paulo, São Paulo |

4.1 Manutenção dos animais

Durante o experimento, os animais ficaram no canil do UNITOX (pertencente à UNISA) e habitaram baias individuais, com ótimas condições de higiene e ventilação, sendo assistidos por um tratador e um médico veterinário. As acomodações e os cativeiros eram limpos na parte da manhã, período em que os cães ficavam soltos em uma área apropriada e tomavam sol. A dieta consistiu de ração comercial ⁵, sendo fornecidos 400 g por dia para cada animal e água "ad libitum". Toda a pesquisa foi feita de acordo com a RESOLUÇÃO 196/96, do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE/MS, sob Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa, envolvendo animais (Extraído na íntegra do Diário Oficial da União), e também de acordo com a Declaração de Helsinque, além de aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA.

4. Max filhote, Três Corações, Minas Gerais

4.2 Procedimentos de anestesia

Como medicação pré-anestésica foi utilizado sulfato de atropina, na dose de 0.04mg/kg, e após dez minutos, foi aplicado acepromazina 1% na dose de 1,0 mg/kg, ambos por via subcutânea, todos no próprio canil.

Em seguida, os animais foram levados para a sala de técnica cirúrgica, onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos. Para indução e manutenção da anestesia foi utilizado Tiopental sódico, na dose de 12,5 mg/kg, por via intravenosa. A manutenção dos planos anestésicos foi monitorada através de oxímetro, bem como a observação dos reflexos (digital, palpebral), além da mensuração das frequências vitais. Os animais foram entubados com sonda endotraqueal e assim mantidos até o final do procedimento.

4.3 Acesso cirúrgico aos campos

Todos os procedimentos foram executados pelos mesmos operadores e assistentes, sob condições assépticas, seguindo-se, sempre, o mesmo protocolo cirúrgico, tendo sido realizado em um grupo de três cães e, após 21 dias, no outro grupo, também de três cães. As manobras cirúrgicas foram realizadas sob anestesia geral, na sala de técnica cirúrgica, equipada para este fim, sob assistência do anestesista geral e médico veterinário. Previamente ao acesso cirúrgico, foi realizada a tricotomia do aspecto externo das pernas direita e esquerda dos animais e a antissepsia da região foi realizada com álcool-iodado.

Sob ação de anestésico local, mepivacaína com levonordefrina 1: 20.000, realizada com seringa carpule e agulha gengival curta, iniciamos o procedimento pela tibia direita e, para expô-la, foi realizada incisão, na pele, com 5 cm, e celular subcutâneo, tendo como ponto de referência a distal do fêmur. A incisão foi feita com bisturi cirúrgico número 3 (Bard-Parker), portando lâmina descartável número 15. Em seguida, procedeu-se à divulsão do tecido subcutâneo, com tesoura Mayo, de ponta romba, e chegou-se à exposição do tecido ósseo.

No longo eixo das duas tíbias de cada animal, foram confeccionados dois defeitos ósseos, sendo um para osso liofilizado humano, um para osso liofilizado bovino, um para vidro bioativo e o último, sem material de enxertia, apenas ficou com o coágulo sangüíneo. Todos foram recobertos com membrana reabsorvível de colágeno.

A penetração para produção do defeito foi realizada com fresas de um *kit* para implantes de formato cônico da empresa Conexão Sistemas de Prótese,

seguindo a mesma seqüência que utilizamos para colocação dos implantes cônicos, com a fresa *start*, a *drill* 2.0, a piloto 2.0/3.0, a *drill* 3.0, e a cônica de 3.5 mm, utilizadas, sempre, perpendicularmente ao plano sagital dos ossos, com a profundidade de 10 mm e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9%, através do uso de um contra-ângulo com redução de 16:1⁶, e um motor da empresa Kavo⁵. O primeiro defeito, chamado de A, ficou 14 mm distante da união da tíbia com a fíbula, e os outros defeitos ficaram 8 mm distantes entre si. A introdução foi realizada através da cortical, em direção ao espaço medular. Posteriormente, seguimos com as manobras de hemostasia, para coibir e prevenir a hemorragia, sendo as cavidades preenchidas com os materiais de enxerto. A fim de facilitar a localização das áreas de enxerto para estudo, o osso cortical entre as janelas ósseas foi perfurado com broca de um *kit* para colocação de enxertos, também da empresa Conexão⁷, que tinha 4mm de profundidade e 1,5 mm de diâmetro, tendo sido inseridos parafusos de enxerto, também da empresa Conexão, que funcionaram como marcadores. Tais parafusos foram inseridos com 2 mm de distância dos defeitos produzidos, sendo estas medidas realizadas com compasso de ponta seca.

6. Kavo, Joinville, Santa Catarina

7. Conexão, São Paulo, São Paulo

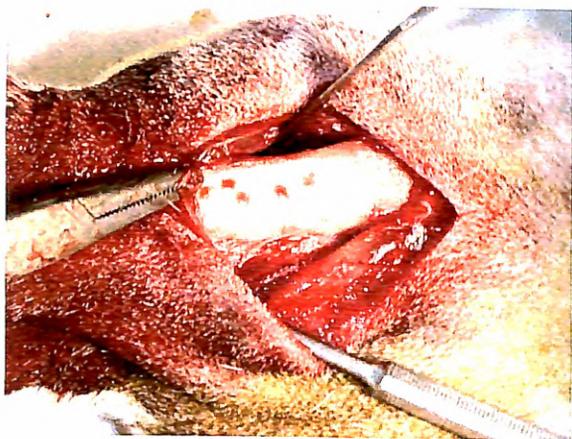


Figura 1A – exposição da tíbia



Figura 1B – início das perfurações



Figura 1C – última broca para produzir o defeito ósseo

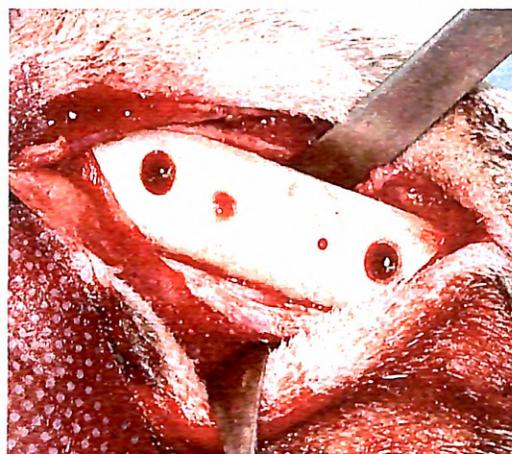


Figura 1D – defeitos ósseos produzidos com leitões para os marcadores

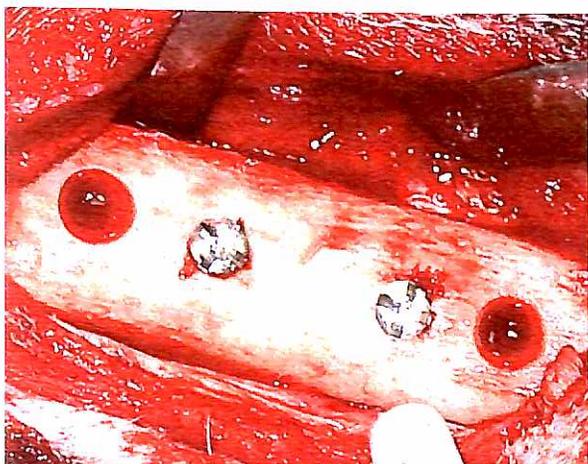


Figura 1E – marcadores inseridos

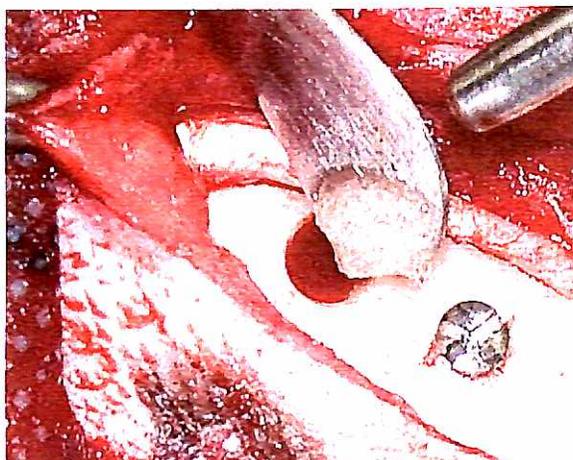


Figura 1F – inserção do vidro bioativo



Figura 1G – defeito preenchido

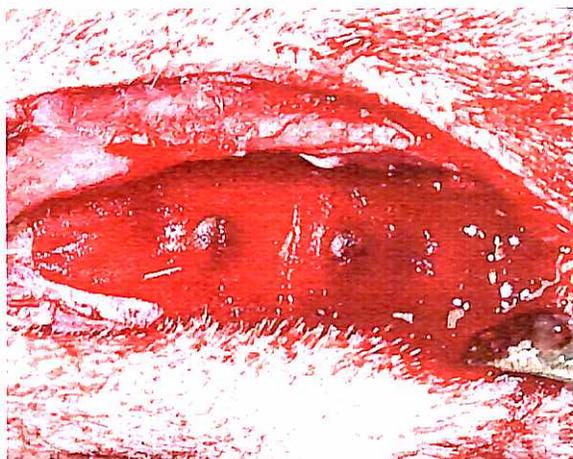


Figura 1H – membranas posicionadas

Figura 1 – Seqüência de fotografias da primeira fase do experimento

4.4 Obtenção e preparo dos materiais para enxerto

Após o preparo das cavidades ósseas, os materiais de enxerto foram preparados para inserção. O osso liofilizado humano foi fornecido em vidros estéreis, contendo 0,5 cc. Este material foi colocado em um pote Dappen, metálico estéril, e misturado a soro fisiológico a 0,9% . O osso liofilizado bovino, também fornecido em vidros estéreis contendo 0.5 cc, foi misturado ao soro, da mesma maneira, antes de ser inserido. Já o vidro bioativo estava acondicionado em potes de plástico também estéreis e seguiu da mesma maneira. Todos foram misturados ao soro com o auxílio de uma espátula número 7. As membranas foram colocadas por cima de todos os defeitos, após terem sido hidratadas em soro, numa cuba de inox.

4.5 Aplicação dos materiais de enxerto

Após a preparação dos locais cirúrgicos, os mesmos foram preenchidos com os materiais mencionados e preparados anteriormente. Os materiais de enxerto (osso liofilizado humano, osso liofilizado bovino e vidro bioativo) foram colocados dentro dos defeitos ósseos produzidos anteriormente, sendo utilizado, em média, 0,2 cc de cada material, e posicionados, preenchendo todo o compartimento. Durante este procedimento, cuidados foram tomados para não preencher excessivamente o local do enxerto, nem extravasar o material nos tecidos moles, de modo que todo material colocado ficasse recoberto pelo retalho cirúrgico. Os materiais de enxerto foram acondicionados no defeito, sendo compactados, moderadamente, usando-se calcador de amálgama, tipo Ward nº 3, obtendo-se, assim, o preenchimento completo do defeito e, com o auxílio de uma pinça dente de rato foi inserida a membrana. O campo do coágulo foi tratado do mesmo modo com coágulo sanguíneo, obtido por curetagem do local cirúrgico, com a cureta dupla, sendo o processo repetido até o coágulo preencher, com excesso, a cavidade.

Em seguida, os tecidos foram reaproximados e firmemente suturados com material atraumático.

A musculatura foi suturada com fio Vicryl nº 4-0⁸ e, com o auxílio do porta-agulha tipo Mathiew, procurou-se coaptar o tecido para recobrir completamente o enxerto, tendo-se o cuidado de não tracionar demais o retalho, evitando-se que o edema pós-operatório lhe causasse isquemia e sua posterior necrose ou deiscência de sutura. Na coaptação utilizaram-se dois tipos de sutura, pois o canil só possui dois colares tipo Elisabetano. Para os cães que ficaram com os colares foi utilizada

sutura com ponto simples e para os que não utilizaram o colar foram feitas suturas do tipo U, de Halsted (ou colchoeiro), que foram intercaladas com pontos simples, com fio de seda nº 3-0⁸, para se selarem totalmente a incisão. O local cirúrgico foi protegido por curativos.

4.6 Cuidados pós-operatórios

Como os procedimentos operatórios envolveram cirurgia de tecidos moles e duros, houve a necessidade de se administrar antibióticos e optou-se pelo enrofloxacin 5% ⁹, na dose de 1,0 ml/10Kg, por via subcutânea, durante dez dias, sendo a primeira iniciada logo após o ato cirúrgico, seguindo com as outras dez aplicações. Além da medicação antibiótica, foram também administrados, via oral, Rofecoxib, como antiinflamatório, e Dipirona+ Citrato orfenadrina ¹⁰, como analgésico.

No período de cicatrização, não houve qualquer tipo de complicação clinicamente detectável. A remoção dos pontos de sutura foi realizada 10 dias após a cirurgia.

9. Baytril

10. Dorflex

4.7 Acesso cirúrgico para obtenção das peças e análise histológica

Após sete dias da cirurgia do último grupo, foi realizada a cirurgia para coleta das peças, seguindo os mesmos passos do primeiro acesso, desde o pré-anestésico até a incisão. Após a visualização dos parafusos e dos enxertos, foi iniciada a remoção das peças, com trefinas¹¹ de 5 mm de diâmetro com 10 mm de profundidade. As trefinas possuíam o diâmetro de 5 mm para que as peças fossem constituídas, tanto do material de enxerto, como do osso periférico, ao defeito do osso da tíbia dos cães. As peças foram soltas com o auxílio de um periótomo⁸ e imediatamente inseridas, com o auxílio de uma pinça de Allis, em potes contendo formol a 10%. A partir disto, os procedimentos de coaptação dos tecidos foram seguidos, como já descrito para a primeira etapa do experimento, com fio reabsorvível internamente e, para o tecido cutâneo, foi utilizado fio de seda.

11. Dentoflex, São Paulo, São Paulo

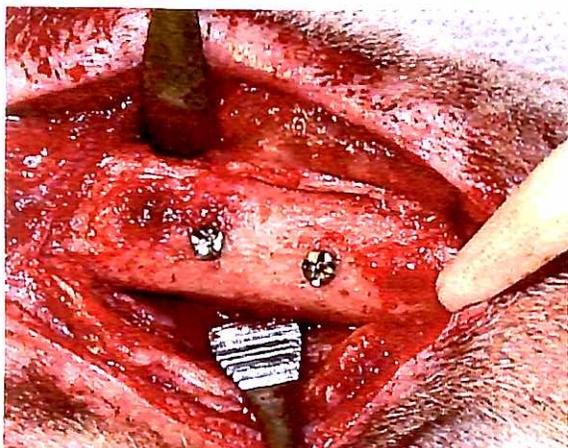


Figura 2A – reabertura após 28 dias

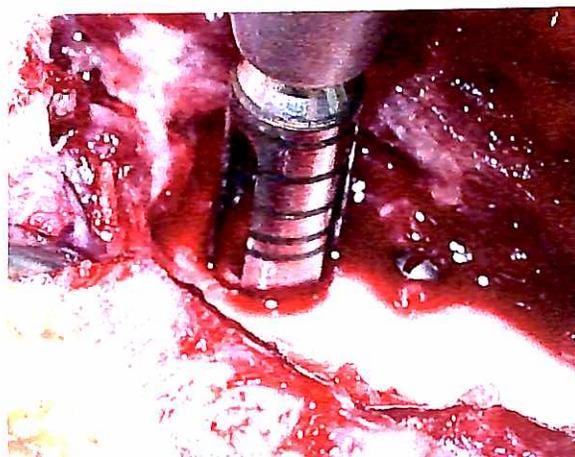


Figura 2B – trefina colhendo o material

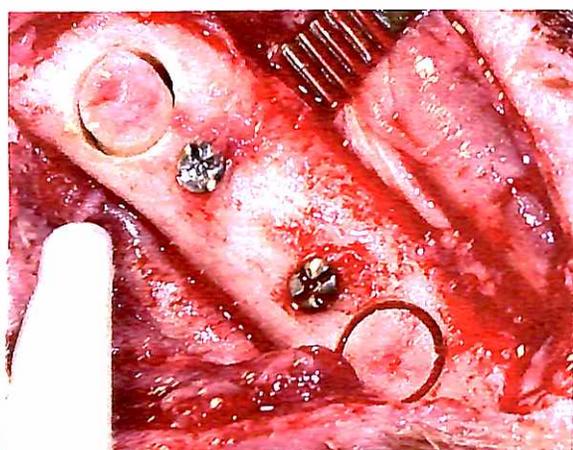


Figura 2C – material trefinado

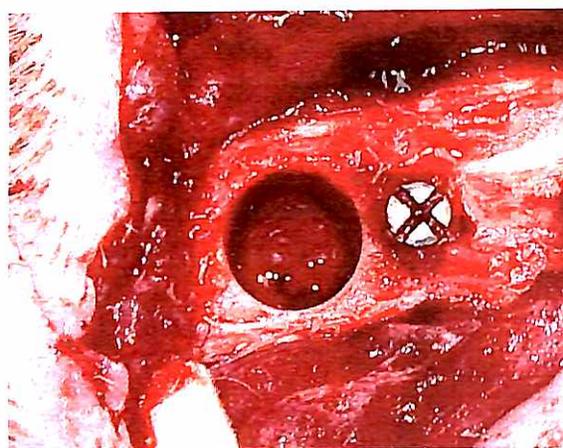


Figura 2D – cavidade óssea após o uso da trefina



Figura 2E – material coletado

Figura 2 - Seqüência de fotografias da segunda fase do experimento

4.8 Preparo histológico

As peças foram inseridas em recipientes contendo formol a 10% e preparadas no laboratório de histologia da UNISA de acordo com a técnica histológica de coloração com hematoxilina e eosina.

5 RESULTADOS

Os espécimes estudados sob microscopia ótica convencional exibiram os seguintes resultados:

A) COÁGULO SANGÜÍNEO

Todo o material da loja cirúrgica, após sete dias, examinado em menor aumento, (Figura 3), apresentou-se preenchido por tecido conjuntivo frouxo, com possibilidade de transformação em denso (maior predominância de fibras colágenas); quase todo o coágulo foi substituído por este novo tecido, apresentando alguns tipos de células como fibroblastos e macrófagos. No interior do tecido conjuntivo, notam-se aglomerados de células osteoprogenitoras.

Aqui podemos observar que ocorreu uma reação tecidual perfeita, pois há um tecido que substituiu o coágulo e este, potencialmente, apresenta características básicas suficientes para originar muitos nichos celulares, que irão formar as futuras trabéculas ósseas.

Vemos que é uma formação homogênea, variando de tecido ostóide para tecido ósseo maduro.

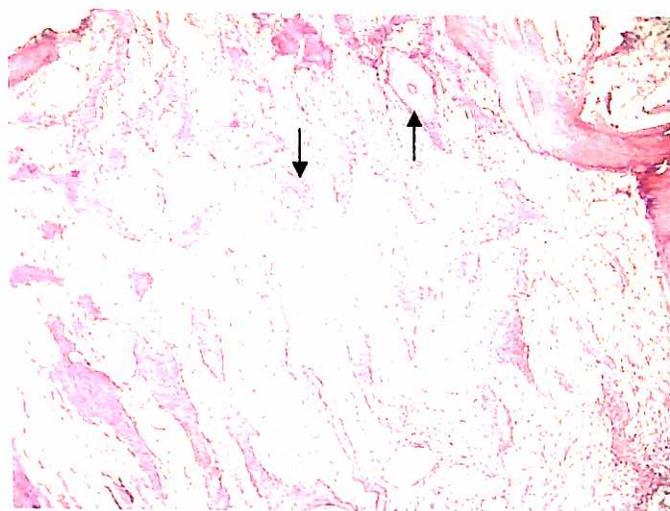


Figura 3 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sangüíneo – 07 dias – HE – aumento de 10x. Podemos observar aglomerados de células osteogênicas (setas)

Com maior aumento (fig. 4), há evidência de tecido conjuntivo bem formado, confirmando os dados obtidos no mesmo tempo de pós-operatório já citado acima. Também com mais detalhes, podemos observar as várias reuniões de células osteogênicas, que irão dar origem aos osteoblastos.

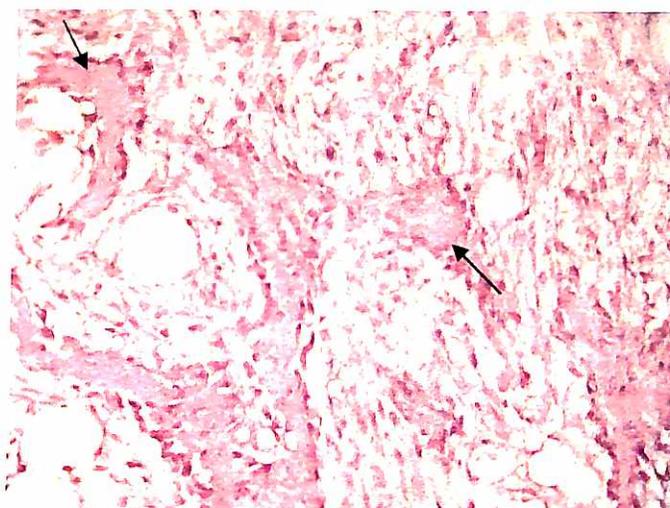


Figura 4 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sangüíneo – 07 dias – HE – aumento de 40x. Presença de aglomerados de células osteogênicas (setas)

Observa-se que, no tempo final do experimento (figura 5), no leito cirúrgico, há presença de trabéculas ósseas de tamanhos variados, constituídas de tecido ósseo maduro, apresentando uma tonalidade de coloração rósea. Entre estas trabéculas, nota-se um tecido conjuntivo preenchendo as lojas ósseas em vários tamanhos.

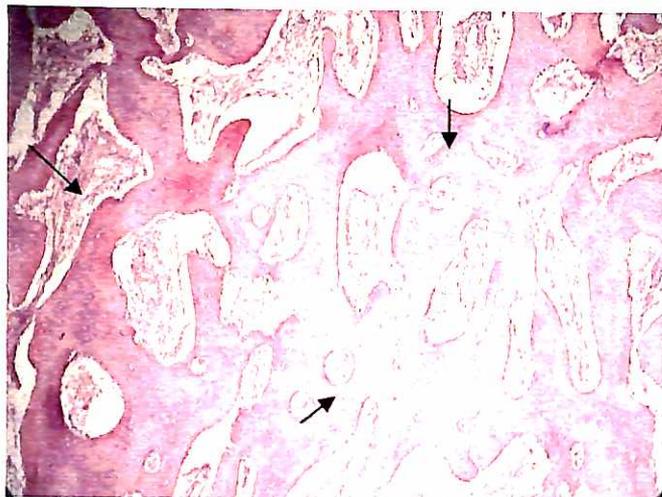


Figura 5 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sanguíneo – 28 dias – HE – aumento de 10x. Podemos observar trabéculas ósseas róseas (setas).

A ilustração mostra osteoblastos aderidos às trabéculas, na sua periferia, e a presença de osteócitos no seu interior.

Já em maior aumento (fig. 6), observa-se, com mais detalhes, a presença de osteoblastos em atividade neoformadora, constituindo um osso do tipo osteóide, apresentando osteócitos no interior das trabéculas ósseas. O tecido conjuntivo que está preenchendo as lojas é do tipo conjuntivo frouxo, com tendência a denso não modelado.

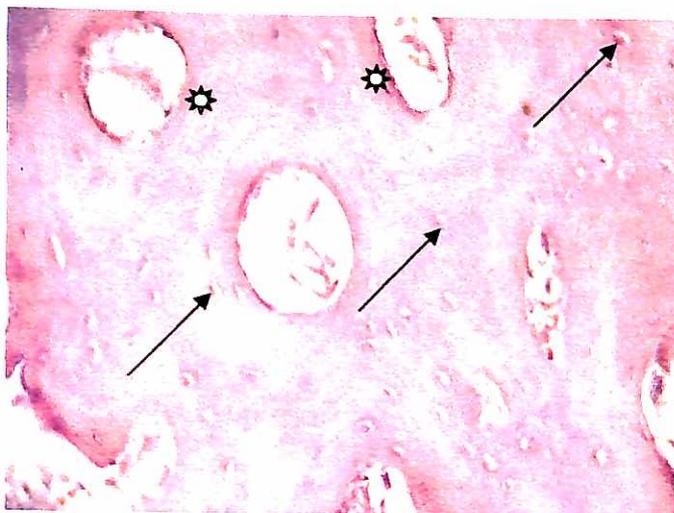


Figura 6 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com coágulo sangüíneo – 28 dias – HE – aumento de 40x. Podemos observar osteócitos (setas) e os osteoblastos (estrelas)

Neste tecido também podemos observar células do tipo fibroblasto, capilares e fibras colágenas. Isto fica mais evidente no coágulo do que em outros materiais utilizados nesta pesquisa.

B) OSSO BOVINO

No tempo inicial do experimento (fig. 7), a formação óssea visualizada ocorre em maior velocidade do que em outros campos da pesquisa que foram enxertados (exceto no coágulo). Observa-se, aqui, que as trabéculas são formadas por um osso tipo osteóide, havendo, também, regiões com presença do tecido conjuntivo e nichos para neoformação óssea.

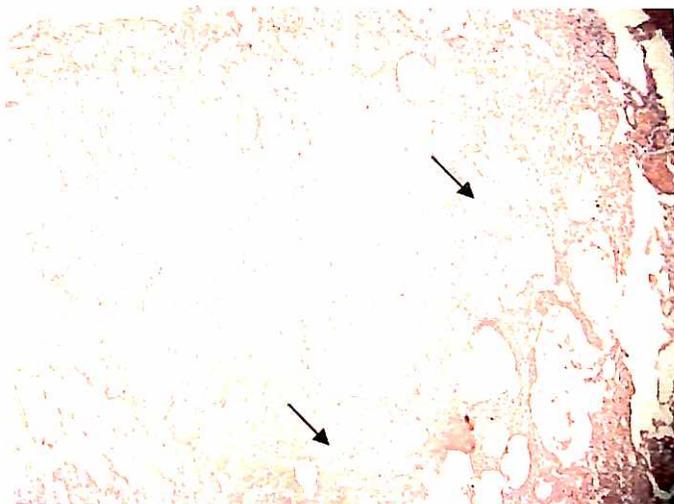


Figura 7 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino – 07 dias – HE – aumento de 10x. Podemos observar nichos para a neoformação óssea (setas)

Observou-se, em maior aumento (fig. 8), um osso todo trabeculado, semelhante a uma rede. Há, também, a presença do tecido conjuntivo com células de variedade muito grande e, entre elas, os fibroblastos.

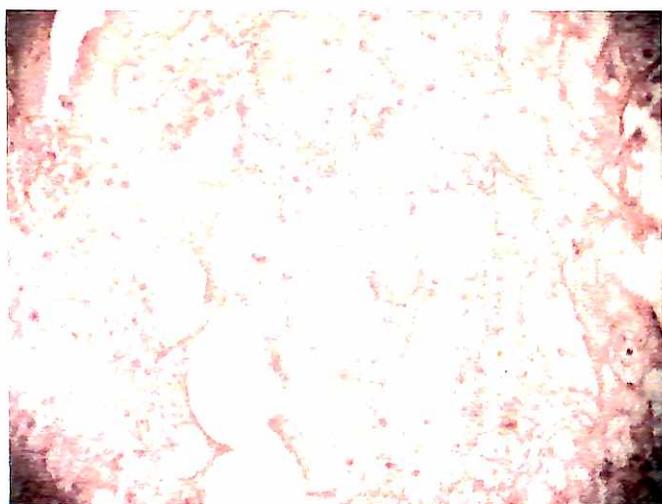


Figura 8 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino – 07 dias – HE – aumento de 40x

No final do experimento (fig. 9), há numerosas trabéculas, delimitando cavidades preenchidas com tecido conjuntivo, mostrando que o osso bovino foi reabsorvido e isto possibilitou a formação de tecido conjuntivo nas cavidades.

As trabéculas apresentam-se em várias espessuras, com uma formação não homogênea e várias tonalidades de mineralização (maduro, osteóide e fibroso) – setas duplas.

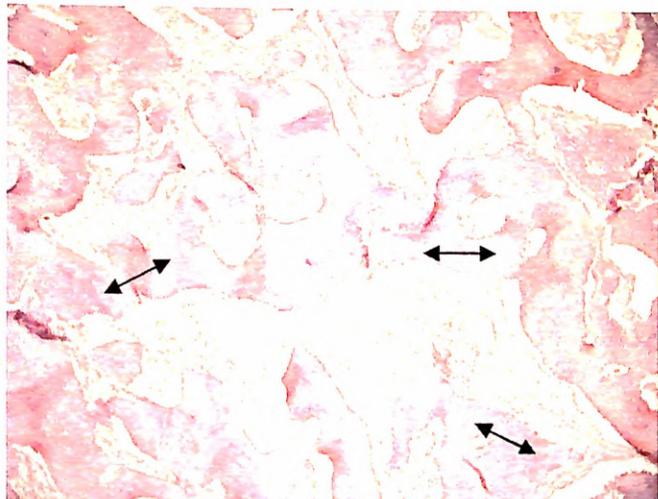


Figura 9 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino – 28 dias – HE – aumento de 10x. Podemos observar as tonalidades de mineralização das trabéculas (setas duplas)

Nota-se, também, a presença de osteoblastos aderidos às trabéculas. É digno de observação também um tecido conjuntivo frouxo, preenchendo as lojas ósseas com a presença de capilares.

Com maior aumento, visto na figura 10, observam-se, com mais detalhes, as trabéculas ósseas com várias tonalidades de coloração, caracterizando uma neoformação em várias etapas. O tecido conjuntivo que preenche a loja é do tipo frouxo, com fibras colágenas em várias direções. Observar-se também, os osteoblastos aderidos na periferia das trabéculas ósseas.



Figura 10 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso bovino – 28 dias – HE – aumento de 40x. Podemos observar osteoblastos aderidos na periferia das trabéculas (estrelas)

C) OSSO HUMANO

Nos cortes do tempo inicial do experimento (fig. 11), há presença de tecido conjuntivo, porém sem formação óssea, com partículas de osso humano, para estimular a neoformação (setas).

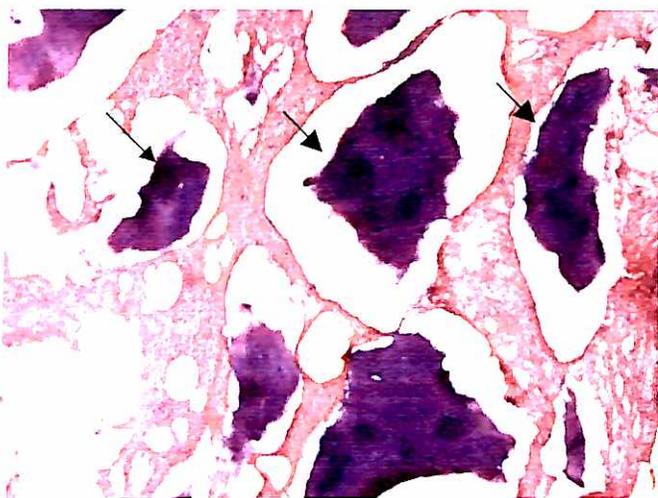


Figura 11 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano – 07 dias – HE – aumento de 10x. Podemos observar as partículas de osso humano aprisionadas (setas)

Em maior aumento (fig. 12) nota-se que dentre os materiais estudados, foi observado que este material, o osso humano, apresentou-se aprisionado no tecido no período de sete dias.

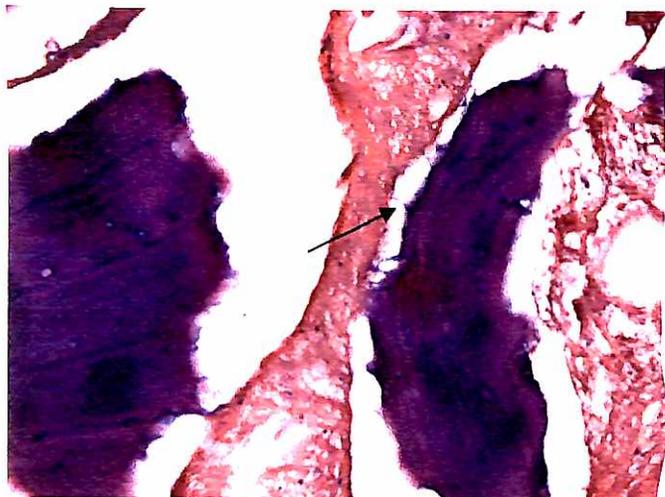


Figura 12 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano – 07 dias – HE – aumento de 40x. Observa-se a formação de pontes (seta)

Foi encontrado, no final do experimento (fig. 13), um corte histológico mostrando características semelhantes às do osso bovino, apresentando porém trabéculas menos espessas e lojas ósseas maiores, com formação mais lenta. Há predominância de osso maduro e pouca quantidade de osso fibroso. Nota-se que a cavidade está toda preenchida com tecido conjuntivo tipo frouxo.

Observam-se, ainda, como no osso bovino, trabéculas ósseas com várias tonalidades de coloração, caracterizando uma neoformação em várias etapas, porém mostrando-se menos madura, com a maior parte das trabéculas na coloração avermelhada e roxa.

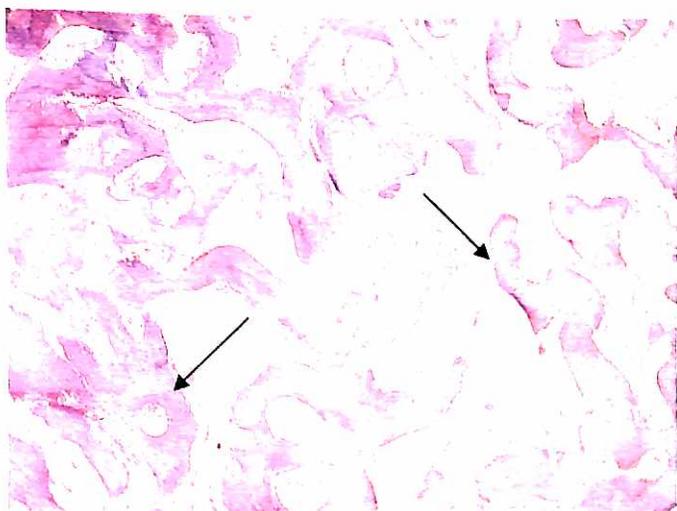


Figura 13 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano – 28 dias – HE – aumento de 10x. Observamos trabéculas menos espessas (setas)

Com aumento maior na figura 14, notam-se trabéculas com grande quantidade de osteoblastos e osteócitos e lojas preenchidas com tecido conjuntivo, contendo fibroblastos e vasos sanguíneos.

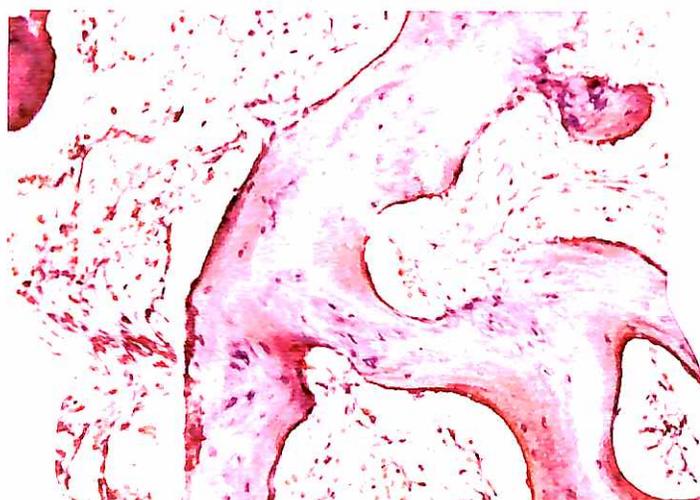


Figura 14 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com osso humano – 28 dias – HE – aumento de 40x.

D) VIDRO BIOATIVO

No início do experimento (fig. 15), observamos que há presença do material enxertado em grande quantidade.

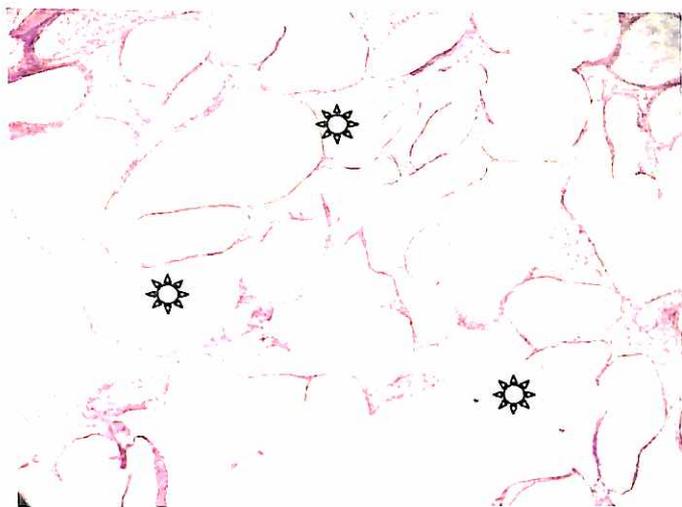


Figura 15 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro bioativo – 07 dias – HE – aumento de 10x. Observar a grande quantidade de partículas de material residual (estrelas)

Neste mesmo tempo, em maior aumento (fig. 16), a loja óssea apresenta-se revestida por tecido mais corado e micropartículas do material.

Há também um tecido conjuntivo, com variedade de células presentes.

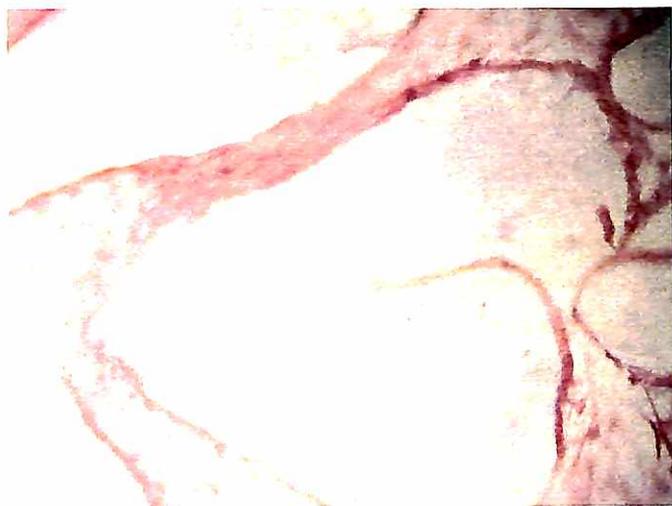


Figura 16 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro bioativo – 07 dias – HE – aumento de 40x.

No final do experimento (fig. 17), há presença de trabéculas ósseas finas e incompletas, de vários tamanhos, com neoformação deficiente, e, também, com pequena quantidade de osteoblastos. Nota-se, ainda, alguns osteócitos no interior das trabéculas.

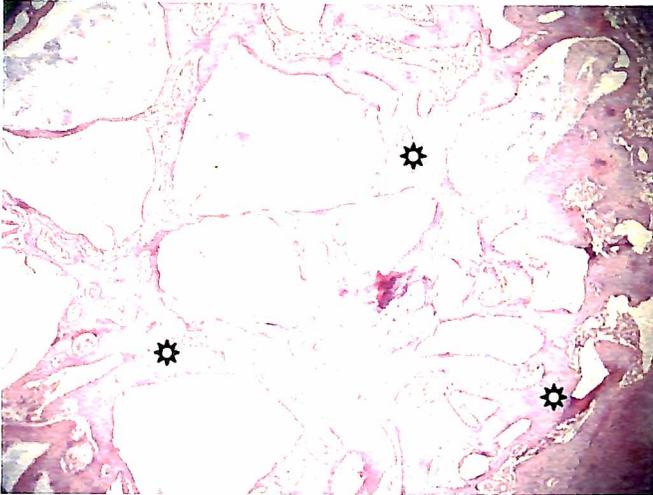


Figura 17 – Fotomicrografia da cavidade preenchida com vidro bioativo – 28 dias – HE – aumento 10x. Observar trabéculas incompletas (estrelas)

É digno de nota, também, que as cavidades ósseas são de projeções grandes; algumas raras, com presença de tecido conjuntivo no interior. É bem evidente, porém, que a maioria das lojas apresenta ainda o material enxertado.

Em maior aumento (fig. 18), é bem evidente a presença de trabéculas ósseas mal formadas com tonalidades de coloração em tons diferentes. Em algumas regiões, observa-se a presença de osteoblastos esparsos (aderidos às trabéculas) e, também, a presença de osteócitos em pequena concentração. Com este aumento, observa-se, com detalhes, a estrutura, e os componentes estruturais das cavidades sendo que umas estão preenchidas com tecido conjuntivo e outras mostram, com mais detalhes, o material usado nesta pesquisa.

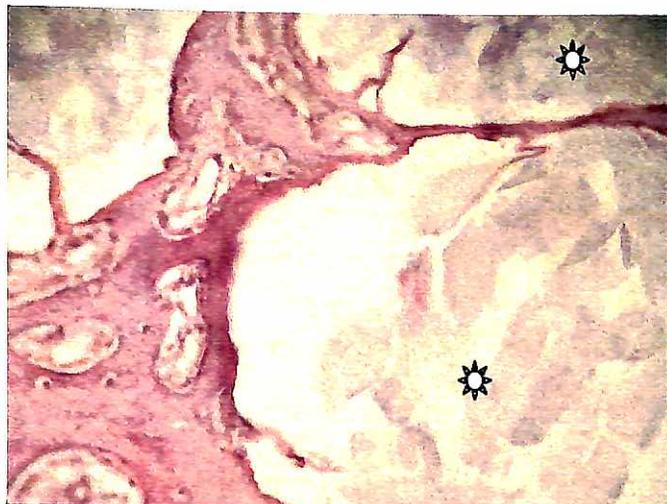


Figura 18 – Fotomicrografia da cavidade óssea preenchida com vidro bioativo – 28 dias – HE – aumento de 40x. Nota-se, ainda, grande quantidade do material (estrelas)

6. DISCUSSÃO

A busca por um material de reparação óssea para pacientes, que estão impossibilitados de reabilitação oral por implantes osseointegrados por falta da estrutura de suporte, tem estimulado muitas pesquisas nesta área, objetivando sempre o material que permita que esta reparação ocorra de maneira a proporcionar um leito semelhante ao próprio osso, para que os implantes osseointegrados tenham boa estabilidade e boa retenção.

Frente a este fato, o mercado odontológico mundial oferece uma grande variedade de materiais destinados a este objetivo e, diante disto, os três materiais utilizados neste experimento foram eleitos de acordo com o seu grande uso na clínica diária.

Diante dos resultados iniciais deste experimento, foi visto que tanto o osso bovino como o osso humano, como material de reparação óssea nos defeitos produzidos na tíbia dos cães, mostraram propriedades muito próximas à reparação óssea ocorrida nos defeitos preenchidos com coágulo sanguíneo, onde, praticamente, toda a loja cirúrgica apresentou-se com áreas iniciais de neoformação óssea, com grande quantidade de osteoblastos e trabéculas com tecido tipo osteóide.

Em relação à biocompatibilidade dos materiais utilizados neste trabalho, nos resultados finais, não foi observado nenhum sinal de inflamação associado aos enxertos demonstrado pela ausência de qualquer marcador histológico de inflamação, como por exemplo, neutrófilos e macrófagos, o que nos permite dizer que os três materiais são biocompatíveis.

Nos resultados finais, os campos estavam quase totalmente ocupados por trabéculas ósseas que, no coágulo, estavam em um estágio de maturação um pouco mais avançado, com todas as trabéculas na coloração rósea total. Já no osso bovino, elas se apresentaram em coloração arroxeada, indicando presença de tecido fibroso, coloração avermelhada, indicando presença de tecido osteóide, e também na coloração rósea, com osso maduro. Tais resultados foram semelhantes aos resultados histológicos obtidos por Consolaro et al. (2002), que estudaram o reparo de defeitos ósseos, em tibia de ratos, preenchidos com osso bovino e coágulo, encontrando, no tempo pós-operatório inicial, áreas de neoformação óssea, com grande quantidade de osteoblastos e tecido osteóide, sendo que, nos campos com os resultados finais, houve uma formação óssea, que preencheu parcialmente a loja cirúrgica.

Os campos histológicos deste experimento também mostram algumas semelhanças ao trabalho de Camelo et al. (1998), que avaliaram quatro casos, com defeitos periodontais em humanos, reparados com osso bovino, nos quais os resultados histológicos finais, de seis a nove meses, apresentaram uma neoformação, na maior parte do local enxertado com tecido conjuntivo denso, porém com partículas do enxerto ainda presentes. Provavelmente, tal fato ocorreu por existir uma diferença entre o osso bovino inorgânico usado pelo referido autor e o osso bovino orgânico que foi utilizado neste trabalho, mostrando, com isso, que o osso bovino orgânico possui maior facilidade de reabsorção.

Batista e Sant'ana Filho (2001), que utilizaram ratos como modelo experimental, com defeitos produzidos no fêmur dos animais, obtiveram resultados histológicos também semelhantes aos deste experimento. O trabeculado ósseo encontrado foi muito semelhante para lojas preenchidas com osso bovino e lojas

preenchidas com coágulo e, nos resultados finais, a proporção de tecido conjuntivo, nos dois tratamentos, foi muito semelhante com a dos campos observados aos 28 dias, tanto do osso bovino, como do coágulo.

Os achados deste trabalho mostram, no tempo final, que, nas cavidades preenchidas com vidro bioativo, houve presença de trabéculas finas, incompletas, de tamanhos variados e em quantidade muito pequena. Houve, também, pequena quantidade de osteócitos presentes, nos quais todo o defeito ainda era preenchido, na sua grande totalidade, por material residual, indicando ser um material com dificuldades de reabsorção para proporcionar neoformação, como se ele estivesse impedindo que um novo tecido fosse formado no local. Já no coágulo, o que foi notado é que havia uma grande presença de trabéculas ósseas de tamanhos variados, constituídas de tecido ósseo maduro, com grande quantidade de osteócitos aprisionados, um tipo de osso que preenche todos os requisitos de uma neoformação óssea, o que contradiz os achados de Johnson, que publicou um estudo, em 1997, em que relacionou a reparação óssea que ocorre em cavidades realizadas em tíbia de coelho preenchidas com o vidro bioativo, comparado com o coágulo sangüíneo, que chamou a atenção no tempo pós-operatório de duas semanas, o que corresponde, em média, a quatro semanas em cães, que houve calcificação intermitente com formação osteóide por todo o defeito preenchido com vidro bioativo e mínima formação óssea nos defeitos com coágulo.

Também utilizando coelhos como animal experimental, Schmitt et al. (1997) analisaram a reparação óssea promovida pelo vidro bioativo em defeitos criados nos raios destes animais, em dois tempos pós-operatórios: quatro e oito semanas. Os resultados da quarta semana mostraram as partículas do material circundadas por tecido ósseo em regeneração. Estes autores também afirmaram que tal

formação óssea poderia estar induzida por numerosos osteoblastos observados no osso misturado ao vidro. Esse resultado contradiz os achados do presente trabalho, pois, no pós-operatório final, notaram-se muitas partículas de vidro bioativo presentes na cavidade, com pouco tecido neoformado ao redor, observando-se, ainda, neste tecido, uma quantidade reduzida de osteoblastos.

De acordo com um trabalho de Schwartz et al. (1998), a idade dos doadores do DFDBA influencia a indução óssea, que ocorre intramuscularmente, na perna de ratos, quando inserido em cápsulas gelatinosas. Os autores salientam que o DFDBA possui capacidade osteoindutora; porém, esta capacidade pode variar dependendo da idade do doador, sendo que as melhores amostras analisadas foram de doadores com idade abaixo de 50 anos. Esses dados podem explicar a não osteoindução ocorrida nos campos observados deste experimento, pois os doadores do DFDBA utilizado tinham idade acima de 63 anos.

Observando as fotomicrografias dos resultados, aos sete dias, há presença de partículas do material DFDBA, que estão no local, estimulando a neoformação óssea, portanto, vemos uma atividade osteocondutora, e também, nestas mesmas imagens, não podemos deixar de salientar a visualização da grande quantidade de pontes que existe entre as partículas de DFDBA e o novo tecido que está em neoformação.

Embora a indução óssea pelo DFDBA tenha sido demonstrada em roedores, não foi demonstrada de forma conclusiva em espécies mais superiores, como cães, macacos ou humanos. Muito do contraste observado pode originar-se dos diferentes bancos de ossos e diferentes lotes do mesmo banco, que podem responder de forma diversificada, como mostrado por Schwartz et al., em 1996. Chama nossa atenção, também, o fato de diferentes processos industriais, que envolvem o

DFDBA, influenciarem nas propriedades ostetoindutoras ou osteocondutoras do produto final.

Os resultados do nosso trabalho também contradizem os de Paul et al. (2001) que, avaliando histologicamente o potencial do DFDBA de induzir a nova formação óssea, em defeitos periodontais de humanos, mostraram, que após oito semanas de implantação, os campos foram dominados por tecido conjuntivo denso fibroso, com as partículas do material misturadas a este tecido conjuntivo, mas não apresentaram nenhuma evidência de mineralização e de reabsorção. Nos nossos resultados, nos campos relativos aos 28 dias, vemos que o material proporcionou condições para neoformação óssea, já que não era mais visto como material residual. Havia, também, muitas trabéculas ósseas formadas, embora com três colorações diversas, mostrando diferentes estágios de maturação; porém, foi um campo favorável à reparação óssea por osteocondução.

Por outro lado, podemos questionar Roberts et al. (1987), que afirmam que a relação fisiológica óssea e o metabolismo ósseo humano se relacionam com os tempos do coelho e do cão, desta forma: 4,5 semanas para o coelho, 10 semanas para o cão e 13 semanas para os humanos. Desta maneira, os nossos resultados finais em relação ao DFDBA, por exemplo, correspondem, em média, aos resultados finais encontrados em humanos, em 40 dias de pós-operatório.

Diferentemente do presente trabalho experimental, Garcia e Albergaria-Barbosa (2002), num estudo para avaliar a capacidade de reparação óssea do osso humano em coelhos, encontraram, no grupo sacrificado com três semanas, nas cavidades com coágulo, remodelação nas bordas, o que já se apresentou diferente dos nossos resultados onde há trabéculas ósseas maduras por toda a loja cirúrgica. Nas cavidades com osso humano havia, neste tempo de pós-operatório, partículas

do material, envoltas em tecido conjuntivo denso, o que difere, também, do resultado presente, em que, com quatro semanas em cães, correspondente a quase duas semanas em coelhos, como citado anteriormente, o campo estava praticamente com todo o material reabsorvido e uma neoformação óssea estava presente com trabéculas quase em estado de maturação, terminadas, indicando presença de osso compatível com reparação óssea.

Outros autores realizaram experimentos semelhantes ao nosso trabalho, em relação aos materiais, comparando porém, somente dois tipos, como Froum et al. (2002), que avaliaram a cicatrização em alvéolos humanos preenchidos pós-exodontia com DFDBA e vidro bioativo, obtendo um resultado histológico, no qual o vidro bioativo apresentou uma porcentagem de reparação que os autores chamaram de osso vital, o que representa um osso maduro, maior que para o DFDBA. Isso nos causa interrogações pois, apesar do tempo pós operatório ser diferente, os resultados caminham em direção a uma melhor reparação para o DFDBA, em defeitos como os deste trabalho que, no final de nosso experimento, já possuía uma cavidade praticamente toda preenchida por trabéculas ósseas, em processo de maturação, diferentemente das cavidades com vidro, que possuíam, ainda, muito material residual em diversas cavidades.

Carvalho et al. (2002), também compararam dois tipos de material, o osso bovino e o vidro bioativo, com o coágulo sanguíneo, em cavidades preparadas em tíbias de ratos. Os resultados só tiveram semelhança quanto ao coágulo sanguíneo, que regenerou por completo toda a cavidade cirúrgica, sendo que, neste presente trabalho, o coágulo regenerou quase a totalidade da cavidade com trabéculas ósseas maduras. No entanto, em relação ao osso bovino, os autores encontraram material residual nas cavidades, no final do experimento, provavelmente também por

ser osso bovino inorgânico, diferente dos achados deste trabalho, pois, no resultado final não foram encontradas partículas de material residual nas cavidades ósseas, somente um defeito reparado com trabéculas ósseas, em fases de mineralização diferentes, tendendo a uma reparação total de toda a cavidade. Analisando o vidro bioativo, houve material residual no interior das cavidades; porém, em torno delas, o osso reparado não tinha propriedades bem desenvolvidas como nos resultados referidos pelos autores.

Sugiro que, no futuro, sejam realizadas pesquisas comparativas destes substitutos ósseos, em modelos humanos, para termos resultados comparativos em relação ao tempo de neoformação óssea e reabsorção dos materiais.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que:

1. as cavidades ósseas preenchidas com osso liofilizado bovino e osso liofilizado humano apresentam-se histologicamente com uma reparação óssea mais aproximada à do coágulo;
2. as cavidades ósseas preenchidas com o vidro bioativo apresentam-se com menor atividade neoformadora e, no final do experimento, ainda possuíam partículas remanescentes de vidro bioativo.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. C.; MACHADO, I. G.; ISOLAN, T. M. P. Avaliação histológica de implantes de osso liofilizado bovino (Bio Bone Laminado) em mandíbula de cão. **BCI**, v.7, n. 25, p. 36 – 39, 2000

ASHLEY, F. L. et al . Experimental and clinical studies on the application of monomolecular cellulose filter tubes to create artificial tendon sheaths in digits. **Plast. Reconstr. Surg.**, n.23, p. 526- 534, 1959

BATISTA, P. S.; SANT'ANA FILHO, M. Avaliação microscópica do processo de reparo em cavidades ósseas submetidas a implante de osso liofilizado bovino em fêmur de ratas. **RPG Rev. Pós. Grad.**, v. 8, n. 1, p. 62 – 69, jan./mar. 2001

BECKER, W.; BECKER, B. E.; CAFFESSE, R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 12, p. 1128-1133, 1994

BECKER, W. et al. Human Demineralized Freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice. A preliminary report. **J. Periodontol.**, v. 66, n.9, p. 822 – 828, 1995

BECKER, W. et al. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. **J. Periodontol**, v. 67, n. 10, p. 1025 – 1033, 1996

BECKER, W. et al. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 414- 421, 1998

BERGLUNDH, T; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio- Oss. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 8, p. 117-124 , 1997

BOËCK-NETO, R.J. et al. Histomorphometrical analysis of bone formed after maxillary sinus floor augmentation by grafting with a combination of autogenous bone and demineralized freeze-dried bone allograft or hydroxyapatite. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 3, p.266 – 270, 2002

- BOWERS, G. M. et al. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. **J. Periodontol.**, v. 60, n. 12, p. 683 – 693, 1989
- BRUGGENKATE, C.M. et al. Autogenous maxillary bone grafts in conjunction with placement of ITI endosseous implants: a preliminary report. **Int. Oral Maxillofac Implants** , v. 10, n. 2, p. 81-84, 1992
- BRUGNAMI, F. et al. Histologic evaluation of human extraction sockets treated with demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) and cell occlusive membrane. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 8, p. 821 – 825, 1996
- BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin Orthop**, v. 3, n. 174, p. 28-42, 1983
- CAMELO, M. et al. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-oss and Bio-guide. **Int. J. Periodont Rest Dent**, v. 18, n. 4, p. 321 – 331, 1998
- CAMPBELL, J. B.; BASSETT, C. A. L. The surgical application of monomolecular filters (Millipore) to bridge gaps in peripheral nerves and to prevent neuroma formation. **Surg Forum**, n. 7, p. 570- 574, 1959
- CARVALHO, P. S. P. et al. Análise histológica do Bio-oss e Biogran em tibia de ratos. **BCI**, v.9, n. 34, p. 117 – 123 , 2002
- CARVALHO, P.S.P.; LUPPINO, F.; MENDES, V.C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA, F.J.B.; LENHARO, A. **Terapia clínica avançada em Implantodontia**. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 2, p. 17 - 30
- CONSOLARO, A. et al. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "osseobond" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. **RPG Rev. Pós. Grad.**, v. 9, n. 2, p. 294 – 305, jan./mar. 2002
- CORDIOLI, M. A. G.; PUSTIGLIONI, F. E.; GEORGETTI, M. A. P. Reparação óssea alveolar pós-exodontia em cães, com e sem o uso de membrana de PTFE-e – análise histológica. **RPG Rev. Pós. Grad**, v.7,n.4, p. 320 – 327, out./dez. 2000
- DIÈS, F. et al. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.7, n.3, p. 277 – 285, 1996

ERSANLI, S.; OLGAC, V.; LEBLEBICIOGLU, B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 5, p. 750 – 756, 2004

FROUM, S. et al. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 1, p. 94- 102, 2002

FURLANI, J. C. G.; KONIG JÚNIOR, B.; NOGUEIRA, M. I. Análise histológica e ultraestrutural da neoformação óssea em enxertos bovinos inorgânicos implantados em tíbias de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). **Rev. Odontol. Univ. Santo Amaro**, São Paulo, v. 7, n. 1 e n.2, p. 18 – 21, jan./jun, 2002

FURUSAWA, T; MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. **Implant Dent**, v. 6, n.2, p. 93 – 101, 1997

GARBIN, C.M. Osso desmineralizado congelado seco (DFDB) . In: _____, **Enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada: noções básicas**. 1. ed. São Paulo: Pancast, 1994. cap. VII, p. 47 – 58.

GARCIA, R. R.; ALBERGARIA-BARBOSA, J. R. Capacidade de regeneração de um enxerto ósseo humano desmineralizado e liofilizado (Dembone) em calvária de coelhos. Análise Histológica. **Rev. ABO Nac.**, v. 10, n 1, p. 18-22, fev/mar 2002

GROSS, J.S. Bone Grafting Materials for Dental Applications: A Practical Guide. **Comp. Contem. Educ. Dent**. v. 18, n. 10, p. 1013-1036, 1997

HAMMERLE, C.H.F.; KARRING, T. Regeneração óssea guiada associada aos implantes dentários. **Periodontology 2000**, v.17, n.5, p. 151 – 175, 2004

HERCULIANI, P. P. 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.**, p. 7 – 14, abr – jun 2000

JOHNSON, M. W. et al. Regeneration of peri-implant infrabony defects using perioglas: a pilot study in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 12, n. 6, p. 835 – 839, 1997

KIMBLE, K.M. et al. Treatment of gingival recession using a collagen membrane with or without the use of demineralized freeze-dried bone allograft for space maintenance. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 2, p. 210 – 220, 2004

KNAPP, C. I. et al. Clinical and histologic evaluation of bone-replacement grafts in the treatment of localized alveolar ridge defects. Part 2: bioactive glass particulate. **Int. J. Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 2, p. 129 – 137, 2003

LEMONS, J.; NATIELLA, J. Biomaterials, biocompatibility and peri-implant considerations. **Dent. Clin. North Am.**, v. 30, n.1, p. 3 – 23, 1986

LINDE, A. et al. Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J. Periodontol.**, v.64, n. 11, p. 1116- 1128, 1993

MARCANTONIO JUNIOR, E. et al. Evaluation of a collagen membrane in treatment of dehiscence bone defects in dental implants. Histometric study in dogs. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, n. 25, p. 145 – 155, 1996

MELCHER, A. The use of heterogenous anorganic bone as an implant material in oral procedures. **Oral Surg**, v.15, n. 8, p. 996 – 1000, 1962

MISH, C. E.; DIETSH, F. D. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent**, v. 2, n. 3, p. 158- 167, 1993

NEVINS, M. L. et al. Human Histologic evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. **The Intern. Journal of Periodontics Restorative Dentistry**, v. 20, n. 5, p. 459 – 467, 2000

OLIVEIRA, M. G.; BRITTO, J. H. M.; FONSECA, L. A. M. Avaliação microscópica do processo de reparo ósseo em tíbias de ratas, usando implantes de osso liofilizado bovino. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 16, n.34, p. 242 - 250, set./dez. 2001

PAUL, B. F. et al. The osteoinductive potencial of demineralizes freeze-dried bone allograft in human non-orthotopic sites: a pilot study. **J. Periodontol.**, v. 72, n.8, p. 1064 – 1068, 2001

PILITISIS, J. G.; LUCAS, D. R.; RENGACHARY, S. R. Bone healing and spinal fusion. **Neurosurg Focus**, v. 13, n. 6, p. 11 – 16, 2002

PROUSSAEFS, P.; LOZADA, J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: A pilot study. **J. Prosthet Dent**, v. 90, n. 6, p. 530 – 538, 2003

RIBEIRO, R. F.; AMSTALDEN, E. M. I.; IZATTO, I. C. Modelo experimental de regeneração óssea espontânea. **Rev. Bras. Ortop**, v. 31, n. 11, p. 931 – 935, 1996

SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **J. Oral Maxillofac Surg**, v. 51, p. 1106 – 1114, 1993

SCHEPERS, E. J. G. et al. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dent**, v. 2, n. 3, p. 151 – 156, 1993

SCHMITT, J. M. et al. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 11, p. 1043 – 1053, 1997

SCHWARTZ, Z. et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 9, p. 918 – 926, 1996

SCHWARTZ, Z. et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 4, p. 470- 477, 1998

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev. FOB**, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, jan./jun. 2000

STAVROPOULOS, A. et al. Desproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when use as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in rat. **J. Clin. Periodontol**, v. 30, n.7, p. 636-643, 2003

STAVROPOULOS, F. et al. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in canine model. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, n. 4, p. 435 – 442, 2004

TAGA, R. et al. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev. Bras. Implant.**, p. 13 – 20, jan-fev 1997.

TAL, H. Autogenous masticatory mucosal grafts in extraction socket seal procedures: a comparison between sockets grafted with demineralized freeze-dried bone and deproteinized bovine bone mineral. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 10, n. 4, p. 289 – 296, 1999

WHEELER, D. L. et al. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **Biomaterials**, v. 19, n. 21, p. 527- 533, 1998

ZELLIN, G.; GRITLHI-LINDE, A.; LINDE, A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. **Biomaterials**, v. 16, n. 8, p. 601 – 609, 1995