

JULIANO DOUGLAS SILVA ALBERGARIA

**INFLUÊNCIA DAS MATRIZES MINERALIZADA E DESMINERALIZADA DE
ENXERTOS ÓSSEOS BOVINOS NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO INTRABUCAL EM RATOS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro de 2017

JULIANO DOUGLAS SILVA ALBERGARIA

**INFLUÊNCIA DAS MATRIZES MINERALIZADA E DESMINERALIZADA DE
ENXERTOS ÓSSEOS BOVINOS NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO INTRABUCAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientadora: Dr^a. Gerluza Aparecida Borges Silva

Co-orientadora: Dr^a. Erika Cristina Jorge

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais que desde a infância me ensinaram os grandes valores das pequenas coisas, à minha namorada, família, amigos e mestres pela motivação e felicidade que me proporcionaram durante esta caminhada.

AGRADECIMENTO

Após longos anos na Academia, pelo qual tropeços, frustrações e obstáculos tornaram a caminhada árdua, a vitória tem um aspecto mais que especial. Ao concluir mais uma etapa, percebo que não caminhei sozinho, mas que vim de mãos dadas com todos aqueles que me acolheram e que percorreram comigo uma parte da estrada.

Agradeço a Deus, o maior cientista de todos, que permitiu o meu aperfeiçoamento ao me aproximar d'Ele.

Aos meus pais pelo amor e incentivo, mesmo sem fazerem ideia das competências da minha formação. Eles foram armas poderosas na luta contra o cansaço e as fraquezas do dia-a-dia. Aos meus irmãos Jonathas e Jessica, pelo companheirismo, diversão e auxílios de diferentes naturezas.

A minha namorada Elaine Lemes, pelos momentos de descontração e companheirismo, sendo um motivador para a minha busca em ser uma pessoa melhor.

Aos meus colegas de laboratório, que viveram comigo essa incrível jornada em busca do conhecimento, pelos momentos alegres e presenças tão relevantes em minha vida.

As minhas orientadoras Gerluza Borges e Erika Jorge, assim como todos os demais pesquisadores que tiveram um importante papel na minha vida científica, Cinthia Pacheco, Katia Maltos, Tânia Amaral, Gracielle Coelho, Celso Queiroz e o técnico Francisco. O compartilhamento de seus conhecimentos, a disponibilidade e orientação foram fundamentais para a construção do meu caráter como cientista.

Agradeço aos professores Hélio Chiarini-Garcia, Gregory Kitten, Gustavo Menezes e Cláudia Carvalho. Também a Danúbia, que me acompanhou nos procedimentos radiográficos. Ao Luiz Costa Filho, Bruno Bertassoli e Igor Reis pelos auxílios no desenvolvimento do projeto e a Ana Carolina, que acompanhou brevemente o projeto como aluna de iniciação científica.

Em especial, agradeço a minha aluna de iniciação científica, Sarah Oliveira, pela alegria e satisfação compartilhada em trabalharmos juntos nesse projeto, com competência e dedicação imensurável.

Por fim, agradeço a CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Enxertos ósseos bovinos mineralizados constituem uma das alternativas mais utilizadas na clínica odontológica, para a substituição de perdas ósseas. Recentemente, a utilização de matrizes desmineralizadas tem sido proposta uma vez que proteínas colagenosas e não colagenosas da matriz óssea parecem otimizar o potencial osteoindutor dos xenoenxertos. O presente estudo avaliou o reparo ósseo de um defeito intrabucal em ratos, submetido à enxertia com dois tipos de enxertos, um osso bovino de origem nacional (Lumina BoneCritéria) em sua versão comercial mineralizada e o mesmo osso em uma versão desmineralizada, processada no laboratório. O enxerto importado, Bio-Oss®, foi utilizado como controle positivo, por ser o enxerto bovino de maior credibilidade na literatura. Previamente à enxertia, o biomaterial desmineralizado foi avaliado por histologia e imunofluorescência, a fim de verificar a preservação de proteínas da matriz, após o protocolo de desmineralização. A imunofluorescência para colágeno III, osteopontina e BMP-4 revelou que a desmineralização em EDTA 10% não compromete ou destrói os componentes orgânicos da matriz ossea. Desse modo, demos continuidade aos protocolos de enxertia, com o preenchimento dos defeitos ósseos com: 1. Osso bovino nacional mineralizado (OBM); 2. Osso bovino nacional desmineralizado (OBD); 3. Osso mineralizado importado, Bio-Oss® (BO); 4. Coágulo sanguíneo (CN = controle negativo). Após 1,7,14,21 e 49 dias, as amostras foram processadas para análises macroscópica, radiográfica e histomorfométrica. A análise macroscópica revelou uma cicatrização gengival satisfatória no sítio cirúrgico, para todos os grupos, sem influência dos enxertos testados. Aos 14 dias, a mucosa sobre a área operada estava cicatrizada, sem diferenças estatísticas entre os grupos. A avaliação radiográfica revelou maior ganho de radiopacidade, aos 49 dias, nos defeitos enxertados com OBD. As análises morfométricas em secções coradas com Tricrômico de Masson e PicroSirius Red submetidas ao software Image Jey revelou, respectivamente, maior deposição de trabéculas e maior maturação óssea em animais do grupo OBD. Nestes, o preenchimento do defeito ósseo estava concluído aos 49 dias. No mesmo período, o padrão de deposição óssea no grupo CN parecia incompleto e em alguns animais, revelava uma superfície côncava na borda superior do tecido ósseo que preenchia o defeito, sugerindo uma perda de volume ósseo em comparação aos grupos enxertados. A histologia revelou que ambos os enxertos mineralizados, Lumina Bone mineralizado (Critéria) e controle positivo (Bio-Oss®) apresentavam resíduos orgânicos no interior dos grânulos, o que está em desacordo com a constituição química (99,9% inorgânica) apresentada pelos fabricantes. Em ambos, a histologia mostrou a presença de focos inflamatórios até 14 dias, junto aos grânulos enxertados, especialmente na zona mais superficial (1/3 cervical) dos defeitos. Paralelamente, nos grupos OBD e CN o processo inflamatório aos 14 dias estava em franco processo de remissão. Imagens de seqüestro e expulsão de grânulos mineralizados em ambos os grupos OBM e BO, foram comumente observados nas margens da mucosa. A análise da reabsorção dos biomateriais ao longo do tempo revelou que o OBD tem uma rápida e completa reabsorção in vivo. O BO apresentou a maior resistência à reabsorção seguido do OBM. Aos 49 dias, a maior parte dos biomateriais mineralizados, OBM e BO, permaneceram no defeito, com grânulos bem osseointegrados nos terços apical e médio dos defeitos. Enfim, o presente estudo fornece pela primeira vez, dados histológicos e radiográficos sobre o enxerto de osso bovino nacional (Lumina Bone) em ambas as versões mineralizada e desmineralizada. Tendo a versão desmineralizada apresentado o melhor resultado, seu potencial osteoindutor merece ser melhor investigado, com outras

metodologias e em modelos de defeitos ósseos críticos, a fim de consolidar-se como uma estratégia terapêutica clinicamente viável.

Palavras chave: Xenoenxerto; defeito ósseo; matriz desmineralizada; Bio-Oss.

ABSTRACT

Mineralized bovine bone grafts are one of the most commonly used alternatives in dentistry to promote replacement of bone loss. Recently, the use of demineralized bone grafts has been investigated since collagenous and non-collagenous proteins may contribute to the osteoinductive potential of xenografts. The present study evaluated the bone repair of an intraoral defect in rats submitted to grafting with a national bovine bone (Lumina Bone-Critéria) in its commercial (mineralized) version and in a Demineralized version processed in the laboratory. The imported graft, Bio-Oss®, was selected as a positive control, since it is the xenograft of greatest reference in the literature. Prior to the grafting procedures, the demineralized biomaterial was evaluated with histological and immunofluorescence techniques to verify the preservation of matrix proteins after the demineralization protocol. Immunofluorescence results of type III collagen, osteopontina and BMP-4 showed that demineralization in 10% EDTA does not compromise or destroy organic components of the bone matrix. Hence, the grafting protocols proceeded. Bone defects were filled with: 1. Mineralized bovine bone (MBB); 2. Demineralized bovine bone (DBB); 3. Bio-Oss® bovine bone (positive control) (BO); 4. Blood clot as negative control (NC). After 1, 7, 14, 21 and 49 days, the samples were processed for macroscopic, radiographic and histological analysis. The macroscopic analysis showed a satisfactory gingival healing at the surgical site for all groups, with no difference among the grafts used. At 14 days, the mucosa over the operated area was closed with no statistical difference among the groups. The radiographic assessment demonstrated higher radiopacity at 49 days in the bone defects grafted with DBB. The histomorphometric analysis stained with Masson's trichrome and PicroSirius Red and later submitted to Image J software revealed, respectively, higher trabecular deposition and greater bone maturation in animals of the DBB group. The bone defect filling was completed at 49 days. Also at 49 days, the pattern of bone deposition in the NC group seemed incomplete and, in some of the defects, revealed a concave surface on the superior border of the bone in the surgical site. This suggests a loss of bone volume in comparison to the other grafts under study. Histological analysis revealed that both mineralized grafts, Lumina Bone mineralized (Critéria) and positive control (Bio-Oss®) exhibited organic residues inside the granules, what is in unconformity with the chemical composition (99,9% inorganic) reported by the manufacturers. In both groups, histological results presented inflammatory sites up until the 14th day amongst the grafted granules, mainly in a most superficial area (cervical third) of the bone defect. Contrastingly, inflammatory response for groups DBB and NC at 14 days were in cessation. Areas of mineralized granules and native bone in a rejection process were seen in both mineralized groups, which were often located in the margins of the defect. Reabsorption analysis of the grafts through time revealed that DBB presented a fast and complete reabsorption. BO exhibited higher resistance to being reabsorbed followed by MBB. At 49 days, most mineralized grafts emained inside the surgical site with granules osseointegrated to the basal and medial thirds of the defect. In conclusion, the present study provides for the first time histological and radiographic data on the national bovine bone graft (Lumina Bone) in mineralized and demineralized versions where the DBB provided enhanced results. The osteoinductive potential of the aforementioned graft must be further investigated via different methodologies in distinct critical sized defects with the purpose of securing it as a viable therapeutic strategy.

Keywords: Xenograft; bone defect; demineralized matrix; Bio-Oss.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

‰: Porcentagem

°C: Graus celsius

µm: Micrômetro

mm: Milímetro

cm: Centímetros

BMP's: *Bone Morphogenetic Proteins*

BO: Bio-Oss® - controle positivo

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CN: Controle Negativo

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindo

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FDA: *Food and Drug Administration*

H&E: Hematoxilina e Eosina

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

OBD: Osso bovino desmineralizado

OBM: Osso bovino mineralizado

PBS: *Phosphate-buffered saline*

Th1: *T helper cell 1*

ROI: *Region of Interest*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: BIOMATERIAIS PARA ENXERTIA ÓSSEA.	Erro! Indicador não definido.8
FIGURA 2: DETALHES DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO ...	Erro! Indicador não definido.2
FIGURA 3: AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO GENGIVAL. ..	Erro! Indicador não definido.2
FIGURA 4: AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E MEDIÇÃO DOS TONS DE CINZA.	Erro! Indicador não definido.5
FIGURA 5: ASPECTO HISTOLÓGICO DO OSSO BOVINO DESMINERALIZADO EM EDTA.	Erro! Indicador não definido.8
FIGURA 6: IMUNOFLORESCÊNCIA DA MATRIZ ORGÂNICA DO OBD. ..	Erro! Indicador não definido.9
FIGURA 7: ASPECTO DO TECIDO EPITELIAL DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO AOS 7 DIAS.	Erro! Indicador não definido.0
FIGURA 8: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS QUANTO AO NÍVEL DE EPITELIZAÇÃO GENGIVAL APÓS 7 DIAS DAS CIRURGIAS	Erro! Indicador não definido.1
FIGURA 9: ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CICATRIZAÇÃO GENGIVAL DOS SÍTIOS CIRÚRGICOS APÓS 14, 21 E 49 DIAS.	Erro! Indicador não definido.2
FIGURA 10: ANÁLISE DO NÍVEL DE MATURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO POR PICROSIRIUS RED NOS GRUPOS CN E OBD.	50
FIGURA 11: ANÁLISE DO NÍVEL DE MATURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO POR PICROSIRIUS RED NOS GRUPOS OBM E BO.....	51
FIGURA 12: AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA POR MEIO DE HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA.	Erro! Indicador não definido.5
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DEFEITO ÓSSEO, DIDATICAMENTE SEPARADA EM ÁREAS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.	Erro! Indicador não definido.6
FIGURA 14: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO.....	Erro! Indicador não definido.9
FIGURA 15: FORMAÇÃO DE CALO ÓSSEO EM SUPERFÍCIES EXTERNAS À ÁREA DO DEFEITO.....	60
FIGURA 16: OSTEOINTEGRAÇÃO DOS BIOMATERIAIS INORGÂNICOS (OBM E BO) AO OSSO NEOFORMADO.....	60
FIGURA 17: MONITORAMENTO HISTOLÓGICO DA REABSORÇÃO DOS ENXERTOS OBD.....	61
FIGURA 18: IMAGENS HISTOLOGICAS DOS BIOMATERIAIS INORGANICOS APÓS 49 DIAS DA ENXERTIA.....	61

FIGURA 19: ASPECTOS HISTOLOGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 1 DIA DE TRATAMENTO NOS DIFERENTES GRUPOS ENXERTADOS (CN, OBD, OBM E BO).	Erro! Indicador não definido.	3
FIGURA 20: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 7 DIAS DE TRATAMENTO NOS DIFERENTES GRUPOS ENXERTADOS (CN, OBD, OBM E BO).	Erro! Indicador não definido.	4
FIGURA 21: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 14 DIA DE TRATAMENTO NOS DIFERENTES GRUPOS ENXERTADOS (CN, OBD, OBM E BO).	Erro! Indicador não definido.	4
FIGURA 22: IMAGENS HISTOLÓGICAS DE EXPULSÃO DE GRÂNULOS MINERALIZADOS PELO ORGANISMO.	Erro! Indicador não definido.	5
FIGURA 23: PRESENÇA DOS BIOMATERIAIS PRÓXIMOS AO EPITÉLIO, FORA DA ÁREA DE DEFEITO.....	Erro! Indicador não definido.	6
FIGURA 24: IMAGEM HISTOLÓGICA DE ANGIOGÊNESE NO GRUPO OBD 7 DIAS APÓS A ENXERTIA.....	Erro! Indicador não definido.	6
FIGURA 25: IMAGEM HISTOLÓGICA DA VASCULARIZAÇÃO DOS ENXERTOS DO GRUPO OBM 7 DIAS APÓS A ENXERTIA. ...	Erro! Indicador não definido.	7
FIGURA 26: IMAGEM HISTOLÓGICA DA VASCULARIZAÇÃO DOS ENXERTOS DO GRUPO BO 7 DIAS APÓS A ENXERTIA.	Erro! Indicador não definido.	7
FIGURA 27: CÉLULAS MULTINUCLEADAS NAS SUPERFÍCIES DAS PAREDES ÓSSEAS REMANESCENTES.	Erro! Indicador não definido.	9
FIGURA 28: OSTEOLASTOS ATIVOS NAS SUPERFÍCIES DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS.		70
TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS....	Erro! Indicador não definido.	0

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1: COMPARAÇÃO DA RADIOPACIDADE NOS DEFEITOS ÓSSEOS APÓS 24 HORAS DAS ENXERTIAS.**Erro! Indicador não definido.**3
- GRÁFICO 2: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS QUANTO AO GANHO DE RADIOPACIDADE ENTRE O TEMPO INICIAL (1DIA) E FINAL (49) DE TRATAMENTO.....**Erro! Indicador não definido.**3
- GRÁFICO 3: EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DE RADIOPACIDADE DOS BIOMATERIAIS AO LONGO DO TEMPO E EM CADA PERÍODO AVALIADO (1, 7, 14, 21 E 49 DIAS).**Erro! Indicador não definido.**4
- GRÁFICO 4: DEPOSIÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO NOS GRUPOS CN E OBD.....**Erro! Indicador não definido.**6
- GRÁFICO 5: DEPOSIÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO DOS GRUPOS OBM E BO.....**Erro! Indicador não definido.**8
- GRÁFICO 6: ANÁLISE QUANTITATIVA DO COLÁGENO COM BIRREFRIGÊNCIA VERMELHA NOS GRUPOS CN E OBD.....**Erro! Indicador não definido.**2
- GRÁFICO 7: ANÁLISE QUANTITATIVA DO COLÁGENO COM BIRREFRIGÊNCIA VERMELHA NOS GRUPOS CN E OBD.....**Erro! Indicador não definido.**2
- GRÁFICO 8: PERCENTUAL DE MATRIZ ÓSSEA MADURA REFERENTE AO TOTAL DE OSSO NEOFORMADO.**Erro! Indicador não definido.**3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 As perdas ósseas	17
2.2 Os enxertos ósseos.....	18
2.3 Enxertias de osso bovino mineralizado x matrizes desmineralizadas.....	20
2.4 Influência dos biomateriais na cicatrização de tecidos moles	23
2.5 O modelo de defeito ósseo intrabucal	24
2.6 Métodos clínicos de análise de reparo ósseo por escala de cinza	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Biomateriais de enxertia óssea e períodos de avaliação	28
4.2 Preparo das amostras desmineralizadas.....	29
4.3 Análise da preservação de constituintes orgânicos da matriz óssea após o processo de desmineralização.....	29
4.4 Animais.....	30
4.5 Procedimentos cirúrgicos.....	30
4.6 Avaliação clínica (macroscópica) do sítio cirúrgico	32
4.7 Avaliação radiográfica (RX Digital)	33
4.8 Processamento histológico das maxilas.....	35
4.9 Tricrômico de Masson.....	35
4.10 PicroSirius Red.....	36
4.11 Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Análise da preservação dos fragmentos ósseos submetidos ao processo de desmineralização.....	38
5.2 Avaliação clínica da cicatrização do sítio cirúrgico.....	40
5.3 Avaliação radiográfica	42
5.4 Histomorfometria do osso neoformado	45
5.4.1. Neoformação óssea nos defeitos enxertados com OBD.....	45
5.4.2. Neoformação óssea nos defeitos enxertados com OBM e BO	46
5.5 Nível de Maturação do osso neoformado nos períodos de 7, 14, 21 e 49 dias.....	48
5.5.1. Refinamento da leitura de birrefringência de fibras vermelhas aos 49 dias	53

5.6 Reabsorção dos biomateriais	54
5.7 Descrições histológicas dos biomateriais enxertados e evolução do reparo	56
5.7.1. Dinâmica da deposição óssea e osteointegração do biomaterial ao tecido remanescente.....	56
5.7.2. Aspectos do processo inflamatório, angiogênese e vascularização dos enxertos.....	62
5.7.3 Osteoclastogênese e reabsorção das paredes ósseas remanescentes.....	67
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO I	88

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos crâniomaxilofaciais constituem um sério problema para a clínica odontológica uma vez que comprometem a estética e a função do esqueleto, assim como o sistema estomatognático. Esses são causados por diferentes motivos, como processos degenerativos, traumas, tumores e perdas dentárias.

Diferentes estratégias são empregadas no reparo de defeitos ósseos. Entre essas estão o uso de enxertos ósseos de naturezas distintas, como autógenos, alógenos e xenógenos. Nos enxertos autógenos, o doador e o receptor são o mesmo indivíduo. Esse tipo de enxertia apresenta excelente osteoindução (propriedade que favorece a diferenciação celular) e osteocondução (propriedade que favorece a migração e proliferação celular, bem como a invasão por vasos sanguíneos). Todavia, devido a necessidade de abertura de dois sítios cirúrgicos (na região doadora e na região de tratamento) e fonte limitada de obtenção do constructo, alternativas aos enxertos autógenos tem sido investigadas. Entre essas há os enxertos alógenos (doador e receptor são indivíduos da mesma espécie) e xenógenos (doador e receptor são indivíduos de espécies diferentes).

Os enxertos xenógenos de origem bovina tem ganhado espaço nas clínicas odontológicas por apresentar boa osteocondução, custo acessível, fonte ilimitada e fácil manipulação. Os mais aceitos por profissionais da área são os xenoenxertos importados inorgânicos por apresentarem respaldo na literatura, sendo vastamente estudados. Contudo, xenoenxertos nacionais inorgânicos também são encontrados no mercado, mas com escassas investigações literárias, o que compromete a sua credibilidade.

Apesar das versões comerciais mineralizadas, ricos em hidroxiapatita (inorgânicos) serem bem empregadas nas clínicas, a melhoria de suas propriedades torna-se um fator chave para terapias cada vez mais eficazes no restabelecimento do paciente. Dessa forma, a matriz orgânica desses biomateriais, por apresentarem proteínas não colagenosas, como BMP's e osteopontina, promove uma osteoindutividade, além de potencializar a característica osteocondutora. Dessa forma, é possível acelerar o processo de diferenciação celular, aumentar a deposição de mineral e promover o restabelecimento do paciente mais rápido, sendo de grande relevância para a clínica e para a qualidade de vida do indivíduo. Entretanto, controvérsias na literatura são encontradas referente ao sucesso do uso de matriz orgânica de xenoenxertos no reparo de defeitos ósseos. É necessário novas pesquisas que viabilizam o uso de matrizes orgânicas xenógenas no

reparo de defeitos ósseos e para averiguar a eficácia de técnicas de avaliação para o reparo ósseo empregadas na clínica odontológica. Nessa vertente, a radiografia é uma das principais ferramentas para avaliação do tecido ósseo. Trabalhos como o de Chakrapani *et al.* (2013) e Al-Fotawei *et al.* (2014) demonstram como a radiografia permite quantificar a densidade óssea inferindo o nível de deposição de mineral através da radiopacidade. Porém, outras análises comparativas a fim de certificar os resultados observados nas avaliações radiográficas e elucidar os eventos existentes no reparo ósseo não foram empregados nesses estudos.

Diante do contexto apresentado, o presente estudo propõe avaliar o reparo ósseo submetido à um xenoenxerto de origem nacional (Lumina-Bone Critéria), em sua versão comercial (mineralizada) e em uma versão desmineralizada processada no laboratório. Propõe-se avaliar os biomateriais em um modelo experimental *in vivo*, em um defeito ósseo intrabucal de dimensão padronizada. A evolução do reparo ósseo será radiograficamente avaliada, mas os dados serão histologicamente comprovados. A influência dos biomateriais na cicatrização dos tecidos moles pode impactar na remodelação óssea, especialmente se o sítio cirúrgico localizar-se em um ambiente passível de maior contaminação bacteriana ou por resíduos, como nos defeitos intrabucais. Por essa razão, a evolução clínica do fechamento das feridas também foi considerada na avaliação dos enxertos intrabucais. Como controle positivo para os experimentos foi empregado o xenoenxerto importado Bio-Oss® por apresentar elevada credibilidade no uso clínico e ser vastamente estudado nas pesquisas científicas.

A divulgação de informações fundamentadas em dados científicos referente aos xenoenxertos nacionais, nas versões mineralizada e desmineralizada, podem cooperar para melhorias da qualidade dos biomateriais e uso de alternativas com melhor custo-benefício na reconstrução de defeitos ósseos nas clínicas odontológicas. Assim sendo, o presente estudo traz esclarecimentos sobre o produto nacional Critéria (Lumina-Bone), reitera a hipótese do potencial osteoindutor das matrizes ósseas orgânicas como adjuvantes no reparo ósseo e abre perspectivas para subsidiar novas pesquisas visando a melhoria das propriedades biológicas dos xenoenxertos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As perdas ósseas

O tecido ósseo é um tecido dinâmico com remodelação constante. Essa remodelação é proporcionada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como hormonais e pressões mecânicas. As características metabólicas do osso proporcionam uma importante capacidade de regeneração tecidual. A presença de células semelhantes a células tronco permite a diferenciação em osteoblastos que, por sua vez, iniciam o processo de formação da matriz óssea. Todavia, defeitos ósseos extensos causados por fraturas, excisão de tumores e doenças metabólicas ou degenerativas consistem em um sério problema para a clínica por apresentar cicatrização tecidual insuficiente (Watanabe *et al.*, 2016).

A reconstrução óssea apresenta alta demanda na área da odontologia e ortopedia, sendo um desafio para os profissionais envolvidos (Loquercio *et al.*, 2015). Os defeitos ósseos prejudicam a forma e função do esqueleto, comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. As deformidades e perdas ósseas faciais prejudicam não somente a estética e a autoestima, mas principalmente o restabelecimento da função mastigatória, afetando diretamente o sistema estomatognático, e os procedimentos de substituição dentária por próteses ou implantes (Bhumiratana *et al.*, 2016).

As perdas ósseas são também consideradas processos degenerativos, que ocorrem naturalmente com o avanço da idade. Todas as limitações decorrentes das doenças degenerativas, bem como de fraturas ósseas, são preocupantes em um país como o Brasil, em franco processo de envelhecimento (Gomes e Garcia, 2006). Segundo dados do IBGE (2015), a população idosa tem uma taxa de crescimento de 4% ao ano e é esperado aproximadamente 73,5 milhões de idosos para 2060, 3 vezes mais do que o atual.

A crescente demanda por soluções para perda ou lesões no tecido ósseo tem estimulado as pesquisas envolvendo técnicas de enxertia (substituição óssea) bem como a indução da regeneração tecidual por moléculas e biomateriais osteoindutores e/ou osteocondutores (Zhao *et al.*, 2011).

2.2 Os enxertos ósseos

Os biomateriais empregados na enxertia óssea podem ser sintéticos ou naturais, permanentes ou biodegradáveis. Esses materiais devem se acoplar ao osso do paciente e permitir uma resposta fisiológica adequada para o processo de regeneração, assim como favorecer a formação da matriz extracelular e a sua integração com o tecido nativo adjacente (Lei *et al.*, 2015).

Diferentes substitutos ósseos estão disponíveis comercialmente para o uso clínico. Entre esses, estão os enxertos ósseos. Os enxertos ósseos são conceituados como materiais de implante que favorecem a regeneração óssea. Em combinação ou não com outras técnicas, esses enxertos devem proporcionar boa osteointegração, influências sobre o metabolismo ósseo, osteoindução e osteocondução (Oryan, 2014; Palachur *et al.*, 2014).

A osteointegração é a capacidade que o enxerto apresenta de se incorporar no local de implantação (defeito ósseo) com conexão ao osso circundante. O metabolismo ósseo é dividido em duas etapas, a osteogênese e a osteoclastogênese. A osteonegenese inicia-se por meio da vascularização e diferenciação de células tronco mesenquimais. Essas, ao expressarem diferentes fatores de diferenciação, tendo como principal o Runx2, originam células osteoprogenitoras que, por sua vez, se diferenciam em osteoblastos maduros ao expressarem Osterix. Esses osteoblastos promovem a síntese e deposição da matriz extracelular, constituída por matéria orgânica e inorgânica. Quanto a osteoclastogênese, a linhagem de células préosteoclásticas são originárias de células tronco hematopoiéticas. Essa linhagem sofre influência da osteogênese, onde osteoblastos maduros expressam RANKL que, ao interagir com receptores de membrana da linhagem préosteoclásticas, estimula a fusão dessas células. Esse processo forma células gigantes multinucleadas denominadas osteoclastos. Vale ressaltar que os osteoblastos controlam a osteoclastogênese não apenas por expressarem RANKL, mas também osteoprotegerina, uma biomolécula com efeito de inibição da fusão das células préosteoclásticas. Uma vez originado os osteoclastos, esses produzem ácidos e enzimas, como colagenase e catepsina K, responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo (Kusumbe e Adams, 2014). A migração de células osteoblásticas e osteoprogenitoras por meio do biomaterial transplantado, além do aporte para o crescimento e inserção de vasos sanguíneos durante o reparo ósseo, é denominada de osteocondução. Já a osteoindução é a propriedade do biomaterial que induz o processo de diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos (Watanabe *et al.*, 2016).

Os enxertos ósseos podem ser classificados como autógenos, alógenos ou xenógenos, de acordo com a origem do material. Os enxertos autógenos são os que apresentam melhor performance. Esses são obtidos do próprio paciente e, além de possuírem excelente osteocondução e osteoindução, favorecem o processo de osteogênese por apresentarem células osteoprogenitoras e serem não imunogênicos (Lei *et al.*, 2015; Elsalanty e Genecov, 2016). Entretanto, a aplicação da enxertia autógena promove na região doadora uma injúria secundária por meio de cirurgia para obtenção do constructo (fragmento ósseo enriquecido com células autógenas). Outra desvantagem é o volume limitado de enxerto obtido por meio dessa técnica, tornando-se inviável para a reconstrução de defeitos ósseos extensos (Lei *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2016).

As terapias autógenas são de alto custo e requerem longo tempo de tratamento, o que inviabiliza a inserção do modelo para atendimento de amplo alcance no país (Zimmermann & Moghaddam, 2011; Watanabe *et al.*, 2016).

Os enxertos entre indivíduos da mesma espécie são caracterizados como alógenos. Esses biomateriais podem ser obtidos de cadáveres e apresentam boa osteocondução. Contudo, sua aplicação tem sido reduzida devido à baixa incorporação do enxerto, potencial imunogênico e riscos de transmissão de doenças (Sawkins, 2013; Kumar *et al.*, 2013).

A enxertia xenógena ocorre entre indivíduos de espécies diferentes, sendo uma alternativa aos autoenxertos. Segundo Ji-Eun *et al.* (2012), os enxertos de origem bovina possuem adequada osteocondução e suas principais formas de apresentação no mercado são em blocos ou particulados. Como vantagem, esse tipo de enxertia favorece a expansão de células e vasos sanguíneos devido a sua porosidade, quando se trata de osso trabeculado (Lei *et al.*, 2015). A vascularização do enxerto é um ponto crítico no tratamento de defeitos ósseos, viabilizando todas as demais etapas de formação da matriz extracelular (Houdek *et al.*, 2015).

Os enxertos xenógenos têm se tornado uma boa alternativa aos enxertos autógenos por não requererem a abertura de um novo sítio cirúrgico nas áreas doadoras, além de apresentarem quantidade ilimitada e fácil manipulação (Ji-Eun *et al.*, 2012). Entretanto, Lei *et al.* (2015) ressaltam que esse tipo de enxertia pode ser imunogênica e favorecer a transmissão de doenças em pacientes, o que demanda um alto controle de qualidade durante os protocolos de coleta e processamento dos materiais. A desproteinização óssea minimiza as respostas imunológicas de rejeição e mantém as propriedades de osteoindução e osteocondução viáveis (Lei *et al.* 2015; Nart *et al.*, 2016).

Já Palachur *et al.* (2014) e Drosos *et al.* (2015) afirmam que a característica proteica do osso a ser enxertado pode apresentar diferentes fatores capazes de estimular a regeneração óssea, como o colágeno, as Proteínas Morfogenéticas Ósseas e demais proteínas não colagenosas. Trabalhar com osso xenógeno desmineralizado, mantendo o arcabouço proteico, permite potencializar o perfil bioativo do material e fornecer uma característica de osteoindução.

Dados da literatura têm revelado o potencial dos enxertos de origem bovina, utilizados em ensaios *in vitro* (Pietrzak *et al.*, 2012) e *in vivo* (Liu *et al.*, 2013), no estímulo de osteoblastos, assim como no reparo de lesões ósseas *in vivo*.

2.3 Enxertias de osso bovino mineralizado x matrizes desmineralizadas

Atualmente, ao abordar enxertias ósseas, a maioria dos estudos divulgados referem-se aos ossos bovinos importados, como exemplo o Geistlich Bio-Oss® (Khoshzaban *et al.*, 2011; Gonzaga *et al.*, 2016).

O Bio-Oss® é um dos principais xenoenxertos ósseos estudados e disponibilizados no mercado nacional e internacional. Trata-se de um osso mineralizado, desproteinado, com estrutura porosa, de baixa imunogenicidade destinado para regenerações ósseas orais (Berglundh e Lindhe, 1997; Carmagnola *et al.*, 2002; Carmagnola *et al.*, 2003; Tapety *et al.*, 2004; Fickl *et al.*, 2008; Khoshzaban *et al.*, 2011; Palachur *et al.*, 2014; Junior *et al.*, 2016).

Os estudos de Galindo-Moreno *et al.* (2010) e Junior *et al.* (2016) revelaram que durante o processo de neoformação óssea, as partículas do Bio-Oss® tornam-se integrantes da estrutura do novo osso formado. Baghban *et al.* (2009) compararam a eficácia do enxerto autógeno, considerado padrão ouro no tratamento de defeitos ósseos, com o Bio-Oss® na regeneração de defeito periodontal humano. Os resultados não mostraram significância estatística. Porém, os autores atestaram a superioridade do Bio-Oss por não envolver um novo sítio cirúrgico, gerando menor desconforto aos pacientes e menor morbidade.

Os resultados clínicos com o uso do Bio-Oss® fazem desse material um dos mais utilizados para enxertias em odontologia, considerado como de 1ª linha de escolha dentre os profissionais periodontistas e implantodontistas. Contudo, seu valor de mercado é alto, o que constitui um fator limitador para torná-lo acessível à população, via sistemas públicos de atenção à saúde. Blocos de osso bovino de marcas nacionais são

comercializados no Brasil com custo mais acessível. Porém, trabalhos científicos que subsidiam o uso destes biomateriais ainda são escassos, o que limita sua credibilidade dentre os profissionais de ponta.

Uma grande variedade de biomateriais de enxertia óssea utilizados na clínica e também em pesquisas de reconstrução óssea são compostos mineralizados, sintetizados a partir de cristais de hidroxiapatita obtidos de osso bovino (Krishnamurthy *et al.*, 2014). Paralelamente, os constituintes orgânicos da matriz óssea também têm sido investigados e sugeridos como potenciais aceleradores do reparo ósseo. As matrizes desmineralizadas revelam potencial osteocondutor e osteoindutor por serem revascularizadas rapidamente e possuírem proteínas e fatores de crescimento da matriz orgânica que favorecem o início da osteogênese. A presença de BMP's (*Bone Morphogenetic Proteins*) na matriz extracelular influencia as propriedades osteoindutivas do osso desmineralizado, propriedade bem documentada em experimentações animais (Sawkins, 2013; Drosos *et al.*, 2015).

O trabalho de Sawkins *et al.* (2013) abordou o uso de duas versões de osso bovino empregados em um ensaio *in vitro*, sendo uma matriz óssea desmineralizada e uma matriz extracelular com compostos orgânicos e inorgânicos. Os autores tiveram como objetivo desenvolver uma forma solúvel dos objetos de estudo para adicioná-los em uma matriz hidrogel. Após a conclusão dessa etapa, buscaram compreender as propriedades biológicas, mecânicas e estruturais dos biomateriais em cultura de osteoblastos derivados de calvária de camundongo. Após o processo de descélularização dos biomateriais, os autores confirmaram resíduos celulares apenas na matriz desmineralizada, justificando a diminuição da viabilidade celular desse produto quando comparado com a matriz extracelular mineralizada. A quantidade de colágeno tipo I no hidrogel de ambos biomateriais foram similares, sem diferenças estatísticas. Os autores ressaltaram a importante presença de proteínas colagenosas e não colagenosas, assim como fatores de crescimento. Esses tipos de substâncias permitiram uma boa osteocondução e osteoindução avaliadas pela viabilidade celular. Quanto ao processo inflamatório, o tratamento de descélularização, mesmo com resíduos nucleares no osso desmineralizado, não permitiu uma resposta inflamatória por liberação de alfa-galactosidase. Essa substância é a principal responsável pela resposta de rejeição aos enxertos. Em conclusão, os biomateriais apresentaram estrutura e características biológicas distintas, mas efeitos semelhantes em cultivo celular, segundo os autores.

O Estudo de Drosos *et al.* (2015) também afirma a capacidade osteoindutora e osteocondutora das versões desmineralizadas de matrizes ósseas. O trabalho foi uma revisão crítica sobre o emprego de produtos desmineralizados em diferentes procedimentos de enxertia óssea. Segundo os autores, diferentes estudos expressaram o emprego de *scaffolds* desmineralizados sozinhos ou em combinação com outros materiais de enxertia. Os autores, por meio da revisão, afirmaram o potencial do uso de matrizes desmineralizadas na enxertia de defeitos ósseos. Esses possuem proteínas importantes no processo de diferenciação e proliferação celular. Contudo, o nível de evidências desses produtos para um emprego clínico eficaz tem sido baixo. Em conclusão, os autores sugerem a necessidade de estudos clínicos de maior qualidade a fim de favorecer ou evitar o uso de produtos ósseos desmineralizados em procedimentos de enxertia.

Os resultados do trabalho de El-Chaar (2013) demonstraram a produção adequada de tecido mineralizado em defeito ósseo intrabucal com implantação de enxerto ósseo autólogo desmineralizado. Esses resultados corroboram com Pietrzak *et al.* (2012) que relataram a viabilidade do uso de osso desmineralizado em indicação para tratamento de defeitos ósseos crâniomaxilofaciais e na cavidade oral.

Atualmente, indústrias voltadas para o mercado odontológico já disponibilizam produtos elaborados a partir da associação de proteínas derivadas da matriz óssea orgânica, como esponjas de colágeno com BMPs, visando acelerar o reparo ósseo. A família das BMP's é considerada agente chave da indução osteoblástica (Sierra-Garcia *et al.*, 2016) e seu uso tem aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA), com estudos e aplicações na regeneração óssea (Ronga *et al.*, 2013).

Outra proteína exposta em enxertos ósseos desmineralizados, relevante nos processos de regeneração tecidual por facilitar a recuperação do organismo após lesão ou infecção, é a osteopontina. Essa é uma fosfoproteína da matriz extracelular que medeia diferentes funções biológicas (Lund *et al.*, 2009; Nam e Han, 2016). Segundo Denhardt e Noda (1998), a osteopontina estimula vias de sinalização celular por diferentes receptores na maioria das células, estimulando a migração celular. Outro fator que favorece esse processo é a sua interação com integrinas, o que auxilia a adesão e sobrevivência das células (Denhardt e Noda, 1998). Diante das respostas inflamatórias, essa proteína atua como citocina Th1 e promove resposta imunitária mediada por células (Lund *et al.*, 2009). Referente a regeneração do tecido ósseo, a osteopontina permite a formação de tecidos calcificados e a sua remodelação por possuir sítios de ligação ao

cálcio. Essa ligação promove a formação de uma estrutura tridimensional que regula a biomineralização e também a atividade de osteoclastos (Lund *et al.*, 2016)

No preparo de fragmentos ósseos desmineralizados, o protocolo de remoção dos constituintes inorgânicos da matriz óssea (desmineralização da matriz) deve expor e preservar as propriedades das BMPs, do colágeno, da osteopontina e de outras proteínas não-colagenosas capazes de interferir favoravelmente nos processos de diferenciação celular, adesão e proliferação de células das linhagens osteogênicas.

2.4 Influência dos biomateriais na cicatrização de tecidos moles

Os enxertos ósseos têm como meta não apenas o preenchimento do espaço do defeito ósseo, facilitando a formação de um novo osso, mas também auxiliar na cicatrização dos tecidos moles circunvizinhos. A influência dos enxertos ósseos no fechamento/cicatrização de tecidos moles é especialmente relevante em áreas passíveis de maior contaminação, como na cavidade bucal. Esse fato diminui os riscos de infecção pós-operatória (Kumar *et al.*, 2013).

A cicatrização epitelial apresenta quatro fases distintas. São essas as fases de homeostase, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual (Velnar *et al.*, 2009). Esses processos são contínuos e diferentes fatores, locais ou sistêmicos, podem comprometê-los. Os fatores locais estão relacionados com as influências diretas presentes na região da ferida, como o seu preenchimento, contaminações físicas e biológicas e a forma da lesão. Os sistêmicos estão ligados às condições fisiológicas do paciente, como enfermidades, alimentação e fatores endócrinos (Guo e DiPietro, 2010).

A inflamação é a principal etapa no processo de cicatrização da lesão cutânea e de mucosas. Contaminantes microbianos podem prolongá-la, resultando em um restabelecimento tecidual inadequado. A má cicatrização do epitélio, junto aos sítios de enxertia óssea pode comprometer a regeneração do tecido ósseo em tratamento (Velnar *et al.*, 2009).

Em odontologia, o uso de enxertos ósseos permite a reconstrução estética e funcional de perdas ósseas crâniomaxilofaciais, Além de favorecer também a reconstrução do periodonto. Esse é constituído por tecidos circunvizinhos ao dente, como o osso alveolar, tecidos moles da gengiva e mucosa oral. A presença do enxerto permite a proliferação de células mesenquimais e osteoprogenitoras, assim como células endoteliais. O aumento do tecido de granulação e posterior deposição de colágeno são

importantes para a restauração do periodonto (Palachur *et al.*, 2014). Deste modo, os biomateriais de enxertia óssea devem permitir a cicatrização da gengiva adjacente e de um modo recíproco, o fechamento epitelial da ferida, isolando os contaminantes do meio bucal e favorecendo a evolução satisfatória do reparo ósseo na área enxertada.

2.5 O modelo de defeito ósseo intrabucal

A literatura nos fornece diversos exemplos de defeitos ósseos experimentais, desenvolvidos para o monitoramento da regeneração óssea após técnicas de enxertia e bioengenharia tecidual. A maioria dos defeitos ósseos publicados são modelos criados fora da cavidade bucal, geralmente em tíbias, fêmures e calota craniana de ratos e coelhos (Athanasίου *et al.*, 2010; Bernabé *et al.*, 2012; Zambuzzi *et al.*, 2012; Yip *et al.*, 2014). Esses modelos, entretanto, estão livres de fatores intrabucais, como bactérias, fluxo salivar, alterações de pH e forças mastigatórias, o que limita a extrapolação direta dos resultados para a clínica odontológica. Um dos motivos para a análise de reparos ósseos fora da cavidade bucal, geralmente em crânio ou ossos longos, decorre da dificuldade técnica para sua realização em animais de pequeno porte, como camundongos, ratos e coelhos. Estes animais apresentam pequena abertura dos maxilares, difícil visualização do campo cirúrgico e espaço limitado para o sistema de irrigação e de aspiração, fundamentais quando da utilização de motores odontológicos. Além desses fatores, a necessidade de afastamento e proteção dos tecidos moles (língua, lábios e bochechas) demanda mãos auxiliares que tornam o campo visual ainda mais restrito (Costa-Filho *et al.*, 2012). Uma alternativa para avaliações de reparo ósseo intrabucal em pequenos animais tem sido o modelo de alvéolos dentários. Nesses casos, apenas instrumentos manuais são necessários para as exodontias e as cavidades radiculares remanescentes são utilizadas como sítios para enxertia de biomateriais, sem a necessidade de utilização de micromotores para osteotomias. Entretanto, as cavidades alveolares de pequenos animais são sítios muito reduzidos, que dificultam a inserção de volumes suficientes de biomateriais de natureza sólida (Asa'ad *et al.*, 2016). Além disso, os alvéolos dentários possuem dimensões variáveis e guardam resíduos de ligamento periodontal que podem interferir nas respostas biológicas.

2.6 Métodos clínicos de análise de reparo ósseo por escala de cinza

Técnicas de avaliação de estruturas internas do corpo humano, *in vivo* e *ex vivo*, constituem estratégias relevantes para compreender modificações anatômicas e morfológicas no desenvolvimento de diferentes doenças, além das respostas aos tratamentos selecionados, ao longo do tempo. A microtomografia computadorizada (micro-CT) é uma modalidade de geração de imagens de alta resolução capaz de analisar a microarquitetura óssea (Campbell *et al.*, 2014). Essa tecnologia tem passado por sofisticações nas últimas décadas, com utilidade em diversas aplicações pré clínicas (Clark e Badea, 2014).

Segundo Campbell *et al.* (2014), a micro-CT apresenta custos relativamente baixos e permite avaliar, além das estruturas ósseas, tecidos moles, como o adiposo, processos de vascularização e cartilagem.

Referente ao tecido ósseo, a tecnologia de microtomografia computadorizada pode ser empregada para fornecer dados quantitativos sobre a microarquitetura óssea. Informações quantitativas sobre trabéculas ósseas e suas densidades, assim como processos de reabsorção e deposição óssea podem ser obtidos. A medida em que o raio x é transmitido por meio da amostra, camadas lineares relativas do objeto estudado são representadas em imagens como valores de escala de cinza (Wu *et al.*, 2015). Dessa forma, a micro-CT produz dados tomográficos tridimensionais com resolução microscópica (tamanho de voxel $\leq 100 \mu\text{m}$), por meio de várias centenas de projeções de feixes cônicos bidimensionais de diferentes ângulos (Clark e Badea, 2014).

Contudo, nos estudos de uso clínico de enxertias e reconstruções ósseas em seres humanos, seja por meio de enxertos mineralizado ou desmineralizado, as análises radiográficas constituem uma das ferramentas mais comuns e acessíveis para o controle da deposição do tecido ósseo nos sítios enxertados. Assim como a micro-CT, esse método permite avaliar as estruturas anatômicas de forma não invasiva e detectar, pelos níveis de radiopacidade (escala de tons de cinza), mudanças internas associadas ao padrão de mineralização tecidual, como do osso alveolar (Chakrapani *et al.*, 2013).

Segundo Chakrapani *et al.* (2013), as imagens radiográficas permitem estimar a integralidade das estruturas mineralizadas e diagnosticar diferentes defeitos ou doenças ligadas ao tecido ósseo. Contudo, os métodos radiográficos possuem limitações, como projeção e sobreposição das estruturas anatômicas na imagem.

Al-Fotawei *et al.* (2014) avaliaram a relevância do uso de imagens radiográficas na avaliação da regeneração do tecido ósseo em um defeito mandibular. A avaliação foi

quantitativa e realizada por meio do nível de radiopacidade da área tratada apresentada nas radiografias. Os valores encontrados corresponderam ao volume de área radiopaca. Os autores afirmaram que a elevada densidade óssea na borda do defeito mandibular faz menção ao osso nativo. Análises de micro-CT demonstraram trabéculas ósseas mais finas quando comparadas com o osso circundante nativo. Dessa forma, os autores concluíram que a avaliação da regeneração óssea por meio de protocolos radiográficos apresenta-se como um método satisfatório. Assim sendo, as análises radiográficas e de micro-CT constituem importantes ferramentas na clínica e nas experimentações em animais a fim de diagnosticar e avaliar enfermidades ósseas, assim como o processo de regeneração tecidual ao longo do tempo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da enxertia de osso bovino da marca comercial Lumina-Bone (Critéria) e os possíveis benefícios da versão desmineralizada, não comercial, durante o reparo ósseo em um sítio intrabucal em ratos.

3.2 Objetivos específicos

1. Padronizar o método de desmineralização dos fragmentos ósseos Lumina-Bone e avaliar se o método interfere na preservação do colágeno, incluindo o colágeno tipo III, e proteínas não colagenosas (BMP-4 e osteopontina) das matrizes ósseas submetidas ao protocolo.
2. Avaliar a influência dos enxertos propostos no fechamento do sítio cirúrgico, por meio da análise macroscópica da epitelização gengival após 7, 14, 21 e 49 dias dos procedimentos .
3. Avaliar a evolução do aspecto radiográfico da deposição óssea nos sítios cirúrgicos após 1, 7, 14, 21 e 49 dias dos procedimentos de enxertia.
4. Quantificar o percentual de deposição óssea na área do defeito por histomorfometria após 7, 14, 21 e 49 dias dos procedimentos de enxertia óssea.
5. Avaliar o nível de maturação do osso neoformado, aos 7, 14, 21 e 49 dias, por meio da coloração com *PicroSirius Red*, avaliada sob microscopia de polarização.
6. Analisar os aspectos histológicos do reparo, como nível de inflamação, vascularização, nível de reabsorção óssea, integridade dos biomateriais e osteointegração dos enxertos, após 7, 14, 21 e 49 dias dos procedimentos, por coloração de Tricrômico de Masson e Hematoxilina & Eosina.
7. Correlacionar os dados histológicos com os achados macroscópicos e radiográficos e confirmar os resultados radiográficos por histologia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Biomateriais de enxertia óssea e períodos de avaliação

Foram utilizados blocos de osso bovino Lumina-Bone, da marca nacional Critéria com dimensões de 10x10x5mm - altura x largura x profundidade (Figura 1A) e o biomaterial particulado Bio-Oss® (Geistlich, Suíça – Figura 1B). O osso nacional foi utilizado em sua versão comercial, mineralizada, após ser fragmentado em grânulos de aproximadamente 3mm (Figura 1C) e em uma versão desmineralizada (Figura 1D, 1E e 1F) obtida após processamento no laboratório. Os blocos do osso Lumina Bone foram gentilmente cedidos pela empresa Critéria, na pessoa do Sr. André Braga.

O Bio-Oss® foi utilizado na versão comercial, em sua apresentação particulada e mineralizada. A literatura refere-se ao Bio-Oss® como um biomaterial de excelentes resultados em estudos experimentais. Sua versão particulada é a mais utilizada clinicamente, motivo pelo qual foi considerada um controle positivo na análise dos resultados. Os animais foram avaliados nos períodos de 1, 7, 14, 21 e 49 dias pós-enxertias.

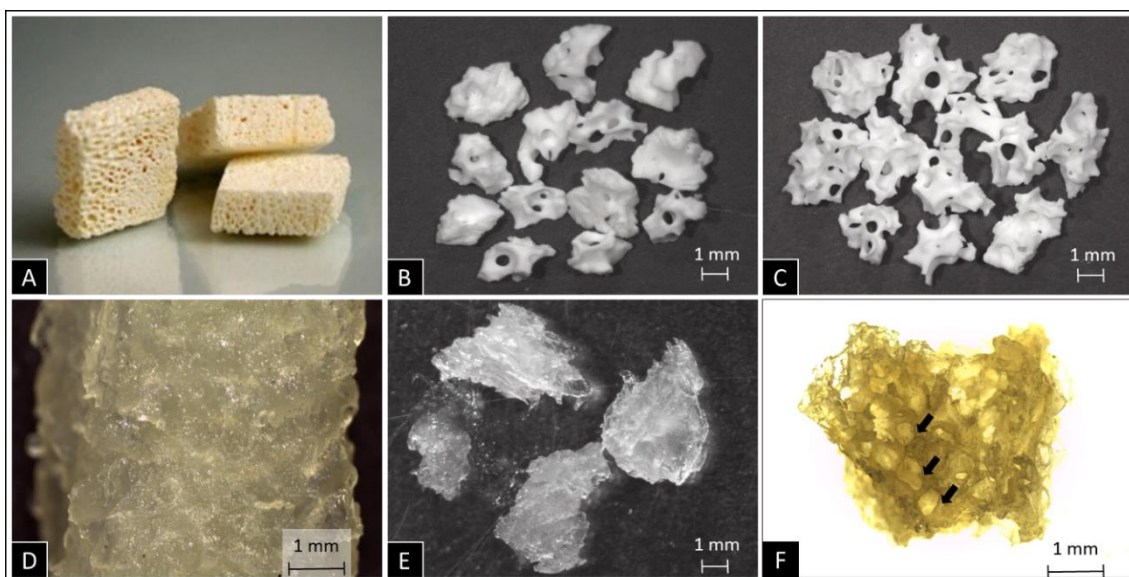


FIGURA 1: BIOMATERIAIS PARA ENXERTIA ÓSSEA. (A) Bloco de osso mineralizado comercial Lumina Bone Critéria (nacional); (B) Lumina Bone Critéria mineralizado fragmentado para enxertia; (C) Bio-Oss® particulado; (D) Bloco de osso bovino Lumina Bone Critéria desmineralizado por EDTA 10% (versão não comercial); (E) Fragmentos do Lumina Bone Critéria desmineralizado para enxertia; (F) Fragmento do Lumina Bone Critéria desmineralizado, as setas pretas evidenciam a estrutura porosa.

4.2 Preparo das amostras desmineralizadas

Fragmentos de osso bovino foram imersos em EDTA 10%, por 72 horas. Resíduos de cálcio e de EDTA foram removidos com lavagens sucessivas em água, seguido de imersão *overnight*. Para desinfecção do biomaterial, os blocos foram imersos em álcool 70% por 24 horas com posterior exposição por 30 minutos em luz Ultravioleta. Na capela de fluxo laminar, as peças foram lavadas e fragmentadas com dimensões aproximadas de 2,5mm de diâmetro x 2,5mm de comprimento e mantidas em solução PBS estéril, previamente aos procedimentos cirúrgicos.

4.3 Análise da preservação de constituintes orgânicos da matriz óssea após o processo de desmineralização

O uso de soluções desmineralizadoras pode comprometer a estrutura dos tecidos. Por essa razão, optou-se pelo uso de uma solução quelante (EDTA 10%) e não de soluções com pH ácido para a desmineralização dos fragmentos. Ainda assim, a preservação dos componentes da matriz orgânica dos blocos ósseos foi avaliada por análises histológica e imunohistoquímica. Para tanto, os fragmentos desmineralizados foram processados para a histologia de rotina, após a fixação em formalina neutra tamponada e inclusão em parafina. Cortes de 5µm foram corados com Tricrômico de Masson, H&E e imunohistoquímica para avaliação do colágeno, principal proteína constituinte da matriz óssea. A expressão de BMP-4 e osteopontina foram avaliadas como parâmetro de preservação de proteínas não colagenosas da matriz orgânica do tecido ósseo por imunohistoquímica.

Para a imunohistoquímica, os cortes histológicos foram coletados em lâminas tratadas com Poli-L-Lisina. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, re-hidratadas em série gradual de etanol e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os cortes foram imersos em H₂O₂ 3% (1 hora) para neutralização da peroxidase endógena e incubados com BSA 2% em PBS (1 hora) para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo primário policlonal anti BMP-4 e anti osteopontina (Santa Cruz Biotechnology, USA/cabra anti-rato), ambos na diluição de 1:200.

Após 16 horas de incubação, as secções foram lavadas com PBS e incubadas com conjugado polimérico EnVision (Dako K 4061) por 30 minutos. Em seguida, a expressão

foi revelada com DAB (Dako K 3468) e os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer. Controles negativos foram realizados pela omissão dos anticorpos 1ºs, com a aplicação de PBS em substituição aos anticorpos.

4.4 Animais.

Foram utilizados 120 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos com peso corporal variando de 280 a 350g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 (quatro) animais, sob temperatura ambiente e controle de ciclo de luz. Os animais receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*. Todos os protocolos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CEUA/UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais – protocolo aprovado 07/2015 – documento anexo). A Tabela 1 ilustra a distribuição dos animais por grupo experimental.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Grupo	Descrição	Períodos (dias)				
		1	7	14	21	49
CN	Grupo coágulo (controle negativo)	n=6*	n=6	n=6	n=6	n=6
OBM	Osso bovino mineralizado (Critéria) - fragmentos de osso trabeculado	n=6*	n=6	n=6	n=6	n=6
OBD	Osso bovino desmineralizado (Critéria) – fragmentos de osso trabeculado	n=6*	n=6	n=6	n=6	n=6
BO	Bio-Oss® (granulado)	n=6*	n=6	n=6	n=6	n=6

(*) Amostras de 1 dia foram destinadas somente à avaliação radiográfica para a mensuração da radiopacidade inicial dos biomateriais *in loco*, considerada como o ponto zero nas análises de tons de cinza. Os demais períodos foram destinados a avaliação radiográfica, macroscópica e histomorfometria óssea.

4.5 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Cloridrato de Xilazina 2% (0,1ml/100g peso corporal) associado à base anestésica, Cloridrato de Ketamina 10% (0,1ml/100g). O protocolo de criação dos defeitos ósseos foi realizado segundo Costa-Filho *et al.* (2012). O procedimento cirúrgico foi viabilizado pela utilização de uma mesa cirúrgica especificamente delineada para procedimentos cirúrgicos intra-buciais em ratos. O equipamento foi desenvolvido e patentado pelo grupo de pesquisa do laboratório de Biologia oral e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG (PI 1103967-1) e tem permitido as cirurgias em boca de pequenos animais com total segurança, reprodutibilidade e comodidade para os operadores. Brevemente, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, os primeiros molares superiores direitos foram extraídos por via alveolar, utilizando-se um instrumento de Holleback Esculpidor 3S para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e remoção dos dentes. O defeito ósseo foi criado na área dos alvéolos das raízes distais remanescentes, com o auxílio de uma broca diamantada cilíndrica KGS-2094. Sob irrigação com solução salina estéril, um micromotor odontológico (Driller) acoplado à broca 2094 permitiu a remoção dos septos interradiculares dos alvéolos das raízes distais. O septo ósseo entre as raízes distais e a raiz mesial foi sempre preservado, pois constitui uma das paredes do defeito ósseo. Os defeitos ósseos obtidos tinham dimensões aproximadas de 2,5mm de diâmetro x 2,5mm de profundidade. As cavidades ósseas foram preenchidas de acordo com 4 grupos experimentais propostos, a saber: 1. Osso bovino mineralizado-inorgânico (OBM), 2. Osso bovino desmineralizado (OBD); 3. Osso Bio-Oss® mineralizado particulado (BO); 4. Coágulo sanguíneo (CN). A mucosa foi suturada com fio de nylon, Biosut 6.0, por meio da técnica de colchoeiro modificada (figura 2.H e 2.I). Após o retorno da anestesia, os animais receberam uma dose de analgésico, TRAMAL (4mg/Kg) e ainda, 3 doses subcutâneas do antibiótico oxitetraciclina (Terramicina Solução injetável), 10mg/Kg, a cada 24 horas. No pós cirúrgico, os animais receberam dieta pastosa até o dia da remoção dos pontos cirúrgicos, realizada aos 7 dias, quando os animais receberam metade da dose anestésica proposta apenas para o relaxamento e abertura dos maxilares. A figura 2 demonstra o passo-a-passo do procedimento cirúrgico.

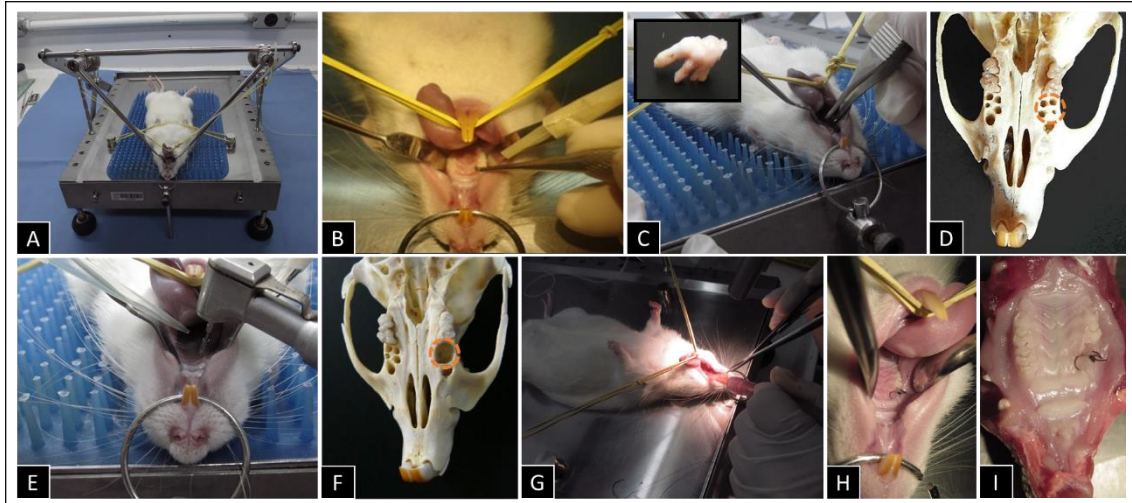


FIGURA 2: DETALHES DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (A) Posição do animal na mesa cirúrgica em decúbito dorsal; (B) Sindesmotomia com auxílio do instrumental Hollemback; (C) Luxação e extração do primeiro molar direito superior com pinça dente de rato; (D) Imagem de um crânio dissecado para visualização da área dos alvéolos dos primeiros molares, após a remoção dos dentes, onde será realizado o defeito pela união dos alvéolos das raízes distais. (E) Confecção do defeito ósseo na região dos alvéolos com auxílio de um micromotor odontológico acoplado a uma broca diamantada 2094; (F) Imagem de um crânio dissecado para ilustrar o defeito ósseo com profundidade e diâmetro de 2,5mm, evidenciado pelo círculo laranja; (G) Defeito ósseo preenchido com biomaterial e coágulo sanguíneo; (H e I) Sutura tipo colchoeiro composto.

4.6 Avaliação clínica (macroscópica) do sítio cirúrgico

Para avaliação clínica/macroscópica da cicatrização da área operada, os animais foram fotografados após sacrifício no final de cada período de tratamento, 7, 14, 21 e 49 dias, com lentes macro - câmera fotográfica Panasonic DMC-TZ3, LUMIX (Figura 3).

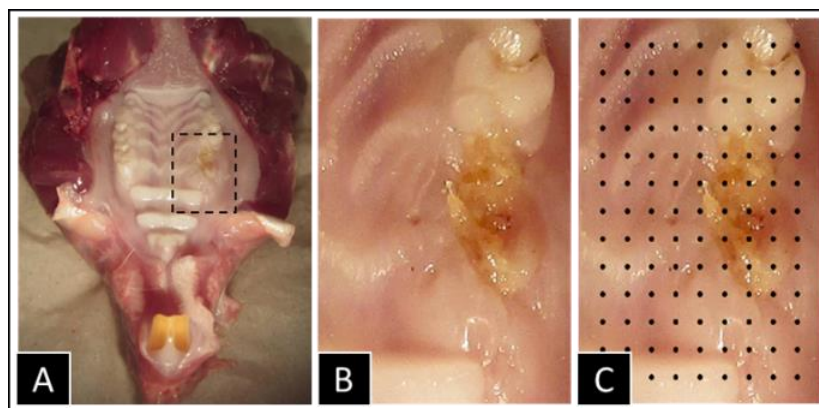


FIGURA 3: AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO GENGIVAL. (A) Macrofotografia padronizada. A região quadriculada em preto representa a área de avaliação da cicatrização gengival, referenciada em B. (C) Pontos igualmente distribuídos sobre a área de avaliação. Os pontos sobre o tecido de granulação foram convertidos em percentuais, em relação ao número total de pontos da área considerada.

Na data do sacrifício, as maxilas foram dissecadas e fotografadas previamente à imersão das peças na solução fixadora. As fotos foram obtidas sem a utilização de flashes, a uma distância padrão de 5cm do objeto de estudo. Os dados clínicos foram estimados pelo nível de epitelização gengival. Para tanto, as imagens tomadas em tamanho padronizado eram posicionadas sob uma grade com pontos equidistantes. Os pontos sobre os tecidos de granulação foram convertidos em percentuais, em relação ao total da área considerada para avaliação. Um maior número de pontos sobre o tecido de granulação indica um menor nível de cicatrização gengival, ou seja, uma ferida ainda aberta, com maior área em processo de cicatrização. Quanto menor o número de pontos sobre o tecido de granulação, mais fechada e epitelizada está a área de mucosa operada. A avaliação macroscópica foi realizada em um estudo cego, por 3 avaliadores calibrados previamente e avaliados pelo método Kappa (medida de concordância interobservador). Após a conversão dos pontos em percentuais, foram calculadas as médias de 6 animais por grupo. Depois, novas médias foram tiradas a partir das médias individuais dos 3 avaliadores que participaram da análise. Os dados foram comparados estatisticamente por One-way ANOVA com fator de correção em Teste Tukey e significância estatística igual a $P < 0,05$.

4.7 Avaliação radiográfica (RX Digital)

Para avaliação radiográfica, as maxilas foram divididas ao meio, na linha mediana do palato entre os incisivos centrais (figura 4A). Somente as hemimaxilas contendo os defeitos ósseos (lado direito) foram radiografadas. Para tanto, após a fixação, as hemimaxilas foram transferidas para solução alcoólica 70% e levadas à Faculdade de Odontologia da UFMG, onde foram radiografadas. Foram utilizadas placas de fósforo 3x4 da Durr Dental (Bietigheim, Bissingen – Alemanha) para captação da imagem por meio do aparelho radiográfico Gendex 756DC (Pensilvânia, EUA) de corrente contínua. As placas foram expostas a um tempo de exposição de 0,125 dm/s, 65 kV, 7 mA com distância foco/filme fixo de 10cm, feixe perpendicular ao objeto radiografado e sem distorção. Essas placas foram digitalizadas pela processadora VistaScanPerio Plus da Durr Dental. O sistema VistaScan possui software próprio, DBSWIN, e nele as imagens foram manipuladas. As imagens digitais foram analisadas pelo software Adobe Photoshop CS5 onde três pontos padrões, ROI – Region of Interest, de tamanho 5x5 pixels foram determinados nas regiões apical, medial e coronal do sítio cirúrgico com

distância de 1mm da raiz mesial do segundo molar superior para medição dos níveis de cinza presentes na área (Figura 4B). Após o cálculo da média dos 3 pontos de cada animal, foram calculadas também as médias dos tons de cinza de cada grupo experimental de interesse. Os níveis de cinza são obtidos pela ferramenta Histograma do software utilizado e apresentam valores entre 0 (completamente preto) e 256 (completamente branco). Quanto mais próximo de branco, maior a radiopacidade da área operada; quanto mais próximo de preto, menor a radiopacidade da área operada. Uma análise preliminar das radiografias dos maxilares de ratos, independentemente da área do defeito, foi realizada para determinar a faixa de trabalho (faixa de tons de cinza das maxilas de rato). Foram usados como referência o ponto mais radiolúcido das radiografias (polpa dos incisivos) e o ponto mais radiopaco das radiografias (esmalte dentário dos incisivos). Os valores da faixa de tons de cinza ficaram entre 46,04 e 135,6. Somente a partir desses parâmetros, foram iniciadas as análises dos 3 pontos, em profundidades diferentes, de referência na área dentro dos defeitos ósseos. As análises foram realizadas por 3 avaliadores independentes. O ganho de radiopacidade do sítio enxertado ao longo do tempo é proporcional à deposição mineral presente. Uma vez que os biomateriais apresentam uma radiopacidade natural, os animais foram radiografados para uma análise preliminar desses biomateriais, após 24 horas das cirurgias. Os valores de radiopacidade encontrados no interior do defeito, 1 dia após a enxertia, foram considerados como “ponto zero” ou seja, o valor da radiopacidade dos biomateriais *in loco*, antes do início da reabsorção dos materiais e da neoformação óssea. Portanto, na avaliação final das radiografias considerou-se somente o ganho de radiopacidade além dos valores do ponto zero. O ganho de radiopacidade entre 1 e 49 dias representam a mensuração digital dos níveis de cinza no sítio avaliado sugerindo uma deposição mineral na área de enxertia nos casos em que a radiopacidade final aos 49 dias supere a radiopacidade inicial avaliada no período de 1 dia. Os resultados foram comparados com as análises histológicas de avaliação da neoformação óssea para confirmação da técnica radiográfica como parâmetro clínico de deposição óssea.

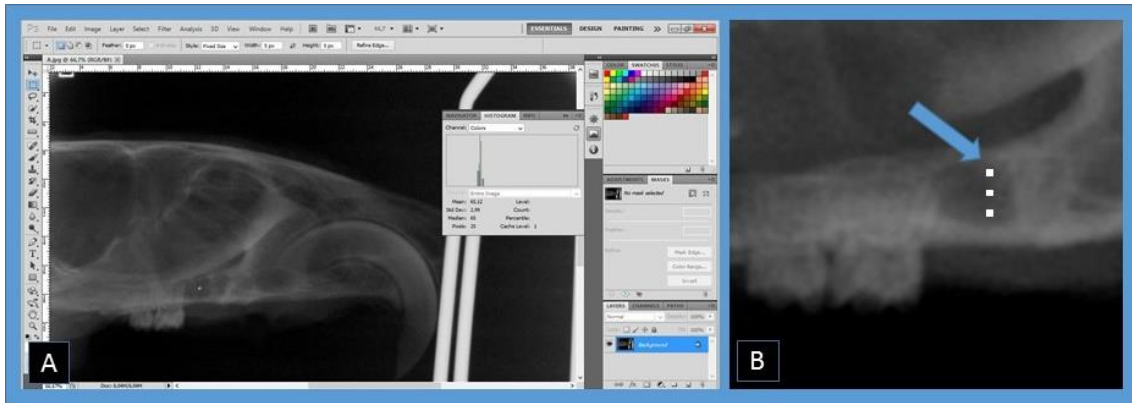


FIGURA 4: AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E MEDIÇÃO DOS TONS DE CINZA. (A) Medição do tom de cinza da região de defeito da radiografia para avaliação do nível de radiopacidade e sua correlação com a deposição de novo osso. (B) Região de defeito. A seta azul referencia os três pontos de medição dos tons de cinza segundo as suas profundidades. O valor final foi determinado pela média dos três pontos.

4.8 Processamento histológico das maxilas

O processamento histológico das maxilas consistiu das seguintes etapas: fixação em formalina neutra tamponada 10% por 72 horas; lavagem em água destilada *overnight* e desmineralização em solução tamponada de EDTA 10%, pH 7.2, por período médio de 35 dias com trocas da solução a cada três dias; lavagem em água corrente (24 horas); desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes por 30 minutos cada (70%, 80%, 90%, 95% e 100%); diafanização em 3 banhos de xilol por 20 minutos cada; infiltração em 3 banhos de parafina 58°C (em estufa) por 40 minutos cada e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em plano frontal. Secções seriadas de 5µm foram coradas com Tricrômico de Masson, Hematoxilina & Eosina (H&E) e *Picro-Sirius Red*. Imagens de cortes semiseriados foram capturadas em microscópio de luz Olympus BX-50 acoplado a câmera Q-color 3 para análises morfométricas.

4.9 Tricrômico de Masson

As secções histológicas de 5µm foram selecionadas em 3 diferentes profundidades de cortes seriados do defeito ósseo para coloração em Tricrômico de Masson. Após a seleção dos cortes, as lâminas passaram por desparafinização em três banhos de xilol por 20 minutos cada, com posterior processo de hidratação em álcool seriado em ordem decrescente (100%, 90%, 80% e 70% por 2 minutos cada banho) e imersão em água por 20 minutos. No passo seguinte, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e

submersas em água corrente por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas no corante Tricrômico de Masson por 14 minutos e foram desidratadas em sequência crescente de álcool por um minuto em cada solução (95%, 100% e 100%). Antes de finalizar a confecção das lâminas, essas foram preparadas em xilol de montagem em 3 banhos seguidos de 20 minutos cada. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck – Alemanha) e encaminhadas, após secagem, para fotografia e análises de morfometria. A avaliação morfométrica da deposição óssea foi realizada por meio do software *ImageJ*. A porcentagem da área ocupada pela neoformação óssea, visualizada pela deposição de trabéculas coradas por Tricrômico de Masson, foi determinada por 3 avaliadores treinados em uma análise cega. Após a avaliação, as médias dos valores obtidos das secções seriadas (3 diferentes profundidades) foram alcançadas. Ao unir os resultados de cada avaliador, uma nova média foi adquirida (média da média) e os dados encaminhados para teste estatístico.

4.10 *PicroSirius Red*

Assim como na técnica de Tricrômico de Masson, para o *PicroSirius Red* foi utilizado secções histológicas de 5µm selecionadas em 3 profundidades diferentes de cortes seriados do defeito ósseo. Os cortes escolhidos passaram por desparafinização em banhos de xilol (2 banhos) por 20 minutos cada. Posteriormente, os cortes foram hidratados com 3 banhos de álcoois seriados em ordem decrescente (100%, 90% e 70% por 5 minutos cada banho) e imersão em água por mais 5 minutos. No passo seguinte, as lâminas foram coradas com *PicroSirius Red* por 45 minutos em estufa à 60°C e submersas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas por mais 5 minutos em água corrente e desidratadas em sequência crescente de álcool por um minuto em cada solução (90%, 100% e 100%). Antes de finalizar a confecção das lâminas, essas foram preparadas em xilol de montagem em 3 banhos seguidos de 20 minutos cada. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck – Alemanha). Após secagem, essas foram fotografadas e analisadas em campo claro e em luz polarizada. A quantificação da matriz óssea madura (colágeno tipo I) foi realizada por meio do software *ImageJ*. Após a quantificação, as médias dos valores obtidos das secções seriadas (3 diferentes profundidades) foram alcançadas. Em um segundo momento, os resultados foram comparados com a morfometria por Tricrômico

de Masson a fim de obter o percentual de colágeno tipo I referente a quantidade de osso neoformado.

4.11 Estatística

Todos os resultados foram analisados por meio do software PrismStatiscal software (Graphpad, San Diego, CA). Os dados foram representados como média +- desvio padrão e estatisticamente comparados usando análise de variância One-way ANOVA e teste de Tukey. Níveis de confiança $< 95\%$ ($p > 0,05$) foram considerados não significativos. A comparação direta entre dois grupos foi realizada por meio do *t test* com níveis de confiança $< 95\%$ ($p > 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise da preservação dos fragmentos ósseos submetidos ao processo de desmineralização

A coloração por H&E revelou a manutenção de trabéculas ósseas, de aspecto eosinófilo contornando espaços medulares regulares (Figura 5^a). Curiosamente, no interior das trabéculas foram observados restos celulares basófilos, sugerindo resíduos nucleares em lacunas, possivelmente remanescentes de osteócitos que resistiram aos processos de descelularização (Figura 5B). A presença de matriz colagenosa nas trabéculas foi confirmada pela coloração em azul pelo Tricrômico de Masson (Figura 5C).

A imunohistoquímica revelou a expressão de todas as proteínas selecionadas, colágeno III, osteopontina e BMP-4. A osteopontina apresentou um padrão mais difuso de marcação, enquanto o colágeno III e BMP-4 revelaram uma expressão mais concentrada nas bordas das trabéculas (Figura 6A, B e C). Adicionalmente o controle da marcação de DNA pelo DAPI confirmou a presença de resíduos celulares no interior das trabéculas (Figura 6D)

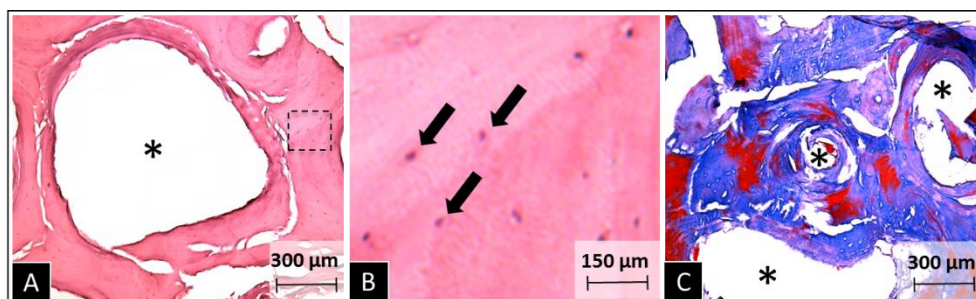


FIGURA 5: ASPECTO HISTOLÓGICO DO OSSO BOVINO DESMINERALIZADO EM EDTA. (A) trabéculas ósseas contornam espaços medulares; (B) imagem ampliada da área tracejada em A. As setas indicam a presença de restos celulares; (C) a presença de matriz colagenosa é confirmada em azul na coloração de Tricrômico de Masson. (*) Espaços medulares.

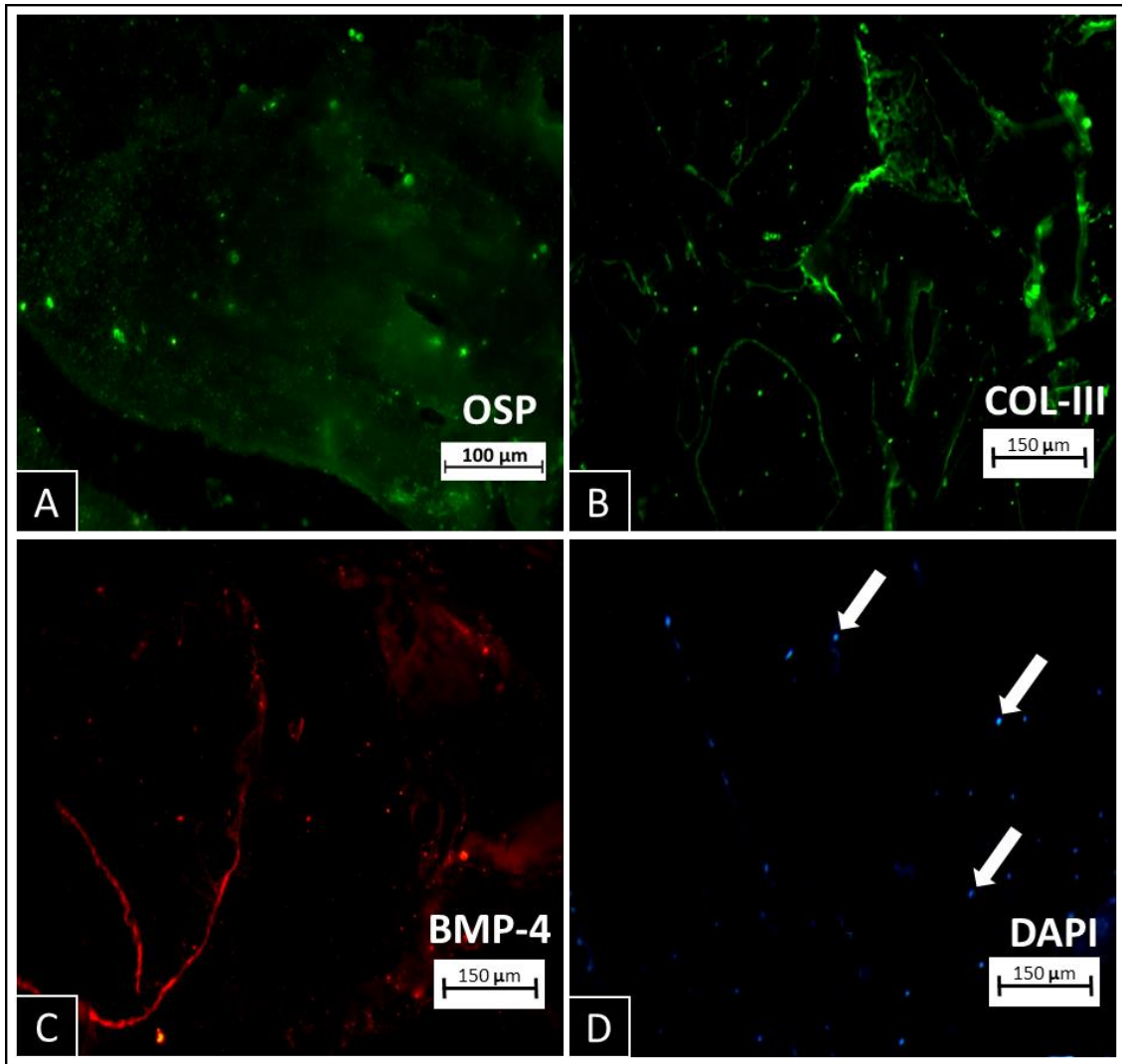


FIGURA 6: IMUNOFLUORESCÊNCIA DA MATRIZ ORGÂNICA DO OBD. Fragmentos OBD submetidos à imunofluorescência para osteopontina - Alexa flúor anti goat 488 verde (A), colágeno III - Alexa flúor 488 verde (B) e BMP-4 - Alexa flúor 555 vermelho (C). Marcação positiva para DAPI, indicando o DNA em resíduos celulares no interior de trabéculas ósseas (D).

5.2 Avaliação clínica da cicatrização do sitio cirúrgico

Todos os biomateriais foram satisfatórios em relação ao fechamento precoce das feridas. Aos 14 dias, praticamente 100% das amostras estavam macroscopicamente cicatrizadas, epitelizadas sem tecido de granulação visível a olho nu. Somente no período mais precoce de avaliação (7 dias), quando as feridas cirúrgicas ainda não estavam completamente cicatrizadas, houve uma diferença no percentual de tecido de granulação encontrado entre os grupos (Figura 7). Nesse período, o grupo CN preenchido com coágulo sanguíneo (controle negativo) apresentou 35,6% de tecido de granulação, o grupo BO (controle positivo) 41,2%, o grupo OBM (enxerto ósseo mineralizado Lumina Bone - Critéria) apresentou 34% e o grupo OBD (enxerto ósseo desmineralizado Lumina Bone - Critéria) apresentou o melhor resultado, com o menor percentual de tecido de granulação, 31,3%, (maior área de tecido epitelizado). Todavia, os valores não foram considerados estatisticamente significativos na comparação entre grupos (Gráfico 1).

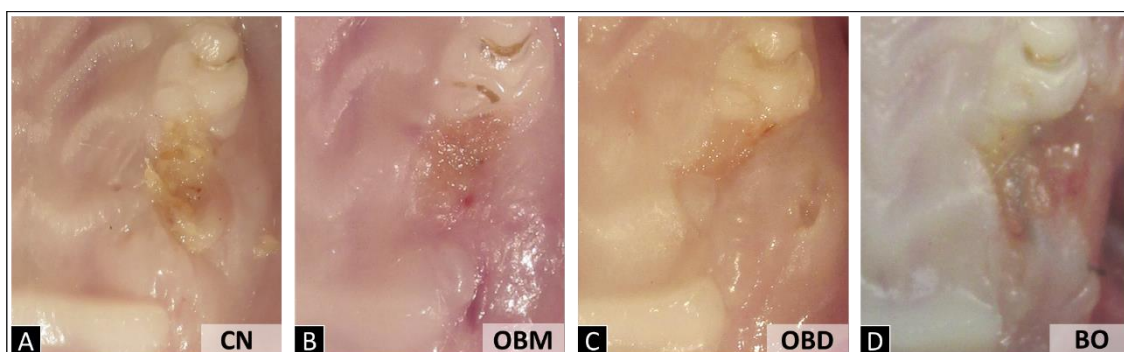


FIGURA 7: ASPECTO DO TECIDO EPITELIAL DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO AOS 7 DIAS. A menor área de tecido de granulação é observada no OBD (C), enquanto os demais grupos (CN, OBM e BO) apresentaram maior quantidade de tecido de granulação com resultados similares (A, B e C).

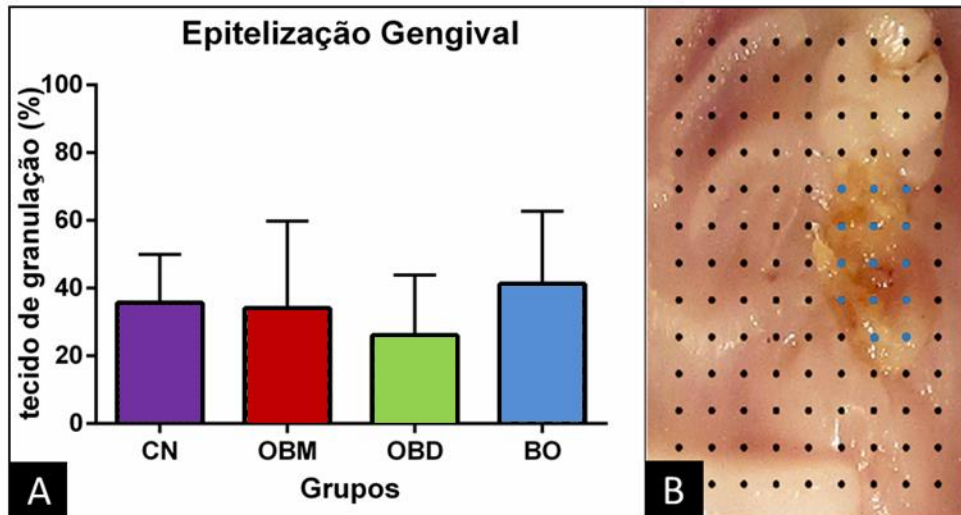


FIGURA 8: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS QUANTO AO NÍVEL DE EPITELIZAÇÃO GENGIVAL APÓS 7 DIAS DAS CIRURGIAS. Em A, os dados representam o índice de tecido de granulação medidos em valores percentuais de área ocupada (pontos azuis na imagem B) em relação à área total avaliada. O melhor resultado foi encontrado para o grupo OBD, seguido pelo grupo OBM, CN e BO. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (One-way ANOVA). (B) Imagem macroscópica da área de avaliação sob a grade de 117 pontos. Os pontos em azul na imagem representam a área de tecido granuloso posteriormente convertida em percentual em relação ao número total de pontos.

A partir de 14 dias, todas as amostras apresentaram epitelação gengival completa, independentemente do tipo de material enxertado (figura 8). Delicadas dobras de tecido foram observadas algumas vezes na linha de junção epitelial (Figura 8F), mas com aspecto rosado, epitelizado, distinto de uma fenda ou tecido de granulação residual.

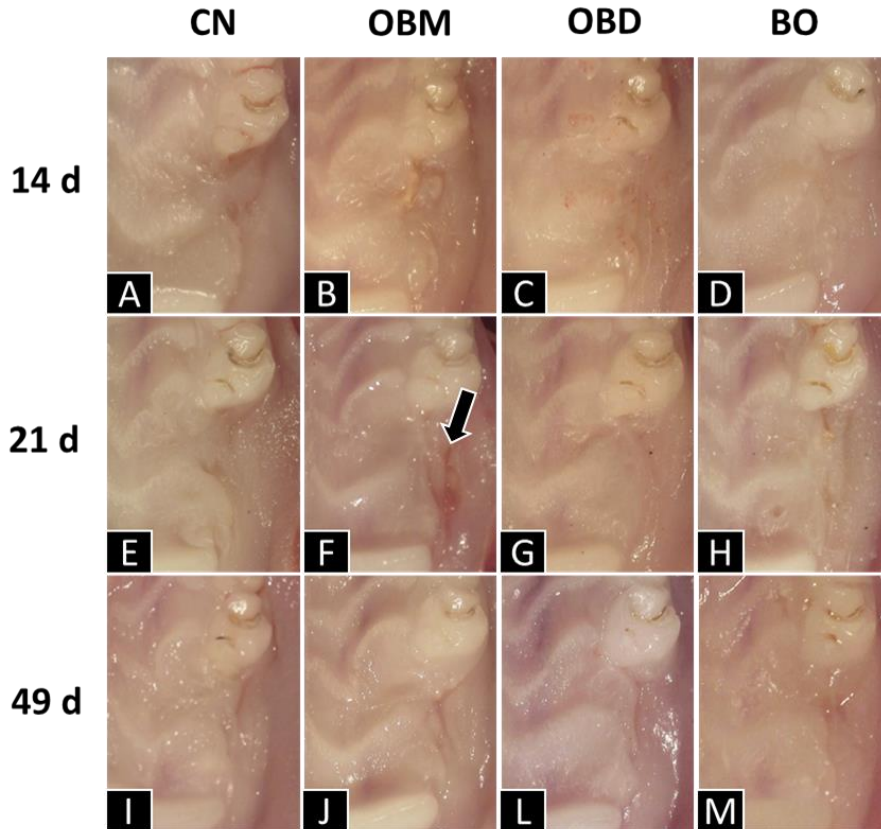


FIGURA 9: ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CICATRIZAÇÃO GENGIVAL DOS SÍTIOS CIRÚRGICOS APÓS 14, 21 E 49 DIAS. Todos os grupos apresentaram macroscopicamente 100% de cicatrização epitelial, nenhum ponto computado sobre tecido de granulação. A seta preta em F indica dobras do tecido na linha da junção epitelial.

5.3 Avaliação radiográfica

Os tons mais radiopacos (mais brancos) das estruturas anatômicas observadas nas radiografias é diretamente proporcional ao nível de mineral presente. O tecido ósseo, por sua natureza mineral, é considerado um tecido radiopaco. Quanto maior os valores obtidos nas curvas de cinza, mais próximos do branco e mais mineralizadas estão as estruturas avaliadas. As radiografias digitais constituem o instrumento de avaliação clínica de mais fácil acesso e portanto mais utilizado por profissionais da odontologia para a avaliação de reparos ósseos intrabucais. A análise preliminar da radiopacidade dos biomateriais *in loco* foi realizada em radiografias obtidas após 24 horas das enxertias (tempo zero). Os resultados revelaram maiores valores na curva de cinza (radiopacidade) para o biomaterial Bio-Oss (101,6), grupo BO, seguindo-se do OBM (99,29). Os menores

valores foram encontrados para o grupo OBD (85,92) seguido do grupo controle negativo (CN) com 84,88 tons de cinza (Gráfico 2).

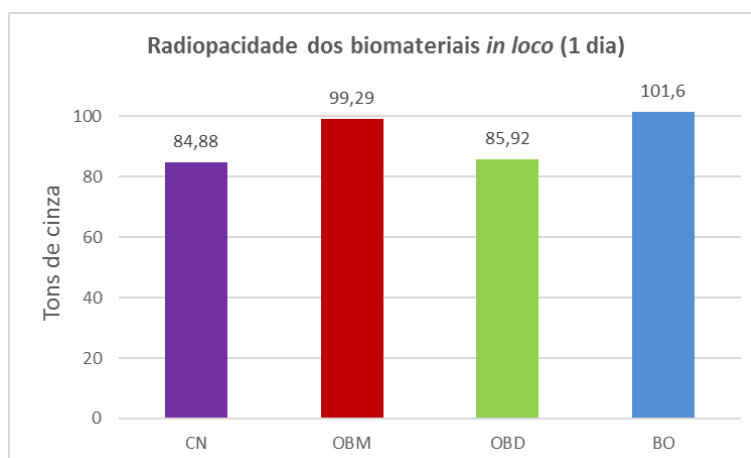


GRÁFICO 1: COMPARAÇÃO DA RADIOPACIDADE NOS DEFEITOS ÓSSEOS APÓS 24 HORAS DAS ENXERTIAS. O BO apresentou maior radiopacidade inicial e o CN, a menor radiopacidade. Na curva de tons de cinza, quanto maior o valor, mais próximo do branco (mais radiopaco) e quanto menor o valor, mais próximo do preto.

Para a conclusão da análise radiográfica, consideramos para cada material enxertado o ganho de radiopacidade, calculado pelo valor encontrado aos 49 dias menos o valor do tempo zero (1 dia). O maior ganho foi registrado para o grupo OBD (ganho de 30,25 tons de cinza), acompanhado pelos grupos CN com ganho de 21,73 tons de cinza, grupo OBM com ganho de 6,41 tons de cinza e controle positivo (Bio-Oss) com ganho de 4,44 tons de cinza (Gráfico 3).

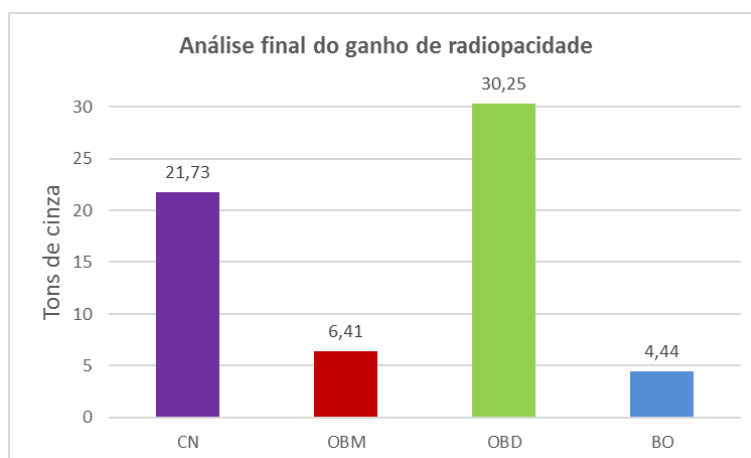


GRÁFICO 2: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS QUANTO AO GANHO DE RADIOPACIDADE ENTRE O TEMPO INICIAL (1DIA) E FINAL (49) DE TRATAMENTO. Os valores foram OBD > CN > OBM > BO.

A curva de radiopacidade (tons de cinza) de cada biomaterial ao longo do tempo está expressa no Gráfico 4. Pode-se observar os seguintes resultados:

1. Grupo CN (coágulo): Os tons de cinza (radiopacidade) tiveram inicialmente uma queda de 10,31 aos 7 dias, com consecutivo ganho aos 14, 21 e 49 dias. O pico de ganho da radiopacidade foi entre o tempo de 14 a 21 dias;
2. Grupo controle positivo (Bio-Oss): Foi observado um ganho de 9,13 tons de cinza (radiopacidade) entre o tempo de 1 dia a 7 dias com queda de 13,97 pontos aos 14 dias. Em seguida, a radiopacidade da região de defeito sofreu seguido ganho aos 21 e 49 dias de 8,21 e 1,07 pontos, respectivamente;
3. Grupo OBM: Apresentou queda de radiopacidade do primeiro dia de avaliação para o sétimo e décimo quarto dia de 15,28 e 7,72 pontos, respectivamente. A partir do décimo quarto dia, houve seguido ganho da radiopacidade aos 21 (4,43 pontos) e 49 dias (24,98 pontos);
4. Grupo OBD: Apresentou queda de 10,31 pontos na radiopacidade entre o tempo de 1 a 7 dias, com ganhos seguidos entre os tempos de 7, 14, 21 e 49 dias de 5,34, 13,26 e 21,96 pontos, respectivamente.

O grupo OBD, referente aos demais grupos aos 49 dias, apresentou radiopacidade superior estatisticamente significativo (One-way ANOVA com fator de correção em Teste Tukey e significância estatística igual a $P < 0,05$).

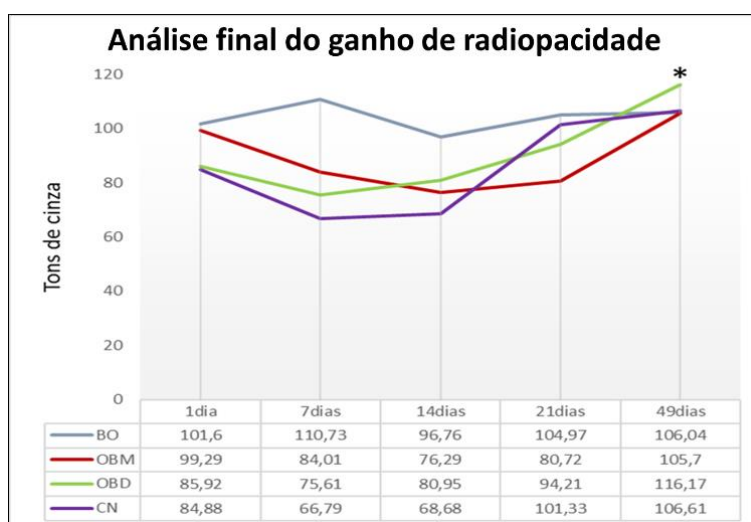


GRÁFICO 3: EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DE RADIOPACIDADE DOS BIOMATERIAIS AO LONGO DO TEMPO E EM CADA PERÍODO AVALIADO (1, 7, 14, 21 E 49 DIAS). Quanto maiores os valores numéricos expressos, maior a radiopacidade dentro da curva de tons de cinza previamente determinada. Aos 49 dias, o OBD apresentou radiopacidade estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos (*).

5.4 Histomorfometria do osso neoformado

5.4.1. Neoformação óssea nos defeitos enxertados com OBD

Os animais enxertados com matriz de osso xenógeno desmineralizado revelaram maior deposição óssea, com diferenças estatisticamente significativas, em relação aos animais não tratados (CN), nos períodos de 14 e 21 dias (Gráfico 5A). Entretanto, nos períodos de 7 e 49 dias não houve diferença entre eles.

A comparação entre os tempos de tratamento em um mesmo grupo permitiu avaliar a progressão do processo de regeneração do tecido ósseo. As avaliações do CN demonstraram uma deposição óssea significativa a partir dos 14 dias de tratamento (Gráfico 5B). Diferentemente, o OBD (Gráfico 5C), a partir do sétimo dia de tratamento até o período final, apresentou significativas deposições ósseas (One-way ANOVA com fator de correção em Teste Tukey e significância estatística igual a $P < 0,05$). Esses resultados expressam uma neoformação óssea precoce ou aceleração do processo de reparo quando comparado com o CN, além de um expressivo ganho de osso neoformado em todos os tempos de tratamento.

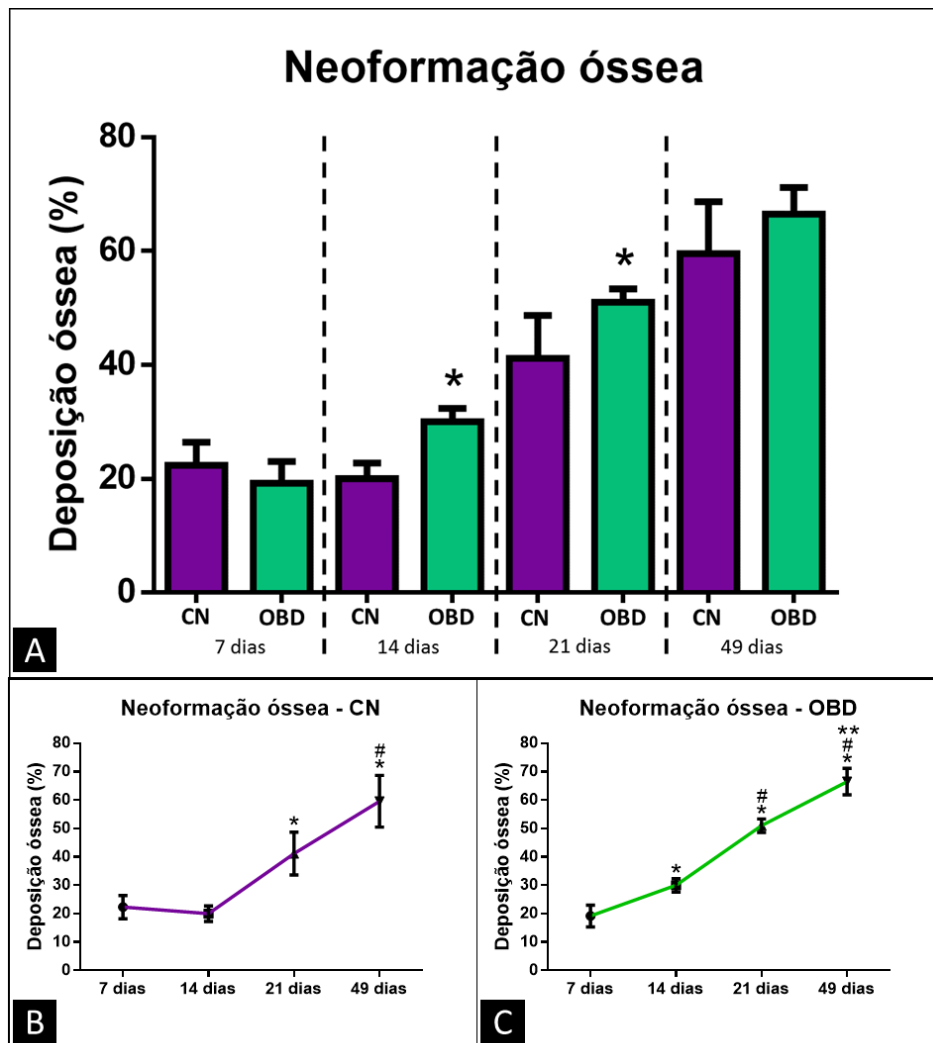


GRÁFICO 4: DEPOSIÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO NOS GRUPOS CN E OBD. (A) Aos 14 dias e 21 dias a comparação entre grupos apresentou diferença estatística com melhores resultados para o OBD (t test). (B) A progressão da deposição óssea ao longo do tempo no CN mostra diferença estatística para os períodos de 49 e 21 dias quando comparados entre si (#) e quando comparados com os períodos de 7 e 14 (*), Anova com fator de correção em Teste Tukey. Em (C), as diferenças estatísticas para o grupo OBD foram encontradas em todos os períodos sendo * $P < 0,05$ para 49, 21 e 14 dias comparados com 7 dias; # $P < 0,05$ para 49 e 21 dias comparados com 14 dias e ** $P < 0,05$ para 49 dias comparado com 21 dias. Anova com fator de correção em Teste Tukey.

5.4.2. Neoformação óssea nos defeitos enxertados com OBM e BO

A deposição óssea observada nos grupos tratados com Osso Bovino Mineralizado (OBM) e Bio-Oss (BO) foi similar com exceção no período de 14 dias, onde a neoformação óssea foi estatisticamente superior para o grupo BO (Gráfico 6A).

Entretanto, aos 21 dias, a deposição óssea nos grupos tratados com OBM já se tornava equivalente à deposição do grupo BO, sem diferença estatística entre eles.

A comparação entre os períodos de tratamento dos animais enxertados com OBM aos 7 e 14 dias, não apresentou diferença estatística. Entre os tempos de 14 e 21 dias, a deposição óssea foi estatisticamente diferente. Já o ganho de osso neoformado nos períodos finais de regeneração, entre 21 e 49 dias, foi insignificante (Gráfico 6B).

A curva de deposição óssea nos animais tratados com Bio-Oss (BO) apresentou um ganho significativo entre 7 e 14 dias. A comparação entre os tempos de 14 e 21 dias não expressaram diferença estatística, diferentemente do observado nos períodos seguintes, entre 21 e 49 dias (Gráfico 6C). Esses resultados indicam uma neoformação óssea precoce para o BO, iniciando aos 7 dias, quando comparado com o OBM que apresenta deposição óssea de forma expressiva somente após 14 dias de tratamento. Por outro lado, a deposição óssea no grupo BO parece mais lenta a partir dos 14 dias, contrariamente ao observado no grupo OBM que tem um pico de produção óssea no período entre 14 e 21 dias.

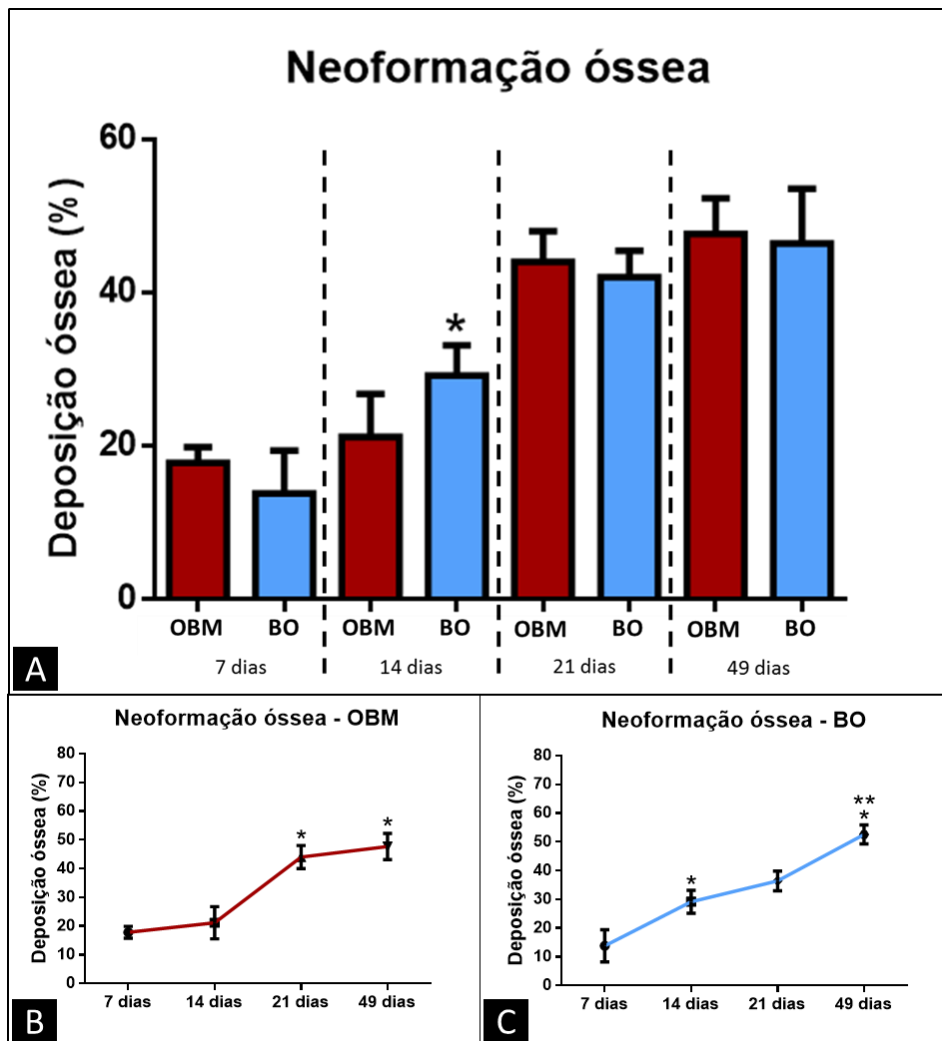


GRÁFICO 5: DEPOSIÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO DOS GRUPOS OBM E BO. (A) Aos 14 dias, a comparação entre grupos apresentou diferença estatística com melhores resultados para o BO (t test). (B) A progressão da deposição óssea ao longo do tempo no OBM mostra diferença estatística para o período de 49 e 21 dias quando comparados com 7 e 14 (*), Anova com fator de correção em Teste Tukey. Em C o gráfico revela uma linha de deposição óssea mais linear gerada pelo BO ao longo do tempo, com diferença estatística entre os períodos de 7 e 14 dias (*) e entre 21 e 49 dias (**), Anova com fator de correção em Teste Tukey.

5.5 Nível de Maturação do osso neoformado nos períodos de 7, 14, 21 e 49 dias

Por meio da polarização das fibras colágenas coradas pelo *PicroSirius Red* foi possível estimar o nível de maturação óssea, nos períodos selecionados, considerando o percentual de fibras vermelhas detectadas com o auxílio do software *ImageJ*. As figuras 9 e 10 mostram a coloração de *PicroSirius Red* para os 3 tipos de enxertia, ao longo do reparo ósseo, observada em campo claro (imagens da esquerda) e em luz polarizada

(imagens da direita). Por meio dos recursos de separação de canais de cores do software *ImageJ*, somente a birrefringência das fibras vermelhas, consideradas mais maduras, espessas e organizadas, foram consideradas.

Nos períodos iniciais de deposição óssea, o percentual de fibras vermelhas detectadas nos defeitos enxertados com OBD foi similar ao grupo CN. Neste último, o percentual encontrado aos 7 e 14 dias foi aparentemente maior, mas a análise estatística não revelou diferenças significativas. Todavia, nos períodos finais de tratamento, aos 21 e 49 dias, o grupo OBD apresentou maior quantidade de matriz óssea madura, contudo, com diferença estatística encontrada apenas no tempo final de tratamento, aos 49 dias (Gráfico 7).

Quanto a maturação das fibras colágenas nos grupos de enxertos mineralizados, não houve diferença significativa entre BO e OBM, embora os percentuais de fibras vermelhas nos grupos enxertados com OBM tenham sido superiores em praticamente todos os períodos de tratamento, exceto aos 14 dias (Gráfico 8).

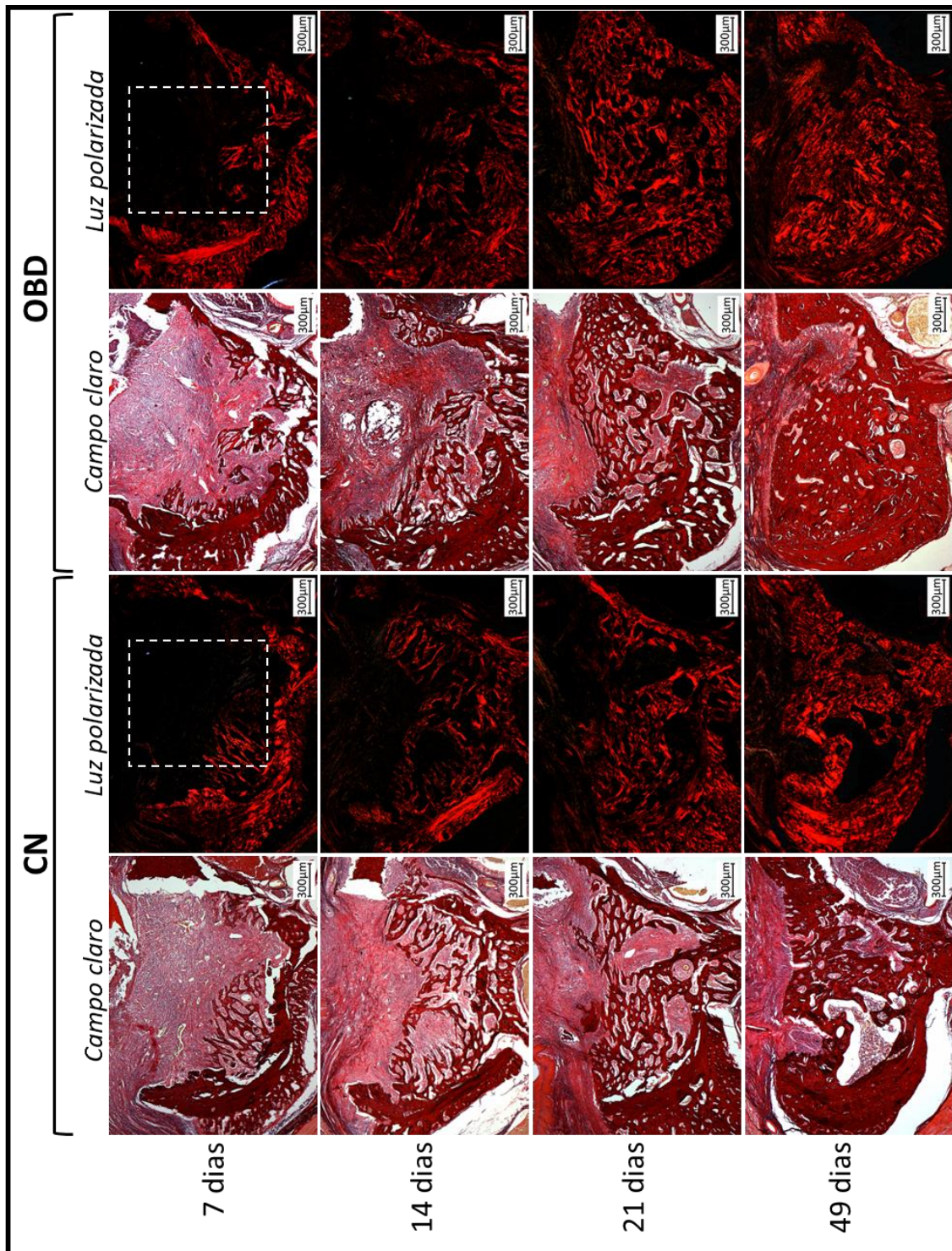


FIGURA 10: ANÁLISE DO NÍVEL DE MATURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO POR PICROSIRIUS RED NOS GRUPOS CN E OBD. As colunas indicadas como campo claro referem-se à análise dos cortes em microscopia comum. As colunas indicadas como luz polarizada referem-se à análise das fibras colágenas maduras. O quadro tracejado branco corresponde à área de análise considerada para a morfometria (1,2mm de largura por 1,4mm de altura), indicando uma leitura sem qualquer interferência das paredes remanescentes do defeito. Toda a marcação vermelha das imagens polarizadas representam a matriz óssea madura, sendo mais expressiva aos 49 dias para ambos CN e OBD.

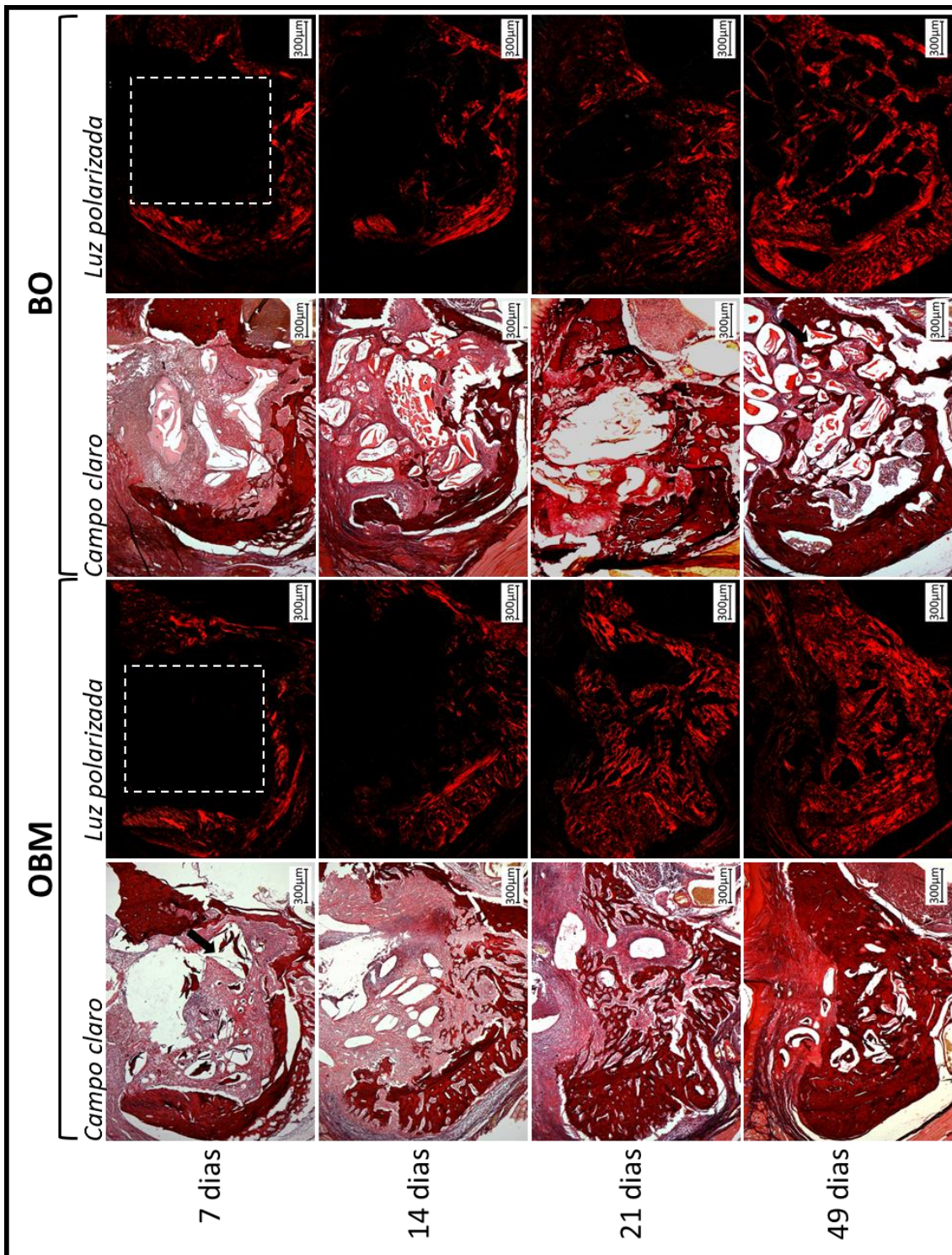


FIGURA 11: ANÁLISE DO NÍVEL DE MATURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO POR PICROSIRIUS RED NOS GRUPOS OBM E BO. As colunas indicadas como campo claro referem-se à análise dos cortes em microscopia comum. As colunas indicadas como luz polarizada referem-se à análise das fibras colágenas maduras. O quadro tracejado branco corresponde à área de análise considerada para a morfometria (1,2mm de largura por 1,4mm de altura), indicando uma leitura sem qualquer interferência das paredes remanescentes do defeito. Toda a marcação vermelha das imagens polarizadas representam a matriz óssea madura, sendo mais expressiva aos 21 e 49 dias para ambos BO e OBM.

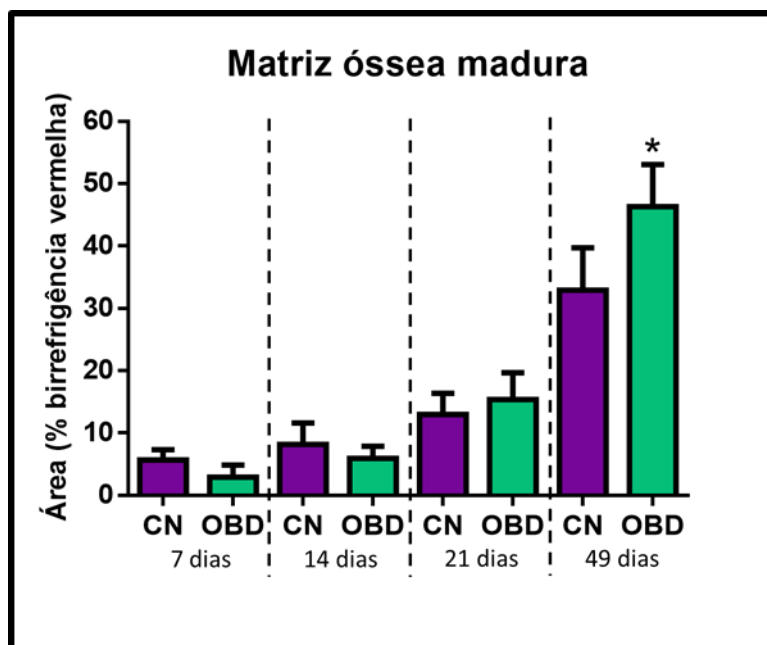


GRÁFICO 6: ANÁLISE QUANTITATIVA DO COLÁGENO COM BIRREFRIGÊNCIA VERMELHA NOS GRUPOS CN E OBD. Observa-se que o pico de maturação das trabéculas neoformadas ocorre entre 21 e 49 dias, em ambos CN e OBD. Entretanto, aos 49 dias, o osso gerado nos defeitos tratados com OBD revelou-se estatisticamente mais maduro que o osso espontaneamente depositado nos animais controle negativo (grupo CN).

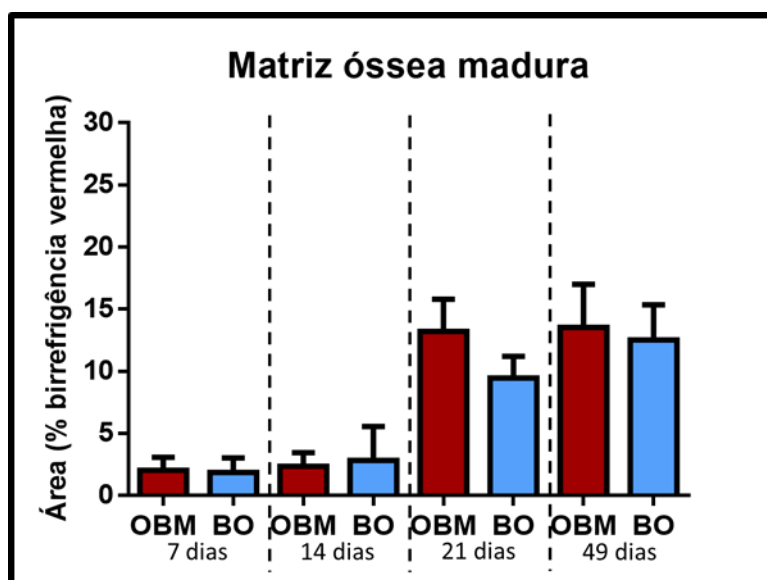


GRÁFICO 7: ANÁLISE QUANTITATIVA DO COLÁGENO COM BIRREFRIGÊNCIA VERMELHA NOS GRUPOS CN E OBD. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos diferentes tempos de tratamento.

5.5.1. Refinamento da leitura de birrefringência de fibras vermelhas aos 49 dias

O nível de maturação óssea no período final do reparo pós-enxertias é extremamente importante para definição do plano de tratamento para o restabelecimento funcional do sítio operado. Os biomateriais devem proporcionar não apenas o preenchimento em volume da perda óssea, mas devem preferencialmente induzir a formação de um osso de qualidade. O tipo de osso formado deve influenciar na seleção das próteses ou implantes a serem instalados no sítio operado. Por essa razão, um refinamento da leitura do *PicroSirius Red* no período final do reparo (49 dias) foi realizado, dessa vez desconsiderando quaisquer outras fibras colágenas dentro da área do defeito que não fossem as trabéculas ósseas, além de tecido mole e presença de biomaterial.

Na leitura anterior (figura 9 e 10) o percentual de matriz óssea madura foi avaliado na mesma área de análise considerada para a morfometria. Contudo, nessa área há a presença de osso neoformado em conjunto com áreas de tecido conjuntivo, de tecido mole, que também possui fibras colágenas em formação. Assim sendo, para uma avaliação mais fidedigna, o percentual de matriz óssea madura adquirida pela técnica de *PicroSirius Red* foi reajustada para um proporcional de 100% da área de osso neoformado observado na histomorfometria. Diante dessa avaliação, o grupo que apresentou maior quantidade de matriz óssea neoformada sobre o total de osso depositado na região de defeito ósseo, aos 49 dias, foi o OBD com 69,6%, seguido do CN, OBM e BO com 52,2%, 28,4% e 23,8%, respectivamente (Gráfico 7). O melhor resultado do grupo OBD nesta leitura reitera, de modo mais específico e seguro, os dados da figura 9.

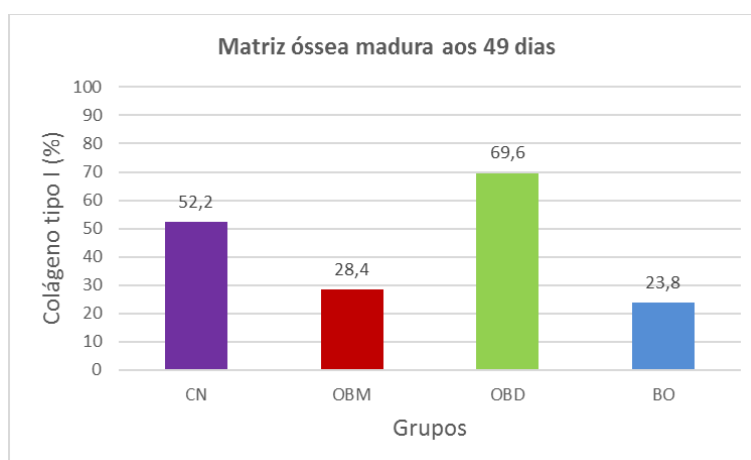


GRÁFICO 8: PERCENTUAL DE MATRIZ ÓSSEA MADURA REFERENTE AO TOTAL DE OSSO NEOFORMADO.

5.6 Reabsorção dos biomateriais

A análise da taxa de reabsorção dos biomateriais foi estimada pelo cálculo da área ocupada pelos biomateriais no 49º dia em relação à área avaliada no 1º dia (24 horas após os procedimentos de enxertia). As medidas foram calculadas com o auxílio do software de análises morfológicas *ImageJ*. Os biomateriais enxertados, desmineralizado (OBD) e mineralizados (OBM e BO), são reabsorvidos pelo organismo parcialmente ou em sua totalidade. A reabsorção dos biomateriais foi estatisticamente significativa entre 1 e 49 dias em todos os casos (Figura 11G). O OBD foi 100% reabsorvido ao comparar o tempo inicial de enxertia com o tempo final. As imagens em HE do defeito preenchido com OBD (Figura 11A e B) demonstram a ausência do biomaterial aos 49 dias, quando o espaço foi praticamente preenchido pelo osso neoformado (Figura 11B). O BO apresentou a menor taxa de reabsorção dentre os biomateriais, uma média próxima de 11% de reabsorção no final do tratamento, sendo estatisticamente significativo em relação à área ocupada no dia 1 (Figura 11G). O OBM revelou uma taxa de reabsorção aproximada de 36% (*t test* pareado). Nas imagens em HE, os biomateriais mineralizados (Figuras 11C a 11F) aparecem como grânulos irregulares em imagem negativa e em alguns casos com resíduos orgânicos em seu interior (setas pretas nas imagens).

A fim de comparar a taxa de reabsorção entre os biomateriais mineralizados, foi realizada uma análise entre eles aos 1 e 49 dias. A comparação no período de 1 dia não apresentou diferença estatística, comprovando similaridade no volume preenchido por ambos os materiais, BO e OBM, no defeito ósseo construído. Contudo, aos 49 dias, a comparação entre BO e OBM demonstrou uma reabsorção superior e estatisticamente significativa para o OBM (*t test* não pareado – trave horizontal entre as colunas OB x OBM no gráfico figura 11G), o que revela uma diferença entre os dois biomateriais. Aos 49 dias, em ratos, quando o processo de reparo já se encontra na fase final conforme verificado nos animais não enxertados (CN), o Bio-Oss foi o biomaterial que manteve sua estrutura mais preservada (Figura 11C e 11D), revelando-se mais resistente à reabsorção que o osso bovino nacional (OBM).

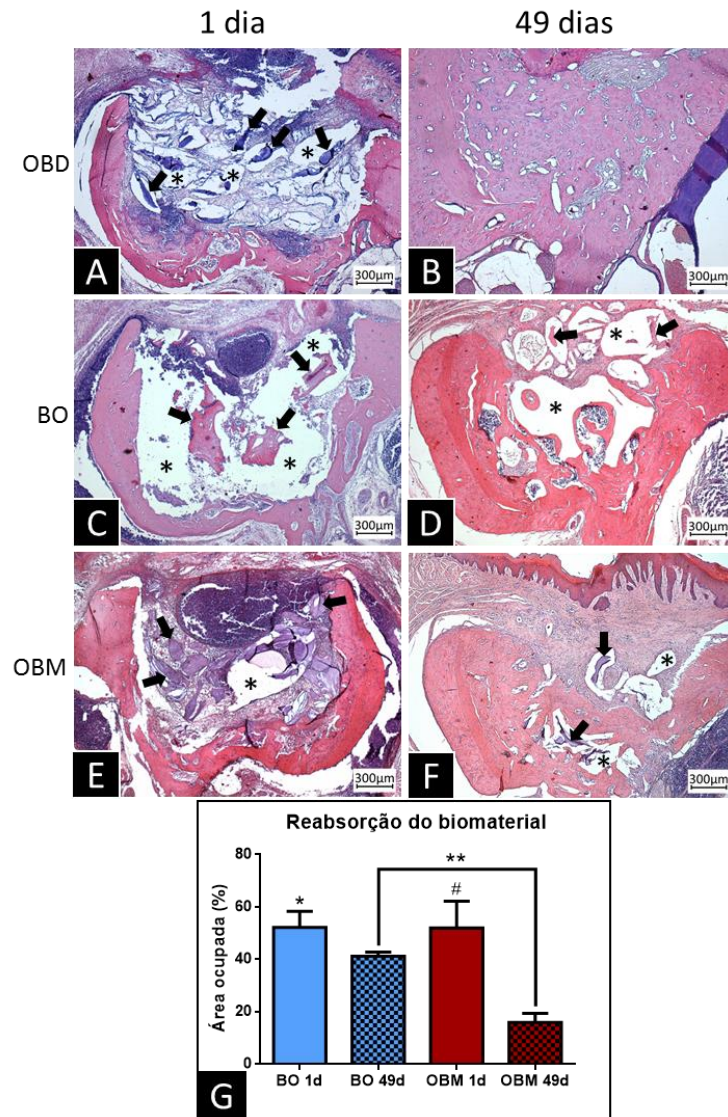


FIGURA 12: AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO DO BIOMATERIAL POR MEIO DE HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA. (A) Avaliação da área ocupada pelos enxertos OBD no 1º e (B) no 49º dia de tratamento. As setas pretas evidenciam as lâminas de matéria orgânica do biomaterial. Nota-se um halo claro ao redor desses resíduos (*) correspondente ao fluido retido na superfície dos fragmentos inseridos. O OBD é enxertado úmido em solução salina estéril (PBS). Aos 49 dias (B), a imagem revela o preenchimento por tecido ósseo, sem resquícios do biomaterial indicando total reabsorção. (C) Imagens do BO após 1 dia de enxertia e (D) após 49 dias. (E) Imagem dos defeitos enxertados com OBM após 1 dia da enxertia e (F) após 49 dias. As setas pretas indicam matriz orgânica residual dos biomateriais. Os asteriscos (*) indicam espaços em branco, imagem negativa, ocupados pela porção inorgânica dos biomateriais, removida pelo processo de desmineralização durante os procedimentos histológicos. Aos 49 dias, percebe-se uma menor área do defeito preenchida pelos biomateriais BO e OBM quando comparados com seus tempos iniciais de tratamento (1 dia). (G) O gráfico indica uma reabsorção estatisticamente significativa para o BO entre o 1º e o 49º dia de tratamento (*). A mesma significância estatística foi encontrada para o OBM, mas com uma taxa de reabsorção maior (#). Aos 49 dias, a comparação entre BO e OBM (***) revela uma taxa de reabsorção estatisticamente superior para o OBM.

5.7 Descrições histológicas dos biomateriais enxertados e evolução do reparo

Além da análise histomorfométrica da deposição óssea em lâminas coradas com Tricrômico de Masson, aspectos do reparo tecidual e sua interação com os biomateriais foram avaliados qualitativamente, em secções semiseriadas, coradas em HE. Foram avaliados os seguintes aspectos histológicos:

5.7.1. Dinâmica da deposição óssea e osteointegração do biomaterial ao tecido remanescente

Para o estudo de deposição do osso neoformado, a área do defeito ósseo, delimitada pelas paredes laterais (pv = parede vestibular e pp = parede palatina) e parede de fundo (pf), foi virtualmente dividida em três partes iguais denominadas de terço apical, terço médio e terço cervical (Figura 12).

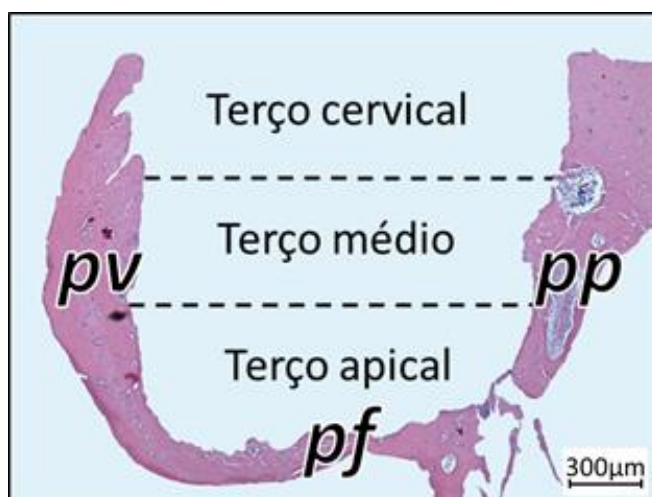


FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DEFEITO ÓSSEO, DIDATICAMENTE SEPARADA EM ÁREAS PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA. Paredes ósseas remanescentes do defeito (pv = parede vestibular e pp = parede palatina; pf = parede de fundo /assoalho da cavidade óssea).

A neoformação óssea inicia-se a partir das paredes remanescentes do defeito, em sentido ao seu centro. Entretanto, é importante ressaltar que simultaneamente ocorre um processo de reabsorção óssea nestas paredes. Deste modo, as paredes parcialmente reabsorvidas ao longo do tempo, alteram o formato original da cavidade, que passa a apresentar-se irregular e transitoriamente mais larga e deformada em relação à área originalmente definida pela osteotomia durante o ato cirúrgico.

Aos 7 dias, paralelamente aos focos de reabsorção, observou-se o início da fase de deposição de trabéculas ósseas em todos os grupos tratados (Figura 13A, B, C e D) principalmente no terço apical. Embora as imagens demonstrem o início de deposição óssea em todos os grupos, as trabéculas eram mais evidentes nos grupos CN e OBD (Figura 13A e B). Aos 14 dias, as trabéculas crescem em número e comprimento em todos os terços para o grupo CN (Figura 13E) e nos terços apical e médio no grupo OBD (Figura 13F). Referente aos grupos OBM e BO, as trabéculas mantêm-se concentradas no terço apical. Aos 21 dias as trabéculas se tornam mais espessas em todos os grupos. Os grupos CN e OBD apresentam osso neoformado em todos os terços, com o processo de regeneração do defeito ósseo praticamente concluído (Figura 13I e J). O mesmo não é observado nos grupos enxertados com biomateriais inorgânicos (OBM e BO), com maior concentração de osso neoformado nos terços apical e médio e baixa concentração no terço cervical (Figura 13L e M). Em relação ao BO, o defeito apresenta histologicamente espaços em sua maioria ocupados pelos grânulos inorgânicos dos biomateriais, vistos nas colorações HE como imagens negativas (Figura 13M). Aos 49 dias, a maioria das amostras representativas do grupo OBD apresentaram regeneração óssea completa, com organização óssea mais compacta e pequenos espaços medulares (Figura 13O). Aparentemente, o grupo CN apresentou espaços medulares maiores quando comparados com o OBD e o preenchimento ósseo no terço cervical encontrou-se incompleto em alguns animais. Foi observado em algumas imagens do grupo CN uma perda de volume ósseo, indicada por uma superfície côncava, sugestiva de uma invasão de tecidos conjuntivos em detrimento da deposição óssea ideal (Figura 13N). Nos grupos OBM e BO, o preenchimento do volume da cavidade por tecido ósseo não é completo, visto que o terço cervical permanece parcialmente ocupado com biomateriais envoltos por tecido conjuntivo, sem associação com osso neoformado, ou seja, sem osteointegração (Figura 13P e Q). Contudo, ao observar as camadas mais profundas do defeito (terços médio e apical) o biomaterial parece bem integrado ao osso neoformado. Esse fato justifica a mobilização de grânulos inorgânicos do biomaterial para regiões fora da área do defeito. Comumente, em ambos os grupos, foram vistas imagens de grânulos na mucosa, sob o epitélio, bem como imagens de sequestro, de expulsão de alguns grânulos através do epitélio oral que cobre os defeitos (figura 19).

Todos os grupos, desde 7 dias de tratamento, apresentaram formação de novo osso na região externa ao defeito, associado às suas paredes remanescentes. Tais deposições, fora da cavidade do defeito, foram denominadas de calos ósseos. Estas novas trabéculas

foram evidentes junto a parede de fundo dos defeitos e justapostas à parede vestibular, externamente a elas. Essa deposição óssea, inicialmente visualizada como trabéculas (Figura 14A à D), tornou-se uma faixa de osso compacto aos 49 dias (Figura 14E à 14H).

A integração do osso neoformado às paredes remanescentes do defeito ósseo no final do tratamento foi observada em todos os grupos experimentais. Quanto aos biomateriais inorgânicos, a osteointegração foi identificada em todos os períodos de avaliação, exceto ao primeiro dia de tratamento, quando não havia ainda a existência de deposição óssea (Figura 15A à 15H). Além disso, como mostrado nas Figuras 13P e 13Q, no final do período de tratamento, aos 49 dias, os biomateriais presentes na região cervical dos grupos OBM e BO não estavam integrados ao osso neoformado.

Quanto ao enxerto orgânico (OBD), o critério de osteointegração do biomaterial não pôde ser avaliado, uma vez que as lâminas de biomaterial enxertados são rapidamente reabsorvidas e a deposição óssea ocorre no espaço antes ocupado pelo biomaterial. Até os 14 dias, poucos resíduos de matriz orgânica do osso xenógeno enxertado ainda eram visíveis (Figura 16A e B). Entretanto, aos 21 e 49 dias, em todos os animais, os resíduos desapareceram, o que sugere a completa reabsorção do biomaterial com substituição por tecido ósseo. (Figura 16C e D). Lâminas de matriz orgânica foram visualizadas também no interior dos grânulos dos grupos BO e OBM e não apenas nos grupos OBD (Figura 17A à D).

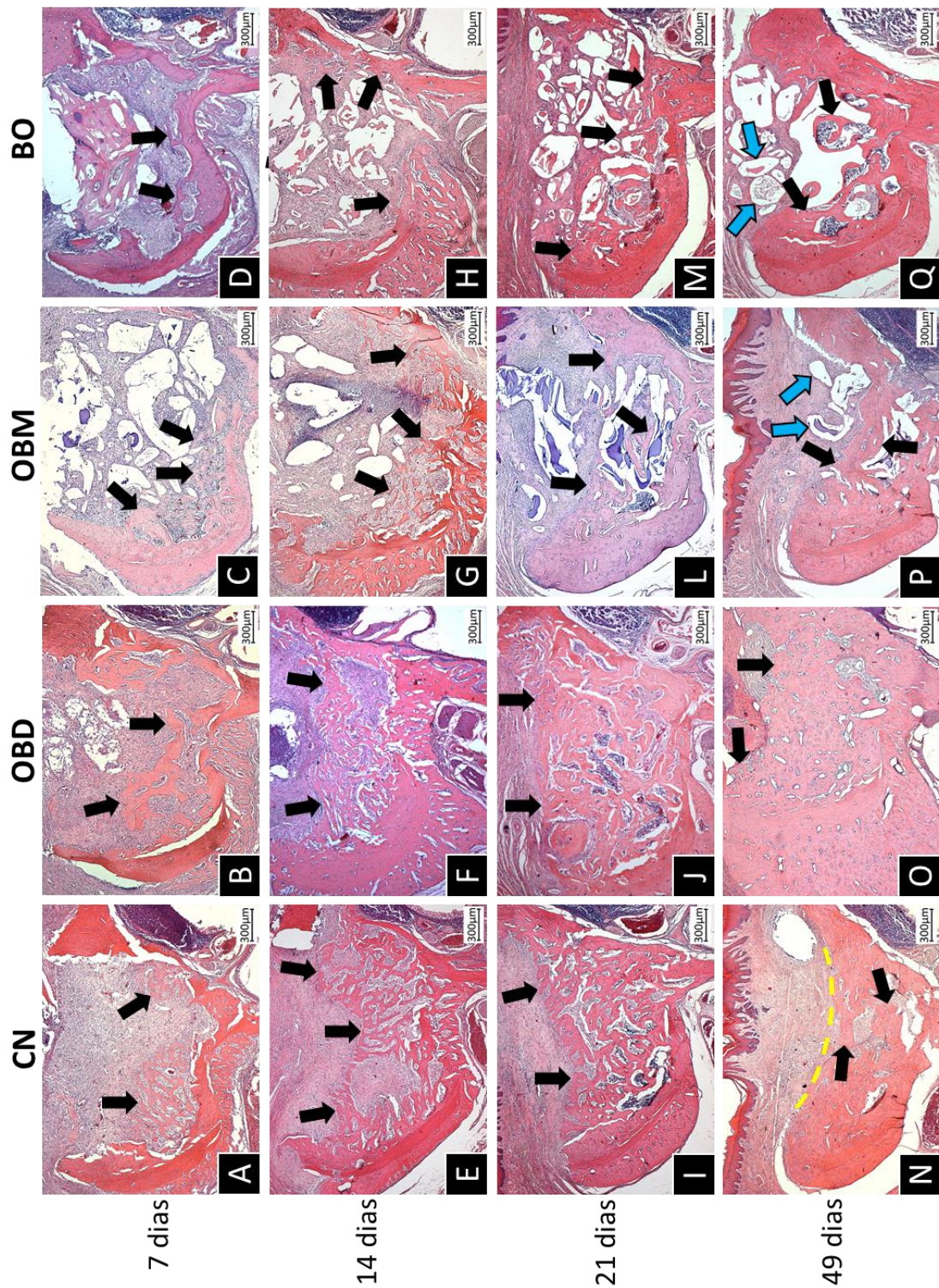


FIGURA 14: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO TEMPO. As setas pretas em todas as imagens evidenciam as trabéculas ósseas neoformadas na região do defeito ósseo. As setas azuis em P e Q, aos 49 dias nos grupos OBM e BO, mostram biomateriais na região cervical do defeito sem associação com osso neoformado. O tracejado amarelo no grupo CN em N, aos 49 dias, demonstra superfície côncava do defeito regenerado sugerindo pequena perda de volume ósseo.

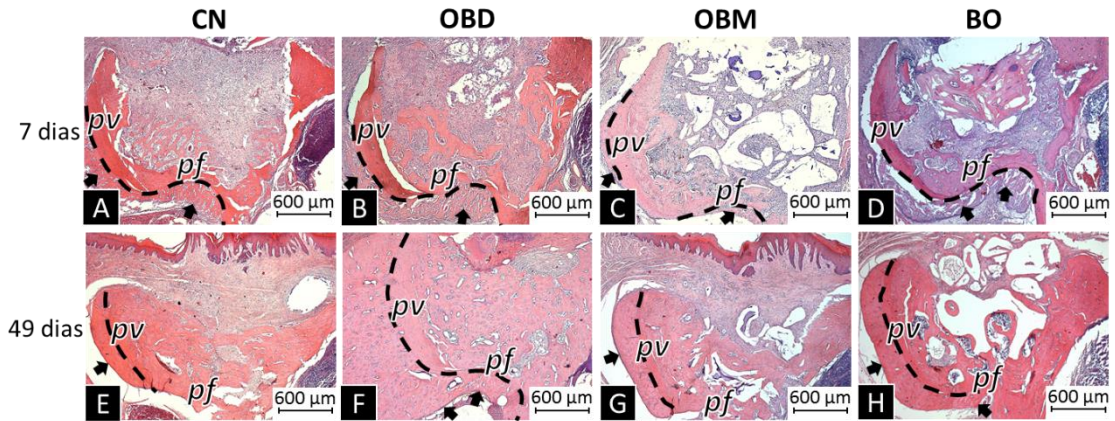


FIGURA 15: FORMAÇÃO DE CALO ÓSSEO EM SUPERFÍCIES EXTERNAS À ÁREA DO DEFEITO. As setas pretas evidenciam a formação de osso novo junto a superfície externa das paredes remanescentes do defeito ósseo, junto a parede de fundo (pf) e a parede vestibular (pv) do defeito. O limite entre o calo ósseo e a zona de reparo está delimitado pelo tracejado amarelo.

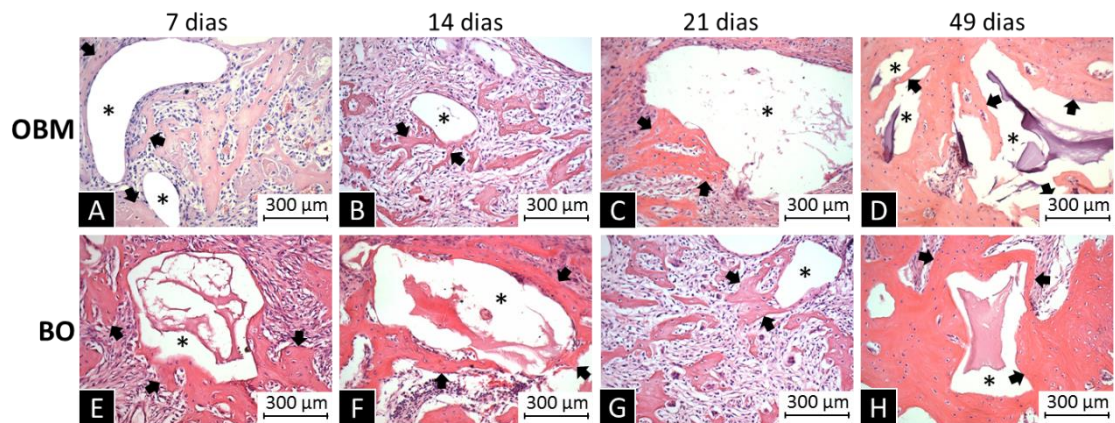


FIGURA 16: OSTEINTEGRAÇÃO DOS BIOMATERIAIS INORGÂNICOS (OBM E BO) AO OSSO NEOFORMADO. As setas pretas indicam o osso neoformado, representado por trabéculas eosinófilas, intimamente associadas ao biomaterial, representado em imagem negativa (*).

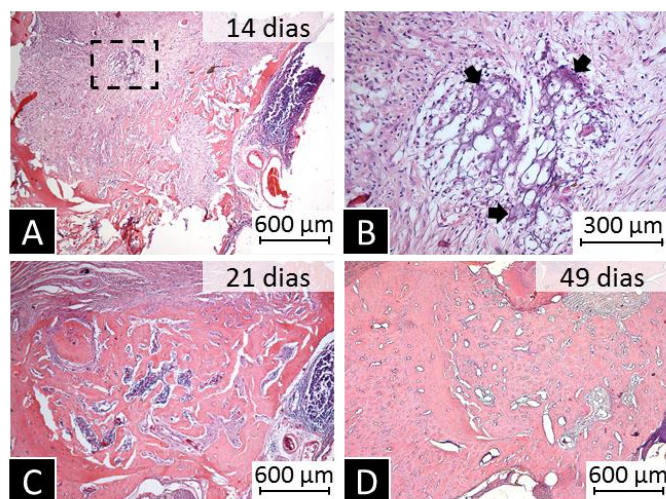


FIGURA 17: MONITORAMENTO HISTOLÓGICO DA REABSORÇÃO DOS ENXERTOS OBD. A imagem (A) representa o grupo OBD 14 dias. O quadro tracejado preto, ampliado na imagem (B) mostra resíduos de matriz orgânica do xenoenxerto. As setas pretas indicam os resíduos da matriz orgânica (roxo mais escuro) do biomaterial, em fase de degradação. C e D confirmam, nos períodos seguintes de 21 e 49 dias, a ausência de matriz orgânica do biomaterial, ressaltando a total reabsorção das lâminas orgânicas e substituição por tecido ósseo neoformado.

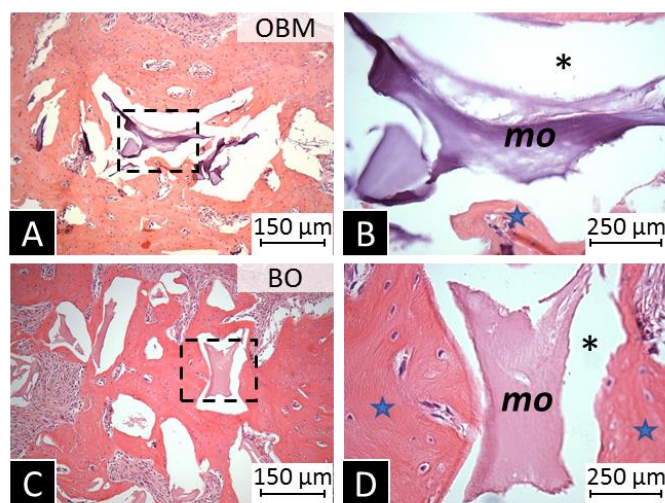


FIGURA 18: IMAGENS HISTOLÓGICAS DOS BIOMATERIAIS INORGÂNICOS APÓS 49 DIAS DA ENXERTIA. Note a presença de matriz orgânica (mo) no interior dos grânulos. Região inorgânica do biomaterial em imagem negativa (*). A imagem (A) representa o grupo OBM. Em (B) imagem ampliada referente ao quadro tracejado preto em (A). (C) representa o grupo BO. EM (D) imagem ampliada referente ao quadro tracejado preto em (C). Estrela = matriz de osso neoformado nos espaços entre os grânulos de biomaterial.

5.7.2. Aspectos do processo inflamatório, angiogênese e vascularização dos enxertos

O processo inflamatório e a subsequente angiogênese são considerados eventos essenciais no processo de regeneração tecidual óssea. Para avaliação do processo inflamatório agudo e inicial, o período de 24 horas após os procedimentos de enxertia foi incluído nesta análise.

No primeiro dia de tratamento, todos os grupos apresentaram intensa inflamação, principalmente no terço cervical e na mucosa próxima ao epitélio (Figura 18B, D, F e H). Além disso, devido ao trauma mecânico de liberação e afastamento dos tecidos moles para acesso ao tecido ósseo, observou-se um nítido descolamento dos tecidos da parede vestibular acompanhado de um infiltrado inflamatório agudo, do lado externo ao defeito, correspondente à região de sindesmotomia (Figura 18 A, C, E, G).

Aos 7 dias, os infiltrados inflamatórios se concentraram mais próximos à abertura do sítio cirúrgico, no terço cervical, onde ainda havia uma solução de continuidade no epitélio, proporcionando maior contato com os contaminantes da cavidade bucal (Figura 19).

Já aos 14 dias de tratamento, o epitélio se encontrava fechado, corroborando os dados macroscópicos. Observou-se a remissão do processo inflamatório, especialmente nos grupos controle negativo (CN) e OBD. Nos grupos enxertados com OBM e BO, focos de infiltrado foram observados especialmente próximos aos resíduos e grânulos dos biomateriais (Figura 20A e B). Em alguns casos observou-se um processo inflamatório ao redor de grânulos mais superficiais, sugerindo um processo de expulsão, de sequestro de fragmentos dos biomateriais, o que é comum na prática clínica. A inflamação associada ao sequestro do biomaterial foi identificada também nas fases mais tardias como no grupo OBM no período de 49 dias de tratamento e no BO nos períodos de 14 e 21 dias (Figura 21A à F). No período de 49 dias não foi observado sequestro do biomaterial para o BO, contudo, alguns animais apresentaram o biomaterial concentrado próximo ao epitélio (Figura 22B), deslocados da área do defeito.

Ressalta-se que nos casos extremos de perda do biomaterial ou ausência dos grânulos nas camadas profundas (terço médio e apical) especialmente em fases precoces, como no período de 7 dias (Figuras 21A e B; Figura 22A), as amostras foram descartadas das análises morfométricas. A ausência de biomaterial aos 7 e 14 dias foi considerada um critério de exclusão das amostras, somando um total de 18% de perda tanto para o grupo OBM quanto para o grupo BO. Mantemos aqui a exposição destes eventos, uma vez que

os sequestros ósseos são corriqueiramente apresentados na clínica e precisam ser descritos como uma possibilidade de causas de insucesso dos enxertos, independentemente da fonte, nacional ou importada.

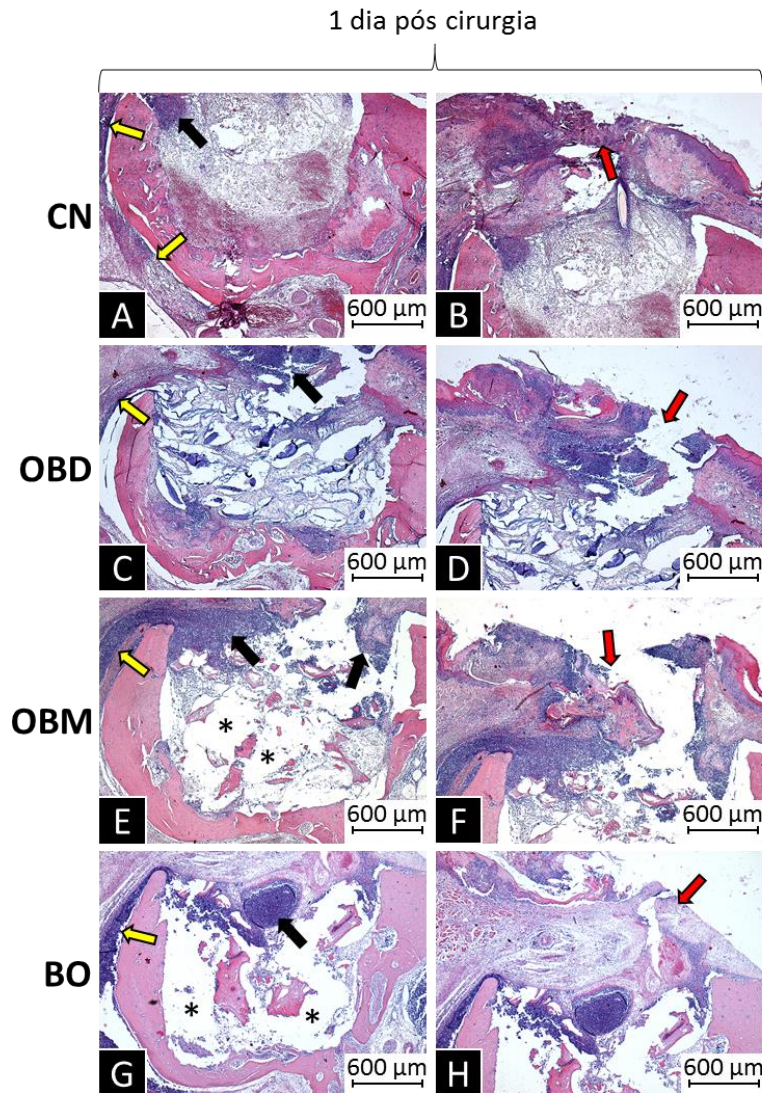


FIGURA 19: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 1 DIA DE TRATAMENTO NOS DIFERENTES GRUPOS ENXERTADOS (CN, OBD, OBM E BO). As imagens A, C, E e G evidenciam a região de defeito ósseo, preenchida por fragmentos e Laminas de biomaterial. As setas amarelas apontam para processos inflamatórios no lado externo da parede vestibular do defeito ósseo, região de sindesmotomia. Note que os espaços vazios dos defeitos enxertados com OBM e BO na verdade são imagens negativas de grânulos mineralizados (*). As imagens B, D, F e H mostram o terço cervical dos defeitos e a área da mucosa com o epitélio seccionado, por onde ainda persiste o contato do sitio cirúrgico com os contaminantes da cavidade bucal (setas vermelhas). Setas pretas indicam alguns focos de inflamação no terço cervical dos defeitos.

7 dias pós cirurgia

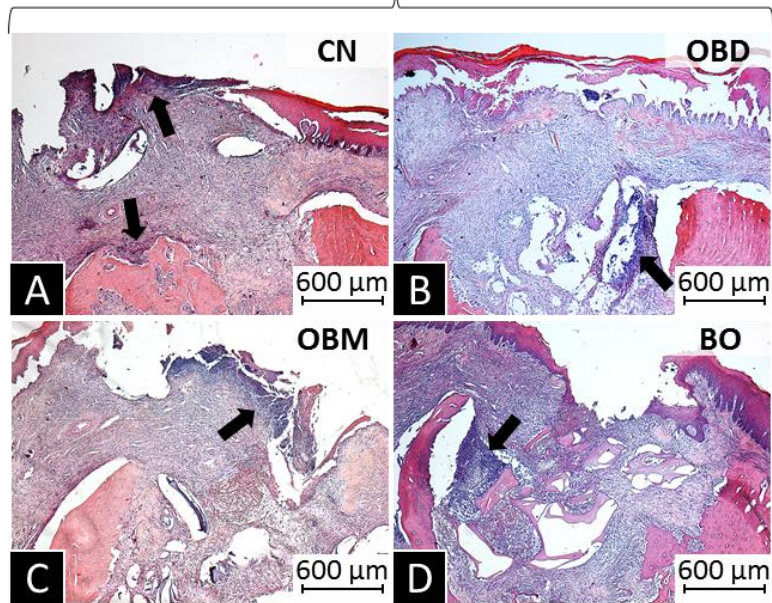


FIGURA 20: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 7 DIAS DE TRATAMENTO NOS DIFERENTES GRUPOS ENXERTADOS (CN, OBD, OBM E BO). As imagens evidenciam pelas setas pretas infiltrados inflamatórios (grupos celulares em roxo mais escuros) na região cervical ou próximo ao tecido epitelial.

14 dias pós cirurgia

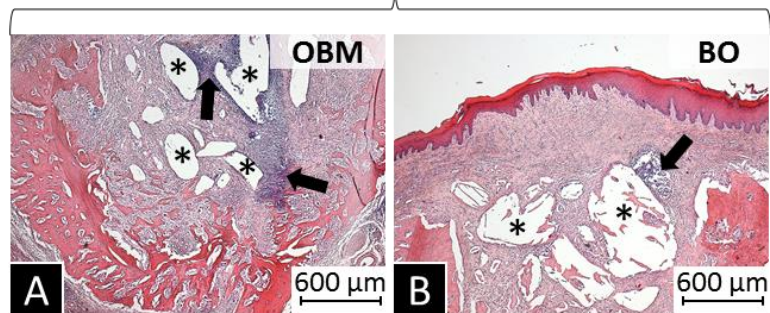


FIGURA 21: ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO PROCESSO INFLAMATÓRIO APÓS 14 DIA DE TRATAMENTO NOS GRUPOS OBM E BO. Note remissão do processo inflamatório nos grupos CN e OBD. Áreas de pequenos infiltrados persiste associada aos biomateriais OBM e BO aos 14 dias. As setas pretas evidenciam os infiltrados inflamatórios. Percebe tecido epitelial (figura B) totalmente fechado sobre o sitio cirúrgico.

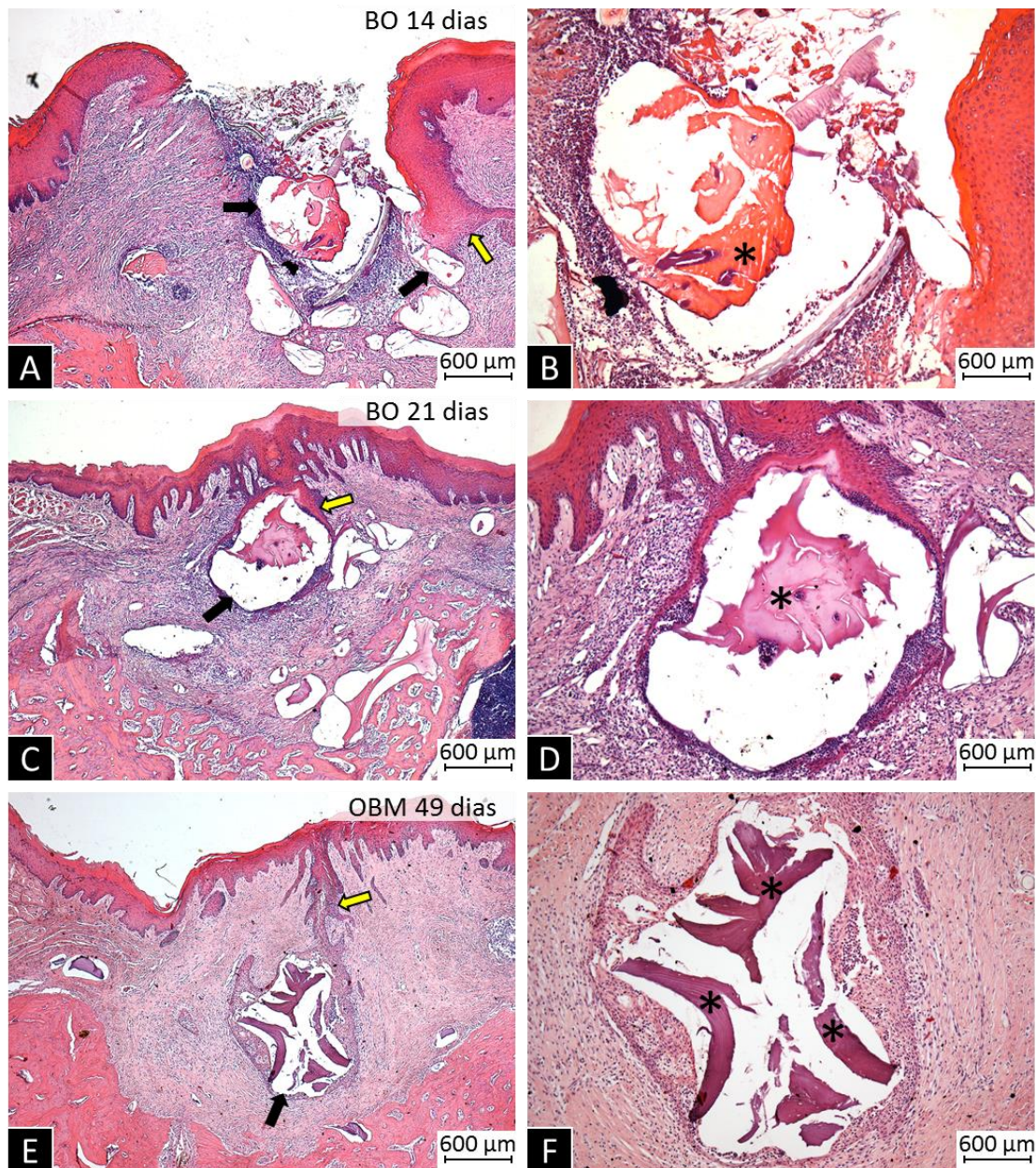


FIGURA 22: IMAGENS HISTOLÓGICAS DE EXPULSÃO DE GRÂNULOS MINERALIZADOS PELO ORGANISMO. A, C e E representam os grupos BO 14 dias, BO 21 dias e OBM 49 dias, respectivamente. B, D e F correspondem as suas ampliações. Note em (A) a dobra do tecido epitelial para dentro do defeito e a quantidade de grânulos acima do nível do defeito ósseo. O epitélio aberto permitiu a entrada de corpos estranhos, resíduos de alimentos. Neste caso, os animais foram desconsiderados das análises morfométricas. (C) e (D) o aspecto da invasão epitelial contornando o grânulo a ser sequestrado. (E) e (F) mostram a presença de infiltrado inflamatório ao redor do grânulo sequestrado, localizado acima do nível ósseo. Observe a expressiva presença de lâminas de matriz orgânica (*) no interior dos grânulos de BO e OBM em B, D e F. As setas pretas sinalizam o biomaterial sendo envolvido por células inflamatórias e as setas amarelas indicam a invasão de tecido epitelial no preparo para o sequestro do osso enxertado.

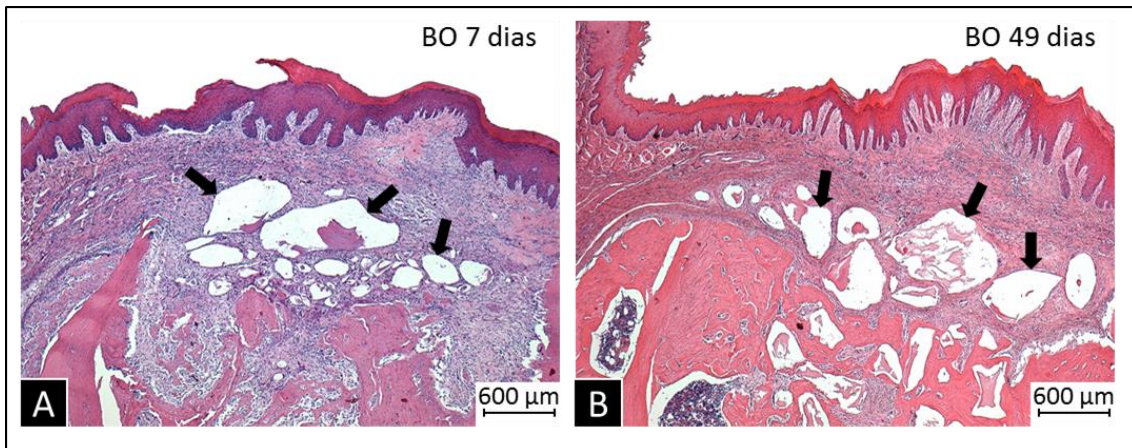


FIGURA 23: PRESENÇA DOS BIOMATERIAIS PRÓXIMOS AO EPITÉLIO, FORA DA ÁREA DE DEFEITO. Em A, aos 7 dias, o grupo BO apresentou biomaterial apenas na região cervical do defeito ósseo e próximo ao epitélío. Neste caso, o animal foi desconsiderado das análises morfométricas. Em B, aos 49 dias, embora o biomaterial tenha sido encontrado em todos os terços do defeito ósseo, os grânulos estavam concentrados no terço cervical e fora do defeito, próximos ao epitélío.

O processo de vascularização dos enxertos foi observado precocemente em todos os grupos experimentais, já aos 7 dias de tratamento (Figuras 23, 24 e 25). A análise quantitativa desses vasos em função do tipo de enxerto inserido não foi escopo deste estudo, mas aparentemente, todos os enxertos permitiram a proliferação vascular, com capilares permeando os poros dos biomateriais, sejam estes constituídos de lâminas orgânicas ou de material inorgânico.

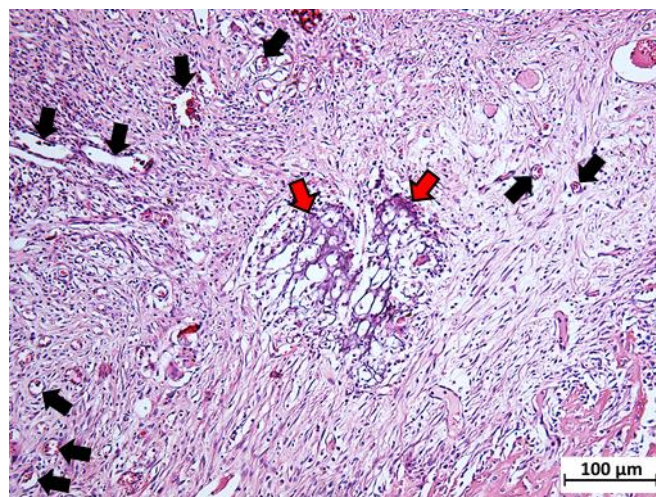


FIGURA 24: IMAGEM HISTOLÓGICA DE ANGIOGÊNESE NO GRUPO OB 7 DIAS APÓS A ENXERTIA. As setas pretas mostram vasos sanguíneos. As setas vermelhas evidenciam em roxo escuro a matriz orgânica do biomaterial em fase de degradação.

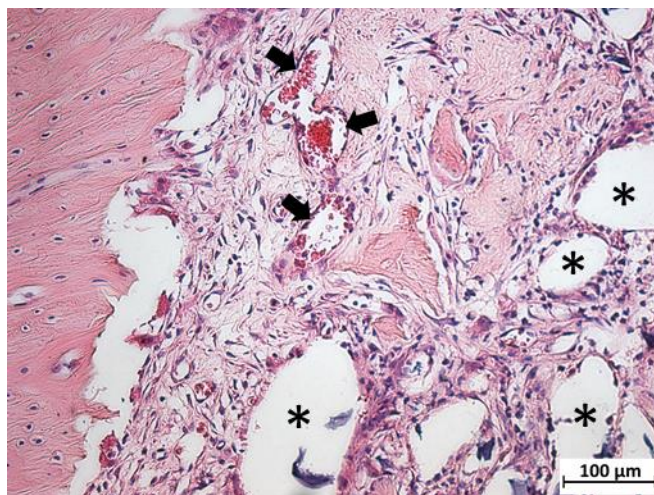


FIGURA 25: IMAGEM HISTOLÓGICA DA VASCULARIZAÇÃO DOS ENXERTOS DO GRUPO OBM 7 DIAS APÓS A ENXERTIA. As setas pretas mostram vasos sanguíneos. Os asteriscos localizam os biomateriais enxertados em imagem negativa.

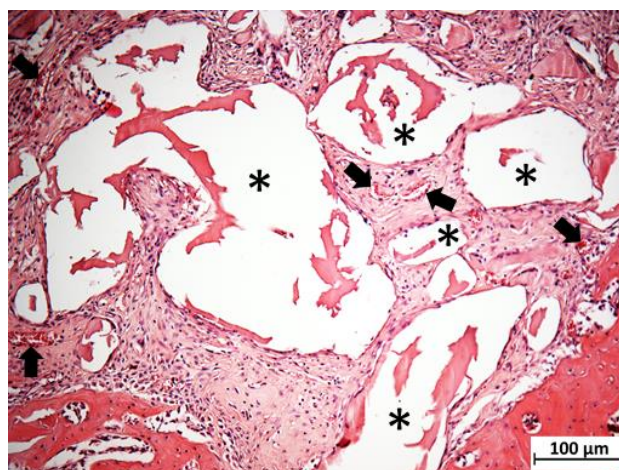


FIGURA 26: IMAGEM HISTOLÓGICA DA VASCULARIZAÇÃO DOS ENXERTOS DO GRUPO BO 7 DIAS APÓS A ENXERTIA. As setas pretas mostram vasos sanguíneos entre os grânulos do biomaterial (*) vistos em imagem negativa.

5.7.3 Osteoclastogênese e reabsorção das paredes ósseas remanescentes

A evolução do reparo ósseo depende da função de osteoclastos, da reabsorção prévia das paredes remanescentes que interferem na ativação de osteoblastos para a deposição óssea. O processo do reparo ideal é aquele que culmina em um equilíbrio de osteoclastos e osteoblastos, que no osso maduro passam a cumprir suas funções no remodelamento ósseo característico da fisiologia do tecido. A presença de osteoclastos, evidenciados por células multinucleadas de citoplasma acidófilo foi observada especialmente nos períodos iniciais de 7 e 14 dias em todos os grupos (Figura 26). Nestes casos, foi possível observar a reabsorção das paredes e crista óssea, alterando a

conformação inicial das cavidades. Simultaneamente, notou-se áreas de blastemas ósseos, já iniciando a fase de deposição. Nos períodos de 21 e 49 dias, o processo de reabsorção óssea e a osteoclastogênese, tão evidentes nos períodos iniciais, foram reduzidas. Não obstante, imagens dos blastemas foram diminuídas, mas osteoblastos ativos foram observados nas superfícies das trabéculas recém depositadas, especialmente nos terços médio e cervical dos defeitos ao longo dos 21 e 49 dias

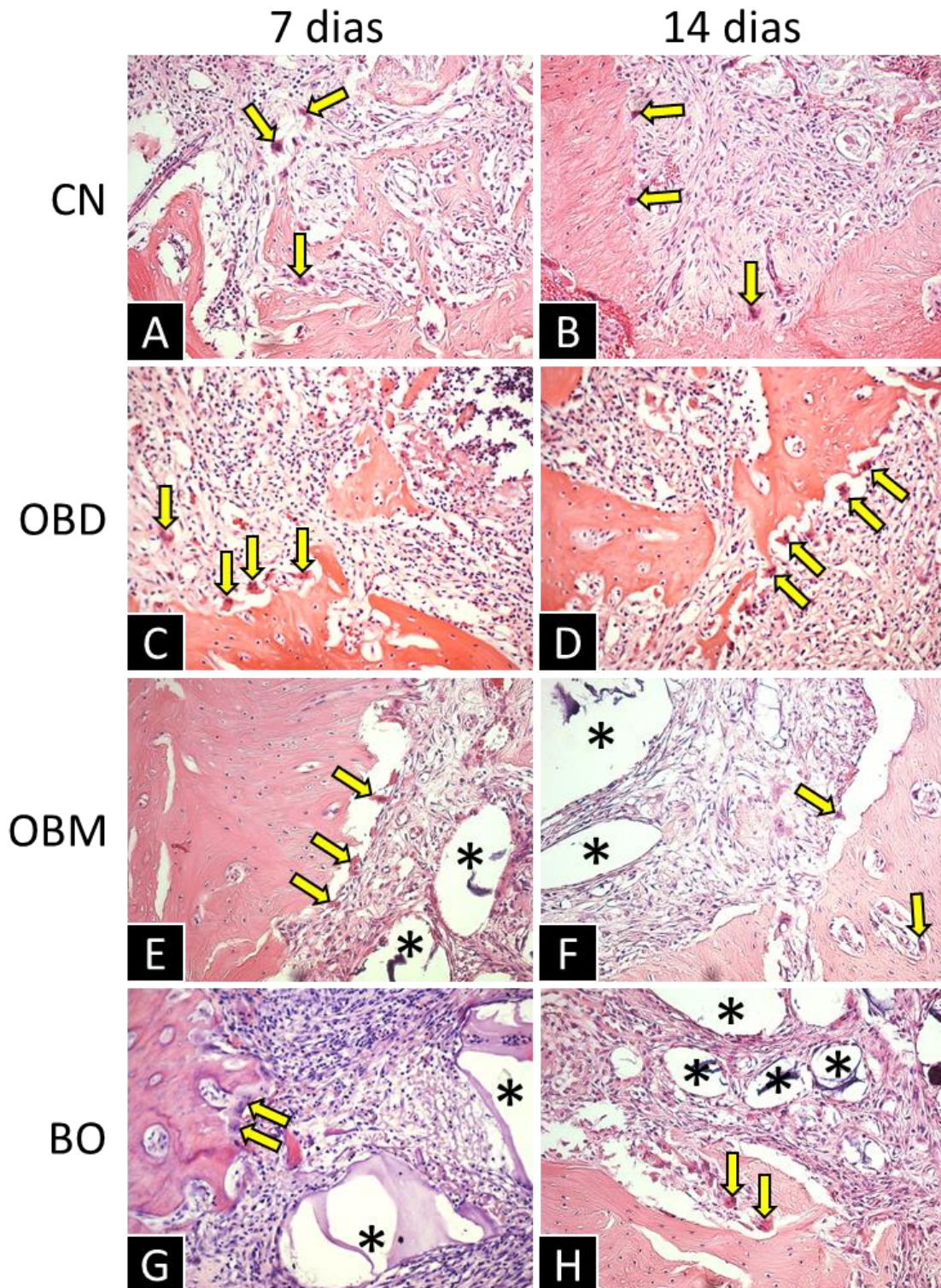


FIGURA 27: CÉLULAS MULTINUCLEADAS NAS SUPERFÍCIES DAS PAREDES ÓSSEAS REMANESCENTES. As setas amarelas evidenciam células multinucleadas junto as paredes ósseas remanescentes. Os asteriscos mostram os biomateriais mineralizados.

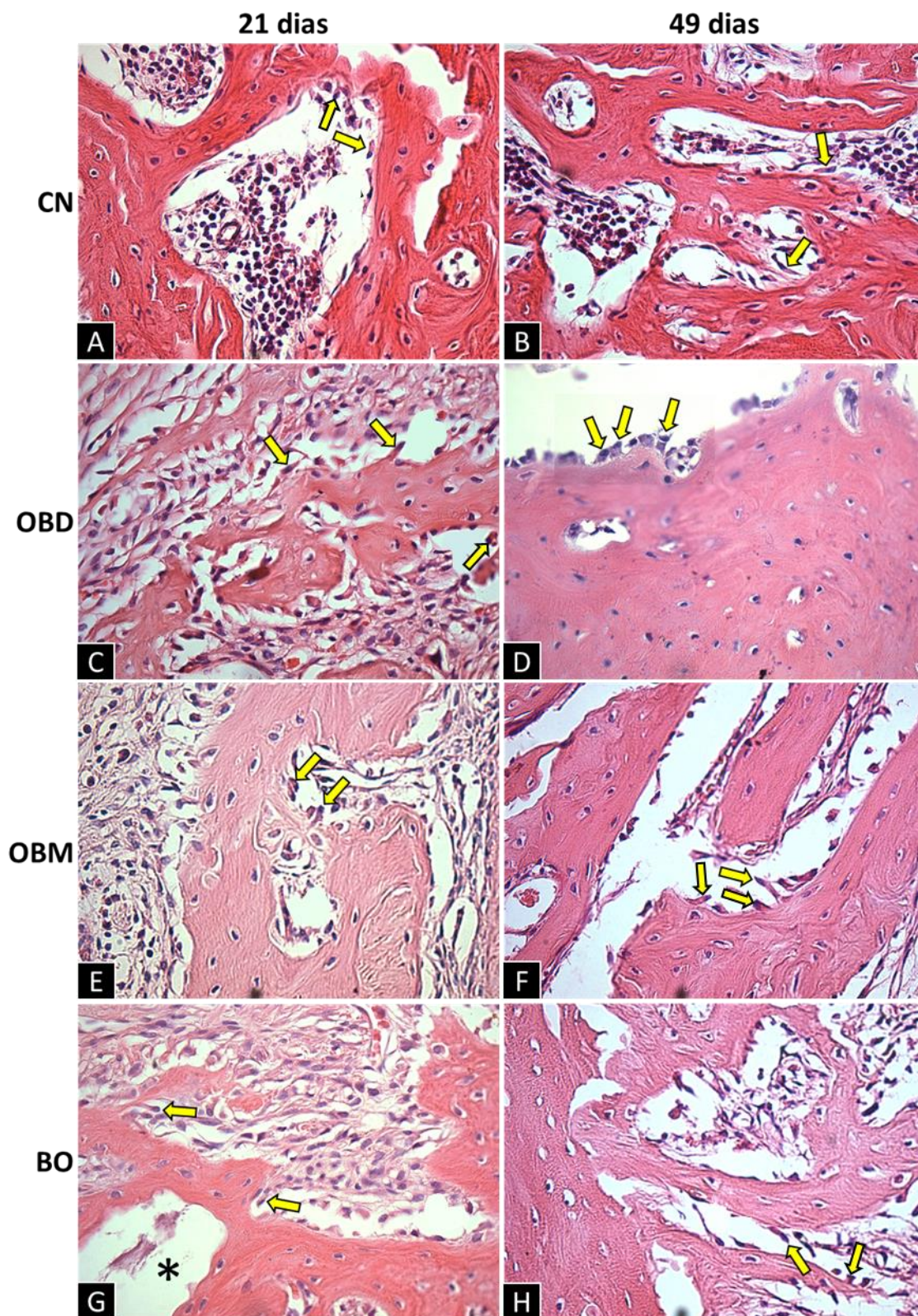


FIGURA 28: OSTEÓBLASTOS ATIVOS NAS SUPERFÍCIES DAS TRABÉCULAS ÓSSEAS. As setas amarelas evidenciam osteoblastos ativos junto as trabéculas. O asterisco em G mostra o biomaterial BO.

6 DISCUSSÃO

Matrizes de osso bovino em diferentes versões, mineralizada, desproteínada, parcialmente desmineralizada ou completamente desmineralizada têm sido extensivamente avaliadas como potenciais biomateriais para enxertias ósseas (Khoshzaban *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2015; Gardin *et al.*, 2015; Drosos *et al.*, 2015; Glowacki, 2015). Especialmente para a odontologia, o suporte ósseo é essencial para a restauração de funções mastigatórias e do sistema estomatognático, por meio da colocação de implantes e próteses dentárias.

A perda precoce dos dentes é uma das causas mais frequentes da perda do suporte ósseo, devido a alterações dimensionais significativas no osso alveolar, tanto em altura quanto em largura. Algumas técnicas têm sido sugeridas para preservar o osso alveolar e assim minimizar a perda óssea consequente das perdas dentárias. Dentre elas, estudos clínicos têm demonstrado que a utilização de substitutos ósseos é um meio eficaz de preservar a altura e largura do osso alveolar remanescente, bem como aumentar o volume ósseo nas regiões do seio maxilar (Chiapasco, 2006). Portanto, a aplicação de enxertos não visa somente o tratamento final, de substituição de áreas ósseas perdidas. A melhoria das propriedades dos enxertos ósseos é essencial tanto para a substituição de áreas de tecido ósseo perdido em defeitos ósseos já estabelecidos (Glowacki, 2015), quanto para medidas preventivas. O preenchimento de cavidades alveolares de dentes recém extraídos com biomateriais, tende a preservar o osso alveolar ou minimizar as perdas ósseas graduais que ocorrem invariavelmente em pacientes desdentados. Além disso, os enxertos ósseos mineralizados ou desmineralizados têm sido utilizados também como aceleradores ou indutores do processo de cicatrização em lesões ósseas (Kumar *et al.*, 2013).

Os biomateriais selecionados neste estudo, Bio-Oss® e Lumina Bone (Critéria), têm sido utilizados na clínica com as finalidades de substituição de áreas ósseas intrabuciais, bem como no preenchimento imediato de cavidades alveolares. O Bio-Oss® é considerado um substituto ósseo, derivado de osso bovino, submetido a um tratamento térmico e químico, processo pelo qual os componentes orgânicos são removidos. Entretanto, a sua arquitetura natural mantém-se esponjosa, mesmo após as etapas de processamento (Rokn *et al.*, 2011).

Comercialmente, o Bio-Oss® é disponibilizado também em uma versão granulada, com grande sucesso no preenchimento de alvéolos e defeitos ósseos. Essa

versão granulada foi utilizada neste estudo como biomaterial de referência (controle positivo), por ser a versão do material mais comumente usada por odontólogos no Brasil.

O biomaterial Lumina Bone é um produto nacional, comercialmente disponível no formato de trabéculas ósseas, com poucos subsídios científicos disponíveis na literatura. Já o uso de sua matriz desmineralizada no reparo de defeitos ósseos ainda não foi investigado.

Previamente à avaliação das enxertias *in vivo*, este trabalho propôs uma análise histológica preliminar do biomaterial de interesse. Curiosamente, as secções histológicas coradas em HE revelou restos celulares no interior das trabéculas ósseas do biomaterial Lumina Bone. Segundo Kumar *et al.* (2013), a presença de diferentes antígenos em um enxerto favorece a reação antígeno-anticorpo e compromete a sua reabsorção e compatibilidade. Compartilhando dessa afirmativa, Sawkins (2013) ressalta que enxertos que apresentam potencial imunogênico com restos celulares têm a sua aplicação clínica reduzida. Corroborando com essa ideia, Gardin *et al.* (2015) discorre sobre a efetividade de protocolos na remoção total de materiais celulares em enxertos ósseos. Segundo o autor, esse fato aumenta a biocompatibilidade do biomaterial. O mesmo autor afirma que é importante que o protocolo empregado na limpeza e descelularização dos xenoenxertos mantenha os componentes da matriz extracelular. Esses componentes constituem um agregado proteico que permite a migração celular e estimula a regeneração do tecido ósseo.

A fim de avaliar a influência da solução desmineralizadora (EDTA 10%) nos componentes orgânicos do biomaterial comercial Lumina Bone, nós realizamos uma análise histológica e imunohistoquímica dos fragmentos desmineralizados. A avaliação histológica do biomaterial revelou a presença de uma vasta matriz colágena visualizada pela coloração com Tricrômico de Masson, bem como a expressão de proteínas BMP-4, osteopontina e colágeno III, identificadas por imunofluorescência. Esses dados indicam a preservação dessas proteínas após ambos os processos, de descelularização, realizado pela empresa fornecedora, e de desmineralização em EDTA realizado no laboratório a partir das amostras comerciais.

Segundo Sawkins *et al.* (2013), o uso de matrizes ósseas parcialmente ou completamente desmineralizadas em enxertia tem sido sugerido para o tratamento de diversas anomalias ósseas, exatamente por deixarem expostas proteínas como colágeno, BMP's e osteopontina. Aproximadamente 90% da matriz óssea extracelular é composta por colágeno, sendo as demais (10%) não colagenosas. Um *scaffold* composto por essa

matriz pode apresentar as suas propriedades de osteoindução e osteocondução potencializadas. O colágeno é o primeiro componente a ser sintetizado na matriz óssea e é um candidato ideal para o desenvolvimento de enxertos. Ele é inerente para a biocompatibilidade e biodegradabilidade do enxerto, pois estimula a proliferação e diferenciação celular (Polo-Corrales *et al.*, 2014). O colágeno é uma proteína empregada como material biológico no desenvolvimento de diferentes compostos para implantação óssea. Além disso, a estrutura colagenosa do biomaterial tem papel osteocondutor (Saravanan *et al.*, 2013).

As proteínas não colagenosas, sejam naturais ou recombinantes, também são empregadas para acelerar o processo de ossificação em lesões. Entre essas proteínas estão as BMP's (Kumar *et al.*, 2013) e a osteopontina (Rodriguez *et al.*, 2014). As BMP's são fatores de crescimento utilizadas sozinhas ou combinadas para acelerar o processo de deposição óssea. Essa proteína é responsável pela ativação da osteoindução, favorecendo a diferenciação celular em osteoblastos (Hinsenkamp e Collard, 2015). Dessa forma, esse fator de crescimento é amplamente usado em pesquisas e na clínica durante cirurgias maxilofaciais e ortopédicas (Sawkins, 2013; Drosos *et al.*, 2015; Glowacki, 2015).

Quanto a osteopontina, essa tem o importante papel durante a osteogênese de auxiliar no controle das atividades osteoclásticas e deposição de mineral intrafibrilar de colágeno na matriz extracelular. No trabalho de He *et al.* (2012), os autores investigaram os efeitos de enxertos ósseos associados a resíduos de osteopontina (peptídeos) e BMP-2 conjugados com células da medula óssea. Os achados do trabalho revelaram que os enxertos associados com osteopontina ou BMP-2 ou conjugadas com células mesenquimais foram capazes de aumentar a osteogênese e vascularização durante o reparo ósseo após 28 dias de tratamento. Segundo os autores, as proteínas não colagenosas empregadas no estudo também favoreceram a diferenciação das células tronco implantadas juntamente com o *scaffold*. Do mesmo modo, Hinsenkamp e Collard (2015) estabeleceram a relevância do uso de enxertos desmineralizados que apresentam BMP's em sua matriz.

Muito embora a utilização de matrizes orgânicas tenha diversos subsídios na literatura, ainda não é uma unanimidade entre os pesquisadores. A exemplo destas contraposições, podemos citar os estudos de Huh *et al.* (2015) e Lei *et al.* (2015). Os primeiros autores empregaram o xenoenxerto Bio-Oss® em dois grupos de avaliação em defeitos ósseos em calvária de coelhos. No primeiro grupo, o biomaterial apresentava a sua versão comercial mineralizada e desproteínada. No segundo, o mesmo biomaterial foi

enriquecido com BMP-2. Os dados obtidos mostraram resultados significativos na regeneração óssea quando comparados com o grupo controle (coágulo sanguíneo), não havendo diferença entre os grupos tratados, demonstrando que o enriquecimento do enxerto com proteínas não colagenosas não agregou benefícios. Da mesma forma, Lei *et al.* (2015) discorrem sobre a influência negativa das proteínas naturais do xenoenxerto. Segundo os autores, essas proteínas são responsáveis pela imunogenicidade do biomaterial. Assim sendo, é de grande relevância que esse tipo de enxerto passe por tratamentos de desproteíntização para minimizar os efeitos de rejeição e cicatrização ineficiente do defeito ósseo.

Após avaliação pré-cirúrgica do biomaterial desmineralizado e cientes da preservação das proteínas presentes nesta matriz, passamos aos experimentos *in vivo*. Os resultados histológicos do grupo OBD foram comparados com o controle negativo, onde os defeitos estavam livres dos biomateriais mineralizados, sendo preenchidos naturalmente com coágulo sanguíneo. Os animais que receberam os enxertos mineralizados nacionais (OBM) foram comparados com o controle positivo, importado e também mineralizado (BO).

A primeira avaliação do estudo visava a análise da influência dos biomateriais na cicatrização gengival, uma vez que essa pode comprometer a regeneração do tecido ósseo no defeito construído. Segundo Kumar *et al.* (2013), a presença de um enxerto favorece não apenas a cicatrização do tecido ósseo, mas também do tecido epitelial por formar uma espécie de suporte para adesão e proliferação de células epiteliais, além de favorecer a deposição da matriz extracelular. Palachur *et al.* (2014) afirma que a presença do enxerto ósseo é importante para a restauração do periodonto, o que permite uma regeneração óssea mais adequada e padronizada.

Os resultados da avaliação macroscópica da regeneração do epitélio gengival demonstraram presença de tecido de granulação apenas no período de 7 dias pós cirurgia, em todos os grupos, o que foi confirmado nas avaliações por HE. Contudo, a diferença de cicatrização ou abertura da ferida, segundo o tipo de enxertia que receberam não foi estatisticamente significativa. Segundo Rowan *et al.* (2015), a epitelização previne infecções durante o período de recuperação e otimiza a recuperação da função tecidual. Palachur *et al.* (2014) expressaram que a enxertia permite a proliferação de células endoteliais, diminuindo o tempo de epitelização gengival e favorecendo a cicatrização óssea. No presente estudo não foi possível detectar a relação ou interferência negativa na cicatrização epitelial em função dos tipos de enxertias, seja pelo biomaterial usado como

controle positivo ou pelos biomateriais utilizados nos grupos tratados. Esses resultados são considerados positivos por serem similares ao grupo coágulo, uma vez que nos grupos enxertados há uma sobrecarga no processo inflamatório, em função da presença de um material que pode ser entendido como corpo estranho por sua natureza bovina. Estes biomateriais, diferentes dos enxertos autógenos, podem apresentar fatores imunogênicos e aumentar o período de inflamação. De acordo com Velnar *et al.* (2009), a inflamação faz parte do processo de cicatrização epitelial e o aumento da fase inflamatória resulta em atraso no processo de fechamento da ferida. Especialmente para ambientes susceptíveis a contaminantes, as feridas abertas podem viabilizar o acesso de agentes físicos ou biológicos, comprometendo o restabelecimento da função do tecido conjuntivo especializado e epitelial, como demonstrado nos trabalhos de Rowan *et al.* (2015) e Palachur *et al.* (2014). Todavia, o padrão de cicatrização observado em todos os grupos do presente trabalho foi semelhante ao grupo não enxertado (coágulo sanguíneo). Percebe-se, portanto, que os materiais não atrasaram o reparo dos tecidos moles.

Além do aspecto clínico do fechamento da mucosa sobre a área operada, este estudo propôs também a avaliação radiográfica dos defeitos ósseos. Embora o nível de radiopacidade das cavidades enxertadas possa ser um dado menos preciso que as avaliações histológicas, as avaliações radiográficas para deposição óssea apresentam respaldo na literatura, sendo uma importante ferramenta na clínica (Chakrapani *et al.*, 2013; Al-Fotawei *et al.*, 2014). Segundo Al-Fotawei *et al.* (2014), a radiografia fornece resultados quantitativos e o ganho de radiopacidade da área tratada corresponde a neoformação óssea.

No presente estudo, uma avaliação preliminar da radiopacidade dos biomateriais utilizados também foi realizada. O Bio-Oss® apresentou maior radiopacidade inicial, em acordo com dados da literatura (Huh *et al.*, 2015). Esse biomaterial refere-se a um osso poroso mineralizado, desproteinado e de baixa imunogenicidade (Palachur *et al.*, 2014). A sua característica mineralizada permite um maior contraste de radiopacidade e radiolucidez em radiografias de enxertias ósseas. O grupo OBM apresentou-se como segundo biomaterial mais radiopaco, mediante sua natureza inorgânica. Por fim, os grupos OBD e controle negativo tiveram menor radiopacidade. Esses achados eram previsíveis, uma vez que a radiografia expressa maior radiopacidade para tecidos mineralizados e menor radiopacidade para tecidos moles (natureza orgânica).

Ao avaliar a deposição óssea por meio da radiopacidade ao longo do tempo, percebemos que o grupo de menor ganho no período final de tratamento foi o BO

(controle positivo), o que aparentemente poderia indicar um ganho pequeno e insuficiente de massa óssea. Entretanto, esse resultado se deve ao fato do biomaterial ser resistente a reabsorção, o que torna o espaço disponível para a deposição óssea menor que nos demais grupos. Isso não indica um pior resultado em termos de deposição óssea, mas uma menor área livre para neoformação óssea. Dados da literatura são coerentes com estes resultados. Segundo Liu *et al.* (2016), o Bio-Oss® torna-se integrante da estrutura do novo osso formado. Assim sendo, entende-se que os valores dentro da curva de tons de cinza encontrados no período de 49 dias para o BO é o resultado da soma da radiopacidade do biomaterial com a neoformação óssea entre os grânulos.

Observando a curva de tons de cinza do grupo BO, nota-se, entre o período de 1 e 7 dias, um pequeno aumento da densidade dos tons de cinza (radiopacidade). Este ganho deve ser decorrente da soma de tons de cinza pelo preenchimento da cavidade na fase de invasão vascular e proliferação de células no interior do defeito junto ao biomaterial, que é considerado altamente biocompatível e atrativo para proliferação celular. A partir do sétimo dia, ocorre uma delicada queda da radiopacidade, aos 14 dias. Nos tempos de 21 e 49 dias o ganho de radiopacidade no grupo BO foi pouco expressivo e se faz decorrente da deposição óssea nos poucos espaços entre os grânulos de biomaterial da fase final do reparo ósseo. Contudo, ao avaliarmos a deposição óssea por meio da histomorfometria, percebemos que o BO teve um ganho significativo de osso neoformado aos 14 dias, contrariamente ao observado na radiografia, e aos 49 dias, cuja radiografia demonstra um baixo ganho. Entendemos como justificativa para esse último resultado a taxa de reabsorção do biomaterial. Embora comparativamente aos outros enxertos a taxa de reabsorção do Bio-Oss® tenha sido a mais baixa (11%), os grânulos menores podem sofrer alguma degradação ou mobilização, refletindo na análise radiográfica.

Nos grupos CN, OBD e OBM, assim como o BO (visto anteriormente) ocorreu uma queda de radiopacidade entre 7 e 14 dias. Esse fato pode ser explicado pela fase de reabsorção das paredes ósseas. Aos 7 dias de tratamento, as imagens histológicas revelaram uma elevada concentração de células multinucleadas, comprovando a fase inicial da reabsorção das paredes remanescentes (vestibular e palatina) e também dos biomateriais em uma reação natural tipo corpo estranho. O raio x emitido para avaliação é transmitido por toda a região de defeito até atingir a placa de fósforo localizada sob o objeto radiografado, fazendo leitura também das paredes remanescentes do defeito ósseo, diminuindo a radiopacidade em sua leitura nas comparações entre os períodos de tratamento. Por outro lado, nas análises histológicas, a quantificação do osso neoformado

é realizada por meio da leitura apenas do percentual das trabéculas formadas ao longo do tempo, que apresentaram um aumento progressivo. Portanto, ainda que as radiografias digitais sejam um instrumento relevante de avaliação dos enxertos ósseos, a histomorfometria ainda é o dado mais fidedigno para a divulgação de resultados científicos.

O OBM apresentou um comportamento diferente do BO, tanto nos resultados radiográficos como na evolução de deposição óssea observada na histomorfometria. Na análise radiográfica, entre os períodos de 7 e 14 dias, ocorreu uma perda de radiopacidade e a partir dos 14 dias, nas duas metodologias de avaliação, houve um aumento da curva de deposição óssea até aos 49 dias, com valores próximos aos do BO na etapa final. Esses resultados indicam a similaridade de efeitos entre os dois biomateriais. Entretanto, ao considerar a reabsorção do biomaterial, o OBM apresentou maior taxa (estatisticamente significativa), equivalente a 36%. Esse fato sugere, portanto, um percentual maior de osso nativo e menor de biomaterial na região de regeneração do defeito ósseo. Mas, embora o ganho de osso neoformado do OBM, observado na histomorfometria, tenha sido superior ao do BO, não houve diferença estatística entre eles.

Ainda considerando os biomateriais inorgânicos, um dos pontos relevantes para as técnicas de enxertia e reparo do defeito ósseo não é somente a capacidade osteoindutora ou osteocondução de um biomaterial. Além de várias outras, a osteointegração é de suma relevância para o sucesso da terapia. Essa se trata de uma conexão estrutural entre o osso remanescente, o osso neoformado e os enxertados, sendo um ponto crítico para estabilizar o enxerto e futuros implantes. Quando não há osteointegração, o enxerto tende a ser eliminado do organismo, inviabilizando conseqüentemente a colocação de implantes ou próteses. Segundo Parithimarkalaignan e Padmanabhan (2013), a interação do biomaterial com o sítio de enxertia é um processo complexo que não envolve apenas biocompatibilidade, mas também alterações mecânicas do ambiente. Assim sendo, a osteointegração se relaciona inicialmente a estabilidade do enxerto por meio de uma interface enxerto-tecido biológico através de uma superfície portadora de carga. Em seguida, a fixação do enxerto ocorre por meio da deposição óssea junto ao biomaterial e a sua remodelação. Dessa forma, a integração do biomaterial ao osso neoformado, torna a região de reparo e os elementos envolvidos nela, uma só unidade. No presente trabalho, as avaliações histológicas revelaram que tanto o OBM quanto o BO, no momento final de tratamento, apresentaram grânulos osteointegrados nos terços apical e médio. Porém, no terço cervical haviam grânulos de biomaterial não osteointegrados. Em alguns animais

também foi descrito a presença de biomaterial fora da região do defeito, na mucosa e próximo do epitélio, o que torna um indicador de instabilidade desses grânulos com o osso nativo, neoformado ou não. Esse fato poderá resultar na eliminação parcial desses grânulos pelo organismo, o que é considerado natural por profissionais que utilizam estes enxertos inorgânicos na clínica. Alternativamente, os biomateriais podem ser estabilizados na mucosa, com o tecido mole, sem induzir inflamações agudas ou expulsão (dado expresso na histologia). Outro ponto relevante observado nas análises histológicas dos biomateriais inorgânicos é que o reparo do defeito ósseo não foi completo aos 49 dias. Nos defeitos preenchidos com OBM e BO, o terço cervical apresentou ausência do recobrimento ósseo, com grânulos presentes mas sem o preenchimento total de osso neoformado. Liu *et al* (2016) discute em seu estudo que a enxertia com o Bio-Oss® sem associação com outras técnicas requer sempre um tempo de regeneração maior antes de obter uma osteointegração bem sucedida, assim como observado em nosso trabalho. Segundo os autores, um meio de acelerar a osteointegração e regeneração do tecido ósseo, seria implantar o enxerto com células para a remodelação e formação de novo osso. Eles ainda debatem sobre o insucesso apenas da associação de células ao enxerto, sendo necessário alterações genéticas para uma superexpressão de fatores de crescimento e outras substâncias a fim de favorecer a reabilitação mais rápida do paciente, como demonstraram em seu estudo dirigido em cães.

Mesmo que os enxertos mineralizados estudados (OBM e BO) não apresentaram uma deposição óssea acelerada e revelaram uma regeneração incompleta aos 49 dias, a enxertia com esses biomateriais podem ser relevantes para a preservação das paredes do osso alveolar. Esse fato favorece, mesmo que tardiamente, um ambiente mais adequado para inserção de implantes dentários. O estudo de Ze-wen *et al.* (2015) avaliou a osteointegração de implantes dentários em sítios de extração de pré-molares preenchidos com Bio-Oss®. O trabalho foi realizado em cães adultos, machos e fêmeas. Após 3 meses, implantes dentários foram inseridos no osso alveolar do grupo experimental e do grupo controle, sem enxertia com o biomaterial. Os resultados após 3 meses do implante, mostraram que a taxa de osteointegração do implante nos sítios enxertados com o Bio-Oss® foi estatisticamente significativa quando comparada com os sítios preenchidos apenas com coágulo sanguíneo (controle). Segundo os autores, o sucesso da osteointegração do implante nos sítios tratados com o Bio-Oss® ocorreu devido a preservação das paredes do osso alveolar promovida pelo enxerto.

Quanto ao enxerto desmineralizado (OBD), ao avaliar seus resultados, os dados radiográficos e histomorfométricos foram bem coerentes, uma vez que não houve interferência da radiopacidade do biomaterial na leitura de reparo do defeito ósseo. Em ambas as análises, o ganho de osso neoformado foi progressivo, com picos de deposição óssea em todos os períodos de tratamento, sendo superiores ao grupo controle (CN). Observou-se também, comparado ao CN, que o OBD possuiu uma deposição óssea precoce e aos 21 dias proporcionava trabéculas espessas e em todos os terços do defeito, com regeneração avançada. Chamamos a atenção para o fato de que o OBD foi o biomaterial enxertado de menor radiopacidade. Contudo, no tempo final de tratamento, o enxerto foi totalmente reabsorvido (como indicado na histologia) e o defeito ósseo regenerado emitiu maior radiopacidade quando comparado com os grupos tratados com biomateriais inorgânicos, que permaneceram presentes até o final do tratamento, influenciando na leitura da análise radiográfica. Chamamos a atenção para o fato de que o grupo OBD, no final do tratamento, apresentou um defeito em toda sua totalidade por osso nativo.

Referente ao controle negativo, o OBD induziu a deposição óssea com valores estatisticamente significativos aos 49 dias pela análise radiográfica e aos 21 dias pela histomorfometria. As análises histológicas mostraram completa ausência do biomaterial orgânico aos 21 dias. O nível de reabsorção do biomaterial e suas propriedades proteicas podem ter influenciado no processo de regeneração do defeito ósseo. A exposição de proteínas que auxiliam no controle e estímulo da fisiologia do tecido ósseo, como referenciadas na nossa avaliação de imunohistoquímica para BMP-4 e osteopontina, podem ser parcialmente responsáveis pelos resultados positivos. Segundo Sawkins *et al.* (2013), Palachur *et al.* (2014) e Drosos *et al.* (2015), a característica proteica do osso desmineralizado, com exposição de BMP's, favorece o processo de diferenciação celular e osteogênese. Já He *et al.* (2012) e Rodriguez *et al.* (2014) esclarecem que a presença de osteopontina auxilia na deposição mineral durante o reparo ósseo. Esses estudos corroboram com os melhores resultados encontrados para o grupo tratado com osso desmineralizado no presente trabalho.

Ao considerar o controle negativo, no último período de avaliação, a superfície do defeito ósseo regenerado apresentou-se, em algumas amostras, em formato côncavo. Sugere-se uma perda óssea em volume, o que parece ser evitado pela presença de biomateriais desde fases iniciais do reparo. Nos grupos tratados com biomateriais inorgânicos, a regeneração também se encontrava em fase de conclusão. Entretanto, os

espaços no terço cervical, onde não havia osso neoformado, estavam ocupados por grânulos do próprio biomateria e não por tecido conjuntivo como nos grupos CN.

Na clínica, o osso neoformado em um paciente reabilitado deve ser capaz de suportar e integrar o implante inserido, como referenciado por Ze-wen *et al.* (2015). A deposição óssea e preenchimento do defeito com osso nativo ou associado ao biomaterial, devem apresentar a qualidade adequada para inserção de um implante. Assim sendo, a avaliação quantitativa da neoformação óssea no defeito por si só é insuficiente para fornecer dados relevantes para a clínica. Dessa forma, a fim de averiguar a organização e maturação da matriz óssea depositada nos grupos tratados, utilizamos a técnica de coloração por *PicroSirius Red*. O processo de polarização do *PicroSirius Red* permite avaliar a qualidade do colágeno da matriz óssea pela birrefringência e organização de seus feixes. O colágeno da matriz óssea recém-formada pode expressar fibras colágenas mais finas, com fraca birrefringência em verde (fibras tipo III) ou fibras mais organizadas, mais espessas em amarelo e vermelho (fibras tipo I). As fibras vermelhas demonstram o máximo de maturação da matriz. No processo de reparo ósseo, as fibras colágenas tipo III, depositadas na fase proliferativa do processo inflamatório, tendem a ser substituídas pelas fibras tipo I. A coloração do *PicroSirius Red* analisada em microscopia de polarização permite, portanto, avaliar a dinâmica da maturação da matriz óssea neoformada. O trabalho de Vivan *et al.* (2015) avaliou um vidro bioativo comparado com osso bovino Bio-Oss® em defeito ósseo construído em calvária de coelho. Os resultados mostraram que o vidro bioativo apresentou deficiência na formação de trabéculas ósseas. Já no grupo enxertado com Bio-Oss®, ocorreu uma deposição óssea na superfície do biomaterial, indicando osteointegração. As análises de maturação da matriz óssea também expressaram resultados mais significativos para o grupo tratado com o Bio-Oss®, com quantidades estatisticamente significativas de fibras birrefringentes vermelhas. Em outro momento, a enxertia com o vidro bioativo foi associada ao enxerto bovino e os resultados demonstraram uma melhora gradual na síntese de colágeno I. Os autores justificaram os resultados desfavoráveis do vidro bioativo devido a sua reabsorção, uma vez que a reabsorção do Bio-Oss® é mínima, mantendo uma característica osteocondutora excelente. Diferentemente, em nosso trabalho, as avaliações de colágeno I por *PicroSirius Red* foi mais expressiva para o grupo tratado com o biomaterial desmineralizado, mesmo sendo 100% reabsorvido. Ao comparar o grupo OBD com o controle negativo, percebe-se aos 49 dias similaridade no nível de deposição óssea avaliada por histomorfometria. Contudo, como considerado anteriormente, a deposição óssea por si só, em uma avaliação

direta, não é capaz de fornecer dados sobre a qualidade do osso depositada. Ao analisarmos o processo de maturação das fibras colágenas no grupo enxertado com biomaterial orgânico, encontramos o percentual de colágeno tipo I estatisticamente superior aos demais grupos. A confirmação desse dado é especialmente importante na fase final do reparo. Por essa razão, foi realizado um refinamento da análise por *PicroSirius Red*. Na análise inicial, a leitura das fibras maduras foi realizada em uma área (quadros tracejados nas figuras 9 e 10) onde constam também fibras colágenas de tecido conjuntivo e dos espaços medulares. Os resultados deste refinamento considerando somente a área das trabéculas ósseas recém depositadas revelaram que, diante de todo o osso produzido no grupo OBD durante o reparo ósseo, 69,6% apresentavam fibras de colágeno tipo I (matriz óssea madura). Já os grupos OBM e BO apresentaram apenas 28,4% e 23,8% de matriz óssea madura. Esses dados revelam que o biomaterial orgânico apresentou uma capacidade elevada de acelerar a maturação do osso neoformado quando comparado com os demais enxertos. Quanto ao grupo controle negativo, esse apresentou uma taxa de maturação óssea de 52,2% de todo o osso depositado durante a regeneração, superior aos enxertados com biomaterial inorgânico. Um dos fatores que podem justificar a maturação óssea mais acelerada para o grupo com enxertia de matriz orgânica é a exposição de proteínas colágeno tipo III, BMP-4 e a osteopontina, que devem atuar não somente na fase inicial de migração e proliferação celular, mas também nas fases de diferenciação e maturação óssea. O tempo de inflamação na região de reparo também pode ser responsável por esse sucesso. Como abordado por Guo e DiPietro (2010) e Velnar *et al.* (2009), o período de inflamação determina o sucesso e o tempo de regeneração tecidual. Sendo assim, o prolongamento da fase de inflamação pode gerar um atraso no processo de reparo do defeito ósseo. Ao observarmos histologicamente os grupos enxertados, reparamos que infiltrados agudos inflamatórios, junto ao biomaterial, permaneceram até aos 14 dias de tratamento nos grupos OBM e BO e aos 21 e 49 dias foi observado processos inflamatórios junto a expulsão do enxerto. A inflamação prolongada pelo biomaterial, como observado, pode ser um fator responsável por atrasar o processo de deposição óssea e, conseqüentemente, a sua maturação.

A comparação do biomaterial nacional (OBM) com o importado (Bio-Oss®) mostrou similaridade nos resultados. Referente a deposição óssea por histomorfometria, apenas no 14º dia o biomaterial importado apresentou neoformação óssea significativa ao comparar com o nacional. Na análise de formação óssea entre os tempos de um mesmo biomaterial, os resultados do BO apresentaram pico, com significância estatística, aos 14

dias e aos 49 dias. Diferentemente, o OBM teve o seu pico de deposição óssea aos 21 dias e se iguala ao enxerto importado quanto a quantidade de osso neoformado nos períodos finais, não havendo significância estatística entre eles. Ao avaliar a organização das fibras e maturação do osso neoformado em ambos os grupos, a quantidade de colágeno tipo I foi próxima, sem diferença estatística. A organização da neoformação óssea entre os biomateriais e a sua osteointegração também foi similar. Em ambos, a avaliação histológica demonstrou um reparo parcialmente concluído, ainda sem limite ósseo no terço superior dos defeitos e ausência de osteointegração de alguns grânulos ao osso neoformado nesta região.

7 CONCLUSÃO

- O enxerto ósseo nacional, em ambas as versões, mineralizada e desmineralizada não prejudicou ou atrasou o processo de epiteliação das feridas, apresentando resultados similares ao osso importado e ao grupo controle.
- O enxerto ósseo desmineralizado é rapidamente reabsorvido, o que viabiliza a análise clínica da deposição óssea por meio de análise radiográfica, sem a interferência da radiopacidade do biomaterial.
- Mesmo sendo rapidamente reabsorvidas, as matrizes desmineralizadas de enxertos xenógenos resultaram em maior deposição e maturação óssea nos defeitos intrabucais em ratos, em comparação aos defeitos não enxertados. Este resultado pode estar relacionado à exposição de proteínas osteoindutoras, as quais foram bem preservadas no processo de desmineralização por quelante (EDTA 10%).
- O osso bovino nacional (Lumina Bone) em sua versão comercial, mineralizada, apresentou aspectos similares ao osso bovino importado (Bio-Oss®): taxa de deposição óssea final (49 dias) sem diferença estatística, aspectos histológicos similares (inflamação, vascularização, osseointegração, qualidade do osso formado). Em ambos observou-se mobilização de grânulos, algumas imagens de sequestro de biomaterial e falhas no processo de osteointegração dos grânulos superficiais. Os dois biomateriais revelaram a presença de resíduos orgânicos no interior dos grânulos, em contraposição às informações técnicas de que são produtos de composição 100% inorgânica. A diferença constatada neste estudo foi a menor taxa de reabsorção dos grânulos de Bio-Oss®.

Este estudo contribuiu para o entendimento e esclarecimentos sobre o enxerto bovino nacional e abre perspectivas para novas investigações sobre o potencial das matrizes ósseas desmineralizadas como estratégia de otimização dos reparos ósseos em odontologia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Athanasiou, V. T. Papachristou, D. J. Panagopoulos, A. Saridis, A. Scopa, C. D. Megas, P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: An experimental study in rabbits. **Med SciMonit.** 2010; 16(1):24-31.
2. Al-Fotawei, R. Ayoub, A. F. Heath, N. Naudi, K. B. Tanner, K. E. Dalby, M. J. McMahon, J. Radiological Assessment of Bioengineered Bone in a Muscle Flap for the Reconstruction of Critical-Size Mandibular Defect. **PLoS One.** 2014; 9(9): e107403.
3. Baghban, A. A. Deghani, A. Ghanavati, F. Zayeri, F. Ghanavati, F. Comparing alveolar bone regeneration using Bio-Oss and autogenous bone grafts in humans: a systematic review and meta-analysis. **IEJ.** 2009; 4(4).
4. Berglundh, T. e Lindhe, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res.** 1997; 8(2):117-124.
5. Bernabé, P. F. Melo, L. G. Cintra, L. T. Gomes-Filho, J. E. Dezan, E. Jr. Nagata, M. J. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. **Clin Oral Implants Res.** 2012; 23(3):384-388.
6. Bhumiratana, S. Bernhard, J. C. Alfi, D. M. Yeager, K. Eton, R. E. Bova, J. Shah, F. Gimble, J. M. Lopez, M. J. Eisiq, S. B. Vunjak-Novakovic, G. Tissue-engineered autologous grafts for facial bone reconstruction. **Sci Transl Med.** 2016; 8(343):343-383.
7. Campbell, G. M. Sophodeous, A. Quantitative analysis of bone and soft tissue by micro-computed tomography: applications to ex vivo and in vivo studies. **Bonekey Rep.** 2014; 3:564
8. Carmagnola, D. Adriaens, P. Berglundh, T. Healing of human extraction sockets filledwith Bio-Oss. **Clin Oral Implants Res.** 2003; 14(2):137-143.
9. Carmagnola, D. Berglundh, T. Lindhe, J. The effect of a fibring lue on the integration of Bio-Oss with bone tissue. A experimental study in labrador dogs. **J Clin Periodontol.** 2002; 29(5):377-383.
10. Chakrapani, S. Sirisha, K. Srilalitha, A. Srinivas, M. Choice of diagnostic and therapeutic imaging in periodontics and implantology. **J Indian Soc Periodontol.** 2013; 17(6):711-718.
11. Chiapasco, M. et al.; The role of pericranium grafts in the reduction of postoperative dehiscences and bone resorption after reconstruction of severely deficient edentulous ridges with autogenous on lay bone grafts. **Clin Oral Implants Res.** 2013; 24(6):679-687.
12. Clark, D. P. Badea, C. T. Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives. **Phys Med.** 2014; 30(6):619-634
13. Costa-Filho, L.B. Silva, G. A. B. Abreu, F. A. M. Assis, M. H. S. Reis, I. D. G. Pertence, A. E. M. Oliveira, P. A. D. Desenvolvimento de uma mesa cirúrgica para cirurgiasgerais e odontológicasanimais de pequenoporte. In: **VII Congresso Nacional de EngenhariaMecânica**, 2012, São Luis - Maranhão. Anais do VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica - CONEM 2012, São Luis, MA, 2012. ISSN 2178-180X. Sao Luis - Maranhão: Associação Brasileira de Engenharia e Ciências Mecânicas - ABCM, 2012.
14. Denhardt, D. T. Noda, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. **J Cell Biochem Suppl.** 1998; 30(31):92-102.

15. Drosos, G. I. Touzopoulos, P. Ververidis, A. Tikeridis, K. Kazakos, K. Use of demineralized bone matrix in the extremities. **World J Orthop.** 2015; 6(2):269-277.
16. El-Chaar, E. S. Demineralized bone matrix in extraction sockets: a clinical and histologic case series. **Implant Dent.** 2013; 22(2):120-126.
17. Elsalanty, M. E. and Genecov, D. G. M. D. Bone Grafts in Craniofacial Surgery. **Craniofacial Trauma Reconstr.** 2009; 2(3):125-134.
18. Fickl, S. Zuhr, O. Wachtel, H. Bolz, W. Huerzeler, M. B. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. **Clin Oral Implants Res.** 2008; 9(11):1111-1118.
19. Galindo-Moreno, P., et al., Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. **Clin Oral Implants Res.** 2010; 21(1):122-128.
20. Gardin, C. Ricci, S. Ferroni, L. Guazzo, R. Sbricoli, L. Benedictis, G. D. Finotti, L. Isola, M. Bressan, E. Zavan, B. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. **PLoS One.** 2015; 10(7): e0132344.
21. Glowacki, J. Demineralized Bone and BMPs: Basic Science and Clinical Utility. **J Oral Maxillofac Surg.** 2015; 73(12):126-131.
22. Gomes, M. C. S. M.; Garcia, R. R. Comparação entre o tratamento no solo e na hidroterapia para pacientes com osteoporose: revisão da literatura. **R Bras Aten S.** 2006; 4(7):45-56.
23. Gonzaga, F. A. Miranda, T. T. Magalhães, L. M. Dutra, W. O. Gollob, K. J. Souza, P. E. Horta, M. C. Effects of Bio-Oss® and Cerasorb® dental M on the expression of bone-remodeling mediators in human monocytes. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 2016.
24. Guo, S. e DiPietro, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **J Dent Res.** 2010; 89(3):219-229.
25. He, X. Yang, X. Jabbari, E. Combined effect of osteopontina and BMP-2 derived peptides grafted to an adhesive hydrogel on osteogenic and vasculogenic differentiation of marrow stromal cells. **Langmuir.** 2012; 28(12):5387-5397.
26. Hinsenkamp, M. Collard, J. F. Growth factors in orthopaedic surgery: demineralized bone matrix versus recombinant bone morphogenetic proteins. **Int Orthop.** 2015; 39(1):137-147.
27. Houdek, M. T. Wagner, E. R. Wyles, C. C. Nanos, G. P. Moran, S. L. New options for vascularized bone reconstruction in the upper extremity. **Semin Plast Surg.** 2015; 29(1):20-29.
28. Huh, J. B. Yang, J. J. Choi, K. H. Bae, J. H. Lee, J. Y. Kim, S. E. Shin, S. W. ectof rhBMP-2 Immobilized Anorganic Bovine Bone Matrix on Bone Regeneration. **Int J Mol Sci.** 2015; 16(7):16034-16052.
29. Lee, J. E. Heo, S. J. Koak, J. Y. Kim, S. K. Han, C. H. Bone Regeneration with Rabbit Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Graft Materials. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2012; 27(6):1389-1399.
30. Junior, O. L. H. Meirelles, L. S. Scolari, N. Becker, O. E. Melo, M. F. S. Oliveira, R. B. Bone grafting with granular biomaterial in segmental maxillary osteotomy: A case report. **Int J Surg Case Rep.** 2016; 25:238-242.
31. Khoshzaban, A. Mehrzad, S. Tavakoli, V. Keshel, S. H. Behrouzi, G. R. Bashtar, M. The comparative effectiveness of demineralized bone matrix, beta-tricalciumphosphate, and bovine-derived anorganic bone matrix on inflammation and bone formation using a paired calvarial defect model in rats. **Clin Cosmet Investig Dent.** 2011; 3:69-78.

32. Kumar, P. Vinitha, B. Fathima, G. Bone grafts in dentistry. **J Pharm Bioallied Sci.** 2013; 5(1):125-127.
33. Kusumbe, A. P. Adams, R. H. Osteoclast progenitors promote bone vascularization and osteogenesis. **Nat Med.** 2014, 20(11):1238-1240.
34. Lei, P. Sun, R. Wang, L. Zhou, J. Wan, L. Zhou, T. Hu, Y. A New Method for Xenogeneic Bone Graft Deproteinization: Comparative Study of Radius Defects in a Rabbit Model. **PLoS ONE.** 2015; 10(12):e0146005.
35. Liu, X. Li, Q. Wang, F. Wang, Z. Maxillary sinus floor augmentation and dental implant placement using dentin matrix protein-1 gene-modified bone marrow stromal cells mixed with deproteinized bovine bone: A comparative study in beagles. **Arch Oral Biol.** 2016; 64:102-108.
36. Liu, Y. Ming, L. Luo, H. Liu, W. Zhang, Y. Liu, H. Jin, Y. Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects. **Biomaterials.** 2013; 34:9998-10006.
37. Loquercio, G. DI Costanzo, G. Fazioli, F. Gallo, M. DE Chiara, A. Lervolino, V. Azzaro, R. Petruzzello, A. Mattiello, A. Cacciapuoti, C. Autologous Platelet Gel Improves Bone Reconstruction of Large Defects in Patients with Bone Giant Cell Tumors. **In Vivo.** 2015; 29(5):533-540.
38. Lund, S. A. Giachelli, C. M. Scatena, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. **J Cell Commun Signal.** 2009; 3(3-4):311-322.
39. Nam, J. W. Kim, M. Y. Han, S. J. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. **Maxillofac Plast Reconstr Surg.** 2016; 38(1):27.
40. Nart, J. Barallat, L. Jimenez, D. Mestres, J. Gómez, A. Carrasco, M. A. Violant, D. Ruiz-Magaz, V. Radiographic and histological evaluation of deproteinized bovine bone mineral vs. deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen in ridge preservation. A randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res.** 2016.
41. Oryan, A. Alidadi, S. Moshiri, A. Maffulli, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **J Orthop Surg Res.** 2014; 9:18.
42. Palachur, D. P. Rao, K. V. P. Murthy, K. R. V. Kishore, D. T. Reddy, M. N. Bhupathi, A. A comparative evaluation of bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and type I collagen membrane (Bio-Gide) with bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) and fibrin fibronectin sealing system (TISSEEL) in the treatment of intrabony defects: A clinico-radiographic study. **J Indian Soc Periodontol.** 2014; 18(3):336-343.
43. Parithimarkalaignan, S. and Padmanabhan, T. V. Osseointegration: An Update. **J Indian Prosthodont Soc.** 2013; 13(1):2-6.
44. Pasquali, P. J. Teixeira, M. L. Oliveira, T. A. Macedo, L. G. S. Aloise, A. C. Pelegri, A. A. Maxillary Sinus Augmentation Combining Bio-Oss with the Bone Marrow Aspirate Concentrate: A Histomorphometric Study in Humans. **Int J Biomater.** 2015; 2015:121286.
45. Pietrzak, W. S. Dow, M. Gomez, J. Soulvie, M. Tsiagalis, G. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. **Cell Tissue Bank.** 2012; 13:653-661.
46. Polo-Corrales, L. Latorre-Esteves, M. Ramirez-Vick, J. Scaffold Design for Bone Regeneration. **J Nanosci Nanotechnol.** 2014; 14(1):15-56.
47. Rohn, A. R. Khodadoostan, M. A. Ghahroudi, A. A. R. R. Motahary, M. J. K. F. Bruyn, H. D. Afzalifar, R. Soolar, E. Soolari, A. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. **Open Dent J.** 2011; 5:96-104.

48. Ronga, M. Fagetti, A. Canton, G. Paiusco, E. Surace, M. F. Cherubino, P. Clinical application of growth factors in bone injuries: experience with BMPs. **Injury**. 2013; 44(1):34-39
49. Rowan, M. P. Cancio, L. C. Elster, E. A. Burmeister, D. M. Rose, L. F. Natesan, S. Chan, R. K. Christy, R. J. Chung, K. K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Crit Care**. 2015; 19:243.
50. Saravanan, P. Ramakrishnan, T. Ambalavanan, N. Emmadi, P. John, T. L. Efficacy of guided bone regeneration using composite bone graft and resorbable collagen membrane in Seibert's Class I ridge defects: radiological evaluation. **J Oral Implantol**. 2013; 39(4):455-462.
51. Sasikumar, K. P. Elavarasu, S. Gadagi, J. S. The application of bone morphogenetic proteins to periodontal and peri-implant tissue regeneration: A literature review. **J Pharm Bioallied Sci**. 2012; 4(2):427-430.
52. Sawkins MJ, Bowen W, Dhadda P, Markides H, Sidney LE, Taylor AJ, Rose FR, Badylak SF, Shakesheff KM, White LJ. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta Biomater**. 2013; 9(8):7865-7873.
53. Sierra-Garcia, G. D. Castro-Rios, R. González-Horta, A. Lara-Arias, J. Chávez-Montes, A. Bone morphogenetic proteins (BMP): clinical application for reconstruction of bone defects. **Gac Med Mex**. 2016; 152(3):381-385.
54. Tapety, F. I. Amizuka, N. Uoshima, K. Nomura, S. Maeda, T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clin Oral Implants Res**. 2004; 15(3):315-324.
55. Velnar, T. Bailey, T. Smrkolj, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res**. 2009; 37(5):1528-1542.
56. Vivan, R. R. Mecca, C. E. Bigueti, C. C. Rennó, A. C. Okamoto, R. Cavenago, B. C. Duarte, M. H. Matsumoto, M. A. Experimental maxillary sinus augmentation using a highly bioactive glass ceramic. **J Mater Sci: Mater Med**. 2016; 27:41
57. Watanabe, Y. Harada, N. Sato, K. Abe, S. Yamanaka, K. Matsushita T. Stem cell therapy: is there a future for reconstruction of large bone defects? **Injury**. 2016; 47(1):47-51.
58. Yip, I. Ma, L. Mattheos, N. Dard, M. Lang, N. P. Defect healing with various bone substitutes. **Clin Oral Impl**. 2014; 00:1-9
59. Zambuzzi, W. Fernandes, G. V. O. Iano, F. G. Fernandes, M. S. Granjeiro, J. M. Oliveira, R. C. Exploring Anorganic Bovine Bone Granules as Osteoblast Carriers for Bone Bioengineering: A Study in Rat Critical-Size Calvarial Defects. **Braz Dent J**. 2012; 23(4):315-321.
60. Ze-wen, Q. Hui-ying, L. Wei-jian, Z. et al. Histological Observation for Osseointegration of Delayed Implantation with Bio-Oss Following Tooth Extraction. **J Oral Sci Res**. 2015; 31(1):1-3
61. Zhao, J. Yang, C. Su, C. Yu, M. Zhang, X. Huang, S. Li, G. Yu, M. Li, X. Reconstruction of orbital defects by implantation of antigen-free bovine cancellous bone scaffold combined with bone marrow mesenchymal stem cells in rats. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. 2013; 251:1325-1333.
62. Zimmermann, G. Moghaddam, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**. 2011; 42:16-S21.

ANEXO I

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS:



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 7 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Avaliação de enxertos ósseos bovinos, associados ou não à terapia celular no reparo de defeito ósseo intrabucal em ratos.", que tem como responsável Gerluza Aparecida Borges Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2015. Este certificado expira-se em 14/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 7 / 2015, related to the Project entitled "Evaluation of bovine bone graft associated or not to cell therapy to repair intraoral bone defect in rats.", under the supervision of Gerluza Aparecida Borges Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2015. This certificate expires in 14/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 14/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br