

Rodolpho Valentini Neto

Resposta tecidual ao implante ósseo xenógeno inorgânico variando-se o método de esterilização. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica.

**ARAÇATUBA-SP
2012**

Rodolpho Valentini Neto

Resposta tecidual ao implante ósseo xenógeno inorgânico variando-se o método de esterilização. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica.

Programa de Pós-graduação em Odontologia, nível de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

Doutorando: Rodolpho Valentini Neto

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

ARAÇATUBA-SP
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

V161r Valentini Neto, Rodolpho.
Resposta tecidual ao implante ósseo xenógeno inorgânico variando-se o método de esterilização. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica / Rodolpho Valentini Neto. - Araçatuba : [s.n.], 2012
45 f. : il. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

1. Substitutos ósseos 2. Regeneração óssea 3. Transplante heterólogo

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Aos meus pais, Rodolpho e Inês,

pela vida, amor, confiança, força e educação humanista. Em todos os momentos de dificuldade, que não foram poucos, a lembrança dos dois me deu ânimo para continuar buscando meus sonhos. Obrigado.

Aos meus irmãos, Janaina, Pablo e Pedro,

pelo companheirismo e exemplo de perseverança e determinação.

À Marina,

amor de minhas vidas. Trouxe-me de volta a metade que faltava. Companheira, brava guerreira, que insana e destemidamente aceitou viver ao meu lado. Quantos desafios já vencemos, amor meu! Obrigado mais uma vez e sempre, por me ensinar a cuidar e amar.

Só enquanto eu respirar...

Agradecimentos Especiais

Ao Dr. Daisaku Ikeda,

filósofo e presidente da Soka Gakkai Internacional, associação humanista preservadora dos valores do Budismo de Nitiren Daishonin, e franco incentivador da paz, cultura e educação no mundo todo. Obrigado aos associados da Brasil - Soka Gakkai Internacional, por me permitirem partilhar desta escola humanista.

Aos familiares,

Vó Niná, tia Ana, tia Rosa, tia Concita e toda família do Rio de Janeiro.

Vó Nilce, tio Reinaldo, tia Fátima e toda família de São Paulo e Paraná.

Aos meus familiares de coração, tia Isa, Carol, Jacqueline, Débora, Sonja, Beth, Sandra e respectivas famílias. Mesmo à distância, sempre senti o carinho de todos.

Ao prof. Walter Leal de Moura,

amigo e professor que me adotou intelectualmente desde a faculdade e me fez acreditar que poderia chegar longe. Sua obstinação sempre me foi inspiradora.

Ao prof. Eduardo Hochuli Vieira,

pela orientação compreensiva e paciente. Obrigado pelos ensinamentos e pela confiança depositada!

Ao prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior,

líder como poucos, que une benevolência e rigurosidade. Exemplo de profissional e professor que, apesar de atarefado, sempre se demonstrou solícito, acessível e disposto.

Ao prof. Wilson Roberto Poi,

pela educação humanística transmitida em todos os ensinamentos, em todos os temas. Professor apaixonado, educador, mestre inspirador. Obrigado.

À profa. Roberta Okamoto,

professora dedicada e abnegada, que pacientemente deu suporte a mim e aos meus trabalhos.

À Cleide Lemes Toquetão,

que nos recebe vindos de longe, mesmo sem nunca ter nos visto, como uma mãe alegre pelo retorno dos filhos. O que eu poderia esperar de toda esta jornada em Araçatuba, longe da família? Qualquer coisa... Felicidades... Dificuldades... Não importa... O seu companheirismo fez tudo ficar mais leve e alegre. Obrigado por tudo!

Ao Abrahão Cavalcante e ao Paulo Esteves Faria,

Irmãos que só descobri em Araçatuba. O “cabra-da-pestes” e o “Paulinho”! Amigos assim fazem bem pra mim, fazem bem pra vida! Agradeço por tê-los como companheiros para dividir os fardos e as alegrias vividos nesta jornada existencial. Exemplos de pessoas e profissionais a serem seguidos. Obrigado de coração!

À Thallita Queiroz e Jéssica Gullinelli,

por serem pessoas iluminadas e profissionais incansáveis. Devo muito às duas. Abnegada e carinhosamente, acolheram-me neste universo de pesquisa, ensino e companheirismo. Muito obrigado!

Ao Marcos Guskuma,

pela paciência e presteza sempre demonstradas com este “retirante”. No princípio desta jornada, abrigou-me gentilmente em sua casa. Pessoa sábia e benevolente, exemplo de espírito elevado! Sempre tenho a impressão de não corresponder ao carinho e amizade do “Marcão”... Isto porque ele, como poucos, gratuitamente distribui amor e carinho mesmo aos que não são espíritos dignos como ele. Muito Obrigado!

À Dirce Colli e ao Gilmar Oliveira,

vai me faltar tempo nesta existência para agradecê-los. Horas e horas de convivência, aprendizado e, principalmente, amizade. Todos sabem que sem vocês este trabalho nunca teria sido feito, principalmente pelas dificuldades por que passei. Muito obrigado!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP,

pela contribuição direta na minha formação profissional, através de sua estrutura física, laboratórios, clínicas, salas de aula e centros cirúrgicos experimentais nas áreas de ensino, pesquisa e extensão; e pela contribuição na formação pessoal, através de seu material humano valoroso.

À professora Dra. Mônica Mathor,

coordenadora do Grupo de Banco de Tecidos Biológicos do Centro de Pesquisa do IPEN-CNEN/SP, por todo inestimável apoio na irradiação das peças deste trabalho.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações IPEN/CNEN-SP,

e todos os seus professores e funcionários, por todo apoio na irradiação das peças deste trabalho.

À TitaniumFix,

pelo parafusos doados e material de fixação dos implantes xenógenos.

Aos amigos de Pós-Graduação,

pela paciência, orientação e pelo apoio nos plantões e nas pesquisas.

Aos amigos do Doutorado,

Pedro, Cassiano, Fernando, Heloisa, Pâmela, Marcelo, Lamis e demais pelos plantões divididos e pela convivência fraterna.

Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,

Dirce, Bernadete, Gilmar, Paulo, Antonia, pelo profissionalismo e competência, mas principalmente pelo carinho e amizade. Obrigado!

Aos professores da Cirurgia,

Alessandra, Daniela, Ana Paula, Francisley e Michel, que auspiciosamente contribuem para a formação de todos, como profissionais e seres humanos.

Aos estagiários da Cirurgia,

Tárik, Carol, Sara e todos os demais que compartilharam a convivência maravilhosa que podemos desfrutar na CTBMF da FOA/UNESP.

Aos funcionários da Pós-graduação,

Valéria, Cristiane e Lilian, pela ajuda e paciência! Obrigado!

Epígrafe

“... embora tenha ensinado dia e noite a meus discípulos, todos, criando a dúvida, abandonaram a fé. O que é costumeiro no tolo é esquecer nas horas cruciais, o que prometera nas horas normais...”

Buda Nitiren Daishonin

VALENTINI NETO, R. **Resposta tecidual ao implante ósseo xenógeno inorgânico variando-se o método de esterilização. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica.** [Tese] – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, 2012.

Resumo

Proposição: Este estudo avaliou a resposta tecidual ao implante xenógeno inorgânico de osso bovino, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica, variando-se o método de esterilização. **Materiais e Método:** Discos de 8 mm costela bovina foram obtidos por processamento específico para remoção de parte orgânica e foram esterilizados por meio de autoclavagem ou radiação gama. Em seguida, 20 coelhos brancos (Nova Zelândia) foram cirurgiados para instalação dos discos na face lateral dos gônios mandibulares, bilateralmente, através de parafuso de fixação de enxertos, originando dois grandes grupos: Grupo EA - implante autoclavado; Grupo EI – implante gama-irradiado. As lâminas foram obtidas nos períodos de 15 e 45 dias pós-operatórios e as imagens teciduais foram analisadas qualitativa e quantitativamente. **Resultados:** O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado e não identificou diferença significativa entre as medidas lineares das interfaces osso/implante (BIC) dos grupos dentro dos mesmos períodos (15 dias: $p=0,100$; 45 dias: $p=0,940$). **Conclusão:** De acordo com a metodologia aplicada, foi possível concluir que o estabelecimento da integração osso/implante cursou com atraso quando o implante foi esterilizado por radiação, porém, com a evolução da reparação, o método de esterilização não ocasionou alterações significativas no período final.

Palavras-chave: Substitutos Ósseos; Regeneração Óssea; Transplante Heterólogo.

VALENTINI NETO, R. **Tissue response to inorganic xenograft implant. Histomorphological and histomorphometrical evaluation.** [Thesis] – Univ Estadual Paulista, UNESP, Araçatuba, 2012.

Abstract

Proposition: This study evaluated the tissue response to the implant inorganic xenogenic bovine bone through the histomorphological analysis, varying the method of sterilization.

Materials and Methods: Discs of 8 mm bovine rib were obtained by specific processing to remove organics phase and were sterilized by autoclaving or gamma radiation. Then, 20 white rabbits (New Zealand) were operated for discs installation on gonion external side of mandibular, bilaterally, through screw grafts, yielding two large groups: EA - implant autoclaved; EI Group - gamma-irradiated implant. Slides were obtained at 15 and 45 days post-operative tissue and the images were analyzed qualitatively and quantitatively. **Results:** The Kruskal-Wallis test was used and no difference was found between linear interfaces of the bone / implant (BIC) groups within the same period (15 days: $p = 0.100$; 45 days: $p = 0.940$). **Conclusion:** According to the methodology, it was concluded that the establishment of integration bone / implant occurred later when the implant was sterilized by radiation in initial period, but with the evolution of repair, the method of sterilization did not cause significant changes in the final period.

Key words: Bone substitutes. Bone regeneration. Transplantation, Heterologous.

Lista de Figuras

Figura 1 – Bloco ósseo bovino. Vista cortical e medular

Figura 2 – Disco ósseo bovino

Figura 3 – Cirurgia em fase inicial

Figura 4 – Fixação do implante no leito

Figura 5 – Grupo EA15, 15 dias, HE, 125x

Figura 6 – Grupo EA15, 15 dias, HE, 400x

Figura 7 – Grupo EI15, 15 dias, HE, 125x

Figura 8 – Grupo EA45, 45 dias, HE, 125x

Figura 9 – Grupo EI45, 45 dias, HE, 125x

Figura 10 – Gráfico representando o percentual de contato linear osso/implante (BIC), nos grupos EA e EI, nos períodos de 15 e 45 dias.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela representando o percentual de contato osso/implante, nos grupos EA e EI, nos períodos de 15 e 45 dias.

Lista de Abreviaturas

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo “Júlio Mesquita Filho”

CTR – Centro de Tecnologia das Radiações

IPEN-CNEN/SP – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-Comissão

Nacional de Energia Nuclear da Universidade de São Paulo

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

mm – Milímetros

BIC – Contato linear osso/implante (Bone Implant Contact, em inglês)

HE – Hematoxilina e Eosina

g – grama

cm – Centímetro

Depto – Departamento

mL/L – mililitros por litro

ATM – atmosfera

kGy – kiloGrey

mg/kg – miligramas por quilo

mm – milímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODO	19
4 RESULTADO	24
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	30

REFERÊNCIAS

FIGURAS

TABELAS

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA

1 Introdução *

A evolução da Implantodontia proporcionou um avanço conjunto na utilização de técnicas e biomateriais de reconstrução dos rebordos maxilares visando à reestruturação do tecido ósseo, em espessura e altura¹.

Esta reestruturação óssea, sob aspectos fisiológicos, é realizada pela combinação de três processos: osteogênese, osteocondução e osteoindução^{2,3}. Considerando-se estas três etapas, dentre os tipos de materiais utilizados nos enxertos, o autógeno é o mais compatível e o que mostra melhor resultado. Suas propriedades biológicas desencadeiam uma série de eventos que culminam na sua revascularização, incorporação e remodelação, o que permite a reabilitação com implantes osseointegráveis de forma mais previsível⁴.

Entretanto, a cirurgia de remoção de fragmentos ósseos para os enxertos autógenos é seguida de alguma morbidade nos sítios doadores, que podem desencadear hematomas, edemas, infecções, lesões vasculo-nervosas, além do aumento do tempo cirúrgico⁵.

Outras opções reconstrutoras têm sido mencionadas como alternativa para substituir o enxerto ósseo autógeno, como o osso alógeno, osso xenógeno e os materiais aloplásticos⁶, o que conseqüentemente minimiza o grau de morbidade. No entanto, estes materiais não apresentam as propriedades osteogênicas dos enxertos autógenos.

Dentre os materiais xenógenos, os de origem bovina merecem destaque, pois estão disponíveis em grandes quantidades e sugerem segurança em relação à indução de resposta imune e transmissibilidade de doenças quando o processamento laboratorial é adequado³. Assim, o implante xenógeno de osso

* Normas da revista Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Anexo B).

bovino, tem sido pesquisado no intuito de identificar as propriedades específicas desse material⁷.

Atualmente, o grande desafio na área médico-odontológica é encontrar o carreador ideal para fatores de crescimento ou de indução, como as proteínas morfogenéticas ósseas, e que seja biocompatível e osteocondutor, podendo ser utilizado para melhorar a regeneração óssea no local do tratamento³. Verificar o comportamento tecidual frente à presença do referido material, submetido a métodos de esterilização distintos, foi o objetivo maior deste trabalho, buscando colaborar com a comunidade científica atuante neste campo.

2 Proposição

Este trabalho teve o propósito de avaliar a resposta tecidual ao implante xenógeno inorgânico de osso bovino esterilizado por diferentes métodos, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica.

3 Material e Método

Para o presente estudo foram utilizados 20 coelhos Nova Zelândia adultos e com peso corporal médio de 3kg. Os animais foram mantidos em gaiolas com dieta padrão de ração sólida e água “ad libitum”, em condições de temperatura ambiente, no Biotério do Depto. de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP sob o no. 00261-2012.

O implante xenógeno foi obtido de costela bovina. A coleta foi realizada imediatamente ao abate do animal e o processamento se deu em até 5 horas após o sacrifício do animal. A costela foi dissecada e reduzida a blocos retangulares de 8 x 5 cm e seccionadas longitudinalmente (Figura 1) através de fresa carbide 702 em baixa rotação e irrigação acoplados a um motor elétrico para implantodontia. Estes blocos foram processados da seguinte forma: imersão por 60 minutos em peróxido de hidrogênio a temperatura ambiente, com trocas a cada 15 minutos; nova imersão em peróxido de hidrogênio por 12h sob refrigeração; lavagem água corrente por 1h; banhos sequenciais com agitador em detergente enzimático (RioZyme, 5mL/L) por 2h; lavagem por 1h em água corrente; banhos sequenciais em álcoois 70, 80, 90 e absoluto; escovação vigorosa; lavagem por 2 h em água corrente; secagem em

estufa por 3-4 horas à 35-45 graus; redução das corticais em discos (Figura 2); embalagem individual dos discos em invólucro tipo grau cirúrgico e esterilização;

A esterilização ocorreu por meio de autoclavagem (em autoclave comum, 121°/2,1 ATM) ou radiação gama à dose de 25kGy, no irradiador multipropósito do Centro de Tecnologia das Radiações da Comissão Nacional de Energia Nuclear/Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos cirúrgicos seguintes foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental a ser utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis.

Os indivíduos receberam anestesia geral pela combinação de 70mg/kg de Ketamina intramuscular (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e 6,5mg/Kg de cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer SA – Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Após a sedação dos animais, na região cervical ventral de cada espécime (Figura 3), foram realizadas tricotomia e antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), sucedido por Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico 10% (Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Na mesma região, com lâmina número 15 (Feather Industries Ltda., Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) foi realizada

uma incisão vertical de aproximadamente 35 mm de comprimento até a tela subcutânea, em seguida, o tecido mole foi divulsionado em direção à região goníaca esquerda e direita, onde foram realizadas incisões mioperiosteais, expondo a cortical do ângulo mandibular. Os tecidos foram divulsionados com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para preparação do leito. A superfície óssea foi decorticalizada suavemente com broca diamantada n^o 6 em baixa rotação, sempre sob irrigação com soro fisiológico 0,9%. No ângulo mandibular direito, foi fixado o implante xenógeno autoclavado com parafuso de enxerto de 1,5 x 8mm (TitaniumFix, São José dos Campos). No lado esquerdo, foi similarmente fixado o implante xenógeno irradiado (Figura 4). Dois grandes grupos foram preliminarmente criados, conforme:

Grupo EA - implante autoclavado;

Grupo EI – implante gama-irradiado;

Os tecidos de todos os sítios cirúrgicos foram suturados em planos empregando-se fio mononylon 5-0 (Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com pontos interrompidos no plano mais externo. Após a sutura, foi realizada nova anti-sepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico 10% (Riodeine tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

No pós-operatório imediato, os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico® (Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento.

Sacrifício e coleta do material

Os animais foram sacrificados com uma dose duas a três vezes maior que a dose para ação anestésica (0,25mg/kg) de Tiopental sódico (Laboratório Abbott do Brasil Ltda.) administrada por via intramuscular, nos períodos de sacrifício de 15 e 45 dias, com 5 animais em cada grupo experimental. Foram definidos os grupos de estudo do trabalho. Dois grupos sacrificados ao 15^o dia para implante xenógeno autoclavado (EA15) e irradiado (EI15) e os dois grupos para os sacrificados ao 45^o dia (EA45 e EI45).

Processamento Laboratorial

As peças foram fixadas em solução de formol tamponado 10% durante 48 horas, à temperatura ambiente. Passado este período, as peças foram lavadas e descalcificadas em ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 18% por aproximadamente 12 semanas, à temperatura ambiente, com trocas semanais da solução. Após a descalcificação completa das peças, estas foram lavadas em água corrente por 24 horas e passaram pelas etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, para posterior obtenção dos cortes com 5 μ m de espessura, realizados em micrótomo. Os cortes, transversais e abrangendo toda a extensão do defeito, foram montados nas lâminas utilizando-se solução de albumina.

Os cortes obtidos foram corados por hematoxilina e eosina, para realização das análises histológica e histométrica.

Para a realização das mensurações, foi utilizado um microscópio óptico

com objetiva de aumento de 10/12,5 Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação de imagem (AxioCam MRc-5 Zeiss, Alemanha) e conectado a um microcomputador Pentium IV com software analisador de imagens digitalizadas AxioLab Release 4.5 (Zeiss, Alemanha). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos TIFF e analisadas através do software de quantificação ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, USA). Através do software ImageJ, as extensões de interesse foram selecionadas pela ferramenta Free hand e medidas em pixels.

Foi avaliada a medida linear de contato do tecido ósseo ao implante (BIC). Os dados obtidos nas análises foram transformados de valores absolutos. Todos os valores lineares do mesmo grupo foram somados. Para a comparação entre os valores somados obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney por meio do programa estatístico Sigma Stat 3.10 (Systat, USA).

4 Resultado

Análise Qualitativa

Aos 15 dias Pós-operatórios

Grupo EA15: Apresentou baixa proliferação e diferenciação óssea adjacente ao implante, permanecendo tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. Em algumas áreas, pode-se observar proliferação óssea subjacente ao implante. Esta proliferação óssea era constituída por um trabeculado delgado, com espaços medulares amplos (Figura 5) e intensa atividade osteoblástica. Observou-se a presença de células gigantes multinucleadas, caracterizando osteoclastos, em áreas marginais ao implante (Figura 6).

Grupo EI15: Apresentou ainda menor proliferação e diferenciação óssea adjacente ao implante (Figura 7), destacando-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas e vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. A proliferação óssea, quando observada, era constituída por trabeculado discretamente mais delgado e desorganizado quando comparado ao grupo anterior, com espaços medulares amplos.

Aos 45 dias Pós-operatórios

Grupo EA45: O processo de integração do implante apresentou-se praticamente completo em extensão, apesar de imaturo, com tecido ósseo neoformado na interface. (Figura 8).

Grupo EI45: De maneira similar ao grupo anterior, houve integração com o leite receptor. A proliferação óssea na cortical estava completa, porém a imaturidade dos tecidos pode ser observada (Figura 9).

Análise Quantitativa

Em relação à variável BIC, notou-se grande variação dos valores lineares (Figura 10). O teste de Kolmogorov-Smirnov não demonstrou normalidade na distribuição dos dados e utilizou-se procedimentos de análise estatística não-paramétricos. Aplicou-se o teste de Mann-Whitney, comparando grupo a grupo no mesmo período, que confirmou a ausência de significância estatística entre a diferença de BIC nos grupos avaliados ($p=0,112$). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado e não identificou diferença significativa entre as BIC dos grupos dentro dos mesmos períodos (15 dias: $p=0,100$; 45 dias: $p=0,940$).

5 Discussão

A busca por um biomaterial que possa gerar reconstrução satisfatória em leitões ósseos, seja pela recuperação de volume ou de função, tem sido tema de inúmeras pesquisas ao longo dos anos. É sabido que obter um material que alcance as características do osso autógeno é um grande desafio à ciência. O osso autógeno é reconhecidamente o padrão ouro para as reconstruções ósseas^{8,9}.

Um biomaterial, considerado como ideal, deveria reunir as seguintes propriedades: origem não-autogênica, osteoindutor, osteocondutor, esterilizável, não-tóxico, não induzir resposta imunológica, disponível em grandes quantidades, absorvível, funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento ou invaginação de tecido fibroso ou muscular^{6,9}.

Dentre os substitutos utilizados, o osso bovino tem se demonstrado um bom material nos quesitos físico-químicos, pois possui composição e estrutura muito semelhantes ao osso humano^{10,11}. Por estas razões, o osso bovino tem sido alvo constante de investigação científica, demonstrando-se confiável e com resultados promissores³.

Devido à imunogenicidade e à transmissão de doenças, houve a necessidade de melhorar a biocompatibilidade deste biomaterial através de processamentos laboratoriais^{12,13,14}. Em 1995, Aaboe et al⁹ previam uma restrição no uso de aloenxertos e xenoenxertos devido aos problemas de resposta imunológica e risco de contaminação. Contrariando tal previsão, atualmente existem inúmeros métodos desenvolvidos para redução dos problemas acima descritos e osso bovino tem sido utilizado amplamente.

Dentre os métodos de processamento, podemos citar a autoclavagem, exposição ao óxido de etileno, irradiação gama, liofilização, desproteínização e, mais recentemente, o BioCleanse®^{13,15}. Este último tem se destacado por utilizar baixas temperaturas e causar menos alterações nas propriedades biomecânicas dos enxertos do que outros métodos conhecidos¹⁶⁻²⁴.

O BioCleanse® consiste em processo patenteado de exposição do osso a uma sequência de soluções químicas em baixa temperatura, incluindo detergentes, álcoois e peróxido de hidrogênio. O objetivo é a remoção de contaminantes, medula óssea flava e rubra, descontaminando e desengordurando a matriz óssea. Tal processo é similar ao desenvolvido pelos autores deste trabalho e já utilizado em outras pesquisas pelo grupo.

A autoclavagem, técnica simples de esterilização utilizada nos grupos experimentais EA15 e EA45, é conhecida por desnaturar as proteínas devido à alta temperatura e pressão causando perdas nas propriedades biológicas dos enxertos²⁵. Embora a estimada característica de osteoindução não tenha sido avaliada nesta metodologia, esperava-se diminuição no potencial osteogênico nestes grupos devido ao processamento inicial associado à autoclavagem²⁶. Em ambos os grupos, o implante xenógeno era eminentemente cortical, o que por si só causaria um reparo mais lento^{27,28}. Embora atrasado, o processo de reparo seguiu-se promovendo a integração do implante no leito receptor ao 45º dia (Tabela 1).

Outro desafio é encontrar um método de esterilização que não descaracterize, estruturalmente ou em suas propriedades biológicas, o biomaterial e seus possíveis agentes osteogênicos artificialmente carregados. A irradiação Gama tem se destacado por promover toxicidade e alterações biomecânicas dose-dependentes^{19,26,29}, enquanto induz a desnaturação protéica pelo calor (proporcional

à dose de irradiação). Tem sido demonstrado que a irradiação gama de enxertos ósseos é segura para as células somente após procedimentos de desengorduramento²⁹.

Os grupos EI15 e EI45, que foram gama-irradiados, apresentaram-se com discreto atraso na integração dos implantes xenógenos. Este retardo na integração, observado pelo contato linear osso-implante, ocorreu apenas no período mais curto. À medida que o processo de reparação progrediu, a extensão do contato osso-implante superou a encontrada no grupo autoclavado, embora, qualitativamente, o osso neoformado tenha se demonstrado pouco desenvolvido. Tal comportamento pode ser causado pelas alterações na superfície de contato do implante submetido à irradiação, que dificultariam o povoamento celular superficial do implante. Segundo Endres³⁰, uma redução notável no número de células e a ausência de uma rede fibrosa organizada foram observadas em cultura “in vitro” sobre osso gama-irradiado.

Em estudo das propriedades das superfícies de Titânio, Ferraris et al²⁹ reforçaram a influência da esterilização na molhabilidade, interação protéica, bioatividade, mineralização e a ligação de células. Citou ainda alteração significativa no ângulo de contato da superfície após a esterilização, o que pode afetar o comportamento celular.

Em ambos os grupos com períodos tardios, EA45 e EI45, pôde-se observar a permanência da microarquitetura do implante xenógeno, sem evidências de remodelação significativa. Em algumas espécimes, observou-se a formação de ilhas de osso neoformado ocupando grandes lacunas da parte esponjosa remanescente do implante.

Estas ilhas foram observadas também nos períodos iniciais do grupo EA15, reforçando a maior afinidade do leito receptor e suas células pelo implante xenógeno autoclavado.

Sugere-se a pesquisa de sinalizações protéicas nos leitos receptores mediante a presença dos implantes para maior caracterização dos fenômenos observados.

6 Conclusão

De acordo com a metodologia aplicada, foi possível concluir que o estabelecimento da integração osso/implante cursou com atraso quando o implante foi esterilizado por radiação, porém, com a evolução da reparação, o método de esterilização não ocasionou alterações significativas no período final.

REFERÊNCIAS**

1. Segundo TK: Avaliação dos enxertos ósseos e homólogos utilizados em Implantodontia. RGO 48: 217-22, 2000
2. Manso, MC: Reconstrução óssea em implantodontia: apresentação de um protocolo de condutas. Rev Bras Implant 8: 7-12, 2002
3. Zambuzzi, WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM: Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. Braz Dent J 17(4): 274-8, 2006
4. Cypher TJ, Grossman JP: Biological principles of bone graft healing. J Foot Ankle Surg 35: 413-17, 1996
5. Garcia RJ, Feofilof ET: Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos, protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina. Rev Bras Ortop 3: 895-903, 1996
6. Young C, Sandsted P, Skogund A: A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants 14:72-6, 1999
7. Garofalo GS: Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. Minerva Stomatol 56: 373-92, 2007
8. Mokbel N, Serhal CB, Matni G, Naaman N: Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. Oral Maxillofac Surg 12:73–78, 2008.
9. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E: Healing of experimentally created defects: a review. Br J Oral Maxillofac Surg 33: 312-8, 1995

** Normas da revista Journal of Oral Maxillofacial Surgery (Anexo B).

10. Oliveira RC de, Sicca CM, Silva TL da, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM: Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. Rev. FOB 7(3/4): 85-93, 1999
11. Katz J, Mukherjee N, Cobb RR, Bursac P, York A: Incorporation and Immunogenicity of Cleaned Bovine Bone in a Sheep Model. J Biomater Appl 24: 159, 2009
12. Kim YK, Yun PY, Kim SG, Kim BS, Ong JL: Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107:21-8, 2009
13. Supronowicz P, Zhukauskas R, York-Ely A, Wicomb W, Thula T, Fleming L, Cobb RR: Immunologic analyses of bovine bone treated with a novel tissue sterilization process. Xenotransplantation 15: 398-406, 2008
14. Kemper N, Davison N, Fitzpatrick D, Marshall R, Lin A, Mundy K, Cobb RR: Characterization of the mechanical properties of bovine cortical bone treated with a novel tissue sterilization process. Cell Tissue Bank 12(4):273-9, 2011
15. Mroz TE, Lin EL, Summit MC, Bianchi JR, Keesling JE Jr, Roberts M, Vangsness CT Jr, Wang JC: Biomechanical analysis of allograft bone treated with a novel tissue sterilization process. Spine J 6: 34-9, 2006
16. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM: Factors affecting bone graft incorporation. Clin Orthop 324: 6-74, 1996
17. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP: The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. Clin Orthop 290: 279-84, 1993

18. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC: Biomechanical properties of bone allografts. *Clin Orthop* 174: 54–7, 1983
19. Cornu O, Banse X, Docquier PL, Luyckx S, Delloye C: Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *J Orthop Res* 18: 426–31, 2000
20. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, et al: Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3: 1–8, 1995
21. Akkus O, Rimnac CM: Fracture resistance of gamma sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res* 19: 927–34, 2001
22. Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC: Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 15: 111–7, 1997
23. Anderson MJ, Keyak JH, Skinner HB: Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation. *J Bone Joint Surg [Am]* 74: 747–52, 1992
24. Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D: Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 21: 369–76, 2000
25. Del Carlo RJ et al: Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. *Revista Brasileira Ciência Veterinária* 6: 121-6, 1999
26. Hallfeldt KKJ, Stutzle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L: Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 59: 614-20, 1995
27. Burchardt H, Enneking WF: Transplantation of bone. *Surg Clin North Am* 58: 403-27, 1978

28. Day S, Ostrum R, Clinton R: Bone injury, regeneration, and repair. In: Buckwalter J, Einhorn T, Simon S, eds. *Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. American Academy of Orthopaedic Surgeons 388, 2000
29. Ferraris S, Pan G, Cassinelli C, Mazzucco L, Verné E, Spriano S: Effects of sterilization and storage on the properties of ALP-grafted biomaterials for prosthetic and bone tissue engineering applications. *Biomed Mater* 7: 054-102, 2012
30. Endres S, Kratz M: Gamma irradiation. An effective procedure for bone banks, but does it make sense from an osteobiological perspective? *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9(1):25-31, 2009

Figuras

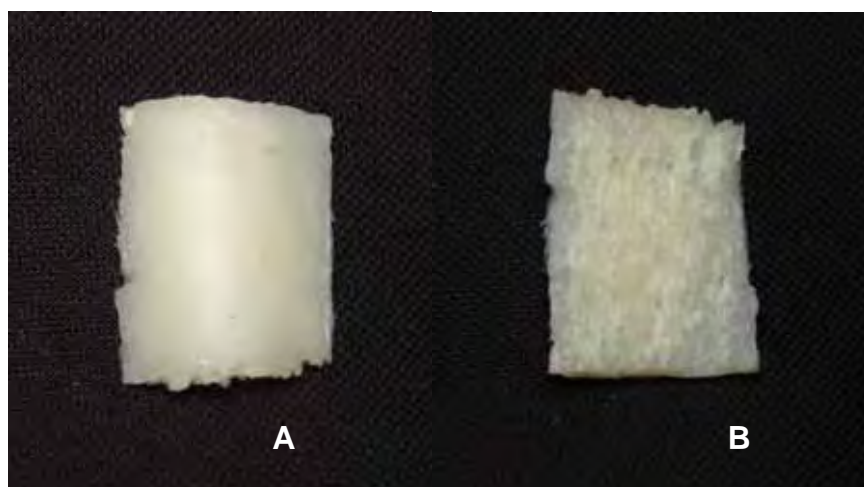


Figura 1 – Bloco ósseo bovino. Vista cortical (A) e medular (B).



Figura 2 – Disco ósseo bovino

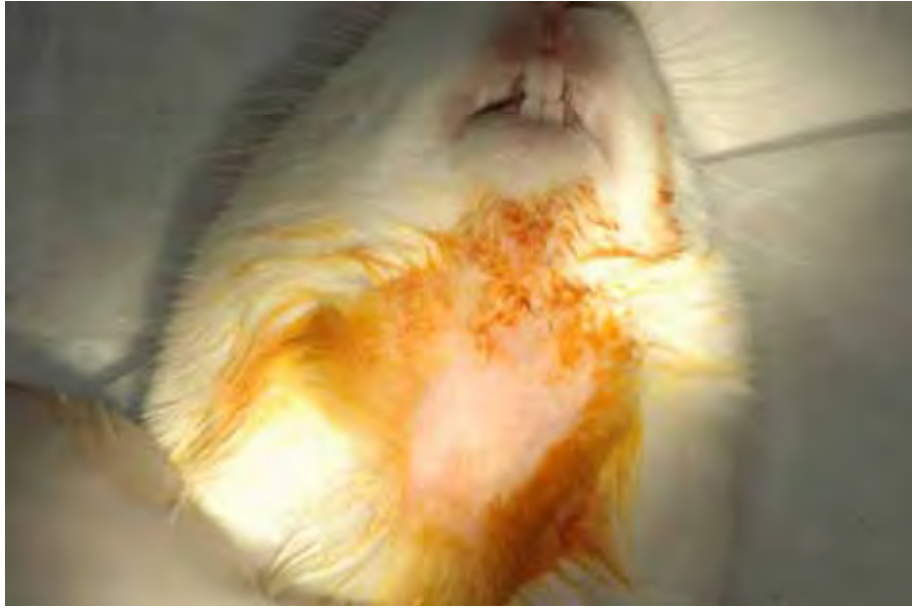


Figura 3 – Cirurgia em fase inicial



Figura 4 – Fixação do implante no leito

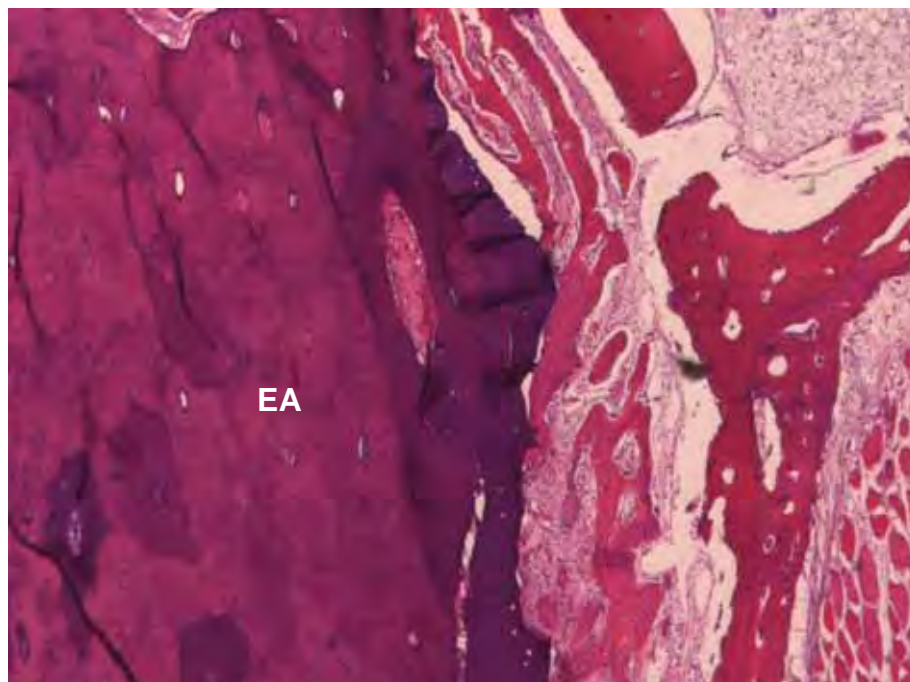


Figura 5 – Grupo EA15, 15 días, HE, 125x

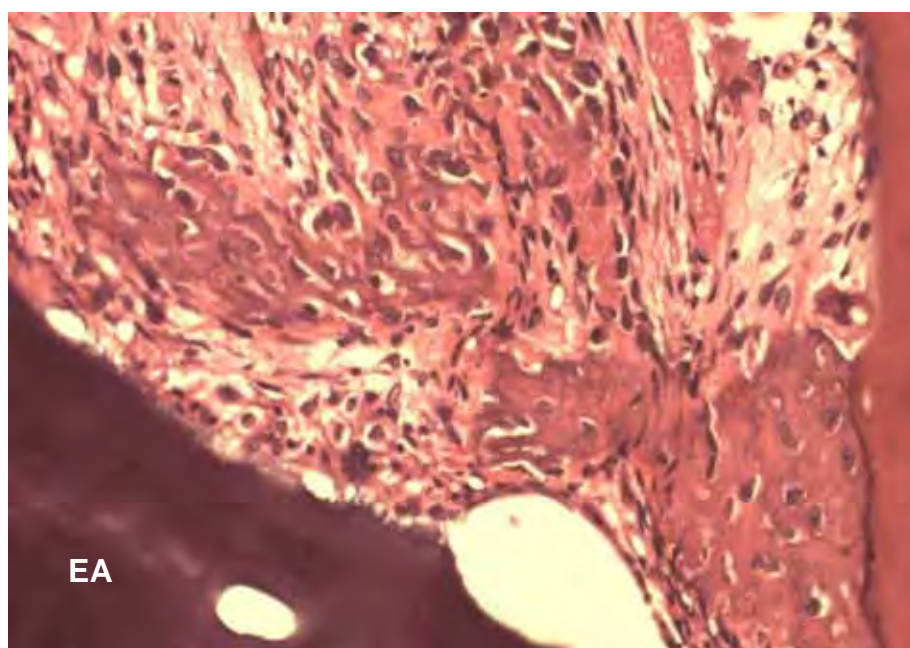


Figura 6 – Grupo EA15, 15 días, HE, 400x

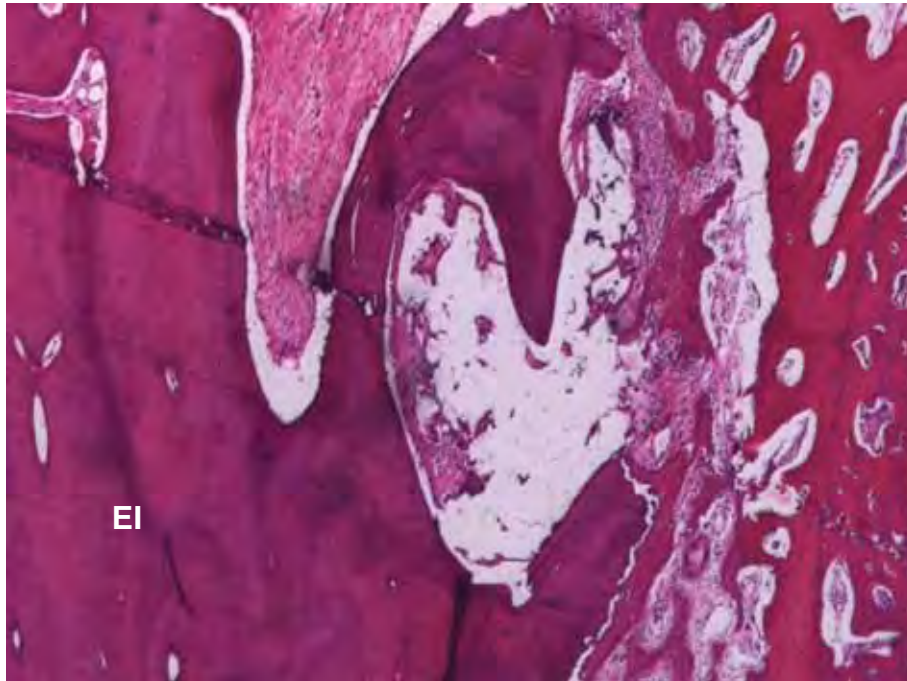


Figura 7 – Grupo EI15, 15 días, HE, 125x

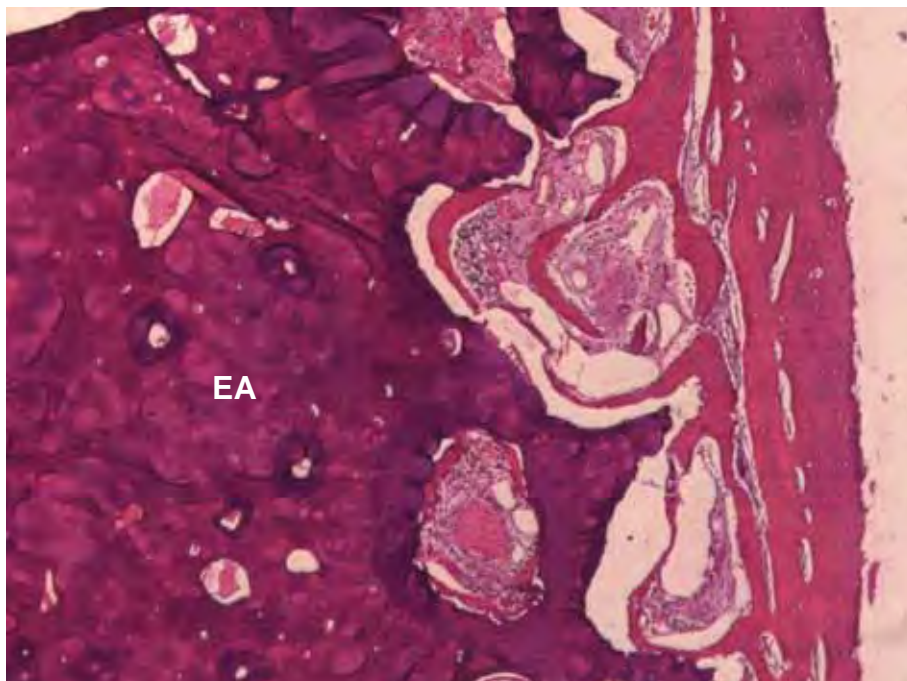


Figura 8 – Grupo EA45, 45 días, HE, 125x

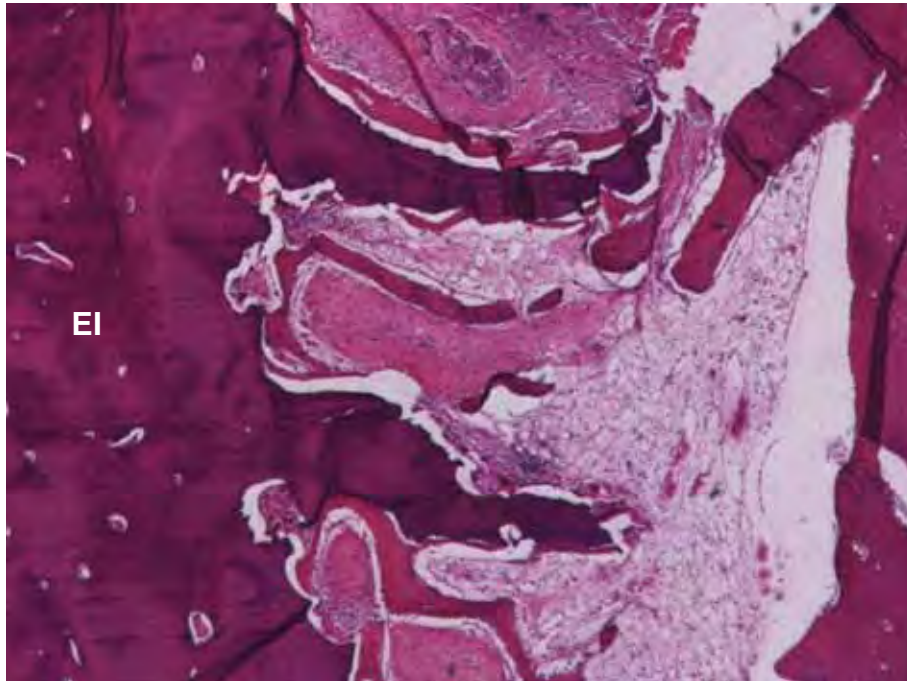


Figura 9 – Grupo EI45, 45 dias, HE, 125x

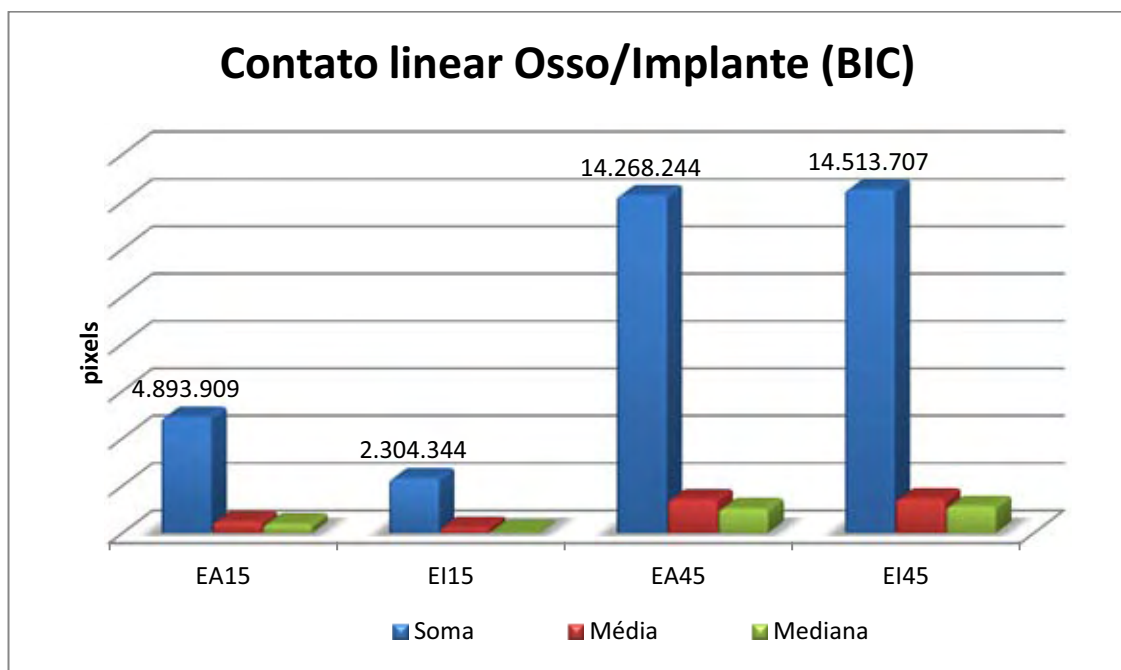


Figura 10 – Gráfico representando o percentual de contato linear osso/implante (BIC), nos grupos EA e EI, nos períodos de 15 e 45 dias.

Tabelas

Percentual de Contato	
Grupo	BIC (%)
EA15	67,99
EI15	32,01
EA45	49,57
EI45	50,43

Tabela 1 – Tabela representando o percentual de contato osso/implante, nos grupos EA e EI, nos períodos de 15 e 45 dias.

Anexo A

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)



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

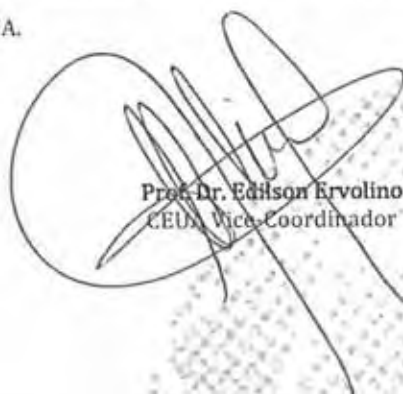
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Resposta tecidual ao implante ósseo xenógeno inorgânico variando-se o método de esterilização. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica" sob responsabilidade do Pesquisador **EDUARDO HOCHULI VIEIRA** e colaboração de Rodolpho Valentini Neto e Idelmo Rangel Garcia Júnior está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00261-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Tissue response to inorganic xenograft implant. Histomorphological and histomorphometrical evaluation", process number **00261-2012**, under responsibility of **EDUARDO HOCHULI VIEIRA** and with collaboration of Rodolpho Valentini Neto and Idelmo Rangel Garcia Júnior agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Anexo B

Normas da Revista

Guide for Authors

Notice to Contributors

Reprints of the notice are available from the Editor-in-Chief and are also available at www.joms.org. The JOURNAL publishes articles reflecting a wide range of opinions and techniques, provided they are original, contribute new information, and meet the standards of scientific thought, rational procedure, and literary presentation.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/joms>, authors will be guided through the electronic submission process; original source files (text documents in Word, image files in TIFF or EPS) are required. The author should specify a category designation for the manuscript (original investigation, review article, letter to the editor, etc) and choose a set of classifications from the list provided online. All authors must download and fill out the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office (juliush@ohsu.edu). All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be sent via e-mail.

All author correspondence may be directed to the Editorin- Chief:

Dr Leon A. Assael
Oral and Maxillofacial Surgery
School of Dentistry?SD-522
Oregon Health & Science University
611 SW Campus Dr
Portland, OR 97239
Phone: (503) 494-0293
Fax: (503) 494-0294
E-mails: assaell@ohsu.edu, juliush@ohsu.edu

Original articles are considered and accepted for publication on the condition that they have not been published, or submitted for publication, elsewhere. The Editor reserves the right to edit manuscripts to fit articles within the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. A title page should be included with each article that lists the title, the authors' names, degrees, affiliations, complete mailing address (including street number), and the telephone number, fax number, and e-mail address for the corresponding author. Titles of articles should be descriptive but as concise as possible. A structured abstract (introductory summary) of no more than 250 words should be included. It should be divided into four sections labeled *Purpose, Materials (or Patients) and Methods, Results, and Conclusions*.

All Contributors to *JOMS* should refer to the Consort statement on clinical research design and the Helsinki statement on medical protocols and ethics.

Consort statement:

☞ <http://www.consort-statement.org/statement/revisedstatement.htm>

Helsinki:

☞ <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>

References. Type with double spacing. All references given must be cited in numerical order in the text. Bibliographies and reading lists are not used. For journal references, give the author's name, article title, journal name as abbreviated in Index Medicus, volume, pagination, and year.

1. Regezi JA, Batsakis JG, Courtney RM: Granular cell tumors of the head and neck. *J Oral Surg* 37:402, 1979

For books, give the author's name, book title, location and name of publisher, and year of publication (exact page numbers are required for direct quotations):

1. Skinner EW, Phillips RW: *Science of Dental Materials* (ed 5). Philadelphia, PA, Saunders, 1960, p 246

Figures. All figures must be numbered and cited in the text in order.

Legends. All submitted figures require a legend. For photomicrographs, magnification and stain should be specified.

Photographs. Photographs should be high-quality, sharp images. Color art and color photography submissions are encouraged. Images must be high-resolution digital illustrations (EPS or TIFF files); Powerpoint is acceptable for review purposes, but not of sufficient quality for publication. Authors may contact Elsevier for more information or should download a copy of the Specifications for Supplying Digital Artwork from www.us.elsevierhealth.com/subguide.

Tables. Each table should be logically organized and should supplement the article. Each table should be numbered consecutively and cited in the body of the text in order. Title and footnotes should be on the same page with the table. Do not draw vertical rules in tables.

Acknowledgments. Only persons who have made significant contributions to an article can be acknowledged.

Permission and Waivers. These should accompany the manuscript when it is submitted for publication. Include the following statement in the covering letter: In consideration of the *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in the event that such work is published in the JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. Permission of original author and publisher must be obtained for direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that is not your own. (Up to 100 words of prose material usually can be quoted without getting permission, provided the material quoted is not the essence of the complete work.) **Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Waivers**

must be obtained for full-face photographs unless eyes are masked to prevent identification. Waiver forms are available from the Editor-in-Chief.

Financial Interests. As specified in the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment, any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors. A covering letter at the time of submission should inform the Editor about pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will discuss with the authors how best to disclose the relevant information.