

**UNIVERSIDADE POTIGUAR**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**OS EFEITOS DE PSEUDOWOLASTONITA SOBRE  
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE  
RATOS *WISTAR***

**DEWREN PATRÍCIO CAVALCANTI**

**NATAL**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DEWREN PATRÍCIO CAVALCANTI**

**OS EFEITOS DE PSEUDOWOLASTONITA SOBRE  
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE  
RATOS *Wistar***

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre (Mestrado em Odontologia).

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Carlos Frederico de Moraes Sarmiento

Co-orientadora: Patrícia Teixeira de Oliveira

**NATAL/RN**

**2006**

C376e Cavalcanti, Dewren Patrício.

Os efeitos da pseudowolastonita sobre regeneração óssea em alvéolos dentários de ratos *Wistar* / Dewren Patrício Cavalcanti. – Natal, 2006.

76f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Potiguar. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Bibliografia : 12-69

1. Odontologia – Dissertação. 2. Regeneração óssea - Alvéolos dentários 3.Pseudowolastonita 4. ratos. I. Título.

**UNIVERSIDADE POTIGUAR**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**OS EFEITOS DE PSEUDOWOLASTONITA SOBRE  
REGENERAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE  
RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada pela aluna DEWREN PATRÍCIO CAVALCANTI à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Potiguar, em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ a qual obteve a nota abaixo conforme avaliação da banca examinadora constituída pelos professores:

**Banca Examinadora**

\_\_\_\_\_  
Prof. Carlos Frederico de Moraes Sarmiento (Orientador)

\_\_\_\_\_  
Prof. \_\_\_\_\_ (Universidade Potiguar)

\_\_\_\_\_  
Prof. \_\_\_\_\_ (Convidado)

Avaliação final: \_\_\_\_\_

**NATAL/RN**  
**2006**

## DEDICATÓRIA

À minha família, a base de tudo. Aos meus pais Adonai e Hélia, pelo constante incentivo, exemplo de vida, luta e honestidade, dedico este trabalho. Ao meu irmão Andrew, que mesmo distante suscita inspiração, eu ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Carlos Frederico de Moraes Sarmiento pela orientação, colaboração e ensinamentos para realização deste trabalho.

Às Professoras Dra. Maria Goretti Freire de Carvalho e Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira pela co-orientação, apoio demandado, sugestões e ensinamentos para execução da abordagem experimental e, em especial, o processamento e análise histológica.

Ao Biólogo da Instituição Tarcísio Bruno pela atenção dispensada à pesquisa e cuidado no acompanhamento dos nossos animais.

Ao técnico de laboratório Canindé Macedo pela valiosa ajuda e longas horas dedicadas ao processamento das peças e obtenção das lâminas.

À graduanda Andreza Rocha pela dedicação, encorajamento e ajuda de grande valia durante a realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao meu mestre maior e pai na Implantodontia Dr. Gilmar Poli de Arruda por mostrar que clínica e pesquisa devem caminhar juntas e em equilíbrio. Inspiração para a docência, fonte acessível e inesgotável de conhecimento, exemplo de vida.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Clínicas Odontológicas na pessoa de Dra. Rejane Andrade de Carvalho, exemplo de garra e resignação pela Odontologia. É uma honra fazer parte deste sonho realizado.

## RESUMO

### OS EFEITOS DE PSEUDOWOLASTONITA SOBRE REGENERAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE RATOS *WISTAR*

Com o constante avanço da ciência, a engenharia tecidual tem buscado novas terapêuticas com o intuito de otimizar e acelerar o tempo do processo de reparo e regeneração dos tecidos ósseos. Pseudowolastonita (psW) é uma nova biocerâmica, a base de sílica, que demonstra bioatividade *in vitro* e adere-se ao tecido ósseo quando implantada *in vivo*. Estudos em defeitos ósseos na tíbia sugerem que psW tem aplicações potenciais na medicina em situações onde o reparo ou substituição óssea é requerida. No entanto, investigações em modelos na cavidade bucal para avaliar a sua possível utilização em Odontologia, ainda não foram realizados. O propósito deste trabalho foi avaliar o comportamento da psW em cavidade bucal, investigando sua capacidade de estimular regeneração óssea em alvéolos dentários de ratos *Wistar*, correlacionando a resposta histológica ao grau de reparo/neoformação do tecido ósseo na presença ou não da biocerâmica. Em quinze espécimes, os alvéolos dos primeiros molares inferiores recém extraídos foram preenchidos com psW (lado esquerdo), enquanto no grupo controle (lado direito) permaneceu a presença apenas do coágulo sanguíneo. Os eventos biológicos e grau de reparo ósseo local foram avaliados em dias específicos (7, 14 e 21 dias) através de estudo morfológico e histomorfométrico. Os dados da histomorfometria foram analisados por um teste “t” pareado com nível de significância estipulado em  $p < 0,05$ . No estudo morfológico, durante todo o período experimental, em nenhum dos dois grupos foram observadas regiões de necrose ou lesões vasculares. Ao sétimo dia, em ambos os grupos, foi predominante a resposta tecidual inflamatória com discretas neoformação vascular e proliferação fibroblástica; no grupo teste houve um leve aumento de atividade osteoclástica. A análise histomorfométrica demonstrou um grau mais elevado de elementos associados ao processo de reparo em alvéolos que receberam psW. Foi possível perceber no grupo teste, ao décimo quarto dia, uma tendência de aumento de produção de matriz osteóide e mineralização na cerâmica; angiogênese e proliferação fibroblástica foram observadas em ambos os grupos. A produção de matriz osteóide e a mineralização óssea foi patente no grupo teste ao vigésimo primeiro dia. Chama atenção neste período a presença de granulomas envolvendo psW, algumas delas mineralizadas, bem como dissolução e englobamento dessas partículas por macrófagos. Os achados deste estudo sugerem que a psW é biocompatível, estimula tanto a resposta inflamatória/reparativa quanto a neoformação óssea e, pode, em algum grau, ser absorvível.

Palavras-chave: Regeneração óssea, alvéolo dentário, pseudowolastonita, ratos.

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF PSEUDOWOLLASTONITE ON BONE REGENERATION IN DENTAL EXTRACTION SOCKETS OF *WISTAR* RATS

With the constant technological progress, tissue engineering has emerged as a potential form of therapy to accelerate and optimize bone regeneration. Pseudowollastonite (psW) is a novel silica based ceramic that has shown bioactivity *in vitro* and bonds to bone when implanted *in vivo*. Studies in bone defects in the tibia suggest that psW has potential clinical application in medicine in situations where repair or bone substitution is required. However, investigations in experimental models in the oral cavity to evaluate its possible use in dentistry have not been carried out. The purpose of this study, therefore, was to evaluate the biological behavior of psW in the oral cavity, as well as its capacity to stimulate bone regeneration in extraction sockets of *Wistar* rats, correlating the histological response with the degree of repair/ new bone formation in presence or absence of the ceramic. Using a contra-lateral approach left and right lower first molars of 15 rats were extracted and the sockets either filled with psW particles (left) or left to heal only with the blood clot (control). General biological aspects and the level of repair were evaluated at days 7, 14 and 21 using conventional histology and histomorphometry. Quantitative data were analyzed by a paired Student's "t" test with the level of significance set at  $p < 0,05$ ). During the entire experimental period there were no signs of either local necrosis or vascular lesions. At day 7, in both groups, the histological analysis revealed that there was a predominance of an inflammatory tissue response with discreet angiogenesis and fibroblastic proliferation. In the test group there was an apparent increase in osteoclastic activity. During this period, histomorphometry also showed an increase in elements associated with the repair process in the sockets treated with psW. At day 14, in the test group there was an increase in the production of osteoid and some mineralization was also evident. Angiogenesis and fibroblastic proliferation was observed in both groups. At day 21, osteoid matrix production and bone mineralization was notorious in test group. It is noteworthy during this period both the presence of granulomas surrounding psW particles, some of which mineralized, as well as dissolution and phagocytosis of these particles by macrophages. The results of these studies suggest that psW is biocompatible, stimulates both the repair/inflammatory response and bone formation and may, at least to a certain degree be absorbable.

Keywords: Bone regeneration, extraction sockets, pseudowollastonite, rats.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Estrutura macroscópica do tecido ósseo. Corte transversal da mandíbula de um macaco mostrando padrões variáveis de osso trabecular e cortical: 1 e 2. trabeculado; 3. cortical porosa; 4. cortical densa. Adaptado de Roberts e Garetto, 2000.....p. 19
- FIGURA 2 – Corte do extremo proximal da tíbia. Osso compacto cortical da diáfise e o osso esponjoso correspondente ao espaço medular. Adaptado de Fawcett, 2001.....p.20
- FIGURA 3 – Representação esquemática de tecido ósseo cortical esponjoso e os respectivos envoltórios esqueléticos: 1. perióstio; 2. endóstio harversiano; 3. endóstio cortical; 4. endóstio trabecular. Adaptado de Pinto, Miyagusko e Pereira, 2003. ....p. 20
- FIGURA 4 – Amostra da biocerâmica Pseudowolastonita em disco.....p. 39
- FIGURA 5 – Pseudowolastonita na forma particulada.....p. 40
- FIGURA 6 – Caixa de polipropileno com forragem de maravalha.....p. 42
- FIGURA 7 – Dispositivo para acomodação do animal durante a cirurgia.....p. 43
- FIGURA 8 – Alvéolo direito do primeiro molar mandibular pós exodontia.....p. 43
- FIGURA 9 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Região alveolar circunscrita (RA) com processo inflamatório. Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. MA: margem alveolar. SM: segundo molar adjacente. HE – 40X..p. 47

FIGURA 10 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. Vs: vasos sanguíneos. AF: atividade fibroblástica. HE – 100X.....p. 47

FIGURA 11 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Quantidade significativa de tecido de granulação. Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical das margens do alvéolo. PO: proliferação osteoblástica. Ost: osteócito. TG: tecido de granulação. HE – 200X.....p. 47

FIGURA 12 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo controle sem psW: Tecido de granulação em diminuição. Oc: Osso cortical. PO: Proliferação osteoblástica. TG: tecido de granulação. HE – 200X.....p. 48

FIGURA 13 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo controle sem psW: Lamelas ósseas. NO: Osso neoformado. PO: Proliferação osteoblástica da periferia. Oc: Osso cortical. HE – 200X.....p. 48

FIGURA 14 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo controle sem psW: Início da organização do tecido ósseo. TrO: trabéculas ósseas. NO: Osso neoformado. HE – 200X.....p. 48

FIGURA 15 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Osso adjacente à cavidade alveolar encontra-se reativa (ObR). RI: Reação inflamatória. Oc: Osso cortical. SM: Segundo molar HE – 40X.....p. 50

FIGURA 16 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Proliferação osteoblástica (PO) adjunta à periferia do alvéolo e estímulo na região mais central. Vs: vasos sanguíneos. Inf: Infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. HE – 200X.....p. 50

FIGURA 17 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Infiltrado inflamatório com presença significativa de osteoblastos (Ostb) . NO: Osso neoformado. HE – 200X.....p. 50

FIGURA 18 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Infiltrado inflamatório circundando partículas da cerâmica (em evidência). HE – 400X.....p. 51

FIGURA 19 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo teste com psW: Reação inflamatória crônica. Presença de células fagocitárias. Em destaque células gigante que englobou uma partícula da cerâmica. HE – 400X.....p. 51

FIGURA 20 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo teste com psW: Formação de tecido osteóide circundado por osteoblastos (Ostb). Trb e NO: tecido osteóide neoformado. HE – 200X.....p. 51

FIGURA 21 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo teste com psW: Atividade osteoblástica (AO). TNF: Trabéculas ósseas neoformadas. HE – 100X.....p. 52

FIGURA 22 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo teste com psW: Persiste atividade osteoblástica. NO: Osso neoformado. PO: Proliferação osteoblástica. HE – 200X.....p. 52

FIGURA 23 – Médias das diferenças de neoformação óssea entre grupos controle e teste por período, representado em porcentagem. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).....p. 54

## LISTA DE ABREVIATURAS

A-W: Apatita-Wolastonita

$\beta$ -TCP:  $\beta$ -tricálcio fosfato

$\beta$ -CPP:  $\beta$ -cálcio pirofosfato

$\text{Ca}^{2+}$ : Cálcio

$\text{CaSiO}_3$ : Pseudowolastonita

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ : Hidroxiapatita

$\text{CaCO}_3$ : Carbonato de cálcio

$\text{cm}^2$ : centímetro quadrado

HA: Hidroxiapatita

HCA: Hidroxiapatita Carbonatada

HE: Hematoxilina e Eosina

ml: Mililitro

mg: Miligrama

psW: Pseudowolastonita

$\text{PO}_4$ : Fosfato

SBF: Simulated Body Fluid (solução simuladora de fluido humano)

$\text{SiO}_2$ : Sílica

$\text{Si-O}^-$ : Grupo funcional sílica

$\mu\text{m}$ : Micrômetro

$\mu\text{m}^2$ : Micrômetro quadrado

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Divisão dos animais.....p. 41

TABELA 2 – Médias histomorfométricas por período (área em  $\mu\text{m}^2$ ).....p. 53

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
	2.1 Tecido ósseo	18
	2.1.1 Generalidades, anatomia e morfologia ósseas	18
	2.1.2 Histologia óssea	21
	2.1.3 Fisiologia e mecanismos biológicos de neoformação / reparo	23
	2.1.4. Reparo alveolar	24
	2.2 Biomateriais	26
	2.2.1 Considerações Gerais	26
	2.2.2 Materiais Bioativos	28
	2.2.3 Biovidros e Biocerâmicas	30
	2.3 Pseudowolastonita (psW)	32
	2.3.1 Considerações Gerais	32
	2.3.2 Caracterização e síntese da psW	33
	2.3.3 Comportamento da psW em soluções fisiológicas	33
	2.3.4 Mecanismo de formação da camada de apatita na superfície da psW	34
	2.3.5 Biocompatibilidade e propriedades de osteocondução da psW	35
	2.3.6 Implantação da psW no osso	36

3	PROPOSIÇÃO	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
	4.1 Materiais	39
	4.1.1 Modelo Experimental	39
	4.2 Métodos	41
	4.2.1 Manuseio dos animais	41
	4.2.2 Procedimento cirúrgico	42
	4.2.3 Histórico pós-cirúrgico	44
	4.2.4 Procedimentos de coleta e análise dos dados	44
	4.2.4.1 Processamento histológico	44
	4.2.4.2 Análise histomorfométrica	45
	4.2.4.3 Análise estatística	45
5	RESULTADOS	46
	5.1 Exames Histológicos: Grupo controle	46
	5.2 Exames Histológicos: Grupo teste	49
	5.3 Exames Histológicos: Grupo teste X Grupo controle	53
6	DISCUSSÃO	55
	6.1 Otimização dos procedimentos experimentais	55
	6.2 Biocompatibilidade da pseudowolastonita e seu efeito estimulador no tecido ósseo	57
	6.3 Futuros estudos e aplicações clínicas	60
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas situações clínicas na Odontologia exigem reparo e regeneração em defeitos no tecido ósseo. Várias formas de terapia têm sido estudadas para atingir este objetivo, tais como: enxertos autógenos, substitutos ósseos alógenos, xenógenos e aloplásticos, entre outros. Biologicamente, o enxerto ósseo autógeno constitui o padrão ouro de comparação para aumento ósseo, previsibilidade explicada pelo fato de ser a única a fornecer ao leito receptor células com capacidade de neoformação óssea, fatores de crescimento e um arcabouço imunologicamente idêntico ao leito receptor (GARG E VALCANAIA, 1999; ROCHA, 2000; PINTO, MIYAGUSKO E PEREIRA 2003).

A utilização de biomateriais em substituição aos enxertos ósseos autógenos promoveu a perspectiva de que não seriam mais necessárias áreas doadoras de enxerto, solucionando parte do receio dos pacientes com relação às grandes intervenções cirúrgicas (KUABARA *et al*, 2002). Entretanto, os biomateriais ainda não apresentam o desempenho clínico dos enxertos autógenos. Entre as principais vantagens dos enxertos aloplásticos estão a sua disponibilidade abundante e a eliminação da necessidade de utilizar um sítio doador do próprio paciente, reduzindo a morbidade (TIEDMAN, GARVIN, KILE, 1995; CARVALHO, LUPPINO E MENDES, 2002).

Embora o sucesso com a utilização de biomateriais tenha sido limitada porque a maioria possui apenas propriedades osteocondutivas, há evidências recentes que a classe dos materiais bioativos pode ter ação osteoindutiva, o que os tornam potencialmente atraentes para serem utilizados como integrantes de estratégias em engenharia tecidual.

A Pseudowolastonita (psW) é uma cerâmica à base de sílica, sinterizada em ambiente laboratorial que, em soluções fisiológicas, forma uma camada de apatita na superfície, característica esta, que é típica dos materiais bioativos. Também tem sido demonstrado *in vitro* que este material tem a capacidade de induzir formação óssea à distância.

Estudos *in vivo* sugerem que psW pode potencialmente ter um número de aplicações clínicas na área médica, em situações onde o reparo ou a substituição óssea é requerida. Faltam, porém, estudos no ambiente da cavidade bucal para investigar a sua possível utilização na Odontologia.

O presente estudo avaliou o comportamento biológico da Pseudowolastonita em alvéolos de dentes recém extraídos de ratos *Wistar*, em particular a sua capacidade de promover a regeneração óssea em um modelo experimental na cavidade bucal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A cicatrização pode ser definida como restauração do tecido danificado a um patamar que seja próximo do tecido íntegro. No alvéolo da ferida de extração dentária, a cicatrização se caracteriza como a regeneração do tecido ósseo. A reparação óssea ocorre em um estágio inicial da regeneração e se caracteriza pela presença de um tecido imaturo que se assemelha ao original, só que é fraco e possui deformidades em sua morfologia. Este tecido necessariamente sofrerá remodelação (LEONEL *et al*, 2003).

Regeneração óssea é frequentemente requerida após perdas dentais e procedimentos em cirurgia bucal. Tratamento de cistos, tumores e fraturas dos maxilares pode resultar em defeitos ósseos. Tais defeitos têm sido reparados convencionalmente a expensas de enxertos de osso autógeno. Avanços na engenharia tecidual têm levado ao desenvolvimento de várias alternativas de materiais em detrimento ao osso autógeno (GUGLIELMOTTI *et al*, 1990; NAGAO *et al*, 2002).

Para auxiliar o reparo de um novo osso vários materiais implantares são utilizados em odontologia e medicina. Os substitutos ósseos que simplesmente fornecem um arcabouço para o crescimento vascular e posterior calcificação são conhecidos como osteocondutores. Os materiais denominados osteoindutores possuem fatores de crescimento que regulam e estimulam as células indiferenciadas a se diferenciar em osteoblastos. Os morfogenes, incluindo a proteína óssea morfogenética são osteoindutores controladores de substâncias que iniciam o desenvolvimento de tecidos, órgãos e sistemas pela indução de células indiferenciadas e conversão fenotípica (ALMEIDA, 2004).

O osso autógeno é o único material de enxerto com propriedades osteogênicas, mecanismo pelo qual se processa o crescimento ósseo derivado de células viáveis transferidas dentro do enxerto. O novo osso é regenerado pelos osteoblastos e células que se originam da medula, transferidas com o enxerto e pela incorporação deste com o leito receptor (CARVALHO, LUPPINO E MENDES, 2002; TRIPPLET E SCHOW, 2003).

O material ideal para enxerto deve: promover osteogênese, possuindo ou permitindo a incorporação de fatores de crescimento responsáveis pelo mecanismo de osteoindução; permitir a angiogênese e a osteocondução, estar disponível para o tratamento proposto; ser de fácil manipulação e aplicabilidade; apresentar estrutura física capaz de manter o espaço para a formação óssea; ser reabsorvível, não gerar resposta imune e não transmitir doenças. Deve ainda permanecer no organismo o período necessário enquanto o defeito é repostado por osso neoformado (LOURENÇO, 2002; CHIN, 2004).

Apesar dos enxertos autógenos possuírem propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas, são comprometidos por desvantagens que incluem sua limitada disponibilidade, morbidade relacionada à necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para acesso ao sítio doador e sua remoção e aumento do tempo cirúrgico. A morbidade aumenta de forma diretamente proporcional a sua demanda quantitativa. Estes fatores podem restringir as indicações dos enxertos autógenos, conduzindo a necessidade de utilização de substitutos ósseos. (THRONDSOON, SEXTON E TEX, 2002; SCHILLING *et al*, 2004).

A busca por biomateriais com as características desejáveis intensificou-se nas últimas décadas disponibilizando uma ampla variedade de materiais sintéticos como a hidroxiapatita, carbonato de cálcio e fosfato tricálcico. Estes materiais aloplásticos possuem capacidade apenas de osteocondução e geralmente estão associados a enxertos autógenos ou alógenos, como osso desmineralizado e o mineralizado (MASTROGIACOMO *et al*, 2005).

Um atalho a ser traçado na regeneração do tecido ósseo, no seu estado e função originais, é o uso de arcabouços cerâmicos e vítreos que mimetizem a estrutura mineral do osso, promovam adesão e em alguns casos ativem os genes das células ósseas estimulando um novo crescimento ósseo (JONES E HENCH, 2003).

Os materiais bioativos possuem a capacidade intrínseca de ósteo estimulação podendo influenciar na adesão, proliferação e diferenciação das células com subsequente integração no tecido hospedeiro. Estudos sugerem que materiais bioativos são capazes de liberar íons que podem afetar respostas celulares (HATAR *et al*, 2005; BOSETTI E CANNAS, 2005; QU E WEI, 2006).

Com a busca de alternativas para o tratamento de defeitos ósseos, houve um grande avanço no estudo dos biomateriais e da biologia do tecido ósseo. Assim

sendo, inicialmente se faz necessário conhecimentos inerentes ao tecido ósseo e a compreensão dos eventos biológicos relacionados ao processo de reparação óssea.

## 2.1 TECIDO ÓSSEO

### 2.1.1 Generalidades, anatomia e morfologia ósseas

O osso é considerado um tecido estrutural e também metabólico. No que concerne à sua função estrutural pode-se incluir o fato do osso atuar como suporte, agindo como rígido sistema de alavanca para função muscular, além de servir como cobertura protetora para estruturas vitais. É um órgão dotado de grande capacidade adaptativa, explicando as modificações estruturais que sofre quando submetido a esforços mecânicos, apresentando diferenças proporcionais ao estresse que cada região sofre (BHASKAR, 1989).

A função metabólica primária do osso diz respeito à sua capacidade de servir como depósito e promover a reciclagem, principalmente do cálcio, necessário à condução nervosa, contração muscular, formação do coágulo e secreção celular (CASTANIA, 2002).

Do ponto vista macroscópico, a estrutura óssea e arquitetura fundamental é classificada de acordo com sua densidade como osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso, mecanicamente eficientes. A estrutura óssea macroscópica é uma continuação do tecido cortical denso para um tecido trabecular fino (FIGURA 1), não havendo diferenças histológicas no tipo de osso, apenas na quantidade relativa da substância óssea presente e na disposição geométrica nas quais as camadas são dispostas (ROBERTS E GARETTO, 2000).

Na maioria dos casos, tanto o tecido cortical como o trabecular são encontrados em qualquer osso, mas a quantidade e a distribuição de cada um são variáveis. Osso cortical é encontrado principalmente na diáfise de ossos longos (FIGURA 2) e na superfície externa dos ossos chatos. Osso trabecular ocupa

espaço substancial no tecido ósseo que constitui a cavidade medular (MARX E GARG, 2000).

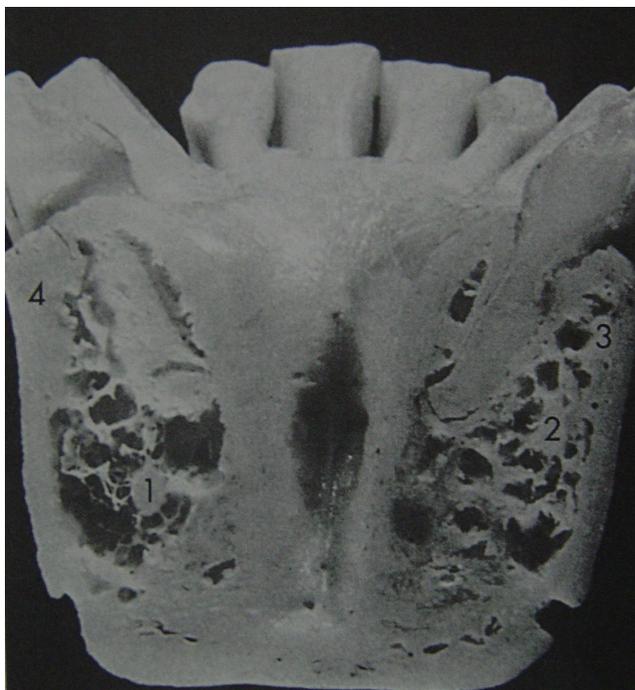


FIGURA 1 – Estrutura macroscópica do tecido ósseo. Corte transversal da mandíbula de um macaco mostrando padrões variáveis de osso trabecular e cortical: 1 e 2. trabeculado; 3. cortical porosa; 4. cortical densa. Adaptado de Roberts e Garetto, 2000.

Os ossos estão recobertos em sua superfície externa pelo perióstio (exceto nas superfícies articulares), uma capa de tecido conjuntivo especializado, dotado de potencial osteogênico. Um revestimento similar, porém mais delgado, é o endóstio presente apenas na superfície interna (FIGURA 3). Suas principais funções são: a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999; FAWCETT, 2001; PINTO, MIYAGUSKO E PEREIRA, 2003).

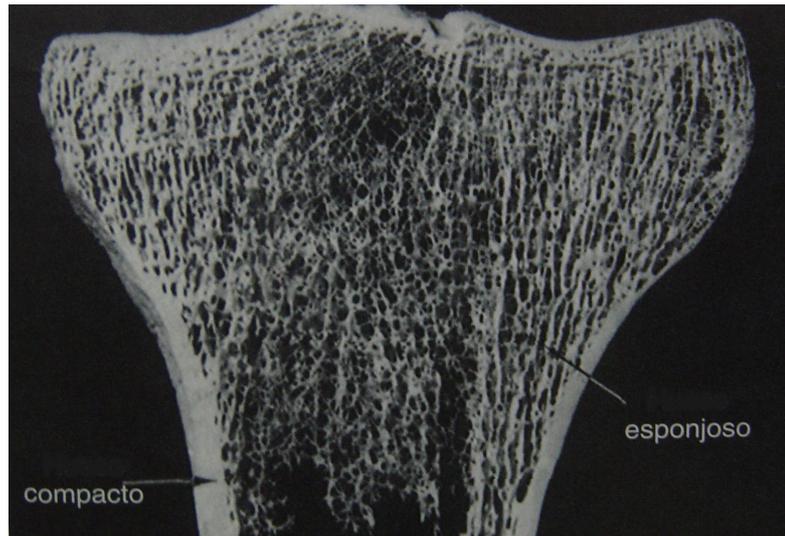


FIGURA 2 – Corte do extremo proximal da tíbia. Osso compacto cortical da diáfise e o osso esponjoso correspondente ao espaço medular. Adaptado de Fawcett, 2001.

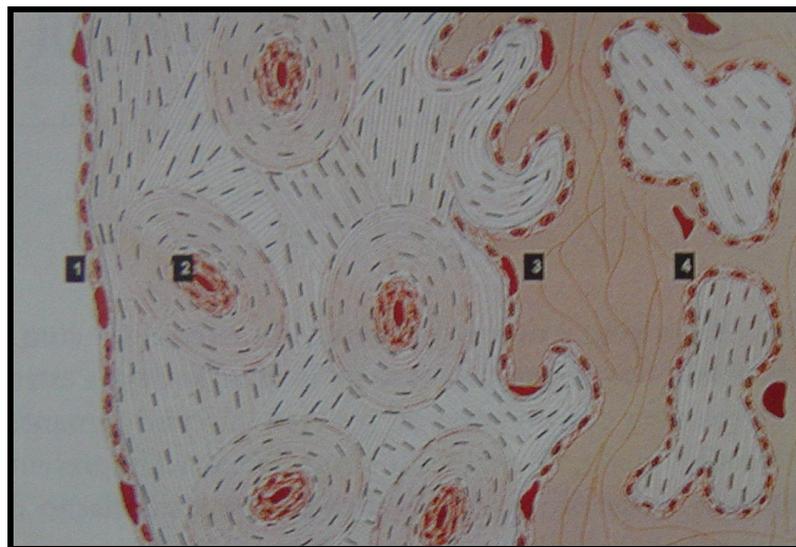


FIGURA 3 – Representação esquemática de tecido ósseo cortical esponjoso e os respectivos envoltórios esqueléticos: 1. periósteo; 2. endósteo harversiano; 3. endósteo cortical; 4. endósteo trabecular. Adaptado de Pinto, Miyagusko e Pereira, 2003.

O osso cortical apresenta abundante quantidade de matriz óssea calcificada, que é depositada em camadas denominadas lamelas, na qual fibras de colágeno estão dispostas em torno de um vaso sanguíneo central, margeando o periósteo ou o endósteo cortical. Entre as lamelas, ou mesmo dentro delas, estão distribuídas as lacunas, cavidades que abrigam os osteócitos (células ósseas). De cada lacuna

partem finas passagens tubulares que penetram na substância intersticial das lamelas, chamadas canálculos. Cada um se anastomosa entre si com outros provenientes de lamelas adjacentes, formando um sistema contínuo de cavidades ou vias essenciais para a nutrição das células ósseas. A maioria das lamelas de um osso compacto é arranjada concentricamente em torno de canais vasculares longitudinais que formam unidades cilíndricas, constituindo o sistema de Havers. Este sistema comunica-se através de um segundo grupo de vasos sanguíneos, transversais ou oblíquos, denominados canais de Volkmann, provendo nutrição; já no osso esponjoso, a matriz óssea (orientada em lamelas longitudinais) e os osteócitos estão organizados em trabéculas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999; CASTANIA, 2002).

O osso esponjoso é formado por um retículo tridimensional de espículas ósseas ramificadas ou trabéculas que delimitam um sistema labiríntico de espaços intercomunicados, ocupados por medula óssea e vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo aposto às trabéculas constitui o endóstio trabecular (FAWCETT, 2000).

### 2.1.2 Histologia Óssea

Ao nível microscópico podemos encontrar quatro tipos de ossos: primário ou imaturo, composto, lamelar ou secundário ou maduro e alveolar. O **osso primário** tem um papel principal durante a cicatrização. Sua principal propriedade é a habilidade em se formar rapidamente, porém, por este motivo, desenvolve-se de modo desorganizado sem arquitetura lamelar ou sistema haversiano, sendo assim, macio. Em cicatrização óssea, ele é referido como osso de fase I, mas por não ser resistente biomecanicamente sofre uma reabsorção obrigatória e é substituído por osso mais maduro chamado osso de fase II, ou osso lamelar. O **osso composto** descreve um estado transicional entre osso primário para osso lamelar. O **osso lamelar** (fase II) é o osso principal, maduro e de alto impacto do corpo, extremamente forte, bem organizado em sua estrutura colágena e estrutura mineralizada sendo o principal componente dos ossos cortical e trabecular maduro.

Sua formação se dá num ritmo relativamente lento. **Ossos alveolares** são o principal tipo ósseo encontrado ao redor dos ligamentos e articulações, ao longo das superfícies formadoras de osso (GARG, 1998; ROBERTS E GARETTO, 2000).

Nos ossos que crescem ativamente se distinguem quatro tipos de células: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As **células osteoprogenitoras** são encontradas em quase todas as superfícies livres dos ossos: no endóstio, capa interna do perióstio e nas trabéculas das epífises dos ossos longos em fase de crescimento; são mais ativas na fase de crescimento, mas também se reativam durante a vida adulta nas situações em que se inicia a reparação das fraturas ósseas e outras formas de lesão do osso por meio de atividades mitóticas, originando outras células ósseas. Os **osteoblastos** são as células osteoformadoras dos ossos maduros e têm como função a produção dos constituintes matriciais (todas as macromoléculas da matriz orgânica) do tecido ósseo. Os **osteócitos** são as principais células do osso completamente formado e residem em lacunas situadas no interior da substância intersticial calcificada e, para não se isolarem hermeticamente, estas células mantêm-se em contato por meio de prolongamentos celulares que se situam no interior de canaliculos, permeando a matriz e transportando nutrientes e sais minerais. Já os **osteoclastos** têm uma origem diferente: provêm de monócitos formados na medula óssea e que circula pelo sangue. São responsáveis pela remodelação e renovação óssea que ocorre no osso sobre durante toda a vida, eliminando a matriz óssea em múltiplos pontos e é substituída por osso neoformado (FAWCETT, 2000; CARVALHO, LUPPINO E MENDES, 2002).

Além de ser composto por estruturas celulares, o tecido ósseo é formado por matriz óssea, composta por matriz orgânica e matriz inorgânica. A **matriz orgânica ou osteoide** é produzida e secretada por osteoblastos, composta de 95% de colágeno (tipos I, III e V), 1% de proteoglicanas (ácido hialurônico, condroitin-sulfato, querato-sulfato) e 4% de proteínas não colágenas (proteínas ósseas morfogenéticas). A **matriz inorgânica ou fase mineral** é constituída de água, fosfato de cálcio, primariamente na forma de cristais de hidroxiapatita, citratos, carbonatos e fluoretos. A matriz óssea possibilita a precipitação dos sais minerais que conferem rigidez ao tecido ósseo. A hidroxiapatita (fosfato de cálcio diidratado) constitui 85% do total de sais da matriz (CARVALHO, LUPPINO E MENDES, 2002).

### **2.1.3 Fisiologia e mecanismos biológicos de neoformação / reparo**

O osso é considerado o maior achado na evolução dos tecidos de suporte. Além de seu excelente comportamento mecânico o osso recebe um inigualável potencial para regeneração. Os ossos passam por três alterações: o crescimento, a modelagem e a remodelagem. Sistemicamente a remodelagem óssea é ativada pelos hormônios de crescimento, da tireóide e da paratireóide, e inibida pela calcitonina e cortisona. Localmente é ativada por qualquer forma de trauma ao osso, incluindo fraturas e procedimentos cirúrgicos (SCHRÖDER E ASSEF, 1998).

Modelamento ósseo é definido como qualquer mudança na forma ou tamanho do osso, podendo ser um processo anabólico com aposição de osso sobre a superfície, ou um processo catabólico com reabsorção. É um processo único no qual a formação não tem que ser precedida pela reabsorção. A ativação das células clásticas e blásticas pode ocorrer no mesmo osso em diferentes superfícies, podendo ser controlado por fatores biomecânicos ou por fatores de crescimento tal como é o caso da cicatrização óssea por enxerto autógeno ou utilização de biomateriais (GARG, 1998).

O organismo contém células que estão programadas para converter-se em células formadoras de osso: células progenitoras ósseas ou células osteogênicas, as quais se originam a partir de células mesenquimais indiferenciadas (PEREIRA FILHO *et al*, 2004). Quando há necessidade de regeneração, as células progenitoras ósseas se diferenciam para osteoblastos que finalmente sintetizam a matriz óssea. Após a formação dos osteoblastos, há emissão dos prolongamentos citoplasmáticos que entram em contato com prolongamentos de outros osteoblastos, havendo amplos espaços entre eles denominados “espaço intercelular”. Os osteoblastos produzem e secretam compostos orgânicos para este espaço (matriz orgânica) e, posteriormente, inicia-se um processo de mineralização ou calcificação por intermédio da deposição de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita. Os osteócitos são osteoblastos que foram aprisionados na matriz mineralizada, porém nem todos os osteoblastos se convertem em osteócitos; alguns migram para a superfície do osso quando formam a matriz orgânica, sendo parte do perióstio e endóstio. Os osteoclastos, que participam do remodelamento ósseo, são originados das células

do sistema monocítico-fagocitário, que derivam dos monócitos a partir do sangue (LIMA, ELIAS E MEIRELLES, 2003).

A formação de osso novo, ou seu remodelamento, ocorre durante o desenvolvimento fetal e neonatal, onde o total da massa do tecido esquelético aumenta. Também a formação óssea durante a remodelação ocorre para continuar o crescimento, para maturação óssea ou para contrapor a reabsorção óssea necessária para a manutenção sérica dos níveis de cálcio (ALMEIDA, 2004).

Muitos tecidos suportam uma regeneração fisiológica que é a reposição contínua de células mortas ou envelhecidas. Já a regeneração reparadora ocorre quando os tecidos são fendidos devido à lesão ou doença. O osso tem um potencial único para restaurar sua estrutura original. Qualquer lesão óssea ativa a regeneração óssea local pela liberação de fatores de crescimento e indutores que estimulam a ocorrência de vários eventos em cascatas, tais como: quimiotaxia, proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras, angiogênese, diferenciação de osteoblastos, síntese de matriz extracelular e, finalmente, formação de novo tecido ósseo. Segundo LEITE (2005) a regeneração do tecido ósseo é determinada pela proliferação celular e deposição de sais de cálcio, que restabelecerão a arquitetura e funcionalidade deste tecido.

Um adequado suprimento sanguíneo, a formação e a manutenção do coágulo são fatores necessários para desencadear a cascata de eventos inflamatórios que levarão ao reparo de um defeito ósseo (LOURENÇO, 2002).

#### **2.1.4 Reparo alveolar**

Podemos considerar que reparo alveolar consiste no conjunto de reações teciduais desencadeadas no alvéolo pós exodontia, que suscitam no preenchimento da cavidade deixada pela ausência do elemento dental por tecido ósseo reparacional. As atividades desencadeadas no tecido ósseo após exodontia são caracterizadas por uma fase inflamatória, uma de regeneração e a final de

remodelagem. Cada uma dessas fases depende de fatores que influenciam a velocidade e a qualidade de cicatrização óssea, tais como: idade do indivíduo, estado de saúde geral e nutricional, irrigação, forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção (CASTRO, 2006).

A cicatrização do alvéolo dentário e do osso por segunda intenção é, em muitos aspectos, similar à cicatrização do tecido mole por segunda intenção. A seqüência inclui inflamação, epitelização, fibroplasia e remodelagem. Entretanto, a cicatrização do alvéolo apresenta características microvasculares exclusivas e um padrão seqüente de formação óssea, antes da remodelagem (MISCH, 2000).

Para BRANDÃO *et al* (2002) há quatro fases morfológicas no processo de reparo alveolar: A primeira fase refere-se à proliferação celular e invasão do coágulo por fibroblastos provenientes do ligamento periodontal. Na segunda fase os fibroblastos sintetizam uma grande quantidade de fibras e substância amorfa. Na terceira, ocorre a maturação do tecido conectivo, caracterizado pela diminuição de células inflamatórias e vasos sanguíneos e o aumento da maturação das fibras colágenas. Na quarta e última fase, é progressivo o aumento em número e espessura das fibras colágenas com aumento da proliferação fibroblástica e dos vasos sanguíneos. Nesta fase a diferenciação osteoblástica ocorre iniciando a síntese de matriz orgânica que sofre progressiva mineralização dando origem ao tecido ósseo.

A extração do elemento dentário induz a uma atrofia óssea da área por um período que varia de seis meses a dois anos. Os fenômenos que ocorrem durante a regeneração óssea pós exodontia são semelhantes em diversas espécies, apenas o tempo de iniciação da regeneração óssea é variável. Em humanos se inicia entre 7 e 10 dias após a extração; já em ratos a regeneração ocorre a partir do quinto dia (DEVLIN *et al*, 1995).

A manutenção do leito alveolar após exodontia é um problema que ainda preocupa os profissionais envolvidos com a reabilitação do sistema estomatognático. Técnicas e materiais têm sido testados nas últimas décadas com o propósito de evitar ou atrasar a reabsorção óssea resultante da extração. Outros materiais têm sido testados no sentido de promover e acelerar a neoformação óssea, sendo o caso das cerâmicas bioativas, em particular no nosso estudo, a pseudowolastonita.

## 2.2 BIOMATERIAIS

### 2.2.1 Considerações gerais

**Biomaterial** pode ser definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos (WILLIAMS, 1987).

Para que os biomateriais consigam realizar as funções para as quais foram desenvolvidos, devem apresentar duas propriedades importantes, no mínimo: biocompatibilidade e biofuncionalidade. Biocompatibilidade é a capacidade de um material de funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica sem provocar efeitos tóxicos ou injúrias, reações adversas e nem impedindo a diferenciação tecidual característica do local da implantação. Biofuncionalidade está relacionada ao conjunto de propriedades que permite ao material desempenhar uma função desejada semelhante a qual está substituindo (HENCH, 1993; BOSCHI, 1996).

É pertinente ressaltar que biocompatibilidade não é apenas a ausência de rejeição, mas envolve a interação entre o implante (biomaterial) e o tecido adjacente. Hoje é sabido não existem materiais inertes, pois ocorre sempre algum tipo de interação entre o tecido receptor e o material implantado, conhecimento este essencial no controle da resposta biológica a um biomaterial (TAGA, 1996; ROCHA, 2000).

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se na classe dos biomateriais e devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Os materiais sintéticos utilizados para estes fins podem ser os metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros (KAWACHI *et al*, 2000).

A utilização das cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dressman relatou o uso do gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ ) como possível substituto para ossos, porém apresentava baixa resistência mecânica e era completamente reabsorvido pelo organismo. Somente a partir da década de 70, com os estudos de Hench e colaboradores, iniciou-se o uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que permitiram sua classificação como biocerâmicas.

Conceitualmente as cerâmicas são materiais inorgânicos, não-metálicos e não-poliméricos, manufacturados por meio de compactação e sinterização em temperaturas elevadas (LEMONS E DIETSH-MISCH, 2000). A bioatividade das cerâmicas é resultado da sua composição, única entre os materiais de enxertos aloplásticos devido à presença da sílica como componente na sua estrutura (TEÓFILO, BRENTGANI E LAMANO-CARVALHO, 2004).

Os biomateriais inorgânicos são compostos alternativos ao uso de enxertos ósseos autógenos por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes às do tecido receptor e quando usados em defeitos ósseos constituem-se em obstáculo à invasão do tecido mole vizinho, permitindo crescimento de tecido ósseo diretamente sobre suas trabéculas porosas e acelulares (SASSIOTO *et al*, 2004).

Os materiais bioativos podem ser colonizados por células dotadas de potencial osteogênico, formadoras de novo osso provenientes da periferia. Este processo de osteocondução e osteoindução pode acelerar a cicatrização óssea (CHAN *et al*, 2002).

Acredita-se que a exigência essencial para um material artificial aderir ao tecido ósseo seja a formação de uma camada biologicamente ativa semelhante à apatita em sua superfície. Um número limitado de materiais cerâmicos chamados bioativos tais como Bioglass, hidroxiapatita sintética, A-W vidros cerâmicos e mais recentemente materiais à base de sílica como a pseudowolastonita ( $\text{psW} = \text{CaSiO}_3$ ) e diopsita ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) são geralmente conhecidos por possuir a habilidade para formar apatita semelhante a do osso em ambientes fisiológicos (DUFRANE *et al*, 2003).

Esforços têm sido feitos no intento de modificar a superfície dos biomateriais a fim de promover uma adesão celular mais efetiva, fatores atribuídos à morfologia

da superfície, microestrutura, e superfície química do material (LEE *et al* 2005; PIRHONEN *et al*, 2006; QU E WAI, 2006).

Apesar de ser uma área em franco desenvolvimento, a da bioengenharia, não se deve exigir dos biomateriais uma demanda biológica irreal como, por exemplo, a neoformação óssea em si, pois este fenômeno é um processo biológico que acontece unicamente às expensas da atividade osteoblástica. A qualidade do tecido neoformado quando da presença destes biomateriais, chamados de substitutos ósseos, não é igual para todos e depende do material, da sua origem, das condições clínicas do local receptor e do domínio das indicações e de técnica cirúrgica (CARVALHO, BASSI E PEREIRA, 2004).

Após essas considerações iniciais, saindo do abrangente universo dos biomateriais, vamos nos deter na área das cerâmicas bioativas para então complementarmos nossa revisão versando sobre nosso alvo de estudo: a cerâmica bioativa pseudowolastonita (psW).

### **2.2.2 Materiais Bioativos**

A bioengenharia do tecido ósseo está relacionada às mudanças tecnológicas na construção dos biomateriais e na obtenção do substituto ósseo ideal capaz de ser osteoindutor (moléculas sinalizadoras), osteocondutor (utilização de arcabouços) e osteogênico (células totipotentes).

No início do desenvolvimento dos biomateriais, o propósito era produzir implantes biologicamente inertes que causassem o mínimo de reposta imune no corpo. A partir da década de setenta, quase vinte anos depois, este paradigma de bioinércia mudou para materiais dotados de bioatividade cuja ação e reação seriam controladas em um meio ambiente fisiológico (SCHILING *et al*, 2004).

Os materiais tidos como bioinertes não possuem nem efeitos positivos nem negativos no crescimento ósseo, enquanto os bioativos induzem respostas de atividades biológicas específicas promovendo ativação osteoblástica e estabelecendo uma adesão nas interfaces entre os tecidos e o material implantado. A literatura é divergente quanto a esta classificação e alguns autores rejeitam a

existência materiais bioinertes uma vez que sempre há algum tipo de interação entre cada tipo de material e o ambiente fisiológico (OLIVA *et al*, 1998; ROCHA, 2000).

Vários materiais bioativos têm sido desenvolvidos, mas os comumente utilizados são as cerâmicas à base de fosfato de cálcio, vidros bioativos e cerâmicas vítreas. Esses elementos permitem a íntima formação de osso na interface do implante promovendo a adesão sem a presença de tecido fibroso (DE AZA *et al*, 1999; CHAN *et al*, 2002), através da capacidade de formar uma camada de HCA em sua superfície uma vez expostas à solução simuladora do fluido humano ou implantadas *in vivo* (HATAR *et al*, 2005).

A bioatividade de materiais foi inicialmente descrita para as chamadas biocerâmicas (hidroxiapatita, vidros bioativos, etc), sendo associada à capacidade de materiais se ligarem, ou se aderirem aos tecidos vivos, fato de suma importância para implantes introduzidos com o intuito de substituir partes do corpo que exerçam funções estruturais; é a capacidade de estimular processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos capazes de permitir a integração do biomaterial no ambiente receptor (SILVA JÚNIOR E ORÉFICE, 2001).

Os biovidros e as biocerâmicas apresentam sódio, cálcio, fosfato e sílica como principais componentes e, quando expostos aos fluidos corporais, ocorrem trocas iônicas onde ocorre formação de sílica gel e uma camada de fosfato de cálcio em sua superfície. Sucessivamente, a camada de fosfato de cálcio na superfície recristaliza em HCA. As propriedades de adesão ao osso dos biovidros e biocerâmicas baseiam-se na formação desta camada. Comparada à HA sintética, esta camada superficial é mais similar, em termos de cristalinidade, à apatita do tecido ósseo e, conseqüentemente, uma melhor adesão ao tecido ósseo é atribuída às cerâmicas e vidros que à hidroxiapatita (OLIVA *et al*, 1998).

Materiais bioativos incluindo os minerais que apresentam sílica, como a pseudowolastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) (psW), têm demonstrado a formação de uma camada semelhante à hidroxiapatita em sua superfície, tanto *in vivo* como *in vitro*. O material cerâmico aparece com potencial terapêutico em situações onde são requeridos aumento e reposição ósseos (DUFRANE *et al*, 2002).

É esperado que os materiais bioativos devam interagir com o organismo no intuito de acelerar o processo de reparo do tecido ósseo, com melhor integração do implante no meio vivo.

### 2.2.3 Biovidros e Biocerâmicas

Os vidros bioativos são uma classe de compostos que apresentam a superfície quimicamente ativa e, por esta razão, têm sido desenvolvidos para oferecerem esta habilidade a específicas aplicações. Na área da cirurgia ortopédica, por exemplo, entre os vários materiais comumente utilizados na superfície das próteses, os vidros bioativos permitem uma melhor adaptação com as cavidades ósseas, previnem a formação de tecido fibroso na interface osso-implante e favorecem uma forte adesão química entre o implante e o tecido ósseo (OLIVA *et al*, 1998).

Os vidros bioativos quando inseridos em soluções fisiológicas, seus íons expostos na superfície tendem a segregar-se formando mosaicos bioativos, e a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4$  podem explicar a boa integração entre tecidos calcificados como osso e dentina, por isso os eles têm se mostrado promissores substitutos em defeitos ósseos experimentais como ainda em situações clínicas no campo odontológico (LOSSDÖRFER *et al*, 2004).

No contexto de terapia óssea, as cerâmicas bioativas podem ser definidas como materiais que provocam respostas biológicas específicas que resultam na união com o tecido ósseo adjacente através de uma ação estimulatória do tecido ósseo.

Diversos tipos de vidros e cerâmicas bioativas têm sido utilizadas em aplicações no campo médico, ortopédico e dental. Materiais à base de sílica como a wolastonita e diopsita têm sido preparados sinteticamente para uso como cerâmicas bioativas (DE AZA *et al*, 2000).

As reações químicas que ocorrem na superfície das cerâmicas desempenham um importante papel no mecanismo de adesão. A superfície da cerâmica inicialmente reage com o fluido fisiológico circundante; por esta razão, a natureza dos sólidos formados na superfície é determinado pela química das cerâmicas e dos constituintes do fluido fisiológico (DE AZA *et al*, 1999).

DE JONG (1926) *apud* KAWASHI (2000) foi o primeiro a observar a semelhança entre a fase mineral dos ossos e da hidroxiapatita através do método de difração de raios X. A fase mineral dos ossos não possui uma composição bem

definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros. A formação de uma camada semelhante à hidroxiapatita indispensável para interação osso-biomaterial (DUFRANE *et al*, 2003).

Algumas cerâmicas como Bioglass<sup>®</sup>, hidroxiapatita sintética e cerâmicas A-W espontaneamente aderem ao tecido ósseo. Chamados materiais bioativos, são usados clinicamente como substitutos ósseos. Contudo, comparados com o osso cortical humano, apresentam menor resistência à fratura e mais elevado módulo de elasticidade. A adesão das cerâmicas bioativas e das cerâmicas vítreas ao tecido ósseo tem sido atribuída a uma série de reações que ocorrem na superfície do material quando implantado (DE AZA *et al*, 2003; KOKUBO, KIM E KAWASHITA, 2003).

Algumas cerâmicas à base de fosfato de cálcio como a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HA),  $\beta$ -tricálcio fosfato ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\beta$ -TCP) e  $\beta$ -cálcio pirofosfato ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ;  $\beta$ -CPP) e materiais à base de sílica como Bioglass<sup>®</sup> e cerâmicas A-W têm demonstrado bioatividade e estão disponíveis para uso clínico. As cerâmicas à base de cálcio fosfato apresentam alto potencial para utilização como biomateriais devido sua composição química próxima aos tecidos duros e, em meios fisiológicos, há formação de HA semelhante à do osso (“bone like” apatite) na superfície do material, fenômeno conhecido como formação biomimética da hidroxiapatita (KASUGA, 2005).

Uma importante descoberta para o desenvolvimento da medicina regenerativa é que os produtos de dissolução das cerâmicas bioativas manifestam um controle genético no ciclo celular dos osteoblastos e na rápida expressão dos genes que regulam a osteogênese e produção dos fatores de crescimento. A sílica tem sido considerada a maior colaboradora no mecanismo de ativação dos genes da mineralização óssea (JONES E HENCH, 2003).

## 2.3 PSEUDOWOLASTONITA (PSW)

### 2.3.1 Considerações Gerais

Pseudowolastonita (psW) é uma nova biocerâmica, policristalina, à base de sílica, sinterizada em laboratório, cuja principal característica diz respeito à sua bioatividade. É uma fase artificial de alta temperatura da wolastonita contendo CaO e SiO<sub>2</sub> na proporção molar de 1 para 1. Apresenta  $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub> como fórmula química e sua reação de formação pode ser assim representada:  $\text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{SiO}_2(\text{aq}) \rightleftharpoons \text{Pseudowolastonita} + 2 \text{H}^+$ . (DE AZA *et al*, 2001).

Desde a década de 90 as cerâmicas wolastonita (CaSiO<sub>3</sub>) e pseudowolastonita ( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>) vêm sendo estudadas como materiais artificiais para regeneração óssea por apresentarem boa bioatividade e biocompatibilidade, sendo consideradas cerâmicas bioativas.

Experimentos *in vitro* demonstraram que psW é um material altamente bioativo que forma uma camada de hidroxiapatita em sua superfície quando exposta a solução simuladora de fluido humano (simulated body fluids – SBF), à saliva da parótida humana e meio de cultura celular; *in vivo*, em implantes de tíbias de ratos. Este achado torna-se relevante conquanto indique que a pseudowolastonita pode ser física e quimicamente integrável na estrutura do tecido ósseo vivo, podendo assim utilizado no reparo ou reposição do osso (DE AZA *et al*, 1999; DE AZA *et al*, 2000; DE AZA *et al*, 2001; SARMENTO, 2001).

A formação da camada de apatita na interface osso-material é induzida pelo grupo funcional Si-OH. A interação entre o cálcio e a sílica liberados pela psW, pode desempenhar um importante papel no metabolismo celular (DUFRANE *et al*, 2002; KOKUBO, KIM E KAWASHITA, 2003).

A formação de apatita em sua superfície se processa de forma mais rápida que em outros biovidros e cerâmicas vítreas quando submersos em solução simuladora do fluido humano (LIU, DING E CHU, 2004).

### 2.3.2 Caracterização e síntese da psW

A pseudowolastonita é uma forma da  $\text{CaSiO}_3$  constituída à altas temperaturas, acima de  $1125\text{ }^\circ\text{C}$ . Comumente ocorre em cimentos e materiais cerâmicos. YANG E PREWITT (1999) determinaram uma estrutura cristalina sintética de alta qualidade da pseudowolastonita. Um gel de  $\text{CaSiO}_3$  foi preparado a partir de  $\text{CaCO}_3$  e tetraetil de ortosilicato. O gel seco foi cristalizado à  $1400\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 dias para garantir que nenhuma outra forma da psW fosse formada. A psW cristalina foi então fundida à  $1570\text{ }^\circ\text{C}$  e resfriado à temperatura ambiente. O  $\text{CaSiO}_3$  vítreo e homogêneo foi cristalizado à  $1440\text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 dias e rapidamente resfriado em mercúrio líquido. Ao final do processo a análise de difração de raio-X revelou a presença exclusivamente de pseudowolastonita.

Outra forma de se obter psW é através do processo de sinterização de uma mistura de carbonato de cálcio (99.5% de pureza) e areia belgíca lavada de alta pureza (99.9%) com  $\text{SiO}_2$  :  $\text{CaO}$  na proporção de 1:1 à  $1450\text{ }^\circ\text{C}$ , seguido por um lento resfriamento. A pseudowolastonita é uma forma da wolastonita sinterizada a altas temperaturas (DE AZA *et al*, 2000).

O processo de fabricação das cerâmicas está envolvido na direção da síntese química da fusão dos pós. Pós obtidos à base de  $\text{CaO-SiO}_2$  ( $\text{CaSiO}_3$ ,  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ,  $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$ ) sinalizam que, quanto mais apurado for o processo, maior o grau de pureza e homogeneidade da cerâmica (LEE, LEE E CHUN, 2005).

### 2.3.3 Comportamento da psW em soluções fisiológicas

A psW, quando submersa em soluções fisiológicas, libera íons cálcio e silicato, ambos conhecidos por influenciar o metabolismo biológico das células osteoblásticas essenciais no processo de mineralização e mecanismo de adesão ao osso (DUFRANE *et al*, 2003).

Experimentos *in vitro* comprovam que psW forma uma camada em sua superfície semelhante a HA quando exposta à solução simuladora de fluido humano com concentração iônica, pH e temperatura virtualmente idêntico ao plasma

sanguíneo humano e quando exposta a saliva humana da parótida. A concentração de sílica aumenta no SBF e na saliva em decorrência da liberação iônica da cerâmica e há precipitação de HA na superfície da psW (DE AZA *et al*, 1999; DE AZA *et al*, 2000).

A psW apresenta o potencial de adesão ao tecido ósseo, bioatividade atribuída ao evento crítico da formação de uma camada de HA em sua superfície quando exposta à saliva ou à SBF. Tão logo esta camada comece a ser formada, colágeno e outros componentes de osteóide são incorporados e a adesão ao osso ocorre quando a mineralização dessa matriz leva a um novo osso (DUCHEYNE, 1999).

A apatita formada em meios fisiológicos na superfície de psW é também chamada de apatita semelhante à do osso devido sua composição e estrutura serem mais similares à natural em detrimento à sinterizada (KOKUBO, KIM E KAWASHITA, 2003).

#### **2.3.4 Mecanismo de formação da camada de apatita na superfície da psW**

No contexto do nosso estudo se faz pertinente a compreensão do processo de formação da camada de hidroxiapatita na superfície da pseudowolastonita quando exposta às soluções fisiológicas ou mesmo à saliva humana da parótida.

Nas cerâmicas que apresentam o sistema binário  $\text{CaO-SiO}_2$ , o mecanismo de formação da apatita se processa da seguinte forma: a reação começa com a troca iônica do  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente da superfície da psW por  $2\text{H}_3\text{O}^+$  do fluido circundante, que transformam os cristais de psW em uma fase de sílica amorfa. À medida que a reação prossegue, a concentração de cálcio e o pH do fluido circundante ou da interface psW/meio aumentam, criando a condição apropriada para a dissolução parcial da sílica amorfa e subsequente precipitação da HA. Os grupos  $\text{Si-OH}$  formados induzem a nucleação da apatita acelerada pela liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O mecanismo de formação da HA na superfície da psW é semelhante tanto no SBF quanto na saliva (DE AZA *et al*, 1999; DE AZA *et al*, 2000).

O aumento do cálcio na solução simuladora de fluido humano não é o fator crítico que afeta a precipitação da apatita na superfície da psW e a apatita pode

somente se formar em uma superfície carregada negativamente com o grupo funcional da sílica ( $\text{Si-O}^-$ ). Depois de submersa em SBF, íons cálcio inicialmente trocam com  $\text{H}^+$  levando à formação de  $\text{Si-OH}$  na camada superficial e aumenta o valor do pH na interface superfície do material-meio fisiológico. Conseqüentemente, a carga da superfície torna-se negativa com o grupo funcional  $\text{Si-O}^-$ . Devido à carga negativamente formada, íons  $\text{Ca}^{2+}$  no meio fisiológico são atraídos para a interface entre a cobertura do material e a solução e, por meio disso, há um aumento da atividade iônica da apatita na interface para ocorrer então a precipitação da apatita em toda extensão da superfície do material (LIU, DING E CHU, 2004).

A formação da camada de apatita na superfície da pseudowolastonita ocorre rapidamente *in vitro*, contudo a interação inicial entre o material implantado com as células osteoblásticas adjacentes *in vivo* é mais difícil de ser avaliada (DUFRANE *et al*, 2003).

Este tipo de camada semelhante a HA não tem sido observada em materiais não bioativos, indicando o papel essencial que desempenha na formação da forte adesão química entre o osso e o material bioativo. A troca iônica ocorrida na interface implante-meio é essencial no processo de integração através do mecanismo de dissolução-precipitação-transformação.

### **2.3.5 Biocompatibilidade e propriedades de osteocondução da psW**

As cerâmicas bioativas à base de sílica amorfa são materiais biocompatíveis, bioativos e osteocondutivos. Sua habilidade de adesão ao osso tem sido atribuída à formação da camada de HA na superfície do material quando em contato com fluidos corporais. A composição e estrutura da camada de HA são similares à do osso e uma forte adesão pode ser formada (JONES E HENCH, 2003).

O fenômeno das trocas iônicas iniciadas na interface do implante com o ambiente fisiológico é essencial no processo de integração do material através do mecanismo de dissolução - precipitação - transformação. Experimentos comprovaram que esta interface desenvolve não-toxicidade biológica, atividade química e remanescente reatividade após o período de doze semanas. Este fato

caracteriza sua biocompatibilidade com também bioatividade em um longo período de implantação (DE AZA *et al*, 2003).

A partir da formação da camada de HA e subsequente colonização osteoblástica, essas células começam a sintetizar matriz óssea. Quando uma camada de proteínas é depositada na superfície de bioimplantes à base de sílica (SiO<sub>2</sub>), esta camada funcional confere reconhecimento específico molecular ou propriedades de ligação facilitando a biocompatibilidade do material com os tecidos biológicos (BHUSHAN *et al*, 2006).

DUFRANE *et al* (2003) avaliaram a citotoxicidade indireta da pseudowolastonita baseado na exposição de osteoblastos humanos a diferentes concentrações do extrato dos produtos de dissolução da cerâmica *in vitro*. Foram quantitativamente avaliadas a viabilidade celular, a integridade da membrana bem como a necrose celular. Esses autores concluíram que a pseudowolastonita não demonstrou efeitos citotóxicos, comprovando a biocompatibilidade deste material.

Quanto à possível ação osteoindutora da psW, é sabido que sua interação com células osteoblásticas *in vitro* é capaz de promover a formação de nódulos ósseos não somente em contato direto com a cerâmica como também estimular essa formação à distância (SARMENTO, 2001; SARMENTO *et al*, 2004).

### **2.3.6 Implantação da psW no osso**

A condição essencial para que o haja aderência do implante ao tecido ósseo vivo do hospedeiro é a formação de uma camada de apatita na superfície do material (HENCH, 1993).

Baseado nas propriedades osteocondutoras, DE AZA *et al* (2000) implantaram barras cilíndricas de psW sinterizada em tíbias de ratos e observaram que após três semanas uma fina camada de tecido ósseo imaturo em torno da cerâmica, diretamente em sua superfície, havia sido formada. Após seis semanas de implantação, toda a superfície do material tinha sido coberta por novo osso imaturo e altamente vascularizado; após oito semanas, o novo tecido já era rico em lacunas com osteócitos. Na décima segunda semana o osso apresentava uma estrutura lamelar madura sem evidência de células inflamatórias ou tecido conectivo fibroso.

Pode-se assim ressaltar que mecanismo de adesão do tecido ósseo ao implante ocorreu pela dissolução-transformação da psW.

Continuando os estudos de implantação de psW em tíbias de ratos, DE AZA *et al* (2001) investigaram a natureza estrutural e morfológica dos cristais de HA na superfície e na vizinhança do implante de psW através do uso do microscópio de transmissão eletrônica convencional e microscópio de transmissão eletrônica de alta resolução e identificaram osso neoformado confirmando as propriedades bioativas da cerâmica.

Cerâmicas que revelam uma camada de apatita em sua interface são capazes de mediar integração com o osso. Observações histológicas *in vivo* mostraram que a formação camada de apatita na superfície do material ocorre nos primeiros períodos da implantação, seguido pela integração da matriz óssea na apatita. Detalhada caracterização indica que esta camada de apatita consiste de nanocristais de HCA com estrutura defeituosa e baixa cristalinidade, cuja característica se assemelha à fase mineral no osso e produtos das células ósseas, ou seja, osteoblastos podem preferencialmente proliferar na apatita, e se diferenciar para formar uma matriz extracelular composta de apatita biológica e colágeno. Como resultado, o osso adjacente cresce em direto contato na camada de apatita formada na superfície da cerâmica. Quando esse processo ocorre, uma adesão química é formada entre o tecido ósseo e a superfície do material através da apatita (KOKUBO, KIM E KAWASHITA, 2003).

O processo de degradação/dissolução dos implantes de psW encoraja o crescimento do tecido ósseo nos poros do material, alterando drasticamente a macro e microestrutura dos implantes pela colonização do novo tecido ósseo (DE AZA *et al*, 2003).

Sendo assim, com o respaldo da literatura, parece ser plenamente viável o estudo da implantação da psW em alvéolos de ratos recém extraídos com o intuito de promover regeneração do tecido ósseo em cavidade bucal, nos beneficiando das propriedades de biocompatibilidade e bioatividade que o material apresenta.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento da pseudowolastonita (psW) em cavidade bucal, investigando sua capacidade de estimular regeneração óssea em alvéolos dentários de ratos *Wistar*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Modelo Experimental

O modelo experimental utilizado para investigar o potencial de regeneração/reparo ósseo da pseudowolastonita (FIGURA 4) consistiu no implante da cerâmica na forma particulada (FIGURA 5) em alvéolos de dentes recém extraídos (primeiros molares mandibulares) de ratos *Wistar*, em um desenho tipo boca dividida.



FIGURA 4 – Amostra da biocerâmica Pseudowolastonita em disco



FIGURA 5 – Pseudowolastonita na forma particulada

Foram utilizados 15 (quinze) ratos machos da raça *Rattus Norvegicus albinus*, variedade Wistar, adultos jovens, de faixa etária entre 80-140 dias, com peso corporal médio de 280g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Potiguar (UnP) após aprovação do projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UnP, protocolo n° 093/2005 (em anexo).

O rato foi escolhido como animal de experimentação por ser utilizado em muitos trabalhos apresentados na literatura que trata de biomateriais, principalmente quando o objeto de estudo é o osso, alveolar ou não (DE AZA *et al*, 2000; DE AZA *et al*, 2001; TEÓFILO, BRENTGANI, LAMANO-CARVALHO, 2004; CHIN, 2004; SASSIOTO *et al*, 2004). Apresenta facilidade na manutenção em laboratório, crescimento bastante regular e linhagem relativamente pura. Segundo SOUZA *et al* (2005), há similaridade anatômica dos tecidos periodontais em relação aos dos humanos, diferença percebida apenas no epitélio sulcular que é queratinizado, não colocando em descrédito este modelo experimental em um estudo sobre regeneração óssea alveolar.

Os quinze animais (n= trinta alvéolos) do estudo foram distribuídos de forma aleatória em três conjuntos, com cinco ratos cada, conforme período planejado para o sacrifício (7, 14 e 21 dias de pós-operatório) e obtenção das peças cirúrgicas com subsequente encaminhamento para processamento histológico e análise da cronologia do reparo/neoformação óssea (TABELA 1).

Em um estudo tipo boca dividida, cada animal configurou o grupo teste e grupo controle, uma vez que na mesma mandíbula foram utilizados os alvéolos dos primeiros molares contra-laterais (direito e esquerdo) recém extraídos. Este modelo apresenta como principal vantagem menores variações biológicas.

O grupo teste consistiu em alvéolos esquerdos preenchidos com a pseudowolastonita em sua forma particulada; o grupo controle, em alvéolos direitos sem nenhuma forma de preenchimento com biomateriais, apenas o próprio coágulo sanguíneo do animal (controle negativo).

TABELA 1 – Divisão dos animais

Grupos	Alvéolo direito: CONTROLE	Alvéolo esquerdo: TESTE	Dia do Sacrifício
G I – 5 ratos	Coágulo	psW	7 dias
G II – 5 ratos			14 dias
G III – 5 ratos			21 dias

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Manuseio dos animais

Os animais foram alocados em caixas de polipropileno com forragem de maravalha (FIGURA 6), a qual foi substituída regularmente, agrupados de cinco em cinco com espaço suficiente para movimentação e repouso, em condições controladas de iluminação (ciclos noite-dia fixos -12 horas luz/ 12 horas escuro) e temperatura ( $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Receberam água *ad libitum* e ração balanceada padrão, exceto pela suspensão do alimento sólido nas primeiras 24 horas após a extração dental e alimentação pastosa nas 48 horas subseqüentes.



FIGURA 6 - Caixa de polipropileno com forragem de maravalha

#### 4.2.2 Procedimento cirúrgico

Inicialmente os animais foram submetidos à anestesia geral através de uma injeção de cloridrato de tiletamina 125,0 mg, cloridrato de zolazepam 125,0 mg (Zoletil® 50 – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) na dosagem de 0.2 ml/100g de peso após reconstituição em 5 ml de água esterilizada aprotogênica administrado através da via intramuscular profunda. Constatada a eficácia da anestesia os animais foram posicionados em um dispositivo apropriado que permitiu a ideal acomodação para intervenção cirúrgica e conforto do animal (FIGURA 7). Foram mantidos em uma inclinação de 45° e confeccionado um tampão de gaze para a orofaringe a fim de evitar deglutição de sangue ou invasão para as vias aéreas.

Após sindesmotomia com *hollemback* número 03, os primeiros molares mandibulares, de ambos os lados, foram extraídos com o auxílio de um instrumental conhecido como Foice Morse 0-00, adaptado do arsenal de instrumentais da Periodontia, o qual melhor se adequou à anatomia das raízes.



FIGURA 7 – Acomodação do animal após anestesia

Uma vez acessado o alvéolo esquerdo, imediatamente foi introduzida a psW em sua forma particulada com o auxílio de um porta hidróxido de cálcio e condensada com um instrumento de Paiva compatível com o diâmetro da região. Para este preenchimento, não foi utilizado nenhum veículo para incorporar a cerâmica. No alvéolo do lado direito, utilizado como controle negativo, apenas a presença do coágulo sanguíneo (FIGURA 8). Ambos os lados foram suturados com fio de sutura tipo seda 4-0 (Polysuture®), onde houve coaptação das bordas da ferida.



FIGURA 8 – Região do alvéolo direito do primeiro molar mandibular pós exodontia

Durante o transcorrer das intervenções, os animais foram constantemente assistidos e monitorados.

### **4.2.3 Histórico pós-cirúrgico**

A pesquisa transcorreu sem ocorrência de infecção, morte de animais ou qualquer outro incidente no pós-cirúrgico.

A alimentação sólida foi suprimida nos três primeiros dias, sendo no primeiro, apenas líquida. Nos segundo e terceiros dias foi introduzida a ração na forma pastosa (CALIXTO, 2001). Do quarto dia em diante a ração padrão foi adotada.

Nos períodos previamente estabelecidos, os animais foram sacrificados através de inalação excessiva de clorofórmio (Vetec Química Fina Ltda.), em seguida decapitados para dissecação e separação das mandíbulas com auxílio de tesoura, pinça e lâminas de bisturi. Ao término do procedimento obtivemos mandíbulas completamente desnudas de tecidos moles, restando apenas a estrutura óssea.

As hemi-mandíbulas direita e esquerda foram separadas através de uma incisão ao nível do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermandibular.

### **4.2.4 Procedimentos de coleta e análise dos dados:**

#### **4.2.4.1 Processamento histológico**

As peças obtidas, após o sacrifício dos animais, constaram de mandíbulas dissecadas que foram fixadas em solução de formol a 10% durante 48 horas e a seguir descalcificadas por três dias, em solução de ácido nítrico à 7,5%.

Após este processo, as peças foram clivadas verticalmente e processadas manualmente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo rotativo (Jung-Reichardt 820, Alemanha)

na espessura de 5µm no sentido coronal, onde se evidenciou as regiões centrais e marginais dos alvéolos. Após realização de cortes semi-seriados foram obtidas as lâminas e coradas em hematoxilina e eosina (HE).

De cada região, foram selecionadas, para análise histomorfométrica 3 secções representativas situadas a 10 secções de distância uma da outra.

#### 4.2.4.2 Análise histomorfométrica

As imagens dos cortes histológicas obtidas foram analisadas com um aumento de 200X. A análise foi feita através de um microscópio ótico (Olympus BX50), equipado com câmera para captura de imagens (Samsung Digital Color Camera – SDC-240) e interligado a um sistema de análise de imagens computadorizado (Image-Pro Plus, versão 4.0 para Windows) para estudo da área média das estruturas histológicas da neoformação óssea.

De cada alvéolo, três secções foram escolhidas onde campos das imagens das lâminas foram submetidos à análise histomorfométrica para obtenção da área de neoformação óssea, cuja unidade medida foi em  $\mu\text{m}^2$ .

Além da histomorfometria, as lâminas foram submetidas a uma análise histológica qualitativa e descritiva.

#### 4.2.4.3 Análise estatística

Aplicou-se o *Teste t de Student pareado* para comparação das médias de formação óssea, do grupo controle e grupo teste, obtidas em cada período estudado (7, 14 e 21 dias), em nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXAMES HISTOLÓGICOS: GRUPO CONTROLE

O exame histológico dos alvéolos dos ratos controles mostrou a evolução do reparo do sétimo para o vigésimo primeiro dia pós-extração, iniciando com a formação do tecido de granulação e culminando com a formação de novo tecido ósseo no alvéolo, ainda em fase jovem, com grande proliferação de osteoblastos.

Ao final da primeira semana, a cavidade da extração encontrava-se preenchida por inflamação crônica (FIGURA 9 e 10), tecido de granulação (tecido conjuntivo jovem rico em fibroblastos e em vasos sanguíneos neoformados) entremeado por remanescentes do coágulo sanguíneo e pelo início de formação de trabéculas ósseas imaturas circundadas por osteoblastos (FIGURA 11). É patente a proliferação osteoblástica a partir da periferia do alvéolo. Nesta fase foi predominante a resposta tecidual inflamatória com discreta neoformação vascular e proliferação fibroblástica.

A partir da segunda semana, observou-se neoformação e maturação óssea progressivas, paralelamente à diminuição da densidade do infiltrado inflamatório e do volume relativo de tecido conjuntivo e de remanescente do coágulo sanguíneo (FIGURA 12). Angiogênese e proliferação fibroblástica foram observadas.

Ao término da terceira semana é possível perceber novo osso, porém ainda não completamente organizado. As trabéculas ósseas começam a ficar mais espessas, mais bem definidas e circundando espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (FIGURAS 13 e 14). A presença de vasos é mais notória para suprir a remodelação obrigatória que esse tecido ósseo sofrerá para sua inteira maturação.

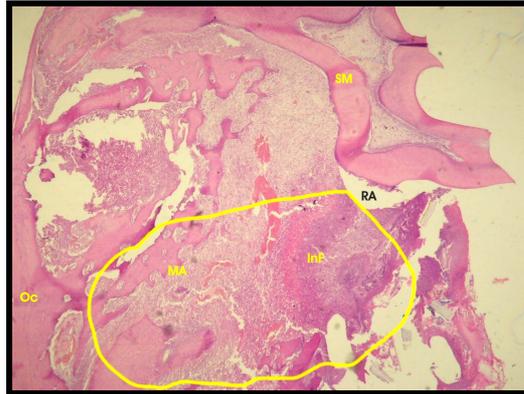


FIGURA 9 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Região alveolar circunscrita (RA) com processo inflamatório. Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. MA: margem alveolar. SM: segundo molar adjacente. HE – 40X

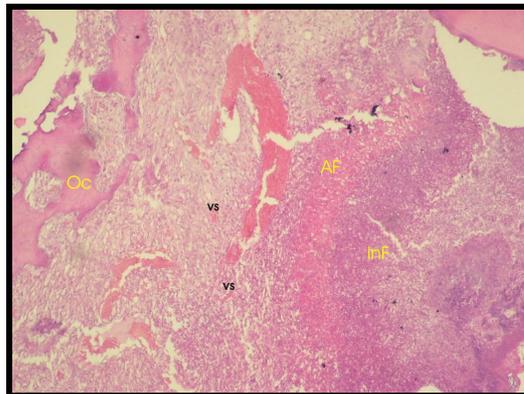


FIGURA 10 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. Vs: vasos sanguíneos. AF: atividade fibroblástica. HE – 100X

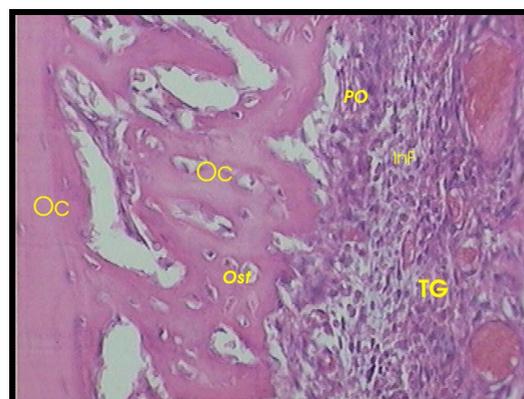


FIGURA 11 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo controle sem psW: Quantidade significativa de tecido de granulação. Inf: infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical das margens do alvéolo. PO: proliferação osteoblástica. Ost: osteócito. TG: tecido de granulação. HE – 200X

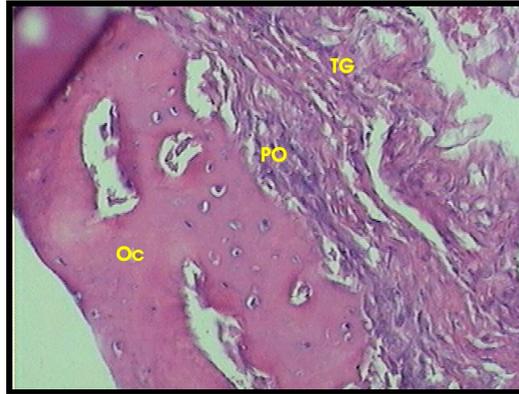


FIGURA 12 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo controle sem psW: Tecido de granulação em diminuição. Oc: Osso cortical. PO: Proliferação osteoblástica. TG: tecido de granulação. HE – 200X

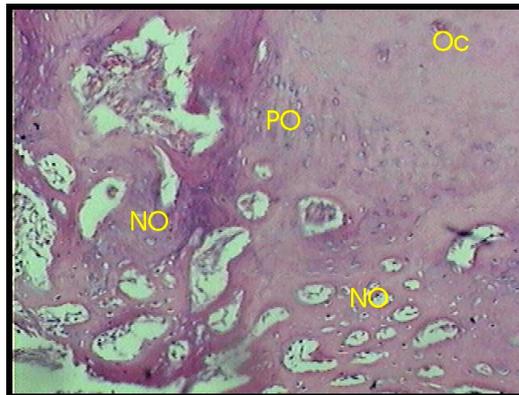


FIGURA 13 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo controle sem psW: Lamelas ósseas. NO: Osso neoformado. PO: Proliferação osteoblástica da periferia. Oc: Osso cortical. HE – 200X

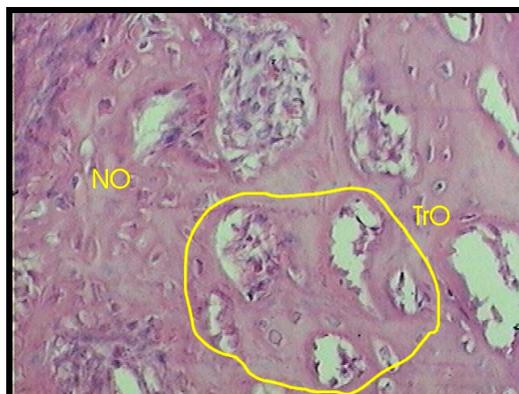


FIGURA 14 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo controle sem psW: Início da organização do tecido ósseo. TrO: trabéculas ósseas. NO: Osso neoformado. HE – 200X

Considerando o conjunto de lâminas histológicas dos alvéolos direitos referentes ao grupo controle, foi verificado o processo normal de neoformação após exodontia. Nele foi possível observar alguns eventos do reparo ósseo como a proliferação angioblástica, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos, a diferenciação de osteoblastos em osteócitos e a formação gradativa de novas lamelas ósseas.

## 5.2 EXAMES HISTOLÓGICOS: GRUPO TESTE

Os alvéolos esquerdos referentes ao grupo teste demonstraram o mesmo padrão descrito para o grupo controle, salvo as diferenças que abordaremos a seguir.

Ao sétimo dia do pós-operatório foi possível perceber a presença de infiltrado inflamatório com grande concentração de tecido conjuntivo frouxo. A proliferação de vasos foi discreta, apresentando um aumento na atividade osteoclástica. A região basal do osso alveolar apresenta-se reativa com proliferação de osteoblastos periféricos (FIGURA 15). O tecido ósseo neoformado apresenta-se ligeiramente mais abundante, com a presença de material osteóide formando em sua proximidade e à distância. (FIGURA 16 e 17).

As partículas da cerâmica, de forma irregular e variável ao final da primeira semana, encontravam-se circundadas por tecido de granulação rico em um infiltrado inflamatório (FIGURA 18).

Ao décimo quarto dia o processo inflamatório já começa a reduzir, embora se prolongue até o vigésimo primeiro dia. A presença da cerâmica prolongou e estimulou uma maior resposta inflamatória, com formação de células gigantes tipo corpo estranho (FIGURA 19). Nessa segunda etapa há uma tendência ao aumento de produção de matriz osteóide e mineralização, inclusive em contato com a cerâmica; angiogênese e proliferação fibroblástica foram observadas, assim como no controle (FIGURA 20).

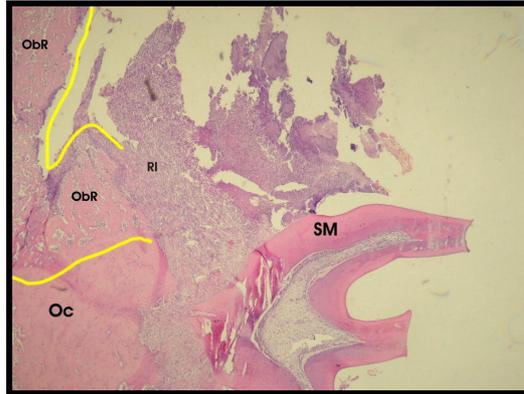


FIGURA 15 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Osso adjacente à cavidade alveolar encontra-se reativa (ObR) com proliferação de osteoblastos periféricos. RI: Reação inflamatória. Oc: Osso cortical. SM: Segundo molar HE – 40X

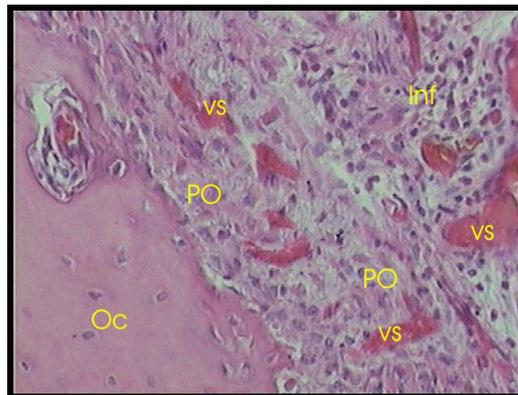


FIGURA 16 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Proliferação osteoblástica (PO) adjunta à periferia do alvéolo e estímulo na região mais central. Vs: vasos sanguíneos. Inf: Infiltrado inflamatório. Oc: Osso cortical. HE – 200X

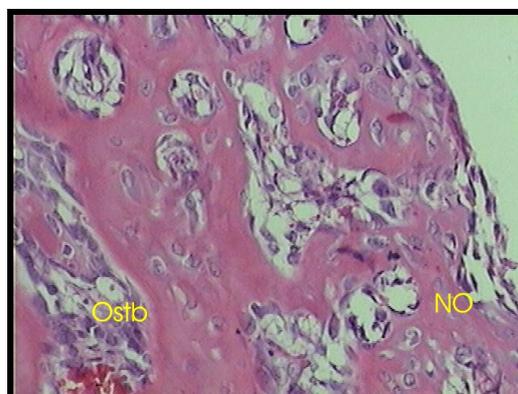


FIGURA 17 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Infiltrado inflamatório com presença significativa de osteoblastos (Ostb) . NO: Osso neoformado. HE – 200X

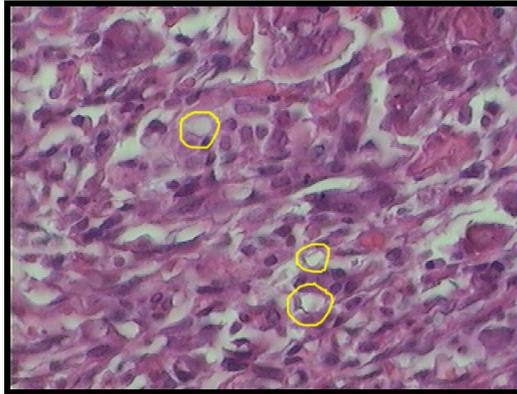


FIGURA 18 - Microfotografia do período de 7 dias. Grupo teste com psW: Infiltrado inflamatório circundando partículas da cerâmica (em evidência). HE – 400X

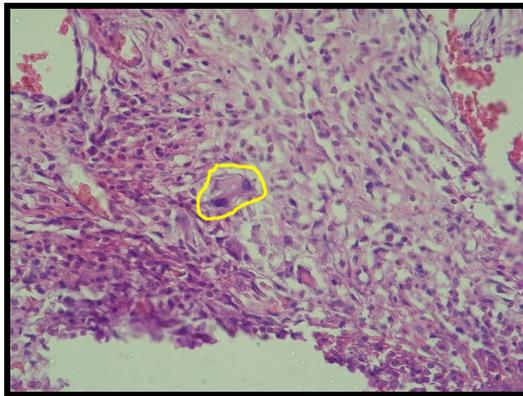


FIGURA 19 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo teste com psW: Reação inflamatória crônica. Presença de células fagocitárias. Em destaque células gigante que englobou uma partícula da cerâmica. HE – 400X

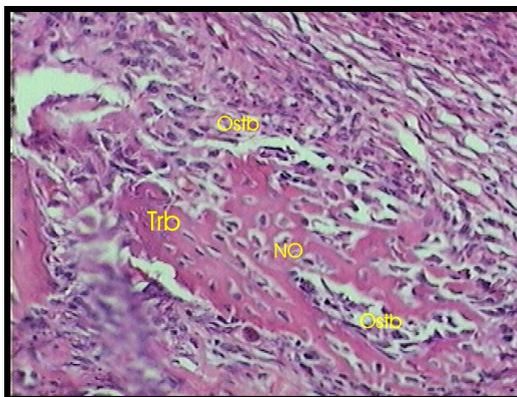


FIGURA 20 - Microfotografia do período de 14 dias. Grupo teste com psW: Formação de tecido osteóide circundado por osteoblastos (Ostb). Trb e NO: tecido osteóide neoformado. HE – 200X

No dia 21 pós-extração, ainda é possível encontrar certo grau de células inflamatórias. A neoformação óssea é mais expressiva e os osteoblastos sugerem estar em plena atividade (FIGURA 21 e 22). A angiogênese encontra-se instalada, dando suporte à produção de matriz osteóide e mineralização observadas. O tecido ósseo neoformado parece ser mais denso e em maior quantidade. A presença do implante foi observada em todos os períodos. Chama atenção a presença de indução de neoformação óssea com acentuada ativação osteoblástica.

A cerâmica psW pareceu induzir uma maior proliferação osteoblástica em todos os períodos estudados.

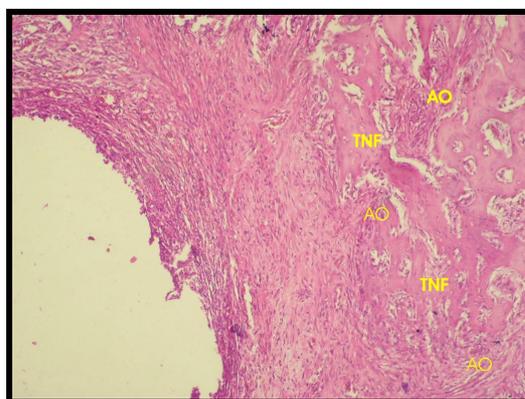


FIGURA 21 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo teste com psW: Atividade osteoblástica (AO). TNF: Trabéculas ósseas neoformadas. HE – 100X

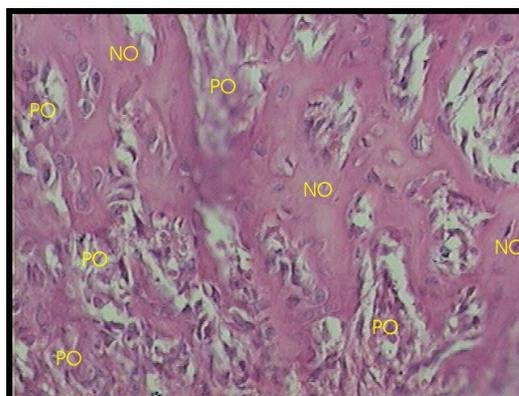


FIGURA 22 - Microfotografia do período de 21 dias. Grupo teste com psW: Persiste atividade osteoblástica. NO: Osso neoformado. PO: Proliferação osteoblástica. HE – 200X

### 5.3 EXAMES HISTOLÓGICOS: TESTE X CONTROLE

Para confrontar os resultados obtidos do grupo controle com o grupo teste utilizamos o método da análise histomorfométrica. Esta análise confirmou as observações histológicas mostrando maior atividade osteoblástica nos períodos 7 e 14 dias, havendo um aumento progressivo do volume relativo das trabéculas ósseas neoformadas.

Comparando-se a cronologia do reparo alveolar entre o grupo controle e o grupo teste, observamos um ligeiro atraso do primeiro. Essa diferença nos resultados da neoformação óssea tendeu a ser menor após duas semanas. Finalmente no terceiro período, as médias das áreas do grupo teste e controle não demonstraram diferenças significantes, ocorrendo um nivelamento nos resultados.

Os resultados das médias das áreas de neoformação óssea são evidenciados por período na tabela 2.

TABELA 2 – Médias histomorfométricas por período (área em  $\mu\text{m}^2$ )

Grupos	CONTROLE	TESTE
G I – 7 dias	78,85	110,56
G II – 14 dias	86,92	104,00
G III – 21 dias	94,06	94,23

O programa mensurou a área de neoformação óssea das lâminas, em um aumento de 200 vezes quantificando em  $\mu\text{m}^2$ .

Em todos os períodos a área de neoformação óssea foi mais evidente no grupo teste, denotando a ação da psW em promover regeneração óssea, mas que no 21<sup>o</sup> dia tendeu a um nivelamento, divergindo dos achados morfológicos.

Os resultados da histomorfometria foram comparados de forma pareada, alvéolo controle e alvéolo teste do mesmo animal, dois a dois. Foi calculada a diferença entre ambos em porcentagem, obtendo assim, a diferença da neoformação óssea em cada animal. De posse dos resultados pareados de todos os ratos, foram

obtidas as médias das porcentagens de cada grupo, por período. O gráfico abaixo representa as médias das diferenças de neoformação óssea em porcentagem nos grupos:

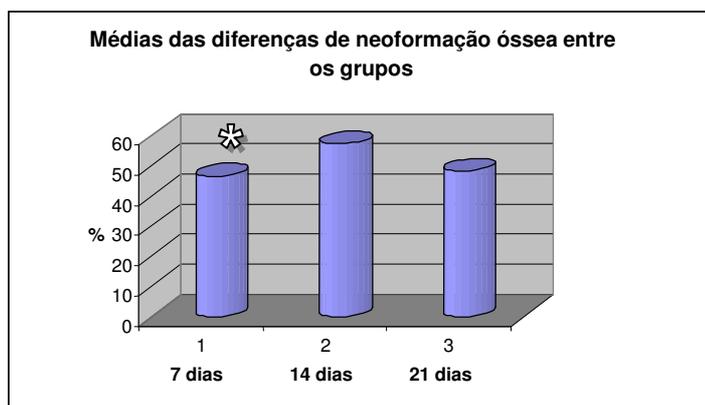


FIGURA 23 – Médias das diferenças de neoformação óssea entre grupos controle e teste por período, representado em porcentagem. \* indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

No gráfico acima, o resultado do grupo 1 referente ao período 7 dias, foi obtido através da porcentagem média de quatro animais (\*). O grupo 2 e 3, com três animais apenas, ocasionado pelo fato das lâminas desses três se apresentarem pareada duas a duas.

O teste “t” de Student pareado aplicado aos dados da histomorfometria revelou diferenças significativas na regeneração óssea somente no primeiro período de avaliação (7 dias). Os resultados dos testes estatísticos seguem em anexo.

## 6 DISCUSSÃO

Existem situações clínicas em que seus tratamentos ainda não apresentam uma resolatividade satisfatória. No campo dos biomateriais, a área dos materiais bioativos tem despertado interesse, isoladamente ou como parte integrante na terapia de regeneração óssea e de outras estratégias. A pseudowolastonita é um exemplo de um material deste tipo que apresenta o potencial de aplicações clínicas na Odontologia, em especialidades como, por exemplo, Implantodontia, Periodontia e Cirurgia bucomaxilo facial.

O presente estudo consistiu na investigação do comportamento biológico da pseudowolastonita em alvéolos dentais de ratos *Wistar*, e sua capacidade de estimular/acelerar a regeneração do tecido ósseo na referida cavidade alveolar.

Os resultados do presente estudo contribuem de forma relevante para o conhecimento do comportamento da psW na cavidade bucal, uma vez que a pseudowolastonita nunca fora antes testada em um modelo experimental neste ambiente, além da inovação quanto à sua forma de utilização: particulada. Quando anteriormente testada em tibia de ratos, a psW apresentava a forma cilíndrica.

### 6.1. OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento do trabalho foram realizados inicialmente dois procedimentos cirúrgicos pilotos, visando ajustar a metodologia, padronizar as etapas trans-operatórias, escolher qual arsenal cirúrgico ideal, bem como a forma de inserir a cerâmica. Os estudos pilotos ainda auxiliaram na forma de obtenção das lâminas (processamento e sentido do corte dos blocos), estudo histológico além de dirimir as dúvidas.

A partir dos pilotos estabelecemos os padrões seguidos durante a etapa de cirurgias e de preparo das lâminas histológicas.

Foi feita a opção de trabalhar com a psW em sua forma particulada para preenchimento do alvéolo pois, segundo CARLISLE (1993), quanto maior o contato da superfície do material com a superfície meio/células, maior é a liberação de sílica. A sílica é conhecida por promover diferenciação celular mesenquimal e formação óssea (BOSETTI E CANNAS, 2005).

Na etapa pós-operatória o cuidado na alimentação foi observado, utilizando-se uma alimentação pastosa por 48h após 12 horas de pausa alimentar, sendo justificado pela necessidade de proteger a sutura e a ferida cirúrgica alveolar do trauma ou impacto causados pela ração nos primeiros momentos e assim preservar o material aí implantado. Nos estudos pilotos, onde ainda não havia sido adotado este procedimento, observamos deiscência na sutura em todas as mucosas em torno dos alvéolos com conseqüente extravasamento da cerâmica, entrada de detritos e exacerbação do processo inflamatório.

No experimento propriamente dito, o aspecto clínico da cicatrização dos alvéolos dentais pós-exodontia foi similar em ambos os grupos não havendo exposição da ferida nem presença de contaminação, fato corroborado por SY (2002) que mostrou que problemas de cicatrização por primeira intenção são relacionados às suturas, que quando se rompem levam a perda do biomaterial e a infecção local.

A escolha do alvéolo de extração dentária como um modelo de regeneração óssea na cavidade bucal está baseado na sua ampla utilização em pesquisas para a observação de possíveis fatores que possam interferir no referido processo, acelerando-o ou retardando-o (CARVALHO E OKAMOTO, 1987; BOECK *et al*, 1999; PINTO, BRITO E OLIVEIRA, 2003; SASSIOTO *et al*, 2004).

Um problema que também merece menção ocorreu durante o processamento dos primeiros cortes histológicos das peças provenientes da etapa cirúrgica definitiva. As navalhas descartáveis do micrótomo utilizado ficaram “denteadas” fato este relacionado, provavelmente, à rigidez do material cortado (REYES, 2002). Esta rigidez seria explicada não pela falta de desmineralização do osso, mas à rigidez das partículas da pseudowolastonita presente nos alvéolos dentais. Nas peças do grupo controle não foi observada tal dificuldade, que foi prontamente contornada com a troca constante das navalhas.

## 6.2 BIOCAMPATIBILIDADE DA PSEUDOWOLASTONITA E SEU EFEITO ESTIMULADOR NO TECIDO ÓSSEO

A condição essencial para um material artificial aderir ao tecido ósseo vivo é a formação de uma camada biologicamente ativa de apatita semelhante ao osso na sua superfície quando em contato com o organismo (KOKUBO, KIM E KAWASHITA, 2003). Estudos em saliva humana de parótida (DE AZA, *et al*, 1999), meio acelular de SBF (DE AZA, *et al*, 1996) e implante de cilindros de psW em tíbia de rato (DE AZA, *et al*, 2000; DE AZA, *et al*, 2001; DE AZA, *et al*, 2003) destacaram a formação da camada de hidroxiapatita na superfície da cerâmica psW nessas ocasiões.

A fase inicial no desenvolvimento de novos materiais com o intuito de serem utilizados em ambientes biológicos é o estudo da evolução da degradação e sua citotoxicidade. Neste trabalho foi observado fagocitose da cerâmica por células inflamatórias e ausência de necrose ou lesões vasculares na região do implante da psW sugerindo que quando presente nos tecidos esta cerâmica não provoca reações de toxicidade local. Isto está em acordo com DUFRANE *et al* (2002) e DUFRANE *et al* (2003), que investigando os efeitos de substância liberadas da psW sobre osteoblastos humanos *in vitro*, demonstraram que estas não provocam lesão de membrana ou sofrimento celular. Estudando o comportamento biológico de cilindros de psW implantados na tíbia de ratos, DE AZA *et al* (2000) também demonstraram que psW é biocompatível, permitindo o crescimento de tecido ósseo na sua superfície. Esta observação ainda tem sido suportada por FERNÁNDEZ-PRADAS *et al* (2002) e SAHAI E ANSEAU (2005).

O estudo histológico dos alvéolos dos ratos controles mostrou uma evolução do reparo da ferida alveolar pós-exodontia compatível com dados da literatura (GUGLIEMOTTI *et al*, 1990; CALIXTO, 2001; TEÓFILO, BRENTGANI, LAMANO-CARVALHO, 2004), embora o completo reparo desta região progrida para além da terceira semana, tempo limite estipulado em nosso trabalho (LAMANO-CARVALHO, BRENTGANI, BOMBONATO, 1997).

Nesta pesquisa ao final da primeira semana, a cavidade da extração encontrava-se preenchida por inflamação crônica, tecido de granulação e início de formação de trabéculas ósseas imaturas. É patente a proliferação osteoblástica a partir da periferia do alvéolo e foi observada principalmente no grupo teste.

A inflamação no grupo controle em todos os períodos, apresentou-se compatível com a cronologia de reparo, onde foi visualizada apenas a do tipo crônica, uma vez que a inflamação aguda limita-se até o terceiro dia pós-cirúrgico. Com a evolução do processo cicatricial houve tendência à diminuição do processo inflamatório. Já no grupo teste a inflamação persistiu até o último período, porém de forma não exacerbada em relação ao controle.

No 14<sup>o</sup> dia, os achados histológicos dominantes foram a neoformação e maturação óssea progressivas, com diminuição do infiltrado inflamatório, que foi melhor evidenciado no grupo teste. É pertinente ressaltar um achado no resultado histológico deste grupo, neste período, que foi a visualização de imagens de células gigantes, fagocitando partículas da cerâmica. Esse fato sugere que psW possa ser, pelo menos em algum grau, reabsorvida pelo organismo, característica desejável dos biomateriais (CARVALHO, BASSI e PEREIRA, 2004).

Com 21 dias pós-extração, a neoformação óssea foi mais expressiva e os osteoblastos se mostraram em plena atividade, principalmente no grupo teste, com tecido ósseo neoformado mais denso e em maior quantidade. A presença do implante foi observada em todos os períodos.

Em relação à proliferação osteoblástica, a análise morfológica demonstrou que em todos os períodos, o grupo teste evidenciou uma atividade osteoblástica mais intensa e com formação de trabéculas ósseas mais organizadas.

Embora não se tenha quantificado de forma detalhada a proliferação óssea, foi possível perceber na análise histológica, que o crescimento ósseo evidenciado pela proliferação osteoblástica, apresentava-se mais densa e reativa tanto no alvéolo, como nas regiões adjacentes. BOSETTI E CANNAS (2005) estudando o efeito de cerâmicas bioativas na diferenciação de células da medula óssea de ratos em osteoblastos, concluíram que foram eficientes não apenas no estímulo da diferenciação como também na promoção da mineralização em nódulos ósseos. Acrescentaram que a presença de uma cerâmica bioativa alcaliniza o meio ambiente pela rápida liberação dos produtos da dissolução da sílica. O aumento do pH é conhecido com estimulador da atividade osteoblástica e da síntese do colágeno (BUSHINSKY, 1996; DUCHEYNE, 1999).

Com base nos resultados morfológicos do grupo tratado, entende-se que a presença da psW acelerou o processo de regeneração óssea, em especial no primeiro período estudado (WHEELER *et al*, 1997; SARMENTO *et al*, 2004). Isto, no

entanto, é diferente do que foi encontrado por Boeck e colaboradores (1999), quando da utilização de hidroxiapatita como material de preenchimento em alvéolos pós-extração dental, que perceberam um atraso no fechamento da ferida em todos os períodos estudados (4, 7, 15, 24 e 60 dias), atribuindo à hidroxiapatita ser um fator perturbador do processo de cicatrização e neoformação óssea.

A análise morfológica do presente trabalho revelou, aparentemente, que em todos os períodos estudados houve uma quantidade maior de neoformação óssea no grupo teste. Isto está em acordo com VALÉRIO *et al* (2004) que estudaram os efeitos dos produtos de dissolução de uma cerâmica à base de sílica em cultura de osteoblastos de ratos. O material testado que apresentava em sua composição 60% de sílica foi capaz de estimular uma proliferação osteoblástica 35% maior e produção de colágeno 25% em relação ao grupo controle. Atribuíram esse comportamento à elevação do pH e ao efeito estimulatório dos produtos de dissolução da sílica nos osteoblastos.

A análise estatística da área de neoformação óssea através de histomorfometria indicou diferenças estatisticamente significantes apenas no período de 7 dias. Isto se deve em parte ao processo natural de evolução do reparo da ferida que tende a se estabilizar para os grupos teste e controle. Quanto à discrepância para o estudo morfológico, possivelmente o teste não revelou diferenças nos períodos tardios uma vez que a quantidade das amostras submetidas ao teste pareado foram menores em relação ao grupo de 7 dias.

### 6.3 FUTUROS ESTUDOS E APLICAÇÕES CLÍNICAS

PsW, como uma cerâmica bioativa à base de sílica, é provida dos pré-requisitos necessários para ser utilizada na área de engenharia tecidual em regeneração óssea. Acredita-se que psW possa ser incorporada no rol dos biomateriais que apresentam aplicações clínicas, devido seu potencial de promover atividade osteoblástica demonstrado *in vitro* e *in vivo*.

Na odontologia diversas situações carecem de auxílio no processo de regeneração tecidual, em especial do tecido ósseo, tais como: preenchimento de alvéolos pós extração dentária com a finalidade de manutenção do rebordo alveolar,

levantamento da membrana do assoalho do seio maxilar, regeneração óssea guiada, preenchimento de defeitos ósseos, entre outros.

Contudo, é imperativo o desenvolvimento de futuros estudos para compreensão do mecanismo de atuação dos seus produtos de dissolução, em especial a sílica, ao nível celular e ultra-estrutural, além de ser estabelecido um protocolo de utilização clínica em humanos.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- A pseudowolastonita, quando inserida em alvéolos recém extraídos de ratos, mostrou-se biocompatível com o hospedeiro uma vez que não causou reação inflamatória exacerbada em relação ao grupo controle;
- A cerâmica apresentou características de material de preenchimento, já que constatamos sua presença no tecido hospedeiro;
- Apresentou boa atividade biológica mostrando-se bioativo, osteocondutivo e pareceu estimular a regeneração óssea através da ativação dos osteoblastos.

A pseudowolastonita, enquanto cerâmica dotada de bioatividade apresenta-se como possível opção para futuras pesquisas no campo odontológico, na área da regeneração óssea.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T.E. Insulina Semelhante a Fator de Crescimento na Reparação Óssea. 2004. 58f. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.

BHASKAR, S.N. Histologia e Embriologia Oral de Orban. 10. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989.

BHUSHAN, B. *et al.* Nanoscale adhesion, friction and wear studies of biomolecules on silicon based surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 39-49, feb 2006.

BOECK, E.M. *et al.* Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em ratos. **Rev Odontol UNESP**, São Paulo, v.28, n.1, p.83-96, 1999.

BOSCHI, A.O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: SEMINÁRIO REGIONAL DE BIOMATERIAIS 1, 1996, Santa Catarina. **Anais...** Santa Catarina: UDESC, 1996. p. 4-16.

BOSETTI, M.; CANNAS, M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. **Biomaterials**, v.26, i.18, p. 3873-3879, june 2005.

BRANDÃO, A.C. *et al.* Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Braz Dent J**, v. 13, n.3, 2002.

BUSHINSKY, D. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. **Am J Physiol**, v.271, p. F216-F222, 1996.

CALIXTO, R.F.E. Implante de um floculado de resina derivada do óleo da mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de reto imediatamente após a extração dental. Avaliações histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo. 2001. 72f. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CARLISLE, E. Silicon a requirement in bone formation independent of vitamin D1. **Calcif Tissue Int**, v.53, p.174-179, 1993.

CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Reparação do alvéolo dental. In: \_\_\_\_\_. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: Panamericana, 1987.

CARVALHO, P.S.P.; LUPPINO, F.; MENDES, V.C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA, F.J.; LENHARO, A. Terapia clínica avançada em implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A.P.F.; PEREIRA, L.A.V.D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News**, São Paulo, v.1, n.3, p.255-260, mai/jun. 2004.

CASTANIA, V.A. Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, em cães: Análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias. 2002. 72f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CASTRO, F.S. Avaliação da manutenção da dimensão de rebordo alveolar após enxerto aloplástico de composto ósseo de rícino pós-extração dental em rato, estudo radiográfico e histológico. 2006. 76f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

CHAN, C. *et al.* Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 31, n.1, p. 73-77, feb. 2002.

CHIN, V.K.L. Avaliação histológica da reparação óssea induzida por um osso bovino desmineralizado, em defeitos bicorticais na mandíbula de ratos, com ou sem membranas de colágeno cálcicas. 2004. 68f. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia da USP, São Paulo.

DE AZA, P.N. *et al.* Morphological studies of pseudowollastonite for biomedical application. **Journal of Microscopy**, v. 182, p. 24-31. 1996.

\_\_\_\_\_. Bioactivity of pseudowollastonite in human saliva. **Journal of Dentistry**, v. 27, i. 2, p. 107-113, feb. 1999.

\_\_\_\_\_. Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. **Journal of Microscopy**, v. 197, p. 60-67, jan. 2000.

DE AZA, P.N. *et al.* Transmission electron microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite. **Journal of Microscopy**, v. 201, p. 33-43, jan, 2001.

\_\_\_\_\_. Mechanism of bone-like formation on a bioactive implant in vivo. **Biomaterials**, v.24, i. 8, p. 1437-1445, april 2003.

DEVLIN, H. *et al.* Localization of pro-collagen type II m RNA and collagen type II in the healing tooth socket of the rat. **Archives of Oral Biology**, v.40, n.3, p.181-185, mar, 1995.

DUCHEYNE, P. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v.20, p. 2287-2303, 1999.

DUFRANE, D. *et al.* In vitro degradation of pseudowollastonite and in vitro cytotoxicity evaluation. **European Cells and Materials**, v. 3, suppl. 1, p.18-19, 2002.

\_\_\_\_\_. Indirect cytotoxicity evaluation of pseudowollastonite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, p. 33-38, 2003.

FAWCETT, D.W. Tratado de Histología. 12. ed. Madri: McGrall-Hill Interamericana, 2000.

FAWCETT, D.W.; JENSH, R.P. Compendio de Histología. Madri: McGrall-Hill Interamericana, 2001.

FERNÁNDEZ-PRADAS, J.M. *et al.* Pulsed laser deposition of pseudowollastonite coatings. **Biomaterials**, v.23, i. 9, p. 2057-2061, may 2002.

GARG, A. Estrutura Óssea, Metabolismo e Fisiologia: Seu Impacto em Implantologia. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 69-80, Jul/Set, 1998.

GARG, A.; VALCANAIA, T. Elevação do assoalho do seio maxilar através de enxerto, para colocação de implantes dentais: anatomia, fisiologia e procedimentos. **BCI**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 53-64, jan./mar, 1999.

GUGLIELMOTTI, M.B. *et al.* Increased osteogenesis in alveolar wound healing elicited by desmineralized bone powder. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 5, p. 487-490, 1990.

HATAR, S. *et al.* Potencial of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. **Biomaterials**, v. 26, i. 8, p. 839-848, mar 2005.

HENCH, L.L. Characterization of Bioceramics. In: HENCH, L.L., WILSON, J. An Introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific, 1993.

JONES, J.R; HENCH, L.L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, i. 4-5, p. 301-307, Aug/Oct 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 9. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KASUGA, T. Bioactive calcium pyrophosphate glasses e glass ceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 1, i. 1, p. 55-64, Jan. 2005.

KAWACHI, E.Y. *et al.* Biocerâmicas: tendencias e perspectivas de uma área. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522. 2000.

KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, p. 2161-2175, jan. 2003.

KUABARA, *et al.* Reconstrução da maxila atrófica para posterior reabilitação com implantes osseointegrados: relato de caso clínico. **Rev Bras Implantodont Prótese Implant**, Curitiba, v. 9, n. 36, p. 296-301, out./dez. 2002.

LAMANO CARVALHO, T.L.; BRENTAGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz Dent J**, v. 8, n.1, p. 9-12, 1997.

LEE, S.J; LEE, C.H.; CHUN, S.Y. Organic-inorganic solution technique for fabrication of porous CaO-SiO<sub>2</sub> based powders. **Key Engineering Materials**, V. 287, p. 117-122, 2005.

LEE, J.H. *et al.* Biomechanical and histomorphometric study on the bone-screw interface of bioactive ceramic-coated titanium screws. **Biomaterials**, v. 26, i. 16, p. 3249-3257, jun 2005.

LEITE, V.L. Estudo comparativo do efeito do ultra-som de 1 MHz com frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato. 2005. 75f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

LEMONS, J.E.; DIETSH-MISCH, F. Biomateriais Utilizados em Implantes Dentários. In: MISCH, C.E. Implantes Dentários Contemporâneos. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2000. Cap. 20, p. 271-302.

LEONEL, E.C.F. *et al.* Ação de diversos materiais de preenchimento durante a neoformação óssea. **RBO**, v. 60, n. 3, p. 154-156. 2003.

LIMA, J.H.C.; ELIAS, C.N.; MEIRELLES, L.A. A osseointegração em diferentes tipos de superfícies dos implantes osseointegráveis. In: CARDOSO, R.J.A.; MACHADO, M.E. Odontologia, conhecimento e arte: dentística, prótese, ATM, implantodontia, cirurgia, odontogeriatria. V.3. São Paulo: Artes Médicas, 2003. Cap. 16, p. 353-365.

LIU, X.; DING, C.; CHU, P.K. Mechanism of apatite formation on coatings in simulated body fluids. **Biomaterials**, v. 25, i. 10, p. 1755-1761, may 2004.

LOSSDÖRFER, S. *et al.* Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. **Biomaterials**, v. 25, i. 13, p. 2547-2555, june 2004.

LOURENÇO, E.J.V. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's): Análise em defeitos na calvária e em redor de implantes de titânio em coelhos. 2002. 191f. Tese (doutorado). Faculdade de odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

MARX, R.E.; GARG, A. K. A estrutura óssea, o metabolismo, e a fisiologia: seu impacto na implantodontia dentária. **Implant Dent.** n. 5, p. 15-25, 2000.

MASTROGIACOMO, M. *et al.* Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. **Orthod Craniofacial Res**, v. 8, p. 277-284, 2005.

MISCH, C.E. Aumento do osso para a inserção do implante: soluções para o enxerto ósseo. In: MISCH, C.E. Implantes Dentários Contemporâneos. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2000. Cap. 29, p. 451-467.

NAGAO, H. *et al.* Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 1, p. 66-72, feb. 2002.

OLIVA, A. *et al.* Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. **Biomaterials**, v. 19, p. 1019-1025, 1998.

PINTO, A.V.S.; MIYAGUSKO, J.M.; PEREIRA, L.A.V. Aumento ósseo com enxerto autógeno – áreas doadoras intrabucais. In: CARDOSO, R.J.A.; MACHADO, M.E. Odontologia, conhecimento e arte: dentística, prótese, ATM, implantodontia, cirurgia, odontogeriatría. V.3. São Paulo: Artes Médicas, 2003. Cap. 14, p. 297-334.

PINTO, L.P.; BRITO, J.H.M.; OLIVEIRA, M.G. de. Avaliação histológica do processo de reparo ósseo na presença da proteína morfogenética óssea (Gen-Pro®) associada com uma membrana biológica (Gen-Derm®). **Rev Bras Implantodont Prótese Implant**, Curitiba, v. 10, n. 37, p. 25-32, jan./mar. 2003.

PIRHONEN, E. *et al.* Mechanical properties of bioactive glass 9-93 fibres. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 103-107, feb. 2006.

PEREIRA FILHO, V.A. *et al.* Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma Rico em Plaquetas e fatores de crescimento – das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2004. Cap. 2, p. 47-67.

QU, H; WEI, M. The effect of the fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 113-119, feb. 2006.

REYES, L.C.V. Aplicação de um vidro bioativo em tíbias de coelhos. 2002. 76f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ROBERTS, W.E.; GARETTO, L.P. Fisiologia e Metabolismo ósseos. In: MISCH, C.E. Implantes Dentários Contemporâneos. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 2000. Cap.17, p. 225-237.

ROCHA, L.B. Estudo de biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico para reparo de defeitos ósseos. 2000. 48f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SAHAI, N.; ANSEAU, M. Cyclic silicate active site and stereochemical match for apatite nucleation on pseudowollastonite bioceramic–bone interfaces. **Biomaterials**, v. 26, i.19, p. 5763-5770, oct 2005.

SARMENTO, C.F.M. Studies of the Expansion of Osteoblast Precursor Cells in Culture and their Interactions with a Novel Bioactive Ceramic, Pseudowollastonite. 2001. 220p. Tese (Doutorado). Universidade de Londres.

SARMENTO, C. *et al.* In vitro behavior of osteoblastic cells cultured in the presence of pseudowollastonite ceramic. **J Biomed Mater Res A**, v.69, n.2, p.351-358, may 2004.

SASSIOTO, M.C.P. *et al.* Estudo do reparo ósseo com matriz bovina desvitalizada e calcitonina em ratos. **Acta Cir Bras** [serial online] v. 19 n. 5 São Paulo, set./out. 2004. Disponível em URL: < <http://www.scielo.br/acb> > Acesso em: 15 out 2005.

SCHILLING, A.F. *et al.* Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. **Biomaterials**, v. 24, p. 3963-3972, 2004.

SCHRÖDER, J.C.; ASSEF, A.L.V. Utilização de dispositivo de retenção para coleta de osso autógeno em cirurgia para colocação de implantes. **BCI**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 57-66, jul./set. 1998.

SILVA JÚNIOR, P.E.; ORÉFICE, R.L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo me matriz de Poli (Metacrilato de Metila). **Polímeros**, São Carlos, v. 11, n. 3, jul/set, 2001.

SOUZA, D.M. *et al.* Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. **Cienc Odontol Bras**, v. 8, n. 4, p. 77-84, out./dez. 2005.

SY, I.P. Alveolar ridge preservation using a bioactive glass particulate graft in extraction site defects. **General Dentistry**, v. 68, p.66-68, 2002.

TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica Médico – Odontológica. **Rev Bras Cirur Implantod**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 59-69, jul./ago. 1996.

TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Archives of Oral Biolog**, v. 49, i. 9, p. 755-762, sept. 2004.

TIEDEMAN, J.J.; GARVIN, K.L.; KILE, R. The role of composite, demineralized bone marrow in the treatment of osseous defects. **Orthopedics**, v. 18, p. 1153-1158, 1995.

THRONDSO, R.; SEXTON, S.; TEX, G. Grafting mandibular third molar extraction sites: A comparison of bioactive glass to a nongrafting site. **Oral and Maxillofacial Surger**, v. 94, n. 4, p. 413-419, oct. 2002.

TRIPLETT, R.G.; SCHOW, S.R. Regeneração óssea com osso coletado da região mandibular anterior. In: NEVINS, M.; MELLONIG, J.T. Implantoterapia: abordagens clínicas e evidência de sucesso. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 2003.

VALERIO, P. *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v. 25, i.15, p. 2941-2948, jul. 2004.

WHEELER, D.L. *et al.* Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. **J Biomed Mater Res A**, v.35, n.2, p.249-254, may 1997.

WILLIAMS, D.F. Definitions in Biomaterials, New York, Elsevier, 1987. Apud: MARCANTÔNIO JÚNIOR, E; MARCANTÔNIO, R.A.C.; CIRELLI, J.A. Regeneração óssea vertical e horizontal. In: TUNES, U.R. Atualização em Periodontia e Implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

YANG, H; PREWITT, C.T. On the crystal structure of pseudowollastonite (CaSiO<sub>3</sub>). **American Mineralogist**, v. 84, p. 929-932, 1999.



ANEXOS

## CARTA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA

Natal, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /2005.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da UnP

Prezados Senhores:

Vimos, por meio desta, apresentar para apreciação o Projeto de Pesquisa: **Os Efeitos de Pseudowolastonita Sobre Regeneração Óssea em um Modelo Experimental na Cavidade Bucal**. Este estudo será realizado na Universidade Potiguar, com o conhecimento do Diretor do Curso e do Professor responsável pelo biotério, além de contar, com a participação dos alunos: Dewren Patrício Cavalcanti (Mestranda) e Andreza Karinny Andrade Rocha (Graduanda).

Declaramos, que conhecemos as normas vigentes sobre experimentação animal e comprometemo-nos a utilizar os materiais e dados coletados, exclusivamente, para os fins previstos no protocolo.

Atenciosamente.

---

Coordenador da Pesquisa

---

Diretor do Curso de Odontologia

## CARTA DE SOLICITAÇÃO

Natal, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2005.

Ao Responsável pelo do Biotério

Prof. (a) \_\_\_\_\_

Vimos através desta, solicitar a V. Sa. autorização para o acesso ao Biotério para experimentação e coleta de dados para a pesquisa: **Os Efeitos de Pseudowolastonita Sobre Regeneração Óssea em um Modelo Experimental na Cavidade Bucal.**

Para efeito desta experimentação, informamos que todos os procedimentos a serem realizados na pesquisa, como anestesia, cuidados pré, trans e pós-operatórios e sacrifício, respeitarão as normas de biossegurança e o bem estar do animal.

Atenciosamente,

---

Coordenador da Pesquisa

## AUTORIZAÇÃO PARA USO DO BIOTÉRIO

Conforme solicitação, autorizo o acesso ao Biotério, assim como a execução dos procedimentos previstos para realização da pesquisa intitulada **Os Efeitos de Pseudowolastonita Sobre Regeneração Óssea em um Modelo Experimental na Cavidade Bucal**, coordenada pelo professor Carlos Frederico de Moraes Sarmiento, bem como das alunas: Dewren Patrício Cavalcanti (Mestranda) e Andreza Karinny Andrade Rocha (Graduanda), sob sua orientação.

---

Profa Sandra Amaral de Araújo  
Coordenadora do Biotério

Natal, \_\_\_\_/\_\_\_\_/2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)