

UNIVERSIDADE POSITIVO
MESTRADO PROFISSIONAL EM
ODONTOLOGIA CLÍNICA

ANÁLISE E UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAL
CONFECCIONADO A PARTIR DAS CONCHAS DE
CRASSOSTREA GIGAS EM DEFEITO
PERIODONTAL EM RATOS

ULYSSES DE ALMEIDA

CURITIBA
2010

UNIVERSIDADE POSITIVO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA CLÍNICA

ANÁLISE E UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAL
CONFECCIONADO A PARTIR DAS CONCHAS DE
***CRASSOSTREA GIGAS* EM DEFEITO**
PERIODONTAL EM RATOS

ULYSSES DE ALMEIDA

Dissertação apresentada à Universidade Positivo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, pelo programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. João César Zielak
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Castiglia Gonzaga

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Aduino de Almeida Júnior, e minha mãe, Solange Laganaro de Almeida, por todo o apoio em minha vida.

Ao meu avô e padrinho, João Laganaro (*in memoriam*), por ter me inspirado em ser uma pessoa trabalhadora.

E também ao meu orientador, João César Zielak, pela amizade, e pela motivação de sempre buscar novas alternativas para o bem da ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Allan Fernando Giovanini, pela assistência histológica e todo o conhecimento passado desde os tempos da graduação.

À professora Dra. Carla Castiglia Gonzaga, por ter co-orientado este trabalho e por ter sempre me motivado a nunca desistir.

Ao professor Dr. Celso Yamashita, pela amizade e por seus ensinamentos milenares.

À professora Maria Fernanda Torres, pela amizade e apoio. À equipe do biotério da Universidade Positivo: Wanderlei, Sirlei, Jéssica.

À professora Dra. Maria da Graça Kfourì Lopes, por sua simpatia e por todo o apoio nos momentos em que mais precisei.

EPIGRAFE

“Encontre um emprego que você ama
e você nunca mais irá trabalhar em sua
vida.”

(Confúcio)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visualização do defeito cirúrgico.	15
Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura das partículas do biomaterial teste em diferentes aumentos.	17
Figura 3 - Fotomicrografias da região central do defeito de amostra do grupo controle de 1 semana.	20
Figura 4 - Fotomicrografia do defeito de amostra do grupo controle de 3 semanas.	21
Figura 5 - Fotomicrografia do defeito de amostra do grupo controle de 6 semanas.	22
Figura 6 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 6 semanas.	22
Figura 7 - Fotomicrografia da região periférica ao reparo ósseo central, amostra do grupo controle de 6 semanas.	23
Figura 8 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 6 semanas.	23
Figura 9 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas.	24
Figura 10 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas.	25
Figura 11 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas.	25
Figura 12 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana.	26
Figura 13 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana.	27
Figura 14 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana.	27
Figura 15 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas.	28
Figura 16 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas.	29

Figura 17 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas.	29
Figura 18 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas.	30
Figura 19 Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas.	31
Figura 20 Fotomicrografia da região central do fechamento do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas.	31
Figura 21 Fotomicrografias da região central do defeito de amostra do grupo experimental de 6 semanas.	32
Figura 22 Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas.	33
Figura 23 Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas.	33
Figura 24 Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas.	34
Figura 25 Fotomicrografia da região central do fechamento do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas.	34

Almeida U. Análise e utilização de biomaterial confeccionado a partir das conchas de *Crassostrea gigas* em defeito Periodontal em ratos [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2010.

RESUMO

As conchas de ostras podem se apresentar como fonte promissora na confecção de biomaterial para enxertia óssea, uma vez que apresentam na sua constituição principal o cálcio. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um biomaterial para enxerto ósseo a partir da concha da *Crassostrea gigas*, e avaliar a resposta tecidual em defeitos periodontais de ratos. Análise das partículas em MEV revelou tamanhos variados e superfície microporosa. A análise das partículas por EDXRF demonstrou uma constituição básica de CaO. Dois grupos de vinte ratos (WISTAR) foram submetidos a confecção de defeito periodontal, preenchidos com coágulo sanguíneo ou com biomaterial teste. Os tempos de monitoramento foram de 1, 3, 6 e 8 semanas. A análise histológica revelou que na presença do biomaterial teste houve um processo inflamatório granulomatoso crônico, que promoveu inicialmente o aparecimento de um tecido osteóide mais fibroso, o qual resultou em reparo ósseo em camadas finas. Pode-se observar um aspecto fibroplásico no ligamento periodontal que, em estágio mais avançado, transformou-se em anquilose. Pode-se concluir que a aplicação do biomaterial em defeito periodontal parece não ser favorável. No entanto, a observação da formação da linha cimentante ao redor de partículas do biomaterial teste, demonstra um potencial para sua aplicação no enxerto ósseo sem o envolvimento do ligamento periodontal, como é o caso de regiões com indicação para implantes

Palavras-chaves: *Crassostrea gigas*; Defeito periodontal; Substituto ósseo.

Imeida U. Histological analysis of *Crassostrea gigas* shell based biomaterial applied to periodontal defects in rats [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2010.

ABSTRACT

Oyster shells may be presented as a potential source for the elaboration of a bone graft biomaterial, once they are mainly constituted by calcium. The aim of this study was to develop a bone grafting biomaterial based on *Crassostrea gigas* shell to evaluate the tissue response in periodontal defects in rats. SEM analysis of the particles showed a variety of sizes and microporous surface. EDXRF analysis demonstrated calcium oxide as the main component. Two groups of 20 WISTAR rats were submitted to surgical procedures in order to create defects filled with blood clot or test biomaterial. Monitoring periods were 1, 3, 6 and 8 weeks. Histological analysis revealed that in the presence of the tested biomaterial developed a chronic granulomatous process, which promoted initially the appearing of a fibrous osteoid tissue, resulting in thin layered bone repair. It was observed a fibroplastic aspect of the periodontal ligament, which in an advanced stage became ankylosis. The application of the biomaterial in periodontal defects appears to be unfavorable. However the observation of a cement line around the particles demonstrates its potential use as a biomaterial in areas away from periodontal ligament, as it is in regions where implants are to be inserted.

Key words: *Crassostrea gigas*; Periodontal defect; Bone substitute

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Enxertos ósseos	5
2.2 Biomateriais	7
2.2.1 <i>Autógenos</i>	7
2.2.2 <i>Alógenos</i>	7
2.2.3 <i>Aloplásticos</i>	8
2.2.4 <i>Xenógenos</i>	9
2.2.4.1 <i>Crassostrea gigas</i>	11
3. PROPOSIÇÃO	12
4. MATERIAL E METÓDOS	13
4.1 Confeção do biomaterial	13
4.2 Análise química inicial do biomaterial por meio de espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF)	13
4.3 Análise das partículas do biomaterial por MEV	14
4.4 Aplicação cirúrgica do biomaterial	14
4.5 Procedimentos histológicos	15
5. RESULTADOS	17
5.1 Análise por MEV do biomaterial teste	17
5.2 Análise por EDXRF do biomaterial teste	18
5.3 Observações clínicas	19
5.4 Análise histológica	19
5.4.1 <i>Grupo controle de 1 semana</i>	19
5.4.2 <i>Grupo controle de 3 semanas</i>	21
5.4.3 <i>Grupo controle de 6 semanas</i>	21
5.4.4 <i>Grupo controle de 8 semanas</i>	24
5.4.5 <i>Grupo experimental de 1 semana</i>	26
5.4.6 <i>Grupo experimental de 3 semanas</i>	28

<i>5.4.7 Grupo experimental de 6 semanas</i>	30
<i>5.4.8 Grupo experimental de 8 semanas</i>	32
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento histofisiológico do osso e a intenção de reproduzir tal tecido é de fundamental importância nas especialidades de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial, Periodontia, Estomatologia e Implantodontia.

A Implantodontia é revolucionada a partir de 1960, quando Branemark *et al.* (1977) demonstraram que o titânio seria o melhor material para ser utilizado nos implantes. Inicialmente, foi elaborado um protocolo cirúrgico para a reabilitação das arcadas dentárias inferiores. Em decorrência deste protocolo, outras técnicas foram surgindo, e hoje em dia cada dente pode ser reabilitado individualmente, desde que haja um remanescente ósseo satisfatório.

Já em 1981, Adell *et al.* publicam um estudo relatando o acompanhamento de implantes osseointegráveis durante um período de 15 anos. Os resultados deste estudo foram surpreendentes apontando uma taxa de sucesso de 81% em próteses implanto-suportadas na maxila, e de 91% em próteses na mandíbula. Os resultados deste estudo provocam grande impacto na implantodontia da época.

Assim, o perfil do tratamento com implantes modifica os diversos quadros de edentulismo, que passa a ser tratado mais eficientemente. Segundo Ferri *et al.* (2008), existe um aumento na resolução das complicações referentes ao tratamento com implantes, principalmente devido à ampliação das indicações, da qualificação dos profissionais, das biotecnologias envolvidas e das diversidades dos tratamentos.

As próteses fixas implanto-suportadas têm evoluído muito nas últimas décadas, viabilizando a proposição de que cada raiz pode ser substituída por um implante, favorecendo uma higienização mais eficaz pelo paciente (Misch *et al.*, 2008).

No entanto, devido à perda precoce de dentes e ao processo fisiológico de reabsorção óssea, além da pneumatização dos seios maxilares, muitos pacientes necessitam de uma reconstrução óssea prévia à cirurgia de instalação dos implantes osseointegráveis. A perda óssea é um problema para a função mastigatória e gera um grande impacto social, especialmente em pessoas com mais idade (Turkyilmaz *et al.*, 2008).

A reposição do osso é geralmente realizada com o uso de osso autógeno, que é considerado o material mais eficiente para tal procedimento (Shegarfi e Reikeras, 2009). Geralmente o osso autógeno é coletado da crista ilíaca, mas também podem ser retirados de outras regiões do corpo, como a costela, a calvária, a tibia e a mandíbula. No entanto, devido à existência de riscos associados à técnica, como o aumento da morbidade pós-operatória, a chance de infecção, entre outros, busca-se substitutos que resultem em tecido semelhante ao osso da região deficiente.

O osso alógeno (proveniente de outro indivíduo de mesma espécie) e o aloplástico (biomaterial sintético) são comumente utilizados para repor o osso perdido principalmente em regiões de enxerto consideradas favoráveis, como por exemplo, o seio maxilar (Kaufman, 2003). O seio maxilar, bem como um alvéolo após uma extração dentária, é considerado uma cavidade favorável, sendo composto por cinco paredes, o que favorece a estabilidade inicial de qualquer enxerto.

Outra opção existente para a reposição do osso é com o uso de biomateriais aloplásticos, que são confeccionados sinteticamente. Entre os aloplásticos pode-se citar: o biovidro (Suominen e Kinnunen, 1996), o sulfato de cálcio (Kelly *et al.*, 2001) e as cerâmicas de enxerto ósseo, a hidroxiapatita e o tricálcio fosfato (Bucholz, 2002).

Dentre as vantagens que justificam o uso dos biomateriais aloplásticos estão: a origem da matéria-prima, sem necessidade do gerenciamento de criadouros para a produção, a possibilidade de uma melhor padronização das propriedades a partir do controle da composição (tamanhos de partículas), e a viabilidade na comercialização e aplicação clínica (Hayashi, 2006).

Por outro lado, biomateriais xenógenos (origem de outro indivíduo e de espécie diferente) podem apresentar outros benefícios, como é o caso da estrutura e composição semelhantes às do osso humano (osso bovino), bem como a utilização de bens renováveis pela própria natureza, ou que já fazem parte da vida do ser humano moderno (fins alimentícios), ou seja, estão incorporados à sociedade e podem inclusive representar o uso racional de substrato sustentável. Alguns pesquisadores avaliaram materiais alternativos para a produção de biomateriais de enxerto ósseo como, por exemplo, cascas de ovo de avestruz (Dupoirieux, 1999) e conchas marinhas (Lamghari *et al.*, 2001).

As conchas de ostras podem se apresentar como fonte promissora na confecção de biomaterial para enxertia óssea, uma vez que apresentam como constituinte principal a calcita, um cristal à base de carbonato de cálcio, e também possuem em sua estrutura orgânica proteínas ósseas morfogenéticas 2 (do inglês *bone morphogenetic protein*, BMP-2) praticamente idênticas às encontradas em humanos (Miyashita *et al.*, 2008). As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) foram bem descritas em um estudo clássico de 1967, no qual Urist *et al.* demonstram suas primeiras pesquisas com substitutos ósseos visando encontrar um material ideal para reconstruir o osso humano, a partir do princípio de que as BMP contribuem para a diferenciação celular.

Estudos com a concha da ostra *Crassostrea gigas* indicam peculiaridades interessantes encontradas em seu processo de mineralização, como a presença de uma BMP que pode proporcionar melhores resultados em enxertos ósseos (Herpin *et al.*, 2005).

Assim, visando a diminuição de custos e ainda o aproveitamento de fontes renováveis para a produção de biomateriais, o objetivo desse estudo foi elaborar um biomaterial teste para enxerto a partir da concha da *Crassostrea gigas*, analisar algumas características das partículas produzidas, bem como verificar a efetividade experimental de sua aplicação *in vivo* em defeito periodontal de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxertos ósseos

As dimensões do suporte ósseo precisam ser compatíveis com o tamanho de um implante, que também deve distribuir as cargas mastigatórias de maneira satisfatória. Porém, em casos com pouco remanescente ósseo, faz-se necessário o preparo do leito receptor por meio de enxerto, com o objetivo de posicionar os implantes em situação que favoreça a estética e a mecânica da reabilitação protética (Misch *et al.*, 2008).

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, caracterizado por um conteúdo extracelular e um outro celular: osteoblastos, células de deposição; osteócitos, intrínsecos ao tecido, auxiliares da manutenção do mesmo; e osteoclastos, células de absorção. Segundo estudo de Martin (2000), o osso é o resultado de um trabalho conjunto destas células, nas quais os osteócitos diminuem sua atividade secretora ao se encontrarem envoltos por tecido osteóide, e assim vão permanecendo aprisionados no meio do tecido mineralizado. Os osteoclastos fazem o papel de absorção, importantíssimo na renovação óssea, pois ao absorverem determinada região, permitem a migração de células que a invadem. O autor denomina este trabalho como sendo desenvolvido por unidades multicelulares básicas (BMU, do inglês *basic multicellular units*).

O remodelamento ósseo é algo que ocorre constantemente durante a vida do indivíduo, no intuito de adaptar e renovar continuamente o tecido ósseo. Desde um bom tempo que se sabe que os osteócitos influenciam esses processos, em resposta a alterações na pressão do tecido e escoamento de fluídos ocasionados por cargas fisiológicas (Rubin e Lanyon, 1985).

A regeneração tecidual é um termo usado para descrever um reparo que leva a uma completa restauração da morfologia e função do tecido afetado (Urist *et al.* 1967). O reparo ósseo envolve fenômenos tanto de regeneração quanto de cicatrização, dependendo da injúria. Apesar de o tecido ósseo apresentar um alto potencial de reparo, defeitos ósseos podem não cicatrizar com tecido ósseo. (Mavrogenis *et al.*, 2009). Para facilitar o reparo, materiais de enxerto ósseo podem ser colocados nos defeitos. Normalmente, três mecanismos podem ocorrer na enxertia: a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução.

A osteogênese ocorre quando osteoblastos viáveis e osteoblastos precursores são carregados juntamente com o material enxertado no defeito, no qual centros de formação óssea podem ser estabelecidos. Osso ilíaco autógeno e enxertos medulares são exemplos de enxertos com propriedades osteogênicas (Shegarfi e Reikeras, 2009).

A osteoindução envolve nova formação óssea pela diferenciação de células de tecido conjuntivo indiferenciadas em células formadoras de osso, sob a influência de um agente indutor, tal como a matriz óssea desmineralizada ou as BMP (Bowers *et al.*, 1989).

A osteocondução ocorre quando um material enxertado serve como arcabouço para o crescimento de osteoblastos precursores no defeito. Este processo é geralmente acompanhado por uma absorção gradual do material enxertado. O osso autógeno cortical e o osso alógeno de banco de ossos são exemplos de materiais de enxerto com propriedades osteocondutoras (Hu e Zhong, 2009).

2.2 Biomateriais

2.2.1 Autógenos

Os enxertos autógenos são aqueles em que o material enxertado é retirado de uma área doadora do próprio indivíduo. As regiões doadoras mais usadas na boca são a sínfise e borda externa do corpo da mandíbula. Outras regiões doadoras bastante utilizadas são as costelas, e principalmente a região da crista do osso ilíaco. A calvária também é uma região utilizada com altos índices de sucesso (Iizuka *et al.*, 2004). Estas últimas requerem a internação hospitalar, que além do risco de infecção, tornam este tipo de enxerto mais complicado (Zijderveld *et al.*, 2009).

Reinert *et al.* (2003) relatam trinta casos de pacientes com maxila atrófica severa tratados com enxertos provenientes da crista ilíaca. Após uma pequena perda óssea durante o primeiro ano de acompanhamento, uma reabsorção mínima foi observada durante o segundo e o terceiro anos.

Chiapasco *et al.* (2007) relatam o uso de técnicas para aumento em altura do rebordo alveolar em mandíbula. Observam um resultado semelhante entre o uso de bloco oriundo do ramo mandibular e de dispositivo para distração osteogênica vertical. Rocuzzo *et al.* (2007) também indicam o uso do osso de ramo mandibular para aumento horizontal nos casos em que a deficiência óssea ocorre em espessura.

2.2.2 Alógenos

Os enxertos alógenos são provenientes de um outro indivíduo de mesma espécie, e são relatados na literatura desde a metade do século passado, quando Puranen, em 1966, descreve acontecimentos relatados na literatura, entre a segunda metade do século XIX e a primeira metade do século XX. Segundo este autor, em 1858 Ollier cria uma

fundação científica para estudos de transplantes ósseos, e a partir daí há um aumento nos relatos.

Os tecidos geralmente são adquiridos no *post-mortem* mas também podem ser adquiridos de doadores vivos. A seleção do doador é bastante criteriosa, assim como são as técnicas de processamento para que os tecidos sejam eficientes e seguros (Galea et al., 1998).

Becker *et al.* (1996) demonstram que o uso de osso alógeno pode ser questionado quanto à sua utilização ao redor de implantes, provavelmente devido à demora no estímulo ao remodelamento local.

São dadas como vantagens o uso exclusivo de anestesia local, ou seja evitando um procedimento cirúrgico hospitalar como no caso de coleta do osso da crista ilíaca, reduzindo assim os custos da intervenção, e a disponibilidade de grandes quantidades de material para enxerto. Como desvantagem é considerada a possibilidade de uma transmissão de doenças (Gomes *et al.*, 2008).

2.2.3 Alopásticos

Há, na Odontologia, uma crescente necessidade de novos biomateriais que apresentem uma resposta tecidual controlada e confiável, como por exemplo, biomateriais que substituam e/ou estimulem a formação de um novo tecido ósseo e que depois possam ser absorvidos. Uma variedade de enxertos ósseos aloplásticos, a partir de polímeros biodegradáveis associados à hidroxiapatita, têm sido objeto de considerável interesse clínico e científico. Os compósitos, polímeros/cerâmicas, alcançam cada vez mais uma aceitação nas áreas de reparação óssea e de defeitos periodontais (Bostrom e Seigerman, 2005).

Materiais à base de fosfato de cálcio granulado possuem propriedades de biocompatibilidade e osteocondução bem estabelecidas, e são muito úteis quando utilizados sozinhos ou em combinação, como por exemplo no uso de hidroxiapatita associada ao trifosfato de cálcio (Chow, 2009).

Outro material comumente usado na enxertia óssea é o sulfato de cálcio, também chamado de “gypsum” ou gesso Paris, que é conhecido por preservar os limites fisiológicos do defeito ósseo (manutenção de volume), reduzir o tempo de cirurgia e perda de sangue, além de evitar a morbidade de uma cirurgia doadora de tecido (Peltier, 1961).

Segundo Hench *et al.*, (1999) o biovidro possui biocompatibilidade com os tecidos do corpo, permitindo a migração óssea e a colonização de células osteogênicas na sua superfície.

2.2.4 Xenógenos

Pode-se fazer uso de biomateriais de origem xenogênica em situações clínicas mais favoráveis, como a necessidade de preencher parte do seio maxilar (Kim *et al.*, 2009), um alvéolo pós-extração bem conservado (Oltamari *et al.*, 2006) ou em defeitos periodontais (Reynolds *et al.*, 2010).

O biomaterial xenógeno mais utilizado é o osso bovino liofilizado desmineralizado. O osso bovino possui disponibilidade quase ilimitada e uma similaridade física e química com o osso humano. Uma desvantagem do osso bovino é o fato de ser um material xenógeno que pode, portanto, desencadear reações imunológicas e inflamatórias no hospedeiro. Esforços são realizados na tentativa de melhorar o processamento físico e químico do material para minimizar os riscos e diminuir

substancialmente a antigenicidade, tornando o osso bovino uma alternativa aceitável quando comparado com os enxertos autógenos e alógenos (Meyer *et al.*, 2008).

Outros animais estudados para prover matéria-prima para a confecção de biomateriais são a ovelha (Zielak¹ *et al.*, 2007) e o cavalo (Simion *et al.*, 2009). Além de utilizar mamíferos como fonte de matéria-prima, outros seres vivos apresentam propriedades de interesse para a engenharia tecidual, tal como as cascas de ovos de aves e as conchas marinhas. Estes materiais são caracterizados por serem ricos em cálcio, como é o caso da casca do ovo de avestruz que têm sua composição mineral distribuída em 97,4% (carbonato de cálcio), 1,9% (fosfato de magnésio) e 0,7% (fosfato tricálcio), além de possuir uma estrutura com microporosidades (Dupoirieux, 1999).

Várias espécies de moluscos também são pesquisados, em especial no que se diz respeito à camada nacre de suas conchas, que apresentam uma estrutura calcificada composta de cristais de carbonato de cálcio organizados em múltiplas camadas de tabletes finos de aragonita, cercados por uma matriz orgânica composta basicamente por proteínas e polisacarídeos (Weiss *et al.*, 2000).

Esta camada nacre de algumas conchas de moluscos foi considerada recentemente como um novo biomaterial para o reparo ósseo, que pode induzir à osteogênese (Mouriès *et al.*, 2002; Lamghari *et al.*, 2001). Fragmentos do nacre do molusco *Pinctada maxima* induzem a uma resposta biológica quando implantados em ossos de ovelhas, com uma atividade osteogênica local e integração do nacre no osso do hospedeiro, sem nenhuma reação inflamatória. O mesmo estudo sugere que a matriz da camada nacre produz sinais químicos que podem ser liberados em um meio fisiológico e que são capazes de ativar osteoblastos (Lamghari *et al.*, 2001). Em estudos *in vitro*, lascas de nacre estimulam células osteoblásticas humanas para a formação de osso

(Lopez *et al.*, 1992). Outros autores confirmam que o nacre é biocompatível, biodegradável e osteocondutor (Liao *et al.*, 2000).

2.4.4.1 *Crassostrea gigas*

Até o presente momento, nas maiores bases de dados, inexistem relatos sobre o uso deste molusco ou sua concha (com camada nacre) para o uso de enxertia óssea. O que se sabe é que a matriz orgânica da concha de moluscos é uma estrutura composta de proteínas e polissacarídeos (Weiner e Traub, 1984).

A ostra do pacífico, *Crassostrea gigas*, está se tornando uma espécie modelo atrativa para atividades de pesquisa relacionadas com o genoma focadas em imunologia comparativa, doença ecológica, estresse causado por poluição e parasitas, fisiologia de desenvolvimento e reprodutiva, e genética evolucionária (Fleury *et al.*, 2009).

Um estudo revela que na cadeia proteica da concha da *Crassostrea gigas* (Cg) existe uma proteína conectora para o cálcio, que surge durante o processo de mineralização da concha, com uma proporção relativamente alta de valina, alanina e isoleucina, o que sugere uma proteína adesiva. Neste mesmo estudo, os autores também correlacionam as matrizes orgânicas com biominais, e concluem que o ácido aspártico e o ácido glutâmico têm um papel importante na modelagem da formação da concha (Lee e Choi, 2007).

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de um biomaterial obtido a partir da concha da *Crassostrea gigas* na sua aplicação em defeitos periodontais de ratos, a fim de fornecer informações histológicas no que se refere à viabilidade de eventual aplicação clínica futura em humanos.

4. MATERIAL E METÓDOS

O seguinte trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo, sob o protocolo número 148/2008.

4.1 Confeção do biomaterial

Foram utilizadas conchas de ostras, *Crassostrea gigas*, coletadas do descarte da indústria alimentícia (Bombinhas, SC, Brasil). As conchas foram primeiramente lavadas com escova em água corrente, e o excesso de resíduos depositados na estrutura externa das mesmas foi removido em máquina para polimento de prótese (Politrix, Nevone, São Paulo, SP, Brasil), em alta rotação (20.000 rpm.) com disco de óxido de alumínio. Em seguida, as conchas foram moídas com um moedor tipo pilão manual e esterilizadas em autoclave.

4.2 Análise química inicial do biomaterial por meio de espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF)

A EDXRF foi realizada em amostra do biomaterial produzido, após autoclavagem do mesmo, de acordo com metodologia previamente descrita (Avigo Jr *et al.*, 2008; Vásquez *et al.*, 2005).

4.3 Análise das partículas do biomaterial por MEV

Parte das partículas do biomaterial teste foram metalizadas (SCD 030, Balzers Union, Alemanha) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (JSM6360-LV, Jeol, Tóquio, Japão).

4.4 Aplicação cirúrgica do biomaterial

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), com idade de 6 meses e com peso variando entre 350 a 450 g provenientes do biotério da Universidade Positivo. Foram tomados cuidados pré-operatórios que incluíram um protocolo de redução de estresse para os animais, no qual eram alojados apenas 3 animais por caixa. Os procedimentos de sedação foram realizados com alotano (Bayer, Alemanha), e posteriormente os animais receberam uma dose de anestesia com quetamina (40 mg/kg, Bayer, Alemanha) e xilazina (5 mg/kg, Bayer, Alemanha) via intraperitoneal. As cirurgias foram realizadas sempre por um mesmo operador.

Uma incisão linear de aproximadamente 0,8 mm foi realizada na mandíbula, na região vestibular e anterior ao forame mental com lâmina de bisturi 15 (BD, São Paulo, SP, Brasil), com o cuidado de não romper o colarinho cervical. O defeito ósseo (Figura 1) foi criado por ação de broca esférica multilaminada (carbide) de 3 mm de diâmetro (Antilope, Suíça) adaptada em aparelho portátil de baixa rotação (Dentec-405N, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com o protocolo cirúrgico pré-estabelecido (Zielak *et al.*, 2007).

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (C) e grupo experimental (E), subdivididos em 5 animais para cada sub-grupo. O grupo controle

tinha apenas coágulo no local cirúrgico e o grupo experimental recebeu o biomaterial marinho. Após, a região operada foi suturada com dois pontos simples usando fio de nylon 5.0 (Procure, Lamedid, Barueri, São Paulo, Brasil). Ao término da cirurgia os animais receberam uma dose de morfina (1 mL, Bayer, Alemanha). A eutanásia dos animais foi realizada com uso de uma câmara de gás de CO₂, conforme os tempos de monitoramento de 1, 3, 6 e 8 semanas.



Figura 1 – Visualização do defeito cirúrgico. Fonte: Zielak *et al.*, 2007.

4.5 Procedimentos histológicos

A área do defeito ósseo presente nas hemimandíbulas foi removida em bloco. Os fragmentos foram fixados Cortes seriados com 5 µm de espessura, foram realizados no sentido mesio-distal, e a coloração utilizada foi hematoxilina e eosina (H.E.) para análise com microscopia de luz. As hemi-mandíbulas com os defeitos enxertados foram coletadas e fixadas em formol (Sulana, Maringá, Paraná, Brasil) neutro a 10%, lavadas e descalcificadas em solução de ácido fórmico a 10% (Sigma, Diadema, São Paulo, Brasil). Depois do período de descalcificação (aproximadamente 20 dias), as peças

foram processadas e incluídas em parafina, seguindo a rotina convencional de processamento.

Para análise histológica as imagens foram coletadas por microscópio (021/3 Quimis, Diadema, SP, Brasil) e câmera acoplada (SDC-310, Samsung, Coréia). Os aumentos utilizados foram de 40, 100 e 400 \times , e os seguintes parâmetros foram considerados: fechamento do defeito, edema, reparo ósseo e reparo do ligamento periodontal.

5. RESULTADOS

5.1 Análise por MEV do biomaterial teste

O aspecto ultraestrutural demonstrou que no processo de confecção das partículas foram produzidos diferentes tamanhos (aproximadamente de 20 a 700 μm) (Figuras 2A e 2B). Além disto, em aumentos maiores (1500 a 10000 \times) pode-se observar a grande irregularidade da superfície do biomaterial teste. Cada partícula parece um aglomerado formado pela união de diversos cristais menores (Figuras 2C e 2D).

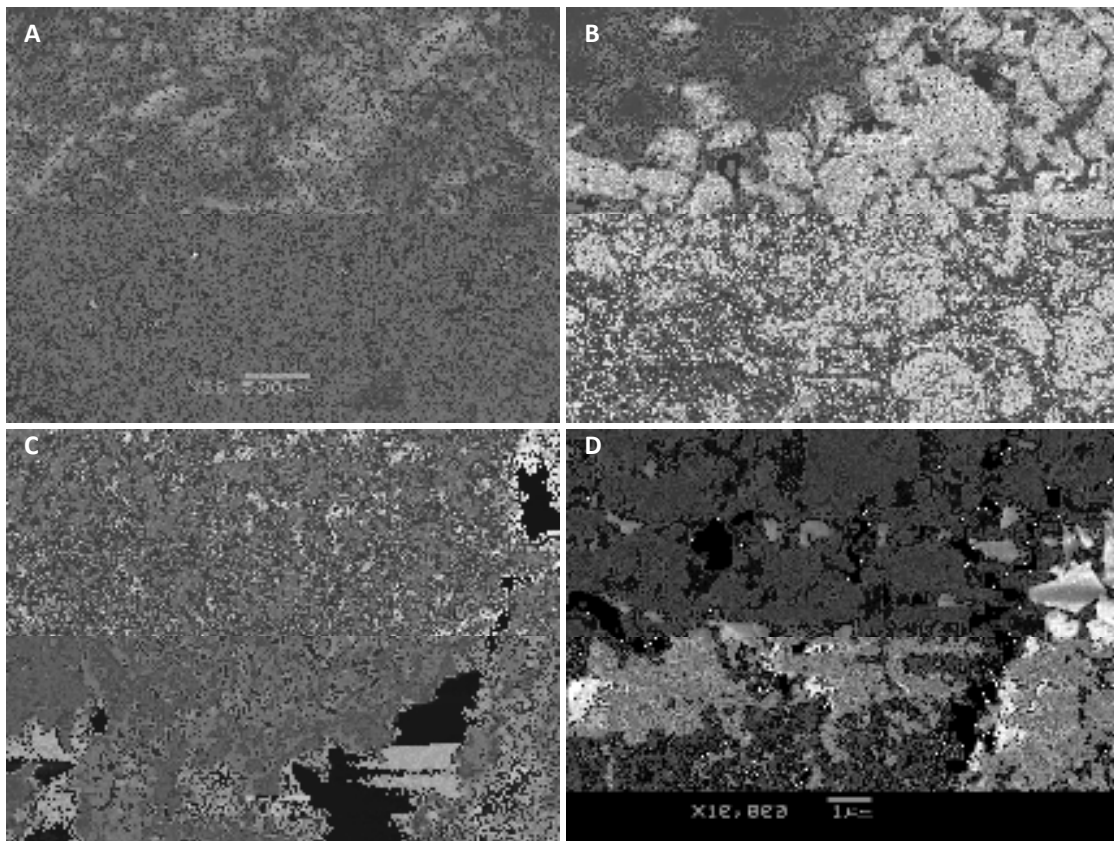


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura das partículas do biomaterial teste em diferentes aumentos.

5.2 Análise por EDXRF do biomaterial teste

Os resultados encontrados desta análise estão dispostos na Tabela 1. Pode-se observar que o óxido de cálcio (CaO) é o composto predominante, representando aproximadamente 96% da composição total do material.

Tabela 1 – Resultados obtidos da análise de composição química por EDXRF. Compostos ou elementos em quantidades menores do que 0,1% estão indicados em ppm (partes por milhão).

Composto ou elemento	Valor	Concentração
CaO	96,43729	%
Al₂O₃	2,613	%
SiO₂	0,288	%
Cl	1664,854	ppm
SrO	1591,8	ppm
SO₃	1503,36	ppm
P₂O₅	1149,97	ppm
Fe₂O₃	632	ppm
MnO	44,417	ppm
ZnO	13,614	ppm
Br	10,828	ppm
CuO	4,187	ppm
Rb	2,089	ppm

5.3 Observações clínicas

Durante a aplicação cirúrgica, o biomaterial teste demonstrou características favoráveis de manipulação. Desde o momento da coleta na embalagem até sua inserção no defeito cirúrgico, manteve-se bem aglutinado e, em contato com os tecidos vivos, apresentou grande estabilidade.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais se alimentaram normalmente apresentando aspectos clínicos considerados normais, sendo que todos os grupos tiveram um comportamento similar, e a ferida cirúrgica ficou caracterizada por uma resposta inflamatória cicatricial.

5.4 Análise histológica

5.4.1 Grupo controle de 1 semana

A partir de cortes seriados (5 μ m) foi possível a identificação de áreas com formação de tecido osteóide no meio do tecido de granulação (focal, apresentando processo inflamatório crônico), e áreas de neoformação de fibras colágenas dispostas perpendicularmente ao tecido cementário, mimetizando ligamento periodontal (Figuras 3A e 3B). Em nenhum dos espécimes analisados foi observado o fechamento ósseo do defeito.

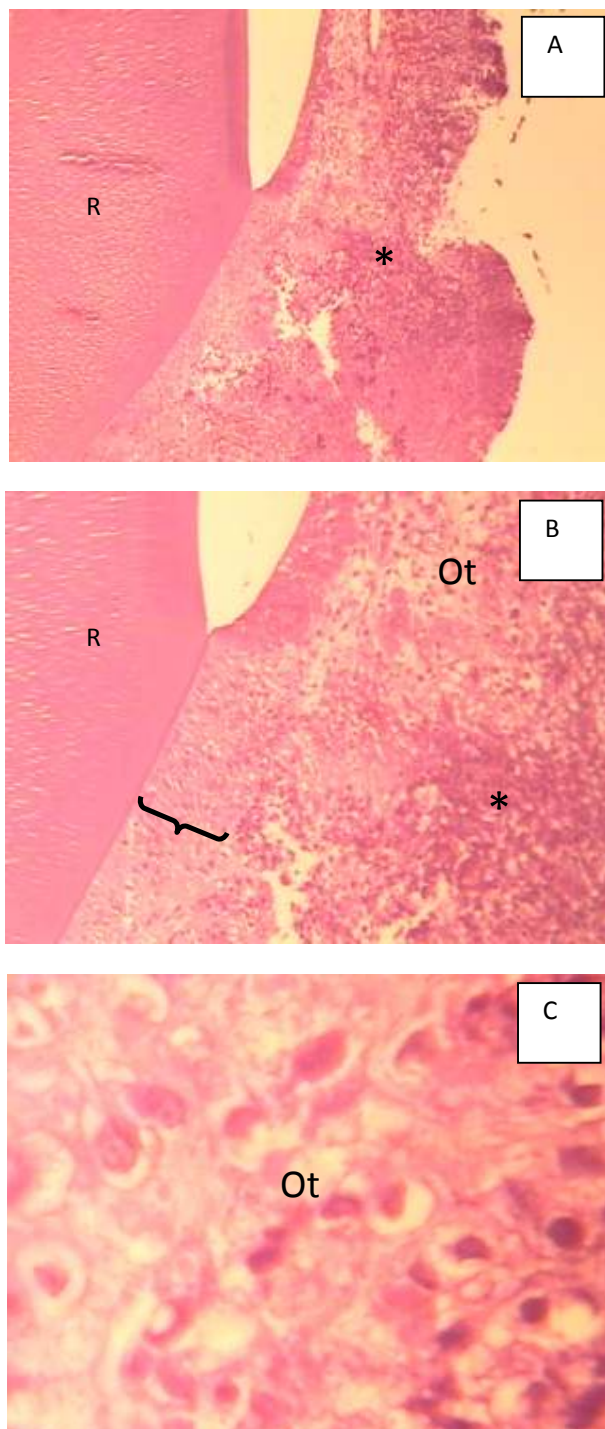


Figura 3 – Fotomicrografias da região central do defeito de amostra do grupo controle de 1 semana (hematoxilina e eosina). (R) Raiz dental. (*) Infiltrado inflamatório com edema. (Ot) Osteóide. ({} Organização do ligamento com aspecto de normalidade na inserção de fibras. (A) Magnificação original de 40×. (B) Magnificação original de 100×. (C) Magnificação original de 400×.

5.4.2 Grupo controle de 3 semanas

Foram observadas áreas com proliferação óssea a partir das margens do defeito. Ainda assim, um tecido de granulação também localizado focalmente estava presente, caracterizado pelo processo inflamatório crônico disperso (Figura 4).

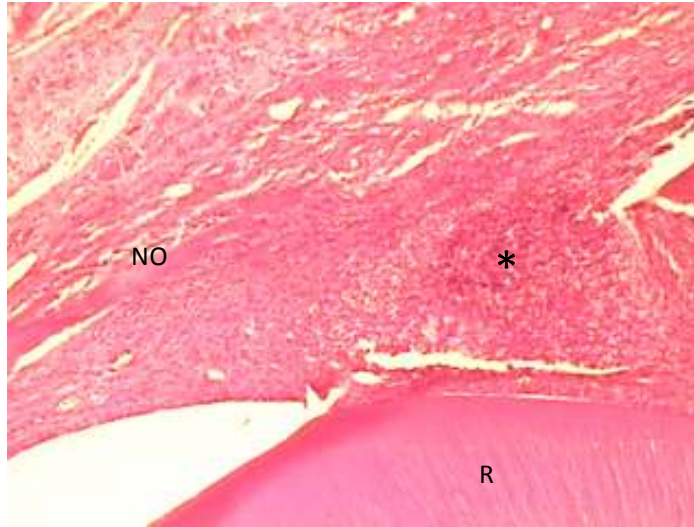


Figura 4 - Fotomicrografia do defeito de amostra do grupo controle de 3 semanas (hematoxilina e eosina). (*) Observar presença de infiltrado inflamatório na região do ligamento. (R) Raiz dental. (NO) Neoformação óssea a partir das margens do defeito. Magnificação original de 40 \times .

5.4.3 Grupo controle de 6 semanas

Foi possível observar o fechamento do defeito cirúrgico em todos os espécimes, a partir da presença de osso neoformado maduro coaptando as bordas. Contudo, ainda foi evidente a presença de um tecido de granulação composto por fibroplasia e processo inflamatório crônico, predominantemente linfo-plasmocitário, nas regiões ligamentar e submucosa (Figuras 5 a 8).

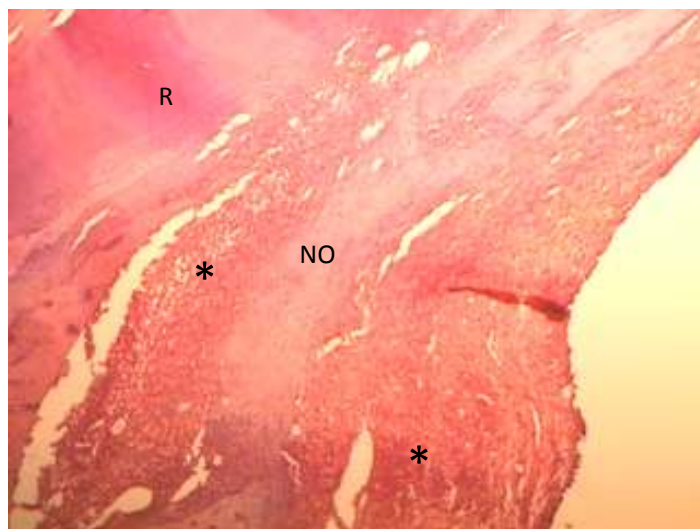


Figura 5 - Fotomicrografia do defeito de amostra do grupo controle de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (*) Observar presença de infiltrado inflamatório nas regiões do ligamento e submucosa. (R) Raiz dental. (NO) Neoformação óssea fechando o defeito. Magnificação original de 40×.

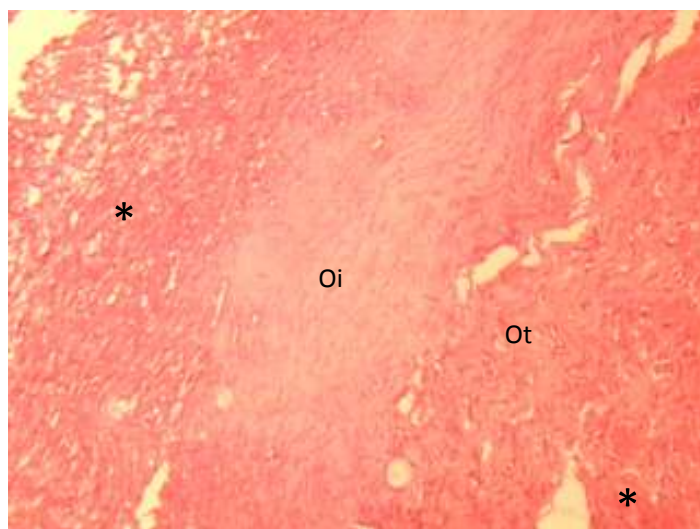


Figura 6 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (*) Observar presença de infiltrado inflamatório nas regiões do ligamento e submucosa. Aspectos da neoformação óssea: (Oi) Osso imaturo. (Ot) Osteóide. Magnificação original de 100×.

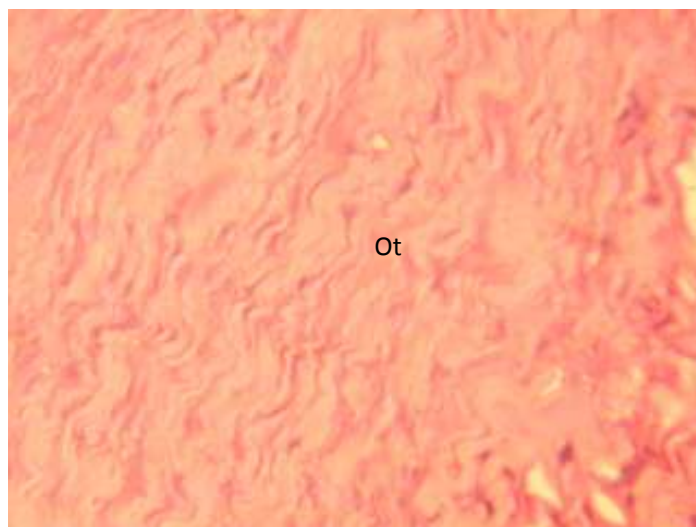


Figura 7 - Fotomicrografia da região periférica ao reparo ósseo central, amostra do grupo controle de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (Ot) Osteóide, observar o modelamento de tecido. Magnificação original de 400×.

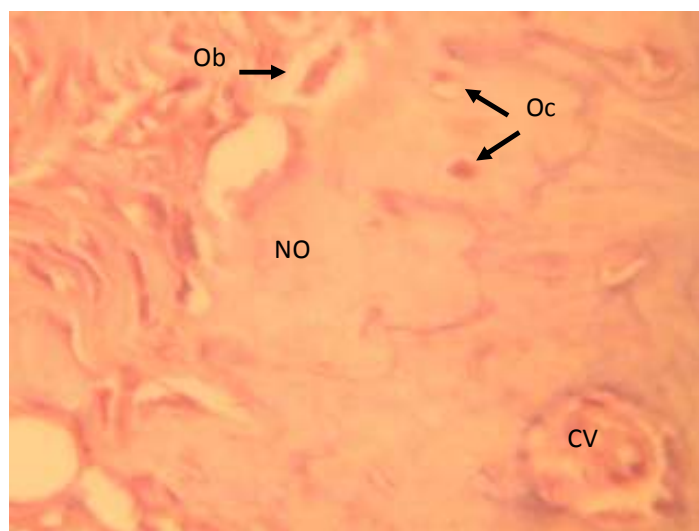


Figura 8 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea com osso imaturo. (CV) Canal vascular. (Ob) Osteoblasto. (Oc) Osteócito. Magnificação original de 400×.

5.4.4 Grupo controle de 8 semanas

Foi observada uma melhor coaptação das margens do defeito nos cortes histológicos, o que se refletiu no fechamento do defeito em todos os espécimes. Mesmo assim, ainda se observou a presença de tecido de granulação restrita ao centro do defeito e predominância de aspectos de normalidade das regiões ligamentar e submucosa (Figuras 9 a 11).



Figura 9 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea com osso maduro. (R) Raiz dental. (E) Área de edema. (f) Região do ligamento com aspecto de normalidade de inserção de fibras na raiz dental. Magnificação original de 40 ×.

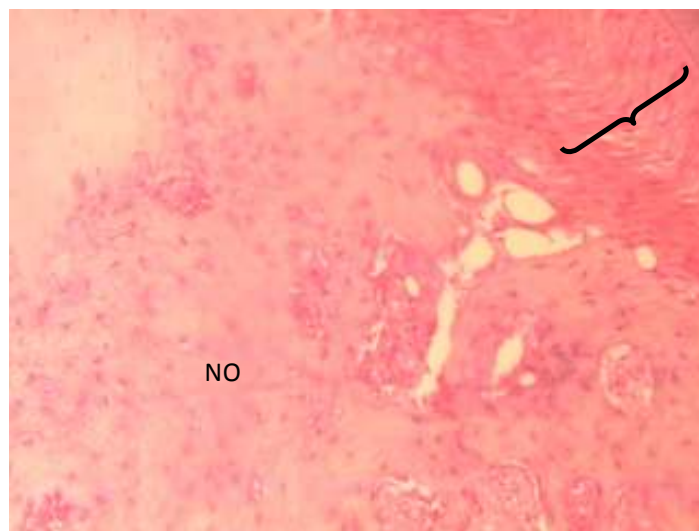


Figura 10 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea com osso maduro. ({}) Organização do ligamento na região de inserção com aspecto usual. Magnificação original de 100 ×.

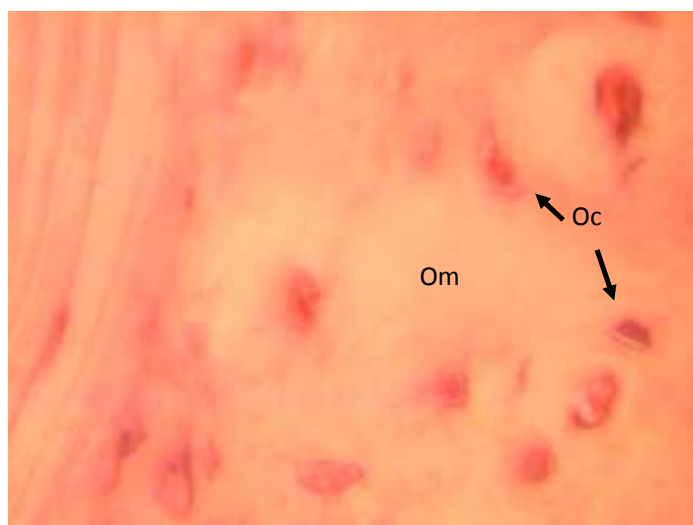


Figura 11 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo controle de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (Om) Osso maduro e disposição de osteócitos (Oc). Magnificação original de 400 ×.

5.4.5 Grupo experimental de 1 semana

Foi possível identificar a formação de tecido mineral semelhante ao tecido ósseo em permeio a intenso processo inflamatório crônico e agudo. Em nenhum dos espécimes analisados foi observado o fechamento ósseo do defeito (Figuras 12 a 14).

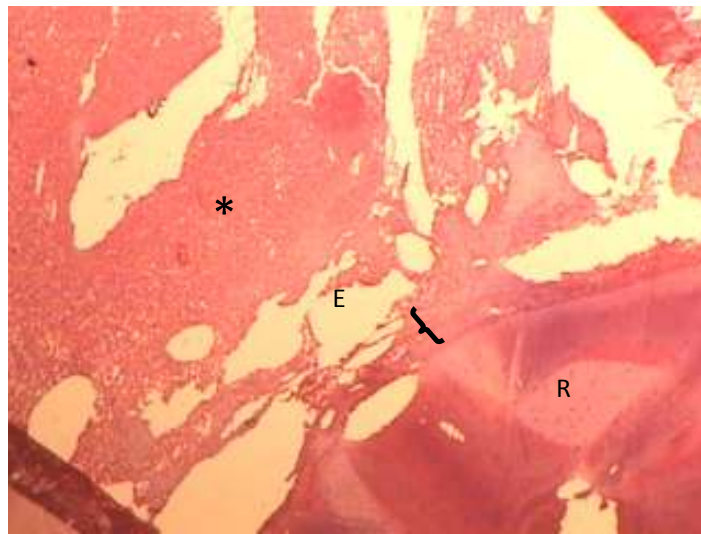


Figura 12 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana (hematoxilina e eosina). (R) Raiz dental. (E) Área de edema. (*) Presença de infiltrado inflamatório. (}) Observar a inserção do ligamento. Magnificação original de 40 ×.

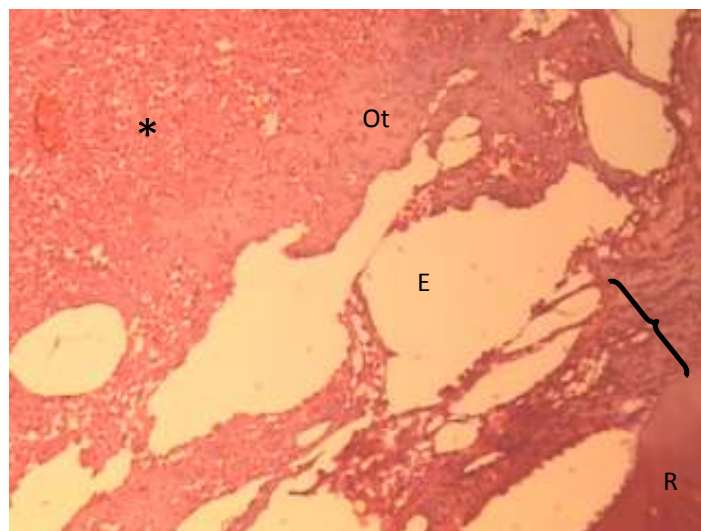


Figura 13 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana (hematoxilina e eosina). (*) Infiltrado inflamatório. (Ot) Osteóide. (E) Área de edema. ({} Observar organização irregular na inserção do ligamento na raiz dental. (R) Raiz dental. Magnificação original de 100 ×.

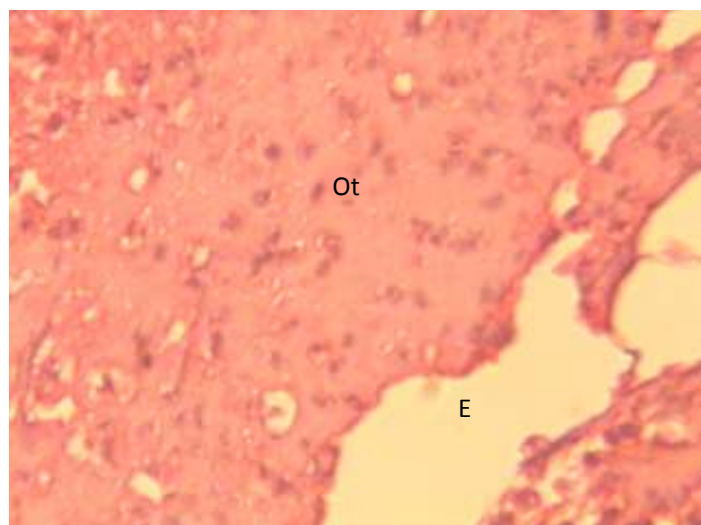


Figura 14 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 1 semana (hematoxilina e eosina). (Ot) Osteóide. (E) Área de edema. Magnificação original de 400 ×.

5.4.6 Grupo experimental de 3 semanas

Foi possível identificar a formação de áreas de tecido osteóide disposto em mosaico circundado por área de intensa fibroplasia. A presença de processo inflamatório crônico inespecífico foi observado neste grupo. Em nenhum dos espécimes analisados foi observado o fechamento ósseo do defeito (Figuras 15 a 17).

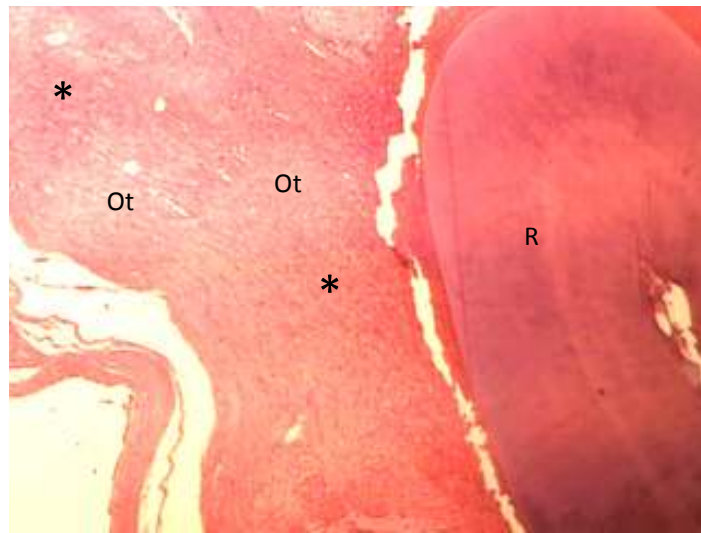


Figura 15 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas (hematoxilina e eosina). (R) Raíz dental. (Ot) Osteóide. (*) Infiltrado inflamatório. Magnificação original de 40 ×.

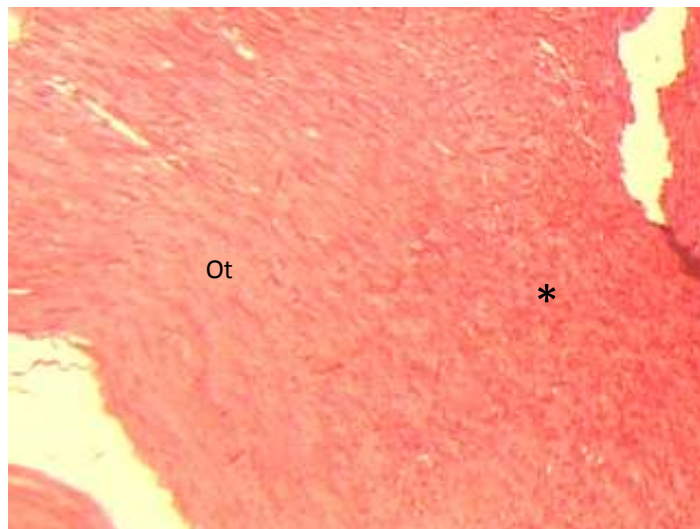


Figura 16 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas (hematoxilina e eosina). (Ot) Osteóide. (*) Infiltrado inflamatório. Magnificação original de 100 ×.

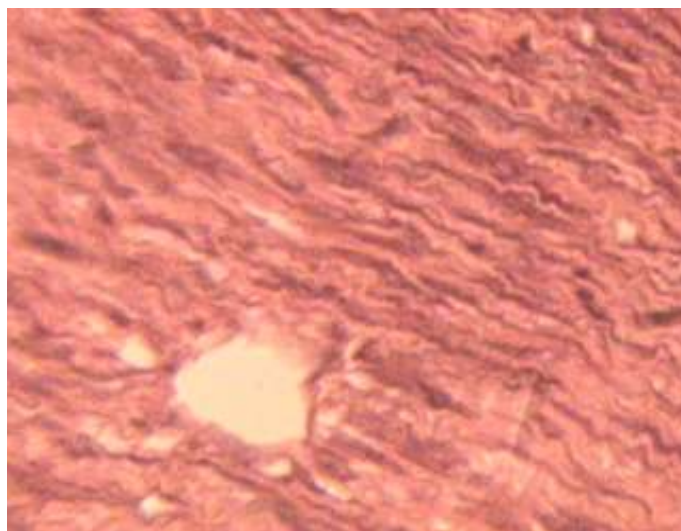


Figura 17 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 3 semanas (hematoxilina e eosina). Tecido ostóide com fibras modeladas. Magnificação original de 400 ×.

5.4.7 Grupo experimental de 6 semanas

Foi observada a formação de uma fina ponte óssea sobre a área do defeito com um processo inflamatório crônico exibindo edema intenso em região ligamentar. A região submucosa estava em remodelamento. Houve fechamento parcial dos defeitos em todos os espécimes (Figuras 18 a 21).

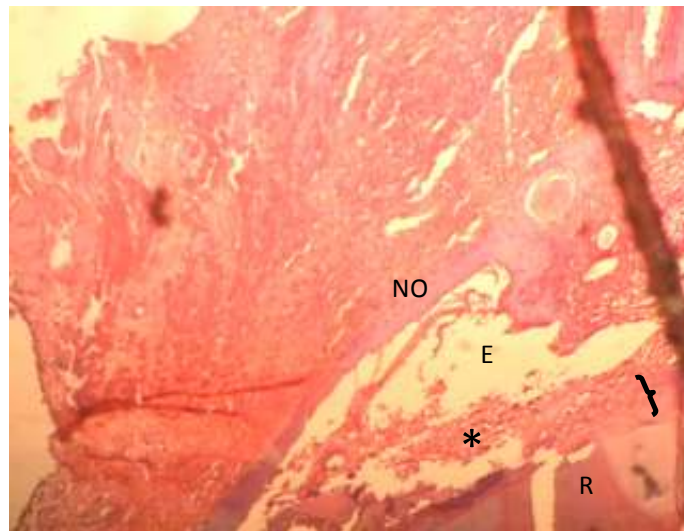


Figura 18 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea. (*) Infiltrado inflamatório. (E) Área de edema. (R) Raiz dental. (}) Área do ligamento de inserção de fibras na raiz dental. Magnificação original de 40 ×.

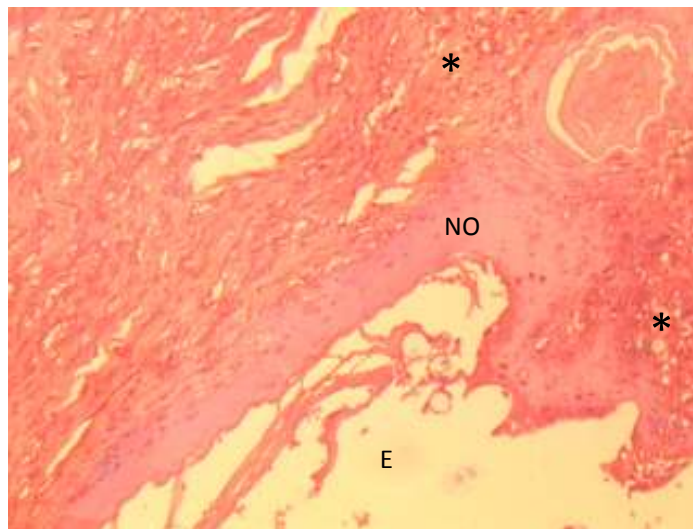


Figura 19 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea. (*) Infiltrado inflamatório. (E) Área de edema. Magnificação original de 100 ×.

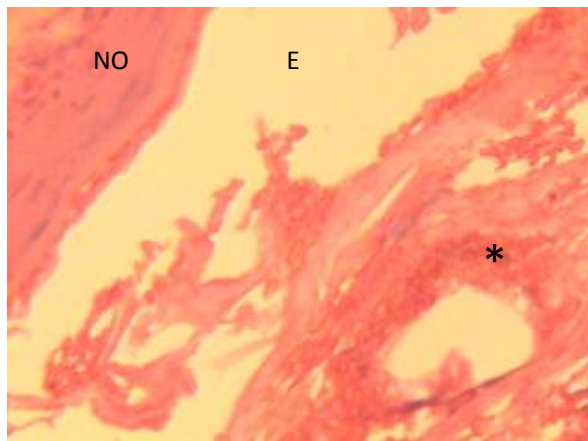


Figura 20 - Fotomicrografia da região central do fechamento do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea. (*) Infiltrado inflamatório. (E) Área de edema. Magnificação original de 400 ×.

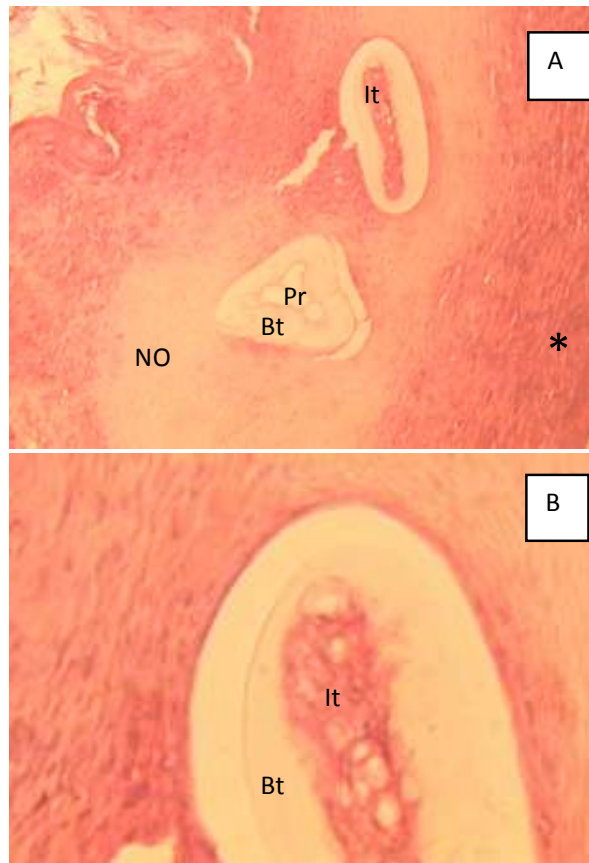


Figura 21 – Fotomicrografias da região central do defeito de amostra do grupo experimental de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea. (*) Infiltrado inflamatório. (Bt) Biomaterial teste. (Pr) Porosidade do biomaterial apresentando invasão tecidual fibrosa (It). (A) Magnificação original de 40×. (B) Magnificação original de 100×.

5.4.8 Grupo experimental de 8 semanas

Neste grupo foi possível observar a coaptação de bordas formada por tecido mineral fino e irregular, além da calcificação de matriz na região ligamentar semelhante a uma anquilose. Observou-se a presença de tecido inflamatório crônico, e o fechamento dos defeitos com tecido mineral irregular fino em todas as amostras (Figuras 22 a 25).

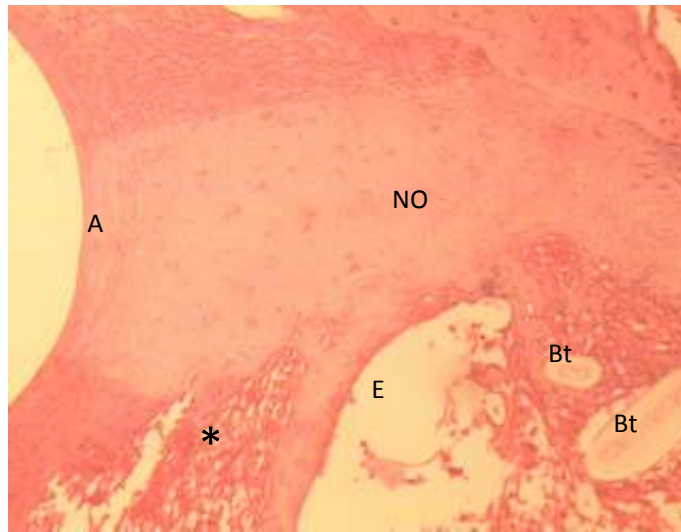


Figura 22 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (A) Anquilose. (NO) Neoformação óssea. (Bt) Biomaterial teste. (E) Área de edema. (*) Infiltrado inflamatório. Magnificação original de 40 ×.

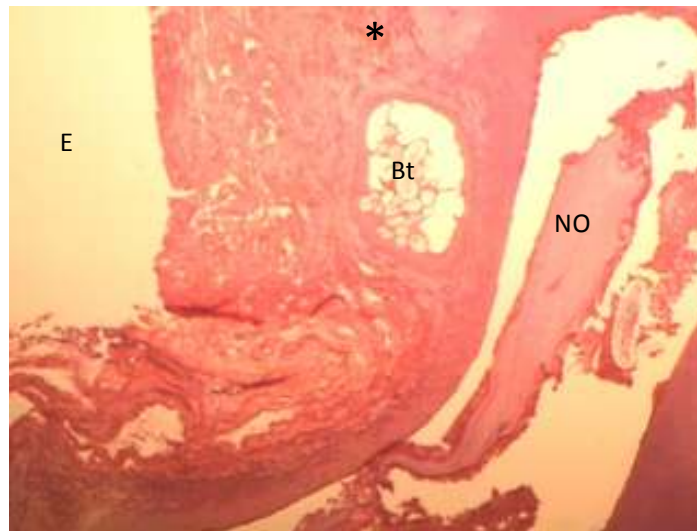


Figura 23 - Fotomicrografia do defeito, amostra do grupo experimental de 6 semanas (hematoxilina e eosina). (NO) Neoformação óssea. (Bt) Biomaterial teste. (E) Área de edema. (*) Infiltrado inflamatório. Magnificação original de 40 ×.

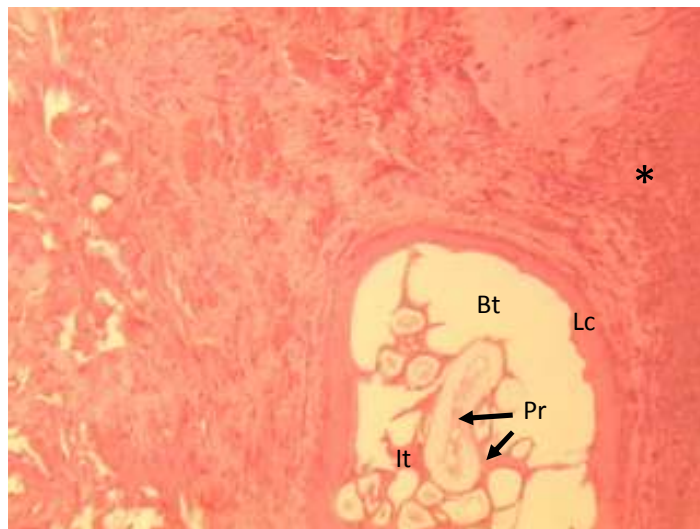


Figura 24 - Fotomicrografia da região central do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (*) Infiltrado inflamatório. (Bt) Biomaterial teste. (Pr) Porosidade do biomaterial apresentando invasão tecidual fibrosa (It). (Lc) Linha cimentante. Magnificação original de 100 ×.

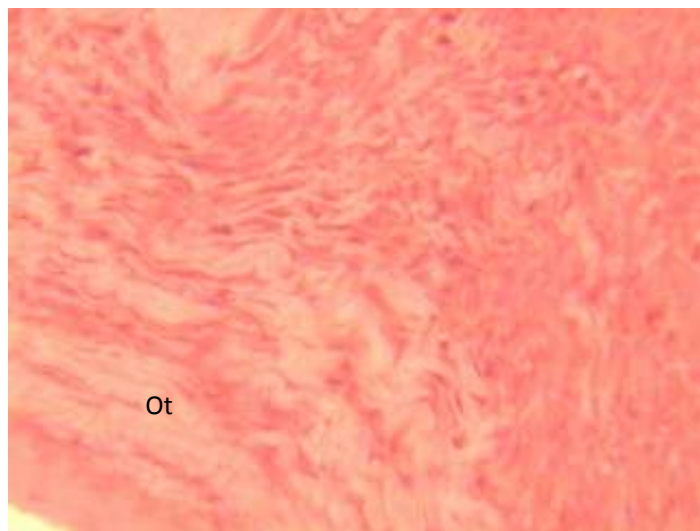


Figura 25 - Fotomicrografia da região central do fechamento do defeito, amostra do grupo experimental de 8 semanas (hematoxilina e eosina). (Ot) Tecido osteóide com fibras modeladas. Magnificação original de 400 ×.

Para uma melhor comparação dos resultados entre todos os grupos, um resumo foi compilado na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação geral dos parâmetros histológicos nos diferentes grupos.

Grupo	Fechamento do defeito	Edema	Reparo ósseo	Reparo do ligamento
C1	–	+	Aspecto normal de cicatrização	Aspecto normal de cicatrização
C3	±	+	Tecido ósseo imaturo, em camada única fina, periférico, sem consolidação	Aspecto normal de cicatrização
C6	+	+	Tecido ósseo imaturo rodeado por tecido osteóide modelado, em camada única espessa, sem consolidação	Aspecto normal de cicatrização
C8	+	+	Tecido ósseo maduro, em camada única espessa, com consolidação	Aspecto normal de cicatrização mais avançada
T1	–	+++	Tecido osteóide	Aspecto de cicatrização com fibroplasia e osteóide
T3	±	++	Tecido osteóide modelado	Aspecto de cicatrização com fibroplasia e osteóide
T6	+	++	Tecido ósseo maduro, em camada única fina, sem consolidação	Aspecto de cicatrização com fibroplasia e osteóide
T8	+	++	Tecido ósseo maduro, em múltiplas camadas finas, com coaptação	Anquilose

(+) Presente ou discreto. (++) Moderado. (+++) Intenso. (–) Ausente. (±) Parcial. (C1) Controle 1 semana. (C3) Controle 3 semanas. (C6) Controle 6 semanas. (C8) Controle 8 semanas. (T1) Teste 1 semana. (T3) Teste 3 semanas. (T6) Teste 6 semanas. (T8) Teste 8 semanas.

6. DISCUSSÃO

Existem relatos do uso de biomateriais de enxerto ósseo de origem marinha na Odontologia (Fricain *et al.*, 2002; Sándor *et al.*, 2003). A idéia de se usar um biomaterial de descarte, como é o caso da concha deste trabalho, esteve contemporaneamente afinada com a filosofia da sustentabilidade, algo essencial para os dias de hoje. A análise química inicial do biomaterial teste confirmou a hipótese de que o principal constituinte seria o cálcio, como observado na Tabela 2, sob a forma de algum tipo de óxido.

Acredita-se que os efeitos das BMP-2 na morfogênese e formação óssea ocorrem a partir da união de dois tipos de receptores kinase serina/treonina (receptores tipo I e II). Ambos são essenciais para a transdução do sinal das BMP (Rosenzweig *et al.*, 1995; Wan e Cao, 2005). Estudos recentes revelam que moléculas semelhante às sinalizadoras (BMP-2) para a formação óssea em humanos são encontradas em conchas *Crassostrea gigas* (Herpin *et al.*, 2005). Tais moléculas podem estar presentes na camada nacre da concha, como acontece na espécie *Pinctada fucata* (Miyashita *et al.*, 2008). Isto também corrobora para justificar a escolha da fonte de matéria-prima para o desenvolvimento do biomaterial teste aqui apresentado.

Em relação ao modelo *in vivo* de teste, como em muitos outros estudos experimentais, o rato foi usado devido a vantagens em termos de facilidade de aquisição, manutenção e manipulação cirúrgica (Aaron *et al.*, 2002). Este modelo específico apresenta uma similaridade com as situações clínicas de enxerto ósseo, devido ao defeito ser na boca do animal. Assim, obteve-se um comportamento clínico da ferida cirúrgica mais realístico, pois o animal salivou normalmente sobre a região, além de ter ingerido seus nutrientes sendo um roedor, e poder estimular a região com

sua língua. No entanto, o defeito não foi caracterizado como crítico, sendo que seu diâmetro máximo foi de 3 mm, enquanto estudos relatam defeitos críticos com diâmetros de 5 mm para o rato (Arosarena e Collins, 2003). Outro fator a ser considerado foi o local escolhido para a criação do defeito, o qual é submetido a cargas constantes decorrentes da mastigação, como o que acontece normalmente na boca de um indivíduo. Sabe-se que o osso responde a estes estímulos de tensão, sendo ativado o seu remodelamento, como é o caso de movimentação constante (Pipkin *et al.*, 2001). Em função do tempo de monitoramento deste trabalho, não se pode observar a regeneração óssea, já que até 8 semanas, mesmo nos indivíduos controle, ainda havia a presença discreta de edema.

Clinicamente, o material se comportou de maneira aceitável durante sua manipulação, incorporando-se na região do defeito devido a característica de hidrofília, o que permitiu sua aglutinação com o sangue. Não se observou sinais de infecção ou abscessos.

No presente estudo, no que diz respeito ao reparo ósseo, observou-se que durante a fase de osteóide, tanto no grupo controle (Figura 7) quanto no grupo experimental (Figura 17), houve regiões de deposição de fibras de forma ordenada, semelhantemente a um tecido modelado. Não obstante, durante a fase de maturação, o aspecto das regiões com osso maduro se apresentou normal, principalmente nos cortes de espécimes do grupo controle (Figuras 8, 10 e 11). Nos cortes histológicos do grupo experimental, o osso maduro formado encontrado foi mais fino, em camadas múltiplas (com tendência à baixa adesão entre as camadas, fato que se observa com o aparecimento de espaços entre as mesmas) (Figuras 19 e 23), e com número menor de

osteócitos (Figuras 19 e 21A) do que o osso maduro observado em cortes do grupo controle.

Em relação à direção da matriz orgânica durante a fase de osteóide, que se apresentou ordenada, sabe-se que modificações diferenciais nas orientações das deposições de colágeno e mineral, durante a neoformação óssea, podem acontecer como adaptações ultraestruturais da matriz, com a finalidade de se obter resitência ótima, ou acomodação à microfaturas por fadiga, em regiões suscetíveis à tensões mecânicas (Noble e Reeve, 2000; Skedros *et al.*, 2006).

Além disto, pode-se perceber que o tecido osteóide no grupo experimental, em determinadas regiões (Figura 14), apresentou um aspecto mais denso, provavelmente mais fibroso, do que o controle (Figura 3C). Este mesmo aspecto mais denso se refletiu no reparo do ligamento das amostras do grupo experimental (Figuras 13 e 18). Um outro achado importante observado no último período de monitoramento, a 8 semanas, foi o fato de que a fibroplasia com aspecto osteóide da região do ligamento se caracterizou como uma anquilose, ou seja, culminou com a mineralização do ligamento periodontal. Em condições normais, o ligamento periodontal se apresenta como um tecido conjuntivo altamente organizado com feixes de fibras, um conteúdo fluido e um sistema vascular que são características importantes para o desempenho de suas funções (Natali *et al.*, 2004).

Em relação à união das partículas do biomaterial teste com o osso, pode-se observar (Figuras 23 e 24), em oito semanas, que estão aderidas ao tecido neoformado ao seu redor por meio de uma linha cimentante. De acordo com Davies (2007), esta linha cimentante representa não apenas uma união química do osso com a superfície do biomaterial, mas uma interdigitação micromecânica, possivelmente de proteínas não

colagenosas, sinal favorável à migração de osteoclastos, ou seja, ao remodelamento. Este achado pode indicar a possibilidade de incorporação do biomaterial ao osso. Nas semanas iniciais (1 e 3), a presença do biomaterial teste nos cortes histológicos não foi evidente, provavelmente devido a uma maior intensidade do edema ao redor das partículas, o que pode ter promovido o deslocamento destas durante o processamento histológico. Neste mesmo modelo e período, em trabalho descrito por Zielak² *et al.* (2007), observa-se um infiltrado inflamatório crônico e agudo, além da presença de células gigantes e vascularização aumentadas em relação ao controle – características não evidentes no presente trabalho.

Outro resultado interessante foi o fato de que em cortes do grupo experimental, o tecido ósseo neoformado na região do enxerto, produziu um reparo ósseo em camadas finas, que visivelmente se dissociaram (Figuras 19 e 23). Neste ponto, talvez por ação da linha cimentante presente entre as camadas ósseas, o remodelamento poderia ter sido estimulado de forma mais rápida do que o que aconteceu com o grupo controle, que por sua vez demonstrou uma tendência a neoformar uma camada única e mais espessa (Figura 5).

O fato de se observar células (fibroblastos) em permeio a material extracelular, dentro de partículas do biomaterial teste comprova que o mesmo possui microporosidades compatíveis com o crescimento celular. É demonstrado (Zhu *et al.*, 2010) que o aumento na área de superfície de materiais à base de cálcio, como é o caso dos biomateriais de enxerto ósseo, pode favorecer a adsorção de proteínas do meio intersticial, e por consequência, atrair células importantes para a formação do tecido. Segundo a análise por MEV do biomaterial teste, pode-se observar que as partículas apresentaram grande porosidade e uma superfície bastante irregular (Figura 2). Pelas

características de incorporação e união da matriz óssea neoformada com as partículas, o biomaterial teste pareceu ter mecanismo de ação semelhante ao do biovidro. O biovidro é um material sintético que também se une ao tecido mineral, por meio de uma camada porosa de sílica, carregada de uma fase iônica de hidroxil-carbonato-apatita, uma fase mineral semelhante ao osso (Hu e Zhong, 2009).

As características estruturais de arcabouços para engenharia tecidual afetam a resposta celular, e devem ser elaboradas para prover adesão celular, proliferação e a diferenciação. Sendo que um arcabouço atua como uma matriz extracelular com a qual as células interagem previamente à formação de um novo tecido (Smith *et al.*, 2009). Portanto, um arcabouço deve apresentar uma superfície que promova a adesão, crescimento e diferenciação celular, enquanto providencia uma rede porosa para o crescimento tecidual (Chen e MA, 2004; Liu e MA, 2004).

Uma vez que o biomaterial teste apresentou proliferação celular dentro de microporosidades, pode-se discutir o perfil desta aplicação de biomateriais. Ao se elaborar um arcabouço, deve-se considerar vários fatores. Preferencialmente, o arcabouço deve se degradar de acordo com a nova formação tecidual, deve ser biocompatível e seus produtos de degradação também devem ser biocompatíveis. Uma vez implantado, deve possuir propriedades mecânicas necessárias para oferecer apoio estrutural temporariamente até que a formação de um novo tecido ocorra. Além disso, o arcabouço deve possuir características morfológicas importantes, como a alta porosidade e disponibilidade de oferecer uma passagem viável para a transmissão de nutrientes e crescimento tecidual interno, além de propiciar a angiogênese. Para obter tais características, os arcabouços são frequentemente desenhados para imitar a estrutura de uma matriz extracelular natural (Ma e Zhang, 1999). Hoje, os arcabouços são

biomateriais de desenvolvimento desafiador para a atual engenharia de tecidos (Smith *et al.*, 2009).

Sugere-se que o biomaterial teste do presente trabalho deva ser mais aprofundadamente avaliado. Para aplicações clínicas em região periodontal, os resultados aqui apresentados não se demonstraram satisfatórios, devido à formação de anquilose. Contudo, em defeitos ósseos que não envolvam a superfície radicular, o biomaterial teste pode apresentar um melhor desempenho.

7. CONCLUSÃO

De acordo com as informações descritas no presente trabalho, a utilização do biomaterial confeccionado a partir da concha da *Crassostrea gigas* promoveu inicialmente o aparecimento de um tecido osteóide mais fibroso, que resultou em reparo ósseo em camadas finas, além de aspecto fibroplásico no ligamento periodontal que, em estágio mais avançado, transformou-se em anquilose. Com este resultado, pode-se concluir que a aplicação do biomaterial em defeito periodontal parece não ser favorável. No entanto, a observação da formação da linha cimentante ao redor de partículas do biomaterial teste demonstra um potencial para sua aplicação no enxerto ósseo sem o envolvimento do ligamento periodontal, como é o caso de regiões com indicação para implantes.

REFERÊNCIAS

- Aaron RK, Wang S, Ciombor DM. Upregulation of basal TGFbetaI levels by EMF coincident with chondrogenesis: implications for skeletal repair and tissue engineering. *J Orthop Res* 2002; 20:233-240.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981; 10(6):387-416.
- Arosarena OA, Collins WL. Defect repair in the rat mandible with bone morphogenic protein 5 and prostaglandin E1. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 129(10):1125-30.
- Avigo Jr D, Godoi AFL, Stranger M, Potgieter-Vermaak S, Janissek PR, Vasconcelos EC *et al*. Particulate matter analysis at elementary schools in Curitiba, Brazil. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391:1459–1468.
- Becker W, Urist M, Becker BE, et al. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts: 15 human case reports. *J Periodontol* 1996; 67:1025-33.
- Bostrom MPG, Seigerman DA. The Clinical Use of Allografts, Demineralized Bone Matrices, Synthetic Bone Graft Substitutes and Osteoinductive Growth Factors: A Survey Study. *HSSJ* 2005; 1:9Y18
- Bowers GM, Chadroff B, Carnevale R, Mellonig J, Corio R, Emerson J, Stevens M, Romberg E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part II. *J Periodontol*. 1989 Dec; 60(12):675-82.
- Branemark PI. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 16 (Suppl) 1977.
- Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft Substitutes. *Clin Orthop*. 2002; 395:44Y52.
- Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous poly (L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials* 2004; 25(11):2065–2073.
- Chiapasco M, Zaniboni M, Rimondini L. Autogenous onlay bone grafts vs. alveolar distraction osteogenesis for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 2-4-year prospective study on humans. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(4):432-40.

- Chow LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J.* 2009; 28(1):1-10.
- Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007; 28 (34):5058-5067.
- Dupoirieux L. Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals – a possibility in facial reconstructive surgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1999; 37, 467–471.
- Ferri J, Dujoncquoy JP, Carneiro JM, Raoul G. Maxillary reconstruction to enable implant insertion: a retrospective study of 181 patients. *Head Face Med.* 2008; 16: 4-31.
- Fleury E, Huvet A, Lelong C, de Lorgeril J, Boulo V, Gueguen Y, *et al.* Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* 2009; 29;10:341.
- Fricain JC, Alouf J, Bareille R, Rouais F, Rouvillain JL. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. *Biomaterials.* 2002;23(3):673-9.
- Galea G, Kopman D, Graham BJ. Supply and demand of bone allograft for revision hip surgery in Scotland. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80 (4):595-9. Erratum in: *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(6):1087.
- Hayashi C, Kinoshita A, Oda S, Mizutani K, Shirakata Y, Ishikawa I. Injectable Calcium Phosphate Bone Cement Provides Favorable Space and a Scaffold for Periodontal Regeneration in dogs. *Journal of Periodontol.* 2006; 77 (6): 940-946.
- Hench LL, West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chemistry Reports* 1996; 13: 187-241.
- Herpin A, Lelong C, Becker T, Rosa F, Favrel P, Cunningham C. Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS J.* 2005; 272(13):3424-40.
- Hu YC, Zhong JP. Osteostimulation of bioglass. *Chin Med J (Engl).* 2009; 122(19):2386-9.

- Iizuka T, Smolka W, Hallermann W, Mericske-Stern R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(5):607-15.
- Kaufman E. Maxillary Sinus Elevation Surgery: An overview. *J Esthet Restor Dent* 2003; 15:272-283.
- Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT: The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop Relat Res* 2001:42-50.
- Kim YK, Yun PY, Kim SG, Lim SC. Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107(2):204-11.
- Lamghari M, Almeida MJ, Berland S, Laurent A, Huet H, Milet C, *et al*. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone* 1999; 25S, 91S–94S.
- Lamghari M, Berland S, Laurent A, Huet H, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials* 2001; 22(6):555–62.
- Lee SW, Choi CS. The correlation between organic matrices and biominerals (myostracal prism and folia) of the adult oyster shell, *Crassostrea gigas*. *Micron* 2007; (38): 58–64.
- Liao H, Mutvei H, Sjostrom M, Hammarstrom M, Li J. Tissue responses to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants in vivo. *Biomaterials* 2000; 21: 457–468.
- Liu XH, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 32(3):477–486.
- Lopez E, Vida, B, Berland S, Camprasse C, Camprasse G, Silve C. Demonstration of the capacity of nacre to induce bone formation by human osteoblasts maintained in vitro. *Tissue Cell* 1992; 24: 667–679.
- Ma PX, Zhang RY. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 46(1):60–72.
- Martin RB. Does osteocyte formation cause the nonlinear refilling of osteons? *Bone* 2000; 26 (1):71–78.

Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009;9(2):61-71.

Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H. Histological osseointegration of Tutobone ((R)): first results in human. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008; 128:539-44.

Misch CE, Misch-Dietsh F, Silc J, Barboza E, Cianciola LJ, Kazor C. Posterior implant single-tooth replacement and status of adjacent teeth during a 10-year period: a retrospective report. *J Periodontol.* 2008; 79(12):2378-82.

Miyashita T, Hanashita T, Toriyama M, Takagi R, Akashika T, Higashikubo N. Gene cloning and biochemical characterization of the BMP-2 of *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72(1):37-47.

Mouriès LP, Almeida MJ, Milet C, Berland S, Lopez E. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002; 132 (1):217-29.

Natali AN, Pavan PG, Scarpa C. Numerical analysis of tooth mobility: formulation of a non-linear constitutive law for the periodontal ligament. *Dental Materials* 2004; 20 (7):623-629.

Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 159 1-2: 7-13.

Oltramari PV, de Lima Navarro R, Henriques JF, Taga R, Cestari TM, Ceolin DS, Janson G, Granjeiro JM. Orthodontic movement in bone defects filled with xenogenic graft: an experimental study in minipigs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007; 131(3):302.e10-7.

Pipkin JL, Baker LA, Buchholz-Bryant MA, Lampley WJ, Elmore-Smith KA, Haliburton JC, *et al.* The effect of aerobic exercise after a period of inactivity on bone remodeling and calcium and phosphorus balance in mature horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 2001; 21(10):491-497.

Peltier LF. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Clin Orthop* 1961;21:1-31.

Puranen J. Reorganization of fresh and preserved bone transplants. *Acta. Ortop. Scand., Oslo, n.92 (suppl), p.56.* 1966.

Reinert S, König S, Bremerich A, Eufinger H, Krimmel M. Stability of bone grafting and placement of implants in the severely atrophic maxilla. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2003; 41: 249–255.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(1):55-71.

Rocuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: a controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(3):286-94.

Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, *et al.* Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 7632-7636.

Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:411–417.

Sándor GK, Kainulainen VT, Queiroz JO, Carmichael RP, Oikarinen KS. Preservation of ridge dimensions following grafting with coral granules of 48 post-traumatic and post-extraction dento-alveolar defects. *Dent Traumatol.* 2003; 19(4):221-7.

Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2009; 17(2):206-11.

Simion M, Nevins M, Rocchietta I, Fontana F, Maschera E, Schupbach P, Kim DM. Vertical ridge augmentation using an equine block infused with recombinant human platelet-derived growth factor-BB: a histologic study in a canine model. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2009; 29(3):245-55.

Skedros JG, Sorenson SM, Takano Y, Turner CH. Dissociation of mineral and collagen orientations may differentially adapt compact bone for regional loading environments: Results from acoustic velocity measurements in deer calcanei *Bone.* 2006; 39 (1):143-151.

Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009;1(2):226-36.

Suominen E, Kinnunen J. Bioactive glass granules and plates in the reconstruction of defects of facial bones. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996; 30: 281–289.

Turkyilmaz I, Patel NS, McGlumphy EA. Oral Rehabilitation of a severely Resorbed Edentulous Maxilla with Screwed-retained Hybrid Denture Using Cresco System: A Case Report. *Eur J Dent.* 2008; 2(3):220-3.

Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The Bone Induction Principle, *Clin Orthop* 1967; 53: 243-283.

Vázquez C, Custo G, Dawidowski L, Gómez D, Villegas M, Ortiz M, *et al.* Elucidating a particulate matter deposition episode by combining scanning electron microscopy and X-ray fluorescence spectrometry. *Anal Sci.* 2005; 21(7):763-7.

Wan M, Cao X. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 328: 651–657.

Weiss IM, Kaufmann S, Mann K, Fritz M. Purification and characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusk *Haliotis laevigata*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 267: 17–21.

Weiner S, Traub W. Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 1984; 304, 421–438.

Zhu XD, Zhang HJ, Fan HS, Li W, Zhang XD. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomaterialia.* 2010;6(4):1536-1541.

Zielak JC, Mathias AL, Almeida S, Giovanini AF. Oral Bone Grafting in a Rat Model and the use of Scanning Electron Microscopy for Tissue Morphology Evaluation. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 2007; 34: 201-210.

Zielak JC, Lopes DK, Giovanini AF, Baratto Filho F, Mathias AL. Histological evaluation of experimental bonegrafting in vivo of lyophilized deproteinated bovine bone. *RSBO.* 2007; 4(1).

Zijderveld SA, Schulten EA, Aartman IH, ten Bruggenkate CM. Long-term changes in graft height after maxillary sinus floor elevation with different grafting materials: radiographic evaluation with a minimum follow-up of 4.5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(7):691-700.