

Rui Tiago Escobar Teixeira e Silva

O efeito do fosfato de cálcio bifásico na reparação óssea – um estudo em ratos

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
2013

Rui Tiago Escobar Teixeira e Silva

O efeito do fosfato de cálcio bifásico na
reparação óssea – um estudo em ratos

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
2013

*Dissertação de candidatura
ao Grau de Mestre em Cirurgia Oral
apresentada à
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto*

Membros do Conselho Científico da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso (Prof. Associado c/ Agregação)

Prof. Doutor António Cabral Campos Felino (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva (Prof. Associado c/ Agregação)

Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha (Prof. Associado)

Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz (Prof. Associado)

Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho (Prof. Associado c/
Agregação)

Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas (Prof. Associado c/
Agregação)

Prof. Doutor José Carlos Reis Campos (Prof. Auxiliar c/ Agregação)

Prof. Doutor José Mário Castro Rocha (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho (Prof. Associado)

Prof. Doutora Maria Cristina Pinto Coelho Mendonça de Figueiredo Pollmann
(Prof. Associado)

Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva (Prof. Associada c/
Agregação)

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes (Prof. Catedrático)

Prof. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira (Prof. Auxiliar)

Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz (Prof. Associado da FEUP -
personalidade convidada)

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos (Prof. Associado c/ Agregação)

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo (Prof. Associado c/ Agregação)

Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida (Prof. Associado c/
Agregação)

Docentes Jubilados da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira (Prof. Associado)

Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas (Prof. Associado - falecido)

Dr. António Ulisses Matos dos Santos (Assistente Convidado)

Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira (Prof. Associado c/ Agregação)

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas (Prof. Catedrático)

Dr. José Maria Vaz Osório (Assistente Convidado)

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves (Prof. Catedrático)

Prof. Doutor Manuel Desport Marques (Prof. Associado Convidado - falecido)

Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo (Prof. Associado)

Dedico esta dissertação às pessoas que mais amo:

*aos meus pais, Joaquim e Manuela,
ao meu irmão André,
à Olga.*

Índice

Agradecimentos	15
Palavras-chave	17
Keywords	17
Siglas e Abreviaturas	18
Resumo	19
Abstract.....	21
I. Contexto e objetivos do trabalho	23
II. Desenvolvimento	25
II.1. Revisão Bibliográfica	25
II.1.i. Base biológica da regeneração óssea	25
II.1.ii. Tipos de colagénio	28
II.1.iii. Conceito de osteogénese, osteocondução e osteoindução	29
II.1.iv. Regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada	30
II.1.v. Propriedades das membranas utilizadas como barreiras	32
a. Membranas não reabsorvíveis	32
b. Membranas reabsorvíveis	34
c. Membrana de polietilenoglicol	39
II.1.vi. Enxertos ósseos e materiais substitutos ósseos	43
a. Enxertos autólogos	45
b. Enxertos alogénicos	47
c. Enxertos xenogénicos	48
d. Enxertos aloplásticos	49
II.1.vii. Indicações clínicas do fosfato de cálcio bifásico e da membrana de polietileno glicol na ROG	56
a. Elevação do seio maxilar	56
b. Preservação do alvéolo pós-extraccional	58
c. Rebordo Alveolar – aumentos ósseos verticais e horizontais	59
II.1.viii. Modelo animal	61
a. Defeito crítico	63

II.2. Material e Métodos	65
II.2.i Amostra	65
II.2.ii Preparação dos materiais	65
II.2.iii Procedimento cirúrgico	67
II.2.iv Análise radiográfica	70
II.2.v Sacrifício dos animais	70
II.2.vi Preparação das amostras para histologia	71
II.2.vii Análise microscópica	73
II.2.viii Análise histomorfométrica	73
II.2.ix Análise Estatística	74
II.3. Resultados	75
II.3.i Cirurgia experimental	75
II.3.ii Análise macroscópica	75
II.3.iii Análise radiográfica	76
II.3.iv Análise histológica	77
II.3.v Análise histomorfométrica	83
II.3.vi Análise Estatística	86
II.4. Discussão dos resultados	89
III. Conclusões	97
IV. Bibliografia	99
Índice de Tabelas, Ilustrações e Fotomicrografias.....	109
Anexo.....	111

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Ricardo Faria de Almeida pela sábia orientação, por toda a disponibilidade, motivação inculcada e total disponibilidade ao longo deste trabalho, assim como agradeço e valorizo todos os ensinamentos ao longo do Mestrado em Cirurgia Oral.

Ao Prof. Doutor Mário Vasconcelos agradeço a co-orientação que tornou possível planejar e colocar em prática o protocolo experimental. Estou igualmente grato pelo apoio na análise histológica e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Doutor António Cabral Campos Felino por todos os ensinamentos que me foi transmitindo dentro e fora da sala de aula.

Ao Prof. Doutor João Carvalho, cujo gosto pelo ensino transparece no planeamento das cirurgias e na facilidade com que explica, muitas vezes com desenhos, os procedimentos que à primeira vista parecem complicados, agradeço todas as lições e simpatia.

A todos os docentes do VI Mestrado em Cirurgia Oral, agradeço todo o empenho para fazer deste Mestrado uma formação de excelência.

À Prof. Doutora Sónia Gouveia por toda a disponibilidade e apoio que me facultou na análise estatística.

Ao Prof. Doutor Américo Afonso por disponibilizar a utilização dos serviços do Laboratório de Anatomia Dentária.

À Prof. Doutora Ana Portela por toda a disponibilidade e cooperação quer na parte experimental, quer na parte burocrática que implica um trabalho desta natureza.

À Técnica Especialista de 1ª classe de Diagnóstico e Terapêutica Ana Mota agradeço todo o trabalho prestado na preparação das lâminas, toda a simpatia e disponibilidade.

Aos meus colegas do VI Mestrado de Cirurgia Oral, por partilharem uma bela caminhada. Em especial ao Dr. David Alfaiate que rapidamente se tornou um grande amigo e cuja experiência profissional e académica me ajudaram a evoluir. Ao Dr. João Almeida e Sousa pela motivação em avançar com o trabalho. Ao Dr. Francisco Correia e à Dra. Ana Lemos Costa agradeço o companheirismo.

À D. Manuela Miranda agradeço por me motivar nos momentos mais difíceis e por me acolher de forma tão protetora e exigente ao mesmo tempo. É admirável a sua dedicação à instituição e aos alunos.

À D. Alexandra Lopes por estar sempre disponível, pela sua organização e dedicação aos alunos.

Ao Sr. Vítor Caldas e ao Sr. Paulo Dias por toda a simpatia e companheirismo.

À D. Teresa Almeida por cuidar do bem-estar dos animais durante o tempo de espera.

A todos os que me apoiaram durante todo este tempo.

Palavras-chave

Regeneração tecidual guiada

Regeneração óssea guiada

Fosfato de cálcio bifásico

Membragel

Membrana

Reabsorvível

Ratos Wistar

Polietilenoglicol

Keywords

Guided bone regeneration

Guided tissue regeneration

Biphasic calcium phosphate

Membragel

Membrane

Resorbable

Wistar Rat

Polyethylene glycol

Siglas e Abreviaturas

FCB – Fosfato de cálcio bifásico

BV – Biovidro

PMO – Proteínas morfogenéticas ósseas

DFDBA – Enxerto alogénico de osso congelado liofilizado e desmineralizado

e-PTFE - Membrana de Politetrafluretileno expandido

FDBA - FDBA – Enxerto alogénico de osso liofilizado mineralizado

ROG – Regeneração óssea guiada

CGLT - Carbono glicólico-láctico-trimetileno

RTG – Regeneração tecidual guiada

HA - Hidroxiapatite

PEG – Polietileno glicol

APG - Ácido poliglicólico

APL - Ácido poliláctico

FTC – Fosfato tricálcico

β -FTC – Fosfato β -tricálcico

Resumo

Na cirurgia oral, implantologia e periodontologia, os Médicos Dentistas deparam-se frequentemente com situações clínicas nas quais o volume ósseo foi de alguma forma perdido. Para ultrapassar este obstáculo, vários substitutos ósseos têm sido utilizados para realizar reconstruções ósseas. O potencial osteogénico do enxerto autólogo confere-lhe o título de *gold standard*, relativamente aos enxertos alogénicos, xenogénicos e aloplásticos. Atendendo à morbilidade do paciente e disponibilidade limitada dos enxertos autólogos recorre-se, frequentemente, a substitutos sintéticos. A procura de um enxerto aloplástico ideal continua.

O objetivo deste estudo experimental piloto é verificar o efeito do fosfato de cálcio bifásico (FCB), coberto por uma membrana de polietileno glicol (PEG), na regeneração óssea guiada (ROG) de defeitos criados na calote craniana de ratos Wistar e comparar esses resultados com a regeneração de defeitos ósseos apenas cobertos com a membrana de PEG. Este estudo tem ainda o objetivo de averiguar se os ratos Wistar serão um modelo animal apropriado para testar regeneração óssea guiada.

Com esse intuito, foram criados dois defeitos parietais de 5mm de diâmetro em sete ratos Wistar. O defeito de controlo realizado no osso parietal esquerdo foi coberto por uma membrana experimental PEG – Straumann® Membragel e o defeito de teste realizado no osso parietal direito foi preenchido com FCB – Straumann® Boneceramic e coberto pela mesma membrana. Após 2 meses os animais foram sacrificados. Realizaram-se radiografias coronais às calotes cranianas dos ratos, colheram-se as amostras ósseas e fez-se o devido processamento das mesmas. Utilizou-se corante de *Solochrome* para tingir as preparações e efetuaram-se as análises histológicas e histomorfométricas dos cortes obtidos.

Os defeitos de teste, regenerados com FCB e cobertos pela membrana de PEG, obtiveram, em média, $61,7\% \pm 14,6\%$ de área de neoformação óssea, enquanto que a percentagem da área regenerada nos defeitos de controlo foi $57,3\% \pm 21,8\%$. O FCB não exibiu propriedades osteocondutoras, constatando-se baixa quantidade de partículas totalmente incorporadas no osso recém-

formado. Serviu de mantedor de espaço e houve diminuta reabsorção das partículas durante o período de cicatrização. A membrana de PEG também se manteve intacta.

Foi possível concluir que o FCB demonstrou ser biocompatível e obteve uma maior percentagem de neoformação óssea. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas.

Abstract

In oral surgery, implantology and periodontology, the Dentists often come up with clinical situations in which the bone volume was somehow lost. To overcome this obstacle, various bone substitutes have been used to perform bone reconstructions. The osteogenic potential of autologous bone gives him the title of gold standard, comparatively with allogenic, xenogenic and alloplastic grafts. Given the patient's morbidity and limited availability of autografts, the use of synthetic substitutes is common. The search for the ideal xenograft continues.

The primary objective of this pilot study is to evaluate the effect of biphasic calcium phosphate (FCB) covered with a polyethylene glycol (PEG) membrane, in guided bone regeneration (ROG) defects created in the calvaria of Wistar rat and comparing these results with the regeneration of defects covered only with the PEG membrane. This study also aims to investigate whether rats are an appropriate animal model to test guided bone regeneration.

For that propose, there were made two parietal defects with the diameter of 5mm in seven Wistar rats. The control defect, carried out in the left parietal bone, was covered by an experimental PEG membrane - Straumann®Membragel and the test defect, performed on the right parietal bone, was filled with FCB - Straumann®BoneCeramic and covered with the same membrane. After 2 months the animals were sacrificed. Samples were collected, then processed and stained with Solochrom for histologic and histomorphometric analyzes.

The test defects regenerated with FCB and covered with the PEG membrane had the average of $61,7\% \pm 14,6\%$ new bone formation area, whereas the proportion filled area in the control defects was $57,3\% \pm 21,8\%$. The FCB did not exhibit osteoconductive properties and demonstrated low number of particles fully incorporated into the newly formed bone. It served as a space maintainer and there was a diminished absorption of the particles, during the healing period. The PEG membrane remained intact.

In conclusion, FCB shown to be biocompatible and achieved a higher percentage of neoformation, however there were no statistically significant differences.

I. Contexto e objetivos do trabalho

A ideia para o presente tema de dissertação surge no início do segundo semestre do VI Mestrado em Cirurgia Oral, durante uma discussão sobre a eficácia dos substitutos ósseos totalmente sintéticos e se estes garantiriam a regeneração dos defeitos ósseos, que tantas vezes se cruzam no caminho da cirurgia oral. No seguimento deste pensamento surgiu a hipótese de testar uma membrana em fase experimental.

A forma que permitiria testar estes materiais *in vivo* com segurança, dentro do tempo útil, sem envolver variáveis multifatoriais associadas aos pacientes e, no que me diz respeito, também aproveitar a hipótese de realizar algo novo, seria a experimentação animal.

Ao realizar a pesquisa bibliográfica foram muitos os obstáculos por mim sentidos, assim como referidos pela comunidade científica, nomeadamente a escassez de estudos e a heterogeneidade de protocolos experimentais. Conscientes da dificuldade de concretização de um estudo que envolve colaborações externas, instalações certificadas, autorizações extremamente demoradas e um ambiente totalmente experimental, decidimos avançar com a investigação.

O presente estudo tem como objetivo verificar o efeito do fosfato de cálcio bifásico (FCB) (Straumann® BoneCeramic), coberto por uma membrana de polietileno glicol (PEG) (Straumann® Membragel), na regeneração óssea de defeitos críticos provocados experimentalmente no osso parietal da calote craniana de ratos Wistar. Pretende-se ainda comparar esses resultados, com regenerações ósseas de defeitos críticos apenas cobertos com membranas de PEG e examinar as propriedades das mesmas. Este estudo tem ainda o objetivo de averiguar se os ratos Wistar serão um modelo animal apropriado para testar regeneração óssea guiada.

II. Desenvolvimento

II.1. Revisão Bibliográfica

II.1.i. Base biológica da regeneração óssea

O tecido ósseo é o componente mais representativo dos ossos, os quais podem conter outros tecidos, sobretudo tecido conjuntivo denso, tecido cartilaginoso e tecido hematopoiético. O cálcio é o mineral mais abundante no tecido ósseo e representa 2% do peso corporal de um adulto. Ao longo de toda a vida existe remodelação óssea, que inclui processos de formação e reabsorção com ritmos variáveis (1).

Relativamente à variedade de células que constituem o tecido ósseo, os osteoblastos são as células que sintetizam a porção orgânica do tecido ósseo: colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas (osteocalcina, osteonectina). São células basófilas mononucleares, possuem uma forma cúbica ou poliédrica e derivam das células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela deposição e mineralização da matriz óssea. Depois da calcificação, os osteoblastos ficam presos em lacunas ou osteoplastos, transformam-se em osteócitos e continuam a sintetizar matriz óssea. O diâmetro mínimo para uma adequada colonização de tecidos conectivo e osteóide é de 100µm, estando o diâmetro ideal entre os 300 e 400µm (2).

Os osteócitos representam 90 a 95% das células ósseas. Da superfície destas células partem prolongamentos citoplasmáticos que se unem a outros osteócitos, permitindo a difusão de nutrientes entre eles. As fibras da matriz extracelular são constituídas por colagénio tipo I e conferem flexibilidade ao osso. A substância fundamental da matriz extracelular consiste em ácido hialurónico, proteoglicanos e glicoproteínas como a osteocalcina e osteoconectina. Estes constituintes são sintetizados pelos osteócitos mediante a indução pela vitamina D. A calcificação da matriz extracelular resulta da presença de cristais de fosfato de cálcio, semelhantes à hidroxiapatite. A matriz

extracelular dispõe-se em camadas sobrepostas de 3 a 7 μ m, formando as lamelas ósseas (1, 3).

Os osteoclastos são responsáveis pela eliminação de osso, são células grandes (150 μ m) e podem conter até 50 núcleos. Quando iniciam a reabsorção óssea formam depressões na superfície óssea, chamadas lacunas de Howship. Estas células produzem a enzima anidrase carbônica que forma ácido carbônico e a colagenase (enzima hidrolítica). O pH ácido dissolve a hidroxiapatite e liberta íons de fosfato e cálcio, enquanto a colagenase digere os componentes orgânicos da matriz descalcificada. Os osteoclastos são estimulados pela paratormona e inibidos pela calcitonina (4).

Os componentes inorgânicos da matriz óssea incluem hidroxiapatite e uma pequena porção apatítica de fosfato de cálcio. Os principais íons existentes na fase mineral do tecido ósseo são: cálcio, fosfato e carbonato (3).

Com base na estrutura macroscópica, o tecido ósseo pode ser classificado em osso compacto e osso esponjoso. O osso compacto é maciço, contrariamente ao osso esponjoso, que é constituído por trabéculas de diferentes espessuras. O osso compacto está coberto por tecido conjuntivo, denominado como perióstio. Possui lamelas ósseas concêntricas, no interior das quais existe o sistema de Havers que geralmente acompanha a direção do eixo longitudinal do osso. No centro do sistema de Havers encontra-se o canal haversiano, que é uma estrutura cilíndrica de 300 μ m de diâmetro, por onde circulam os vasos sanguíneos, linfáticos e nervosos. Perpendicularmente aos sistemas de Havers formam-se os canais de Volkmann, que terminam junto ao osso esponjoso. Entre as trabéculas existe medula óssea. Em contraste com o osso compacto, o osso esponjoso não possui vasos sanguíneos próprios, sendo nutrido pelos capilares do perióstio e endóstio (revestimento celular interno) (4).

O perióstio e o endóstio possuem células osteoprogenitoras que são capazes de se diferenciar em osteoblastos, mas também em fibroblastos e adipócitos (4).

A formação do osso inicia-se com um osso imaturo, que é eliminado e substituído por osso maduro. O osso imaturo pode ser formado por ossificação intramembranosa, a partir de uma massa de tecido conjuntivo, ou por ossificação endocondral (fase de crescimento), através de um molde de tecido cartilaginoso. O osso maxilar possui uma ossificação intramembranosa (4).

O processo de remodelação óssea está ativo durante toda a vida. A remodelação óssea envolve dois processos essenciais: reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e aposição óssea através da atividade osteoblástica. Fatores extrínsecos, tais como cargas exercidas sobre o osso, estão relacionados com o início da remodelação óssea. Um exemplo típico de fatores extrínsecos são as forças ortodônticas. Nas fraturas também ocorre remodelação óssea (1).

A reparação de uma fratura óssea inicia-se com a formação de um coágulo de sangue, que é rapidamente substituído por tecido conjuntivo denso e posteriormente é convertido em fibrocartilagem. As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos e segregam uma bainha de tecido ósseo esponjoso ao redor da fibrocartilagem. Além disso, nas zonas periféricas os osteoblastos dão início à formação de trabéculas ósseas. As trabéculas ósseas substituem a fibrocartilagem. O calo ósseo resulta da bainha e das pontes de tecido ósseo formadas entre os fragmentos ósseos. A consolidação definitiva só ocorre após a modelação externa e interna pelos osteoclastos (4).

Existem vários fatores que influenciam a regeneração óssea. A calcitonina é uma hormona que além da sua ação analgésica e anti-inflamatória, possui uma atuação anti-osteoclástica. Esta hormona aumenta a atividade osteoblástica e a mineralização do tecido osteóide. Outra hormona com influência na regeneração óssea é a grelina. É secretada, na sua maioria (60-70%), pelo estômago. A grelina estimula a replicação dos osteoblastos e aumenta a produção de fosfatase alcalina e osteocalcina (5).

II.1.ii. Tipos de colagénio

Existem doze tipos de colagénio diferentes:

Colagénio Tipo I: é o mais comum e está presente nos tendões, nas cartilagens fibrosas, no tecido conjuntivo, é o principal constituinte do tecido conjuntivo denso e organiza-se em fibras e feixes. Está presente nos ossos, tendões e pele.

Colagénio Tipo II: é sintetizado pelos condrócitos, está presente na cartilagem hialina e na cartilagem elástica. Não produz feixes. Faz parte dos discos intervertebrais, olhos e cartilagem.

Colagénio Tipo III: constitui as fibras reticulares. Existe no músculo liso, endoneuro e nas trabéculas dos órgãos hematopoiéticos (baço, nódulos linfáticos, medula óssea vermelha); artérias, fígado, útero e camadas musculares do intestino. Encontra-se em grande quantidade no tecido conjuntivo. Constitui as fibras reticulares.

Colagénio Tipo IV: aparece na lâmina basal, é um dos componentes da membrana basal dos epitélios. Presente nas lentes da cápsula ocular e glomérulos.

Colagénio Tipo V: está presente nos ossos, tendões e sangue.

Colagénio Tipo VI: está presente no sangue, camada íntima da placenta.

Colagénio Tipo VII: está presente nas membranas corioamnióticas e na placenta.

Colagénio Tipo VIII: constitui o endotélio.

Colagénio Tipo IX: mantem as células unidas e é o principal componente proteico dos órgãos.

Colagénio Tipo X, XI e XII: presentes na cartilagem (1).

II.1.iii. Conceito de osteogénese, osteocondução e osteoindução

É aceite de forma consensual que os mecanismos básicos associados a enxertos ósseos, incluem três processos básicos: osteogénese, osteocondução e osteoindução (6).

Osteogénese: os osteoblastos e os seus precursores são transplantados juntamente ao material de enxerto para o local do defeito ósseo, formando zonas de crescimento ósseo. Deverão existir células vivas no material de enxerto, como por exemplo, um enxerto de osso medular autólogo (6).

Osteocondução: diz respeito à capacidade de manter o espaço e de criar uma infraestrutura para que possa haver neoformação e aposição de células ósseas precursoras dos osteoblastos. É uma propriedade comum à maioria dos enxertos, variando a capacidade de degradação e reabsorção (6).

Osteoindução: é a capacidade de estimular e sustentar a proliferação e diferenciação de células progenitoras em osteoblastos. Por exemplo, enxertos com matriz óssea desmineralizada ou proteínas morfogenéticas do osso (PMO) (6).

Estes três processos ocorrem frequentemente em simultâneo na regeneração óssea. De facto é pouco provável que ocorra osteogénese, sem existir osteocondução e osteoindução, uma vez que nos enxertos ósseos autólogos poucas células sobrevivem. Mais, os osteoblastos e osteócitos do osso circundante não possuem a capacidade de migração, significando que a formação óssea ocorre devido à invasão do enxerto por células precursoras dos osteoblastos, que posteriormente se diferenciam em osteoblastos (6).

Outro termo que importa definir é a bioatividade. Esta propriedade consiste em desenvolver uma ligação forte e direta ao tecido ósseo. Sob o ponto de vista celular, a bioatividade reflete a ligação e diferenciação de células osteogénicas em superfícies cerâmicas (7).

II.1.iv. Regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada

O objetivo da regeneração tecidual guiada (RTG) é regenerar completamente o periodonto, isto é, cemento, ligamento periodontal e osso. A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) diz respeito à regeneração apenas do tecido ósseo (8).

O primeiro registo do tratamento periodontal em humanos utilizando o conceito de RTG ocorreu nos anos 80, com as publicações de Nyman *et al.* que demonstraram resultados bem-sucedidos utilizando filtros Millipore (9). Estes autores concluíram que seria possível restabelecer novo tecido conectivo com células originárias do ligamento periodontal, após cirurgias de RTG (10, 11).

Seguiram-se várias publicações provenientes deste grupo de investigadores, com a utilização de uma membrana bio-inerte de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) em procedimentos de RTG e ROG. Tanto em animais como em humanos, verificaram que existia maior ganho de tecido de conexão proveniente do ligamento periodontal quando utilizavam estas membranas, comumente denominadas por “teflon” (12-16).

Na cirurgia óssea reconstrutiva, a membrana separa o tecido ósseo e os materiais de enxerto ósseo do perióstio, impedindo que ocorra a invaginação de tecido conjuntivo mole, que possui um crescimento mais rápido do que as células ósseas, no interior dos defeitos ósseos. Desta forma, ao reposicionar os retalhos gengivais, confere-se tempo para as células do osso adjacente migrarem e minimiza-se a reabsorção óssea (6).

Estudos realizados por Dahlin C, *et al.* revelaram que a aplicação de uma membrana e-PTFE cria uma barreira fisiológica que separa os tecidos e células, de forma a criar um espaço para que haja proliferação das células angiogénicas e osteogénicas oriundas da medula óssea para o defeito, sem interferência dos fibroblastos (17-19). Nesta altura, devido ao sucesso demonstrado nestes estudos, a utilização de membranas de e-PTFE tornou-se um procedimento padrão (20).

Contudo, são associadas diversas complicações às membranas de e-PTFE, sendo as mais frequentes: o colapso da membrana, formação óssea insuficiente e a formação de perióstio por cima da membrana (21, 22).

No sentido de ultrapassar estas complicações foi sugerida a utilização de enxertos ósseos para suportar a membrana e melhorar a neoformação óssea (23-25).

Os procedimentos de ROG surgem inevitavelmente associados à necessidade de reabilitação com implantes dentários: locais de implantação com disponibilidade óssea insuficiente, durante a colocação de implantes imediatos, preenchimento de defeitos ósseos localizados e de deiscências (21, 22, 26, 27).

A técnica de ROG baseada na utilização de membranas e-PTFE continuava a apresentar várias desvantagens, nomeadamente: alta taxa de exposição, difícil manuseamento devido às propriedades hidrofóbicas (necessidade de fixação com taxas ou parafusos) e a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção da membrana (21, 22, 24).

Os primeiros autores a referir a utilização de membranas reabsorvíveis para técnicas de RTG são Schultz e Gager no ano de 1990 e 1991. Neste último estudo, foram efetuadas RTG em 10 pacientes utilizando membranas de Vicryl - poliglactina 910 (composto utilizado também em fios de sutura reabsorvíveis) em defeitos periodontais (28, 29). Ainda na década de 90, Gottlow *et al.*

descrevem o comportamento histológico de uma nova membrana reabsorvível, num estudo longitudinal em macacos, sendo que esta se mantém estável durante seis semanas e reabsorve lentamente após seis a doze meses (30).

Seguiram-se vários estudos em animais aplicando técnicas de ROG, com membranas reabsorvíveis constituídas por ácido glicólico e láctico e membranas de colagénio (31-35).

A ROG é considerado um procedimento seguro e fiável (9).

II.1.v. Propriedades das membranas utilizadas como barreiras

a. Membranas não reabsorvíveis

As membranas não reabsorvíveis devem ter um conjunto de propriedades comuns. Em primeiro lugar deverão ser biocompatíveis, isto é, deverão ser inertes e não desencadear nenhuma reação imunológica por parte do organismo. Devem servir de barreira, impedindo a proliferação de células não desejadas, ao mesmo tempo que deixam passar nutrientes e gases. Outra característica importante é a integração tecidual. A topografia, porosidade e química da superfície determinam se haverá invaginação ou adesão superficial ao tecido durante a cicatrização. Se o material não for poroso e não houver textura, ocorre o encapsulamento por tecido conjuntivo fibroso da membrana. Isto significa que o suporte mecânico fica comprometido durante o tempo de cicatrização. A rigidez das membranas é outro fator a ter em conta. Para que a regeneração ocorra, é necessário criar e manter um espaço em casos de RTG (6, 9). A utilização de substitutos ósseos para manter esse espaço é uma recomendação frequente (36), assim como a utilização de membranas com reforço de titânio (9, 37). Estas últimas estão indicadas em situações de grandes defeitos ósseos ou em zonas supracrestais (9). O manuseamento e o desenho da membrana são fatores a considerar. Geralmente, durante a cirurgia, é necessário recortar as membranas para que estas se adaptem ao

locar a regenerar. Para tal podem ser utilizados parafusos ou taxas de fixação (6).

O PTFE foi descoberto por Roy Plunkett em 1938. É um polímero de flúor sintético formado pela união de duas moléculas de carbono e quatro moléculas de flúor (C_2F_4)_n. A rigidez deste material pode ser aumentada pela adição de prolipropileno fluoretado, resultando no politetrafluoretileno expandido. O e-PTFE foi desenvolvido em 1969 por Robert W. Gore e comercializado em 1971 pelo nome Gore-Tex. Foi utilizado pela primeira vez numa cirurgia vascular por Soyler em 1972 e mais tarde por Matsumoto em 1973 numa cirurgia de *bypass* arterial (38). Este material pode ser reforçado por titânio (39). É um material não reabsorvível devido à inexistência de enzimas capazes de clivar a ligação carbono-hidrogénio, inerte e hidrofóbico (6).

Durante o processo de ROG podem existir diversas complicações. Nas membranas não reabsorvíveis existe um elevado risco de exposição prematura, o que pode resultar em infeções e subsequente falha da regeneração óssea (9). As membranas não reabsorvíveis são hidrofóbicas e por isso mais difíceis de manusear do que as membranas reabsorvíveis de colagénio, que facilmente absorvem sangue e adaptam-se ao tecido ósseo (24, 40). Estas últimas apresentam menores riscos em caso de exposição (41).

As membranas de titânio são as que detêm a maior rigidez e permitem uma correta imobilização através da sua fixação com parafusos ou taxas. Todavia, existe um risco alto de exposição e consequente infeção bacteriana, o que leva à perda do enxerto e recessão da gengiva circundante (39).

Uma desvantagem óbvia deste tipo de membranas é a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção da membrana. Atendendo à morbidade do paciente, ao *stress* psicológico e ao risco de lesar tecidos moles, é preferível utilizar membranas reabsorvíveis, em detrimento das membranas não reabsorvíveis (9).

b. Membranas Reabsorvíveis

Nos anos 80 as membranas utilizadas eram predominantemente não-reabsorvíveis, mas desde os anos 90 que as membranas reabsorvíveis são preferidas pelos clínicos (42).

As palavras: degradável, absorvível e reabsorvível são frequentemente utilizadas de forma errada na literatura da RTG e ROG. Vert *et al.* definem estes três conceitos. Degradável refere-se a materiais sólidos que se decompõem e dispersam *in vivo*, devido à degradação macromolecular, mas sem haver certeza de que o organismo completa a excreção destes materiais, embora estes se possam deslocar. Esta definição exclui a degradação pela ação de fungos, bactérias ou ambiental. Reabsorvível diz respeito a materiais que podem ser degradados e posteriormente reabsorvidos *in vivo*, isto é são eliminados pelo organismo, quer por simples infiltração e degradação, quer pela sua metabolização. Absorvível significa que o material consegue dissolver-se nos fluídos corporais sem haver clivagem de nenhuma cadeia de polímeros, nem perda de massa (43).

As membranas reabsorvíveis e degradáveis devem preencher os requisitos das membranas não reabsorvíveis, assim como necessitam de obter o mínimo de reação tecidual durante a fase de reabsorção e essa reação deverá ser reversível. Também não devem influenciar negativamente a regeneração dos tecidos desejáveis (9, 44).

As membranas reabsorvíveis apresentam menor risco de infeção, nos casos em que ocorra exposição (40). Ainda assim, uma meta-análise realizada por Machtei revela que os efeitos nefastos da exposição da membrana são menores em RTG de lesões de furca de grau II, do que em ROG de lesões peri-implantares, sendo que o novo osso formado no grupo de casos com exposição da membrana (0.56 +/- 0.45 mm) é muito inferior às ROG sem exposição da membrana (3.01 +/- 0.38 mm) (45).

Vantagens das membranas reabsorvíveis: não necessitam de uma segunda cirurgia, simplicidade do procedimento cirúrgico, ampla variedade de técnicas passíveis de serem utilizadas, melhor relação custo-eficácia e diminuição da morbidade do paciente. Em caso de exposição, a membrana é reabsorvida e não permite a colonização com bactérias. Desvantagens: difícil controle da durabilidade da função de barreira, o processo de reabsorção pode interferir com a cicatrização e a regeneração óssea, e a membrana não suporta o material de enxerto por si só (9).

As membranas reabsorvíveis permitem realizar regenerações ósseas extensas, no entanto, se for possível evitar as deiscências gengivais, as membranas de e-PTFE poderão permitir uma regeneração óssea superior às reabsorvíveis. As razões para assim ser, têm a ver com uma maior capacidade de manter o espaço, manutenção da função de barreira ao longo do tempo e ausência do processo de reabsorção da membrana (9).

Existem dois materiais que têm vindo a ser maioritariamente utilizados na confeção de membranas reabsorvíveis: os poliésteres sintéticos alifáticos¹ e o colagénio derivado de diversas fontes animais (43).

Os poliésteres sintéticos mais utilizados são o ácido poliglicólico (APG) e o ácido poliláctico (APL). Uma vez que estes materiais são sintéticos, existe a possibilidade de produzi-los sob condições estritamente controladas e de forma ilimitada. Outra vantagem reside na capacidade do APG, APL e seus copolímeros degradarem completamente o dióxido de carbono e água pelo ciclo de Krebs (43).

A seguinte tabela apresenta os tempos aproximados para a reabsorção dos ácidos poli(α -hidroxi).

¹ Em química orgânica, os compostos orgânicos constituídos de carbono e hidrogénio são divididos em duas classes: aromáticos, que contêm anéis benzénicos ou anéis de átomos similares; e alifáticos, que não contêm anéis aromáticos.

Tabela 1 - Tempo aproximado para a reabsorção dos poliésteres sintéticos, adaptado de Hutmacher, *et al.* (1996) (43).

Tipo	Meses
Poli(L-láctido),	18 - 36
Poli(D,L-láctido)	4 - 6
Poliglicólido	3 - 4
D,L-láctido-co-glicólito (50:50)	2 - 3
D,L-láctido-co-glicólito (85:15)	2 - 4
D,L-láctido-co-caprolactona (90:10)	2 - 3
Polidioxanona	4 - 6

Os tempos de degradação podem ser influenciados por diversos fatores: estrutura química e composição química, peso molecular, método e condições do processamento, desenho, esterilização, morfologia, sítio de implantação, fatores físico-químicos, mecanismo de hidrólise, entre outros (43).

Piattelli *et al.* foram dos primeiros autores a analisar histologicamente as reações às membranas de APL durante a ROG, num estudo experimental em coelhos. Estes autores verificaram sinais de fragmentação da membrana logo após uma semana da cirurgia. Esta fragmentação foi progressiva e encontraram características de reabsorção, nomeadamente a presença de macrófagos e células gigantes multinucleares. Na terceira semana observaram a divisão em vários fragmentos e, na quarta semana, a macroestrutura da membrana ainda era visível. Verificaram zonas de contacto direto entre o osso/membrana e outras zonas onde havia a interposição de células gigantes multinucleares. Não ocorreu o encapsulamento da membrana (44).

Num estudo mais atual, no qual compararam a membrana de APL com uma membrana de carbono glicólico-láctico-trimetileno (CGLT) e uma membrana de

colagénio porcino (Bio-Gide[®]), a membrana de APL sofreu encapsulamento em ambas as margens e infiltração celular. A membrana de CGLT apresentou uma histologia semelhante. Após vinte e oito semanas as membranas de APL e CGLT ainda eram visíveis, os autores observaram cápsulas fibrosas invadidas por vasos sanguíneos e com presença de infiltrado celular. No que diz respeito à membrana de colagénio, a partir das doze semanas, deixou de ser possível diferenciar a transição da membrana e o colagénio nativo. Houve formação de fibras de colagénio paralelas à tábua óssea externa e, posteriormente, tecido conectivo (46).

Segundo Coonts, *et al.* a membrana de APL demonstrou ter boa resposta tecidual, biocompatibilidade e ser uma barreira eficiente na regeneração de defeitos periodontais (47). Contudo, o processo de degradação das membranas de APG e APL podem prejudicar a regeneração óssea, devido a reações tecidulares inflamatórias adversas (48).

As membranas de colagénio são frequentemente utilizadas em procedimentos de ROG e RTG. O colagénio utilizado para a produção de membranas provém de diversas espécies animais, nomeadamente, tendão bovino, derme bovina, ovina, equina ou porcina (8).

Atualmente existe uma grande variedade de membranas de colagénio no mercado, a maioria destas é constituída por colagénio tipo I e III, que se caracterizam pela integração tecidual pronunciada e permeabilidade suficiente para permitir a passagem de nutrientes durante as fases iniciais da cicatrização (49). A utilização do colagénio nativo implica uma reabsorção rápida (dias) e as membranas de colagénio sem tratamento prévio carecem de estabilidade para oferecer suporte durante a regeneração óssea. Para ultrapassar este problema, foram desenvolvidas várias técnicas envolvendo ligações cruzadas tais como adicionar glutaraldeído, embora este aumente a toxicidade das membranas de colagénio (8).

Tabela 2 - Membranas de colagénio disponíveis no mercado, adaptado de Behring, et al. (2008) (8).

	Company	Collagen origin	Mode of processing
Bicon	Bicon, Boston, MA, USA	Bovine (type I)	–
BioGide	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland	Porcine (type I and III)	–
BioGide Collagen	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland	Porcine (type I and III)	–
BioMend	Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA	Bovine (type I)	Glutaraldehyde cross-linked
BioMend Extend	Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA	Bovine (type I)	Glutaraldehyde cross-linked
Opocrin (discontinued)	Vebas, Milano, Italy	Equine (type I (97%) and Type III (3%))	DPPA cross-linked
Osseoguard	Biomet, Inc., Warsaw, IN, USA	Bovine (type I)	Non-cross-linked but processed otherwise (corporate secret)
Ossix (discontinued)	(Previously: 3i, Colbar R&D Ltd., Ramat Husharon, Israel)	Bovine (type I)	Enzymatically cross-linked
Ossix Plus	OraPharma, Inc, Warminster, PA, USA	Bovine (type I)	Glycation (Glymatrix) cross-linked
Paroguide (discontinued)	Vebas, Milano, Italy	96%–98% equine (type I) (97%) and type III (3%) collagen with 2%–4% chondroitin-4-sulfate glycosaminoglycan	DPPA cross-linked
TissueGuide	KOKEN, Tokyo, Japan	Bovine (type I)	Atelo-collagen
Tutodent	Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen am Brand, Germany	Bovine (type I)	–

DPPA, diphenylphosphoryl azide

Como vantagens das membranas de colagénio é possível referir a hemostasia, quimiotaxia para os fibroblastos do ligamento periodontal e da gengiva, baixa capacidade de suscitar reação imunológica, a semi-permeabilidade permite a transferência de nutrientes, fácil manipulação e capacidade de aumentar a espessura tecidual (50, 51).

O fecho da ferida cirúrgica sobre a membrana de colagénio é essencial, uma vez que a contaminação bacteriana origina resultados desfavoráveis de RTG e ROG. Uma vez que os fibroblastos são capazes de aderir à membrana e a proliferação das células epiteliais é impedida na presença de colagénio, o defeito é rapidamente selado. No entanto, as membranas de colagénio desintegram-se quando ficam expostas ao meio oral. Este facto deve-se às collagenases produzidas pelas bactérias, incluindo a *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides melaninogenicus* (8).

Tanto as membranas de poliésteres como as de colagénio necessitam, na maioria dos casos, de materiais de sustentação (enxertos ósseos) para impedir o colapso da membrana (47). Os enxertos por si só parecem menos eficientes do que quando utilizados simultaneamente com uma membrana reabsorvível (6). As membranas de colagénio são fabricadas em medidas padrão e

necessitam de ser individualizadas quer no tamanho, quer na forma para uma melhor adaptação ao local cirúrgico. Este facto pressupõe uma desvantagem, tendo em conta que aumenta do tempo do ato cirúrgico (47, 52). A maior desvantagem destas membranas prende-se com o facto de a sua biodegradação ocorrer através da atividade enzimática dos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e bactérias (51). Alguns autores assumem a hipótese de um potencial risco de reações imunológicas e transmissão de patologias derivadas dos animais (53, 54).

No que respeita aos desenvolvimentos futuros, aquilo que se procura atualmente é uma abordagem mecânica que facilite a intervenção cirúrgica, reduzindo a morbidade no paciente e, ao mesmo tempo, respeite a regeneração natural do osso (9).

c. Membrana de polietilenoglicol

Neste sentido, Ronald Jung e a sua equipa destacam-se como os pioneiros na investigação de uma membrana promissora, ainda em fase de estudos, que consiste num hidrogel líquido biodegradável constituído por polietileno glicol (PEG). Num estudo realizado em coelhos, com três tipos de condições (teste: HA/FTC e membrana de PEG, controlo positivo: HA/TCP e membrana de e-PTFE e controlo negativo: HA/ FTC), estes autores concluíram que a membrana de PEG poderia ser utilizada eficazmente como barreira biodegradável no tratamento de defeitos não críticos, obtendo regenerações ósseas semelhantes às membranas de e-PTFE. PEG é um composto altamente biocompatível e, atualmente, está a ser utilizado em diversas aplicações farmacêuticas (20).

Após Jung *et al.* terem provado a função oclusiva do PEG, Wechsler, *et al.* comprovaram este conceito. Num estudo realizado em 14 ratos *Sprague Dawley* (espécie proveniente da linhagem dos ratos Wistar), estes autores introduziram esponjas de colagénio envolvidas tridimensionalmente por hidrogel de PEG (formando um cilindro) na zona subcutânea do dorso dos

ratos. Utilizaram as esponjas de colagénio como controlo negativo. A análise histológica revelou que o hidrogel de PEG diminuiu a infiltração celular, sendo esta menor do que 1%, e impediu o crescimento tecidual durante mais de quatro meses. Estes resultados indicam que a membrana de PEG tem potencial para ser utilizada em ROG (52).

Num estudo semelhante, Herten *et al.* utilizaram duas combinações de hidrogéis diferentes: PEG1 (quatro cadeias de PEG-tinol e oito cadeias de PEG-acrilato) e PEG2 (quatro cadeias de PEG-tinol e quatro cadeias de PEG-acrilato), utilizados de forma isolada ou associados a um peptídeo cíclico de RGD. Discos gelificados com o diâmetro de 6mm e espessura de 0,6mm foram introduzidos na região subcutânea do dorso de 60 ratos Wistar. Como controlo foi selecionada uma membrana de colagénio porcino (BioGide®). Após 1 semana observaram a formação de vasos sanguíneos infiltrados na membrana de colagénio, enquanto nas combinações de hidrogéis verificaram existir tecido conectivo bem vascularizado a rodear os discos, sem infiltrações. Estes resultados revelaram baixa reação tecidual e boa biocompatibilidade. Os autores concluíram que a biodegradação depende da composição do hidrogel, uma vez que a biodegradação mais lenta ocorreu no hidrogel PEG1 (24 semanas), PEG1/RGD (16 semanas) seguido da membrana de colagénio (4 semanas) e do hidrogel PEG2 e PEG2/RGD (2 semanas) (51).

Thoma, *et al.* investigaram a rigidez da membrana de PEG e a sua capacidade de prevenir o colapso, num estudo realizado em 16 “*minipigs*”. Esta membrana proporcionou uma menor migração de tecidos moles no interior do defeito criado na mandíbula dos “*minipigs*”, do que os defeitos de controlo (sem membrana), e não houve diferenças significativas face aos defeitos cobertos pela membrana de APL (47).

Num estudo realizado em 11 cadelas beagle foram criadas deiscências de 12mm de comprimento, 8mm de altura e 6mm de profundidade, após exodontia bilateral de quatro pré-molares e do primeiro molar, mandibulares. Após três meses de cicatrização, foram realizadas um total de 44 implantações, com o

ombro do implante ao nível da crista óssea, o que resultou em deiscências de 6mm. Estabeleceram quatro grupos: Teste nº 1 PEG/osso autólogo, Teste nº 2 PEG/grânulos de HA/FTC, Controlo nº 1 membrana de colagénio/osso autólogo e Controlo nº 2 apenas com osso autólogo. A análise histomorfológica revelou alturas verticais regeneradas de 32%, 35%, 38% e 31%, seguindo a ordem anterior. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos de teste e os controlos onde apenas utilizaram osso autólogo. Os autores concluíram que a quantidade de regeneração obtida foi semelhante nos grupos que utilizaram a barreira de PEG e o grupo regenerado com membrana de colagénio (54).

Schwarz *et al.* (2011) investigaram a influência de duas membranas: membrana de colagénio e de PEG e de dois biomateriais associados a osso autólogo: BioOss[®] (osso bovino inorgânico) e Straumann[®]BoneCeramic (FCB), na ROG e na osteointegração. Os autores realizaram quatro defeitos maxilares, idênticos ao estudo anterior, e regeneraram aleatoriamente cada um dos defeitos. Após 8 semanas colocaram implantes e aguardaram mais 2 semanas para sacrificar os animais. Todas as ROG resultaram numa formação óssea homogénea e subsequente osteointegração. A análise histomorfométrica revelou um aumento da área tratada nas amostras onde foram utilizadas membranas de PEG, relativamente à membrana de colagénio, com significância estatística no grupo de FCB combinado com osso autólogo (49). De forma a confirmar estes resultados, foi realizado um estudo no qual aplicaram o mesmo protocolo, mas utilizaram apenas o Straumann[®]BoneCeramic (FCB) puro com membranas de PEG ou colagénio. Não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre o contacto do osso com o implante nem na quantidade de osso formado (55).

Atualmente existem poucos estudos sobre a utilização do hidrogel de PEG, especialmente quando limitamos a pesquisa a estudos realizados em humanos. Apenas dois artigos foram encontrados (42, 53).

Jung *et al.* (2009) levaram a cabo um ensaio clínico randomizado para testar se seria viável realizar uma regeneração óssea vertical adjacente a implantes dentários com hidrogel de PEG (n=19). Os defeitos ósseos foram mensurados e aqueles que fossem menores de 3 mm eram, automaticamente, excluídos. No grupo de controlo (n=18) foram utilizadas membranas de colagénio e, em ambos os grupos, foi utilizado osso bovino como material de preenchimento. Os resultados demonstraram uma média de preenchimento de 94,9% e $5,63 \pm 1,84$ mm no grupo de teste; e 96,4% e $4,25 \pm 1,16$ mm no grupo de controlo. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Este estudo demonstrou que a membrana de PEG pode ser utilizada com sucesso em procedimentos de ROG. Estes autores verificaram ainda que 31% dos indivíduos do grupo de teste e 21% dos controlos, apresentavam deiscências gengivais no momento de remoção de sutura, com exposição do parafuso de fecho (53).

Ramel, *et al.* (2012) utilizaram uma amostra de 36 pacientes, nos quais tinha sido realizado um implante dentário por paciente e, simultaneamente, regeneração de uma deiscência óssea (>3mm) pré-existente. Nessas BGRs utilizaram osso bovino inorgânico juntamente com membranas de colagénio ou de PEG. A seleção de uma ou outra membrana foi feita de forma randomizada. Os autores concluíram que não existiram diferenças significativas entre as perdas ósseas radiográficas mensuradas a 1 ano ($0,43 \pm 0,56$ mm com membranas de PEG e $0,21 \pm 0,36$ mm com membranas de colagénio) e a 3 anos ($0,61 \pm 0,89$ mm com membranas de PEG e $0,33 \pm 0,64$ mm com membranas de colagénio), após colocação em carga dos implantes (42).

A membrana de PEG revelou ser tão efetiva no tratamento de deiscências ósseas associadas a implantes como as membranas de colagénio (53).

Uma das vantagens deste tipo de membranas relaciona-se com a facilidade de adaptação à área que se pretende regenerar, contrariamente às restantes membranas que vêm com dimensões preestabelecidas. Além de poder ser aplicada diretamente *in situ*, existe a possibilidade de gelificar a membrana

previamente à sua colocação (20). Após a ativação e aplicação do hidrogel de PEG, a solidificação ocorre em aproximadamente 90 segundos. A fluidez do material é controlada através da adição de modificadores de viscosidade à solução tampão, com vista a simplificar a aplicação do material diretamente no local cirúrgico. Após gelificação, o material previne o crescimento tecidual e a união dos tecidos que estão separados por esta, até que o hidrogel de PEG atinge certo nível de degradação por hidrólise. Os produtos da degradação consistem em PEGs solúveis em água e eliminados por excreção renal (52-54).

É necessário ter em conta que, devido à sua consistência líquida, é imperativo combinar a membrana de PEG com enxertos ósseos (54). Vários autores apontam para uma baixa incidência de exposições em membranas de colagénio e de PEG (20, 49). A membrana de PEG parece ser segura e não causar reações biológicas anormais do tecido mole (20, 47, 53, 54).

II.1.vi. Enxertos ósseos e materiais substitutos ósseos

Consoante a proveniência do osso, podemos definir o enxerto como sendo: enxerto autógeno ou autólogo: o osso é colhido no próprio indivíduo, numa zona intraoral ou extraoral; enxerto alogénico ou aloenxerto: o enxerto é retirado de um dador da mesma espécie; enxerto xenogénico ou xeno-enxerto: o enxerto provém de um indivíduo de uma espécie diferente (origem grega: *xenos* significa estranho, convidado, hóspede); enxerto aloplástico ou alo-enxerto: diz respeito a materiais substitutos ósseos totalmente sintéticos (6, 56). Existe uma grande variedade de substitutos ósseos, ainda assim o *gold standard* é o osso autólogo (57).

Os diferentes tipos de enxerto podem ser consultados na ilustração 1.

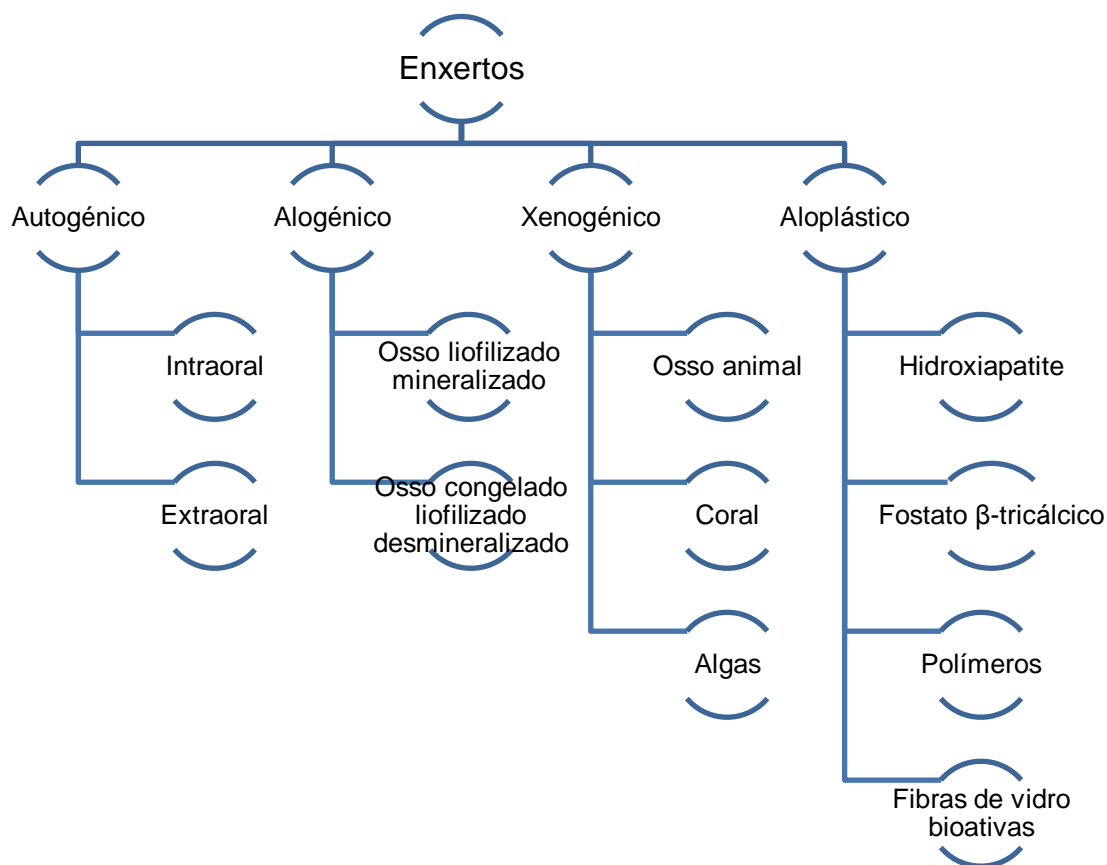


Ilustração 1 - Tipos de enxerto, adaptado de Lindhe, *et al.* (2008) (6).

Os enxertos ósseos podem ser aplicados em diferentes situações clínicas, tais como defeitos periodontais, defeitos peri-implantares, preservação do osso alveolar, elevação de seio maxilar e regeneração de defeitos ósseos para posterior colocação de implantes dentários.

A ideia de um substituto ósseo ótimo, suscetível de ser utilizado em qualquer indicação clínica, embora seja apelativa é apenas uma ideia. Os enxertos ósseos necessitam de um local cirúrgico que contenha uma vascularização adequada, para que ocorra suprimento de células precursoras de osteoblastos e, posteriormente, neoformação óssea. No local do enxerto, seria desejável que o substituto ósseo fosse substituído por novo osso. Se no local a regenerar não houver estabilidade mecânica, se houver células indesejáveis ou se existirem fatores condicionantes associados ao paciente, poderá ocorrer

formação de tecido fibroso e perda do enxerto. Assim, a escolha do material de enxerto depende da situação clínica (7).

a. Enxertos autólogos

O osso autólogo é composto por substâncias inorgânicas (70%), nomeadamente o fosfato de cálcio sob a forma de Hidroxiapatite cristalina, e orgânicas (30%), na sua maioria colagénio tipo I. O enxerto autólogo, até à data, é o único com a capacidade osteogénica, devido às células trazidas da zona dadora para a área recetora. Também possui capacidades osteocondutoras e osteoindutoras. Até à presente data continua a ser considerado o *gold standard* (6).

Transplantar um enxerto ósseo autólogo significa transplantar péptidos osteoindutores e outros fatores de crescimento biologicamente ativos, presentes naturalmente na matriz óssea (58).

Durante a cicatrização óssea existe libertação de PMOs pelos osteoblastos e por algumas células da medula óssea. As PMOs são citoquinas intimamente associadas à formação óssea e diferenciação dos osteoblastos (59).

Os fatores de crescimento presentes na matriz óssea que são libertados durante a reabsorção dos enxertos autólogos incluem PMOs, fatores de crescimento β , fatores de crescimento semelhante à insulina I e II, fatores de crescimento derivados de plaquetas e fatores de crescimento para fibroblastos A e B (6). Quanto maior for a área total do enxerto, maior a libertação destes fatores de crescimento. Assim, um enxerto de osso medular liberta mais fatores de crescimento do que um enxerto compacto, tal como um enxerto particulado apresenta uma maior libertação destes fatores quando comparado com enxertos em bloco (60). Fatores de crescimento, tais como PMO-2 e PMO-7, demonstram notáveis capacidades osteoindutoras (7).

Para o sucesso de uma regeneração óssea é necessário que haja um suprimento sanguíneo adequado. É necessário preservar o coágulo de sangue e que este esteja em contacto direto com o tecido vivo. No caso de um bloco ósseo autólogo, é essencial que esteja fixo com parafusos, taxas ou outros meios retentivos, de forma a preservar o coágulo. A regeneração ocorre através da substituição gradual dos tecidos necrosados no interior do enxerto e sua substituição por novo osso (61).

Os enxertos autólogos podem ser utilizados em bloco ou particulados, de zonas corticais ou medulares. Os enxertos corticais suportam maiores forças mecânicas numa fase inicial, no entanto a sua revascularização é mais demorada do que nos enxertos medulares. Os enxertos particulados permitem uma maior vascularização ao redor das partículas e uma maior libertação de fatores de crescimento e de diferenciação, logo a partir da fase inicial da regeneração, relativamente aos enxertos em bloco. A área total dos enxertos particulados é superior à dos enxertos em bloco, facilitando a atividade osteoclástica e resultando numa maior reabsorção (60).

Quando se opta por um enxerto ósseo autólogo sob a forma de enxerto particulado, o tamanho ideal das partículas encontra-se entre $0,5\text{mm}^3$ e 2mm^3 (60). A reabsorção pode ser minimizada pela utilização de membranas.

De Marco *et al.* realizaram um estudo em trinta ratos Wistar, no qual utilizaram um enxerto em bloco da zona parietal do crânio para regenerar um defeito criado na mandíbula do mesmo rato, com e sem membrana de ePTFE. Estes autores observaram uma revascularização mais rápida no grupo de enxerto sem membrana, com vasos sanguíneos provenientes tanto do leito recetor como do tecido conjuntivo adjacente. Ambos os grupos obtiveram revascularizações completas (61). No entanto, a ausência de membrana implica uma maior reabsorção do enxerto em bloco (62).

Num artigo de *follow-up* de 6 anos por tomografia axial computadorizada, concluiu-se que os enxertos em bloco sofreram menos reabsorção (21,5%) do

que os enxertos de osso autólogo particulado (39,2%) utilizados em elevações de seio maxilar (63). Poder-se-ia criticar o facto de estes autores terem utilizado osso proveniente da crista ilíaca e do mento sem os diferenciarem. Johansson *et al.* utilizaram enxertos provenientes da crista ilíaca e obtiveram reabsorções superiores às do estudo referido anteriormente. Numa avaliação feita após 6 meses da realização de enxertos ósseos, os *onlays* executados sobre o osso alveolar maxilar obtiveram uma reabsorção na ordem dos 47%. Ainda assim foi um valor menor do que nos enxertos de osso particulado (49,5%), utilizados nas elevações de seios maxilares (64). Parece ser que o osso autólogo que sofre menos reabsorção é o osso cortical, nomeadamente o osso proveniente da zona parietal calote craniana. Smolka *et al.* obtiveram reabsorções na ordem dos 19,2% em enxertos de osso parietal (65).

b. Enxertos alogénicos

Os enxertos alogénicos são amplamente utilizados nos Estados Unidos da América e no Brasil, no entanto, este tipo de enxertos carece de utilização em Portugal devido às leis vigentes.

Os aloenxertos são armazenados em bancos de osso sob a forma de enxerto alogénico de osso liofilizado mineralizado (FDBA: *freeze dried bone allograft*) e enxerto alogénico de osso congelado liofilizado e desmineralizado (DFDBA: *desmineralized freeze dried bone allograft*). Os aloenxertos envolvem riscos de transmissão de doenças, assim como de rejeição. Estes problemas parecem ser resolvidos através da liofilização e desmineralização do osso. O osso desmineralizado tem a capacidade de libertar PMOs com a capacidade de induzir as células do recetor a diferenciar-se em osteoblastos (66).

Apesar das regras rígidas de controlo dos dadores, foram reportados nos Centros Americanos de Controlo e Prevenção de Doença sessenta casos de infeções cruzadas devido a este tipo de enxerto. Não é realizada a esterilização dos aloenxertos, uma vez que os métodos de esterilização tendem a degradar a qualidade biológica e biomecânica dos tecidos ósseos (67).

c. Enxertos xenogénicos

Os enxertos xenogénicos podem ter origem animal, como por exemplo enxertos bovino, porcino, equino e ovino. Ainda são considerados como enxertos xenogénicos aqueles que provêm de corais calcificados e algas. O exosqueleto do coral tem notórias similaridades ao osso e é um dos poucos materiais que tem sido estudado há mais de trinta anos *in vitro*, em estudos animais e em humanos (2, 68).

Os corais pertencem à classe *Anthozoa* com mais de sete mil espécies, das quais um terço pertence ao género *Madrepora*. Estes corais formam colónias microscópicas com uma estrutura edificada por cristais de carboneto de cálcio (aragonite), de forma semelhante à formação óssea. Estes cristais podem ser convertidos em hidroxiapatite através de altas temperaturas 250-260°C e pressões de 15000psi durante 24 a 48 horas. Foi comercializado pela primeira vez em 1987, com a designação de Biocoral[®]. Os enxertos provenientes de coral possuem uma porosidade de 50% até 80% e o diâmetro dos poros varia entre os 150 e os 1000µm. Trata-se de um material apenas com capacidades osteocondutoras. No entanto, este material torna-se quebradiço e quanto à capacidade de reabsorção, esta varia consoante a porosidade, dimensão do enxerto e zona do leito recetor. Regra geral, a reabsorção das *Porites* e *goniopora* é mais rápida do que os corais de baixa porosidade como *Acropora* e sem porosidade tais como *Favites*, *Lobophyllia* e *Polyphyllia*. No caso dos corais mais utilizados, *Porites* (com um diâmetro de 150µm e 50% de porosidade), a reabsorção é muitas vezes demasiado rápida para que o novo osso preencha o defeito ósseo (2).

Atualmente, os enxertos de origem animal são amplamente utilizados. Na maioria dos casos, a manufatura destes substitutos ósseos inclui sinterizações com temperaturas até 1000°C, transformando o osso num material cerâmico. No entanto, este processo pode colocar em risco a microporosidade do osso nativo e, por essa razão, diminuir a capacidade de osteocondução. Igualmente, a reabsorção das cerâmicas é inferior à do osso

não sinterizado. Estas desvantagens podem ser ultrapassadas utilizando temperaturas até 300°C (69).

Em 1992, Brown *et al.* relataram casos de transmissões iatrogénicas de patologias devido a enxertos xenogénicos. Partículas infetadas com príões podem causar nos humanos a doença de Creutzfeldt- Jakob e encefalopatia espongiforme bovina. Devido a esta possibilidade, foram criadas normas pelas autoridades de saúde pública (69). Como foi referido anteriormente, a utilização de altas temperaturas, por períodos de tempo longos (6 horas), associadas ou não a solventes químicos, resulta num risco quase nulo de transmissão destas doenças (70).

Num estudo realizado por Piattelli *et al.* foram observadas partículas de osso bovino inorgânico após 4 anos da enxertia em elevações de seio maxilar. Nos cortes histológicos foi possível identificar osteoclastos em processos de reabsorção das partículas de osso bovino e células gigantes multinucleadas (71).

d. Enxertos aloplásticos

As limitações inerentes ao uso de enxertos de osso autólogo e xenogénico levaram ao desenvolvimento de materiais sintéticos e à procura de uma alternativa aloplástica ótima para realizar procedimentos de reparação ou regeneração óssea (72).

A utilização de enxertos aloplásticos tem vindo a aumentar tanto nos Estados Unidos da América como na Europa, devido às limitações inerentes à utilização do osso autólogo, tais como: disponibilidade limitada, tempo cirúrgico, morbidade do paciente e risco de complicações na zona dadora. Os enxertos aloplásticos são apresentados como vantajosos relativamente aos enxertos de origem animal, por não apresentarem risco de transmissão de doenças (7, 56, 67, 73).

Os fosfatos de cálcio, especialmente a hidroxiapatite e o fosfato β -tricálcico têm sido os aloenxertos mais estudados e já são comercializados há mais de três décadas (57).

O primeiro relato da utilização de fosfato tricálcico (FTC) ocorreu em 1920 num estudo realizado em coelhos, e utilizaram o termo triplo fosfato de cálcio. Neste ensaio, foi injetada uma solução de 5% de FTC na zona de fratura do rádio e verificaram um crescimento ósseo maior e mais rápido (74). A cicatrização óssea utilizando FTC é mais rápida devido à libertação de cálcio e fosfato durante a sua degradação. Contudo, esta degradação é de tal forma rápida que não possibilita a manutenção do espaço para que ocorra formação de novo osso. Assim, é frequente a associação HA/ FTC (75, 76).

O fosfato de cálcio bifásico é uma cerâmica bioativa que consiste em duas fases: a menos solúvel – HA – e a mais solúvel – β - FTC. As propriedades do FCB dependem do rácio de HA/ β - FTC (57).

Regra geral, os autores consideram que a HA é um material não reabsorvível ou é reabsorvido muito lentamente, enquanto os materiais baseados em FTC têm um rácio de reabsorção rápido (75, 76). A regeneração óssea com HA ocorre no interface com o tecido ósseo nativo, enquanto nas áreas mais distantes é observado o encapsulamento dos grânulos (77). Em situações clínicas como a de um quisto ou seio maxilar, onde se pretende colocar implantes numa fase posterior, o FTC tem a vantagem de ser substituído por novo osso rapidamente. Por outro lado, a reabsorção deste material pode ser demasiado rápida em situações onde se pretenda garantir o suporte mecânico. Neste último caso, um material de reabsorção lenta é preferível para preservar o volume aumentado (75).

Embora a HA e o FTC não existam na natureza, demonstraram induzir uma resposta celular similar à do osso. As cerâmicas de fosfato de cálcio permitem a adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Os osteoblastos diferenciados produzem colagénio tipo I, fosfatase alcalina, proteoglicanos e

proteínas da matriz óssea, tais como osteocalcina, osteopontina e sialoproteínas óssea, responsáveis pela formação óssea (7).

A natureza sintética destes substitutos ósseos torna-os perfeitamente controláveis durante a sua produção. É possível desenhar a composição química, a dimensão dos poros e as interligações destes poros, para que favoreçam a angiogénese e conseqüente chegada de células osteogénicas. É necessário ter em conta que a resposta biológica depende não só da composição química do substituto ósseo, mas também da sua percentagem de cristalinidade, características macro e microestruturais, tais como dimensão dos poros, porosidade e interconectividade (57).

A cristalinidade é definida pela fração de FCB que está envolvida numa rede cristalina, em contraste com a fração presente na fase amorfa, e crê-se ter um papel importante na adsorção, na fixação celular e na dissolução dos biomateriais. O tamanho dos cristais depende da temperatura de sinterização. A forma, tamanho e distância entre os cristais de apatite, formam a microporosidade que possui uma dimensão inferior a 10 μ m, enquanto os macroporos são maiores do que 100 μ m. A porosidade é definida pelo total de micro e macroporos (76).

A geometria dos enxertos ósseos deve favorecer a angiogénese no interior do enxerto, para que haja chegada de nutrientes até às células. A porosidade é necessária para permitir a migração e proliferação de osteoblastos, células mesenquimais, assim como para que haja deposição de matriz mineral nos espaços vazios. A microporosidade é importante na reabsorção do material, possibilita uma maior área de superfície para adesão de células, troca de iões e formação de apatite. A macroporosidade promove a osteocondutividade, uma vez que cria o espaço para que ocorra neovascularização. Existe alguma divergência no que diz respeito à dimensão dos macroporos, mas acredita-se que o tamanho ideal estará entre os 100 e 500 μ m. Além do diâmetro dos poros, deve-se atender à densidade e à conexão entre poros. A conectividade dos poros é tida como vantajosa. A continuidade espacial do sistema de poros

tem um papel importante no crescimento de novo osso, especialmente a longo prazo. Identicamente, os enxertos particulados não devem ser comprimidos em demasia para permitir a vascularização do enxerto. O osso cortical humano possui uma força compressiva entre os 90 e os 230 MPa e o osso medular varia entre os 2 e os 45 MPa (7, 76, 78).

Os fosfatos de cálcio providenciam um suporte biomecânico limitado, uma vez que são quebradiços e têm pouca força tênsil. O FTC é menos quebradiço do que a HA. No entanto, a reabsorção rápida do FTC resulta numa perda da força mecânica ao longo do tempo. Os materiais cerâmicos não devem ter altas porosidades (>90%) para não comprometer as propriedades mecânicas e integridade estrutural, antes de haver formação de novo osso (7). Normalmente a porosidade dos fosfatos de cálcio não ultrapassa os 50% (76).

A concentração de FTC influencia a adesão celular de osteoblastos e osteoclastos/monócitos à superfície do FCB. Um aumento da percentagem de FTC leva a uma redução da adesão celular. A dissolução da superfície do FCB liberta iões de Ca^{2+} . Havendo um aumento da concentração destes iões no meio extracelular, acima de um limite desconhecido, ocorre a inibição da reabsorção osteoclástica, desune os osteoclastos da superfície do FCB e, por último, provoca lise celular. Normalmente são identificados poucos osteoclastos na superfície do FCB. (76).

Um estudo realizado por Jensen *et al.* em mandíbulas de “*minipigs*” comparou a utilização de FCB (60%HA: 40% β -FTC) com HA puro, FTC puro e enxerto autólogo. Este estudo apresentou diferenças significativas entre os quatro enxertos às 2, 4 e 8 semanas, sendo que houve maior regeneração dos defeitos ósseos no enxerto autólogo, seguido do enxerto de FTC, FCB e HA. Às 24 semanas, os autores não obtiveram diferenças significativas entre as taxas de formação óssea (76).

Torna-se necessário encontrar o rácio de HA: β -FTC ideal. Foi exatamente esse objetivo que levou Jensen *et al.* (2009) a realizarem um estudo em 24

“*minipigs*”. Estes autores compararam rácios de 80:20, 60:40 e 80:20 com um controlo negativo (coágulo sanguíneo), um positivo (autoenxerto) e com um enxerto xenogénico de controlo (osso bovino liofilizado). Os enxertos foram colocados em defeitos de 9mm de diâmetro e 4mm de profundidade no ramo e corpo da mandíbula dos “*minipigs*” e cobertos por uma membrana de e-PTFE, fixa por taxas. Os animais foram sacrificados às 4, 13, 26 e 52 semanas. A análise histológica revelou uma cicatrização completa no controlo negativo às 26 semanas, embora ocorresse o colapso da membrana, devido à ausência de material de suporte. No controlo positivo foi observada formação óssea até ao limite imposto pela membrana, após 4 semanas. Não houve colapso da membrana e a remodelação óssea manteve-se desde as 13 até às 52 semanas. Os enxertos xenogénicos demonstram menos quantidade e menor grau de maturação do novo osso, relativamente aos controlos positivos. Foram detetados osteoclastos desde as 13 até às 52 semanas. No que diz respeito aos enxertos aloplásticos, ocorreu uma reabsorção extremamente rápida do FCB 80:20, sendo que às 13 semanas poucas partículas eram observáveis. A degradação das partículas ocorreu por desintegração em partículas sucessivamente menores, que posteriormente foram fagocitadas. Após 52 semanas essas mesmas partículas mantiveram-se e a densidade óssea observada foi menor do que o enxerto autólogo às 26 semanas. A formação de novo osso no FCB 60:40 foi semelhante ao enxerto xenogénico, quer em quantidade, quer em maturidade. No entanto, a formação óssea ocorreu sobretudo junto às paredes do defeito, sem grande projeção para o centro do defeito. Foram observadas células gigantes multinucleadas, mas sem lacunas de Howship. Em contraste com os enxertos xenogénicos, as células gigantes multinucleadas estavam sempre acompanhadas de tecido mole rico em células. O FCB 80:20 comportou-se de forma semelhante ao rácio de 60:40 (75).

Num ponto de vista quantitativo o FCB 20:80 obteve resultados semelhantes ao enxerto autólogo e tanto o FCB 60:40 como o FCB 80:20 comportaram-se como o enxerto xenogénico (75).

Segundo Jensen *et al.* (2009) o rácio de 60/40 de hidroxiapatite/fosfato beta-tricálcico resulta numa baixa taxa de reabsorção e ajuda a manter enxertos autólogos (75).

Straumann®BoneCeramic é um substituto ósseo sintético, osteocondutor, composto por FCB e contém um rácio de 60% de hidroxiapatite e 40% de fosfato beta-tricálcico. As temperaturas de sinterização estão entre 1100 e 1500°C. Tem uma porosidade de 90%, e o diâmetro das partículas situa-se entre 100 a 500µm. Esta cerâmica é 100% cristalina (76, 77). Através da microscopia eletrónica é possível visualizar a porosidade e a textura irregular deste material. A imagem seguinte foi publicada por Tirkkonen *et al.* (79).

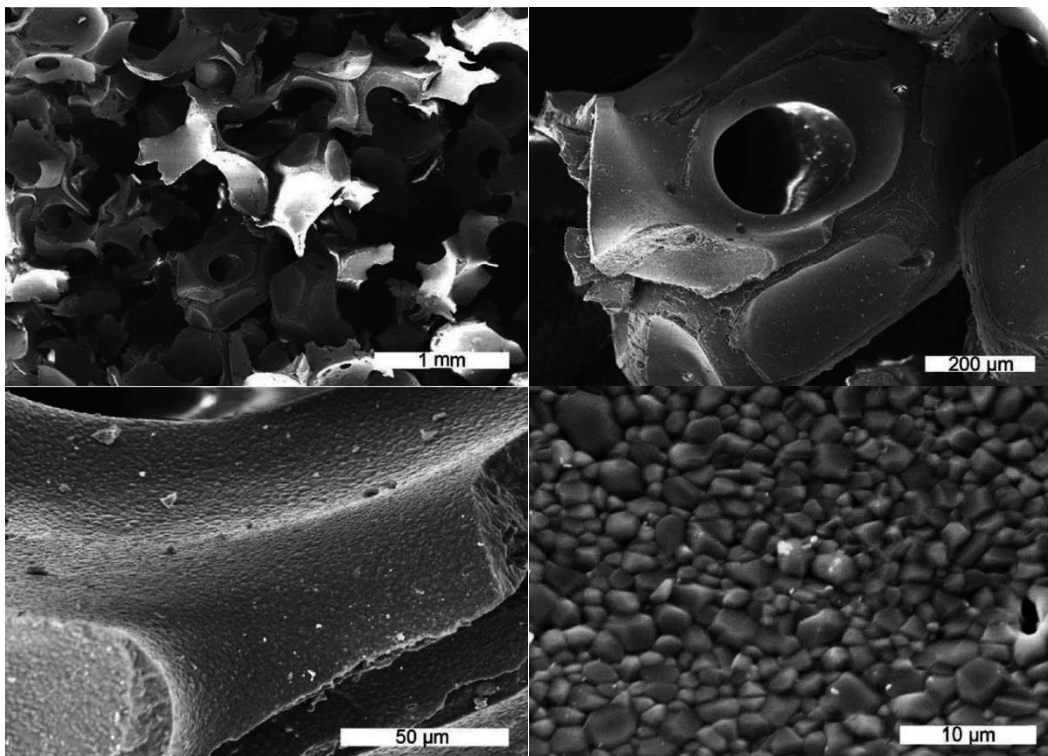


Ilustração 2 - Digitalização de imagens de microscopia eletrónica das partículas de Straumann®BoneCeramic, com ampliações de 20x, 80x, 500x e 2000x. Adaptação de Tirkkonen *et al.* (2013)

Os enxertos biovidro (BV) são biomateriais à base de sílica, descobertos por Hench em 1971. O critério característico para a bioatividade é uma percentagem menor que 60% de dióxido de sílica (SiO_2) na constituição dos enxertos de BV. Os outros constituintes incluem Na_2O , CaO e P_2O_5 . Mais recentemente foram modificadas em $\text{Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$. (67). Quando implantados *in vivo* há formação de uma camada de gel de sílica com uma zona superficial de carbonato de hidroxiapatite. A sua biologia celular e molecular na regeneração óssea ainda não é totalmente conhecida, no entanto os enxertos de BV são amplamente utilizados, especialmente na área ortopédica (58). Na Medicina Dentária um dos enxertos de BV mais utilizadas é o PerioGlas[®] (80). Num estudo realizado por Virolainen *et al.* em ratos, verificaram que os enxertos de BV apresentam propriedades osteocondutoras e osteopromotoras da migração, replicação e diferenciação de células osteogénicas que, por sua vez, produzem matriz óssea. Observaram que existiu produção de citocinas: fator beta de transformação do crescimento, que induzem a síntese de colagénio tipo I. No entanto os enxertos de BV não revelaram crescimento ósseo em zinas ectópicas, i. e., não são osteoindutoras (58).

Os enxertos de BV induzem um alto *turnover* ósseo, podendo-se modificar a composição química para que a reabsorção seja mais lenta (anos) ou mais rápida (semanas). Apresentam propriedades antimicrobianas, através da inibição do crescimento das bactérias (67).

Materiais aloplásticos como HA e o FTC quando utilizados para regenerações de defeitos periodontais em humanos demonstraram ter sucesso no preenchimento ósseo e na diminuição da profundidade de sondagem, mas existe pouca evidência na criação de novo tecido conectivo. Froum, *et al.* referem que os enxertos de BV têm a capacidade de ligar-se tanto aos tecidos duros como aos tecidos moles. Estes autores testaram enxertos de BV em RTG e concluíram que houve melhorias significativas na redução da profundidade de sondagem, preenchimento dos defeitos ósseos e melhorias na inserção clínica (80, 81).

Turunen *et al.* sugerem a utilização de enxertos de BV juntamente com enxertos particulados de osso autólogo para realizar cirurgias de elevação de seio maxilar, diminuindo a quantidade de osso autólogo necessário (82).

II.1.vii. Indicações clínicas do fosfato de cálcio bifásico e da membrana de polietileno glicol na ROG

O osso autólogo é o mais eficaz em ROG e RTG, mas o seu carácter limitado e a morbidade associada à zona dadora do paciente levam à utilização de substitutos ósseos. A ocorrência de defeitos craniofaciais é frequente e pode estar relacionada com trauma, anomalias de desenvolvimento, ressecção tumoral, infeção ou outros tipos de patologia (5, 83).

Quando a disponibilidade óssea é limitada existe a possibilidade de utilizar implantes curtos (5 a 8,5mm) ou implantes com diâmetros reduzidos (3mm ou menos). No caso da maxila ainda se poderá considerar a utilização de implantes zigomáticos. Tudo depende da situação clínica e da experiência profissional do clínico. Contudo, na Medicina Dentária a utilização de substitutos ósseos tem vindo a aumentar devido ao número frequente de casos clínicos com necessidade de aumentar a disponibilidade óssea para colocação de implantes dentários ou para corrigir defeitos ósseos existentes (36).

Pelo facto do Straumann® BoneCeramic ser um material relativamente recente e a membrana de PEG ser ainda experimental, os estudos científicos realizados em humanos que testam a eficácia dos mesmos em conjunto ou separados são limitados e muitas vezes possuem amostras reduzidas.

a. Elevação do seio maxilar

A elevação do seio maxilar para permitir a inserção de implantes dentários, quando o osso alveolar residual é insuficiente, pode ser considerado um procedimento seguro e eficaz. Existem vários procedimentos cirúrgicos para elevar o seio maxilar. As variações mais importantes dizem respeito à utilização

de uma abordagem lateral ou crestal, o tempo de espera para colocação do implante dentário relativamente ao substituto ósseo utilizado, o tipo de enxerto e o tipo de implantes utilizados. Vários tipos de enxertos têm sido utilizados na elevação do seio maxilar. Tem sido proposta a utilização de osso autólogo, enxertos alogénicos, xenogénicos, aloplásticos e misturas de vários materiais. O osso autólogo, apesar de ser o único osteocondutor e osteoindutor, carece de disponibilidade ilimitada e aumenta a morbilidade pós-operatória, tal como já foi referido anteriormente. A utilização de substitutos ósseos é frequente, no entanto a comparação dos diferentes estudos é dificultada pela utilização de diferentes metodologias: dimensão da crista residual, implante imediato *versus* tardio e diferentes tipos de materiais e membranas (84). A decisão entre a colocação simultânea do implante ou colocação tardia depende da estabilidade primária do mesmo. Segundo Peleg *et al* (1998, 1999) em reabsorções severas da maxila é necessário existir uma dimensão de osso residual mínima de 4 a 5mm para que a colocação de implantes simultaneamente à elevação de seio maxilar resulte numa estabilidade primária suficiente (85).

Até à data, a maioria dos estudos comparativos entre o Straumann® BoneCeramic e o BioOss® dizem respeito a elevações do seio maxilar. Os resultados parecem indicar que ambos os materiais exibem propriedades osteocondutoras e estão indicados para cirurgias de elevação do seio maxilar (83, 84, 86-88). Contudo as dimensões das amostras utilizadas nestes estudos são reduzidas.

Cordaro *et al.* (2008) realizaram um estudo clínico multicêntrico randomizado que envolveu 37 pacientes e 48 elevações de seio maxilar pela técnica da janela lateral. A altura óssea residual foi maior ou igual a 6mm e a largura situou-se entre maior ou igual a 3mm e menor do que 8mm. Do total da amostra, 23 seios maxilares foram enxertados com osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) e o grupo de teste incluiu 25 elevações de seio maxilar com FCB (Straumann® BoneCeramic). Foram utilizadas membranas de colagénio porcino (Bio-Gide®). Após 6 a 8 meses de cicatrização foram recolhidas as amostras e os resultados histomorfométricos revelaram ausência de diferenças

significativas na quantidade de osso mineralizado entre o grupo de teste (38,3%) e o controlo (45,2%). É importante referir que houve maior presença de novo osso nas zonas próximas à crista residual, relativamente às áreas mais centrais do seio maxilar. Houve menor percentagem de FCB remanescente (26,6%) e consequentemente maior percentagem de tecido mole (46,4%) do que nas amostras de osso bovino inorgânico (37,7% e 40,3%, respetivamente). Este último apresentou maior contacto enxerto-novo osso do que o FCB (48,2% vs 34,0%). Estas diferenças podem dever-se às diferenças estruturais e à área total disponível (macroporosidade e morfologia). Os autores referem que todos os implantes obtiveram boa estabilidade inicial, no entanto não consideraram a possibilidade de dita estabilidade se dever às cristas ósseas remanescentes com uma altura superior ou igual a 6mm. Os autores concluíram que ambos os materiais estão indicados em cirurgias de elevação do seio maxilar (84). Igualmente, num estudo publicado em Maio de 2013 com uma amostra de 94 implantes e 53 biópsias ósseas, os autores referem o Straumann® BoneCeramic como sendo um material apropriado para realizar procedimentos de elevação de seio maxilar. Este enxerto aloplástico obteve $30,28 \pm 2,16\%$ de novo osso formado e uma quantidade remanescente após 5 meses de regeneração, significativamente inferior ($15,8 \pm 2,1\%$) ao osso bovino inorgânico ($21,36 \pm 4,83\%$) (85). Nestes estudos não avaliaram a sobrevivência dos implantes. Relativamente a este assunto, a taxa de sobrevivência de um total de 40 implantes, colocados em 15 pacientes e avaliados após um período médio de 15 meses, foi de 92,5% (83).

b. Preservação do alvéolo pós-extraccional

No que respeita aos alvéolos dentários, estes cicatrizam entre um a dois meses após ser realizada a exodontia. Durante o processo de cicatrização existe diminuição da largura e altura ósseas que, em certos casos, pode dificultar a colocação de implantes dentários e comprometer esteticamente a reabilitação protética. Tem sido proposto realizar a preservação do alvéolo pós-extraccional com aplicação de substitutos ósseos e utilizando membranas oclusivas (89).

A utilização de Straumann® BoneCeramic foi relatada com decepção por Coster *et al.* (2009), ao encontrarem pouca formação de novo osso e menos mineralizado do que os controlos (14 alvéolos não enxertados), após terem realizado preservação de alvéolos pós-extraccionais com este substituto ósseo. De uma mostra de 15 pacientes, 5 implantações foram adiadas devido à insuficiente regeneração, com presença de tecido mole infetado, e as restantes foram analisadas histologicamente. Os autores consideraram que o FCB atrasou a formação óssea, uma vez que os melhores resultados foram obtidos após 74 semanas de cicatrização e, os piores, às 38 semanas. Contudo, não foram utilizadas membranas para cobrir os alvéolos, facto que poderá ter ditado estes resultados (89)

c. Rebordo Alveolar – aumentos ósseos verticais e horizontais

Esposito *et al.* realizaram uma revisão sistemática para averiguar a eficácia dos aumentos ósseos horizontais e verticais. Os autores, baseados em dois ensaios clínicos randomizados, concluíram que os aumentos verticais com técnicas *inlay* resultaram num maior número de implantes perdidos e mais complicações, tais como dores, número de dias de hospitalização, custos e períodos de tratamento superiores. Os blocos de osso bovino inorgânico parecem ser apropriados para realizar aumentos ósseos verticais, mas apresentam um risco superior aos blocos de osso autólogo e são necessários mais 3 meses de tempo de espera. De oito ensaios clínicos randomizados concluíram que a distracção óssea é a técnica que permite um maior aumento vertical, embora refiram como desvantagens o custo superior, ocorrência de falhas do aumento vertical e parestesias. Os aumentos verticais com ROG utilizando membranas não reabsorvíveis e osso autólogo particulado obtiveram problemas associados a exposição das membranas e infeções. São poucos os artigos que dizem respeito à utilização de FCB em aumentos ósseos verticais e estão associados à utilização de blocos de osso autólogo (36).

Para aumentos ósseos horizontais a evidência clínica favorece os blocos de osso autólogo sozinhos ou combinados com osso bovino inorgânico. Segundo

Jensen e Terheyden (2009) o ganho médio em largura da crista óssea varia entre 4,4mm com bloco de osso autólogo e 2,6mm, quando são utilizados substitutos ósseos (56).

A presença de um defeito horizontal na crista óssea remanescente pode resultar numa deiscência ou fenestração óssea, após a colocação de implantes dentários (90).

Segundo Assche *et al.* (2012) o Straumann®BoneCeramic também está indicado em regenerações de deiscências ou fenestrações, concomitantes à colocação de implantes dentários. Após seis meses e meio da colocação de 14 implantes dentários e regeneração óssea das deiscências/fenestrações existentes, verificaram uma diminuição dos defeitos verticais de, em média, $6,4 \pm 2,2$ mm para $1,9 \pm 1,2$ mm. Não houve diferenças significativas relativamente às regenerações (n=14) efetuadas com Bio-Oss® (90).

Tal como foi referido anteriormente, existem apenas dois estudos referentes à utilização da membrana de PEG em humanos e ambos avaliam a função desta membrana em combinação com o Straumann®BoneCeramic em deiscências ósseas. Ambos os estudos referem não encontrar diferenças estatisticamente significativas entre regenerações de deiscências ósseas com colocação simultânea de implantes realizadas com esta membrana experimental e a membrana de colagénio (49, 55).

Diversos ensaios realizados em animais apontam para um comportamento semelhante entre as membranas de colagénio e a membrana de PEG (48, 49, 51, 54). Parece ser que estas membranas exibem as qualidades necessárias a qualquer tipo de regeneração óssea necessária. Foi demonstrado serem biocompatíveis (51, 91), servirem de barreira oclusiva (20, 52), permitirem a integração tecidual, conferirem rigidez capaz de criar e manter o espaço (20, 47). Além disso possuem um fácil manuseamento e a reação tecidual que existe durante a fase de reabsorção é mínima (20, 54).

II.1.viii. Modelo animal

Diversos estudos relatam a possibilidade de utilizar modelos animais para realizar regeneração óssea através da utilização de técnicas de ROG (19-21, 26, 47, 48, 54, 92).

A utilização de ratos Wistar em ensaios experimentais de regeneração óssea é frequente na comunidade científica (5, 41, 51, 59, 72, 73, 93-101). Trata-se de um modelo animal com características que nos permitem avaliar regenerações ósseas de forma descomplicada e com custos mais reduzidos do que outras espécies. Convém referir que possui uma desvantagem: o crânio de um rato adulto possui uma quantidade limitada de osteoblastos devido à pequena quantidade de osso medular presente entre a cortical interna e a externa (73).

A reparação óssea de defeitos criados no osso femoral e no osso parietal dos ratos Wistar, sem qualquer adição de substitutos ósseos, foi descrita num artigo de Takeuchi *et al.* (2009). No osso femoral, após 3 dias, o defeito estava preenchido por coágulo sanguíneo e tecido necrosado, Nas proximidades das áreas necrosadas, as células medulares eram escassas. Foi detetado tecido de granulação nos extremos circundantes ao defeito ósseo. Nas amostras com 5 dias de cicatrização houve formação de matriz trabecular osteóide, considerado calo ósseo, nas zonas de granulação. Após 1 semana houve formação de tecido fibroso a partir do calo ósseo que, aparentemente, impedia a formação de osso osteóide de conectar os extremos do defeito ósseo. Houve uma diminuição do osso trabecular calcificado passadas 2 semanas e a camada osteóide superficial que selava o defeito evoluiu para osso cortical. Às 4 semanas o osso trabecular praticamente desapareceu. Ocorreu reparação completa do defeito ósseo após 8 semanas, notando-se apenas uma linha de osso trabecular na zona interna da medula óssea. No que diz respeito ao osso parietal, a reparação óssea foi incompleta ou retardada. Aos 3 dias os defeitos estavam preenchidos por coágulo e tecido necrosado. Após 5 dias houve proliferação celular e formação de tecido de granulação. Contudo, os osteoblastos não se diferenciaram, com a exceção de uma pequena minoria

que formaram osso osteóide entre os 5 dias e 1 semana. Estes osteoblastos foram considerados como provenientes dos bordos periféricos dos defeitos. A calcificação do osso osteóide ocorreu centripetamente, mas ocorreu sobretudo nas zonas periféricas e não houve preenchimento completo dos defeitos. Às 8 semanas a área central do defeito estava preenchida com tecido fibroso (59).

Neste mesmo estudo, os autores avaliaram histologicamente o efeito do fosfato beta-tricálcico na reparação dos defeitos ósseos. Referem ter existido um efeito osteocondutor notável, no entanto o defeito não foi totalmente regenerado. No quinto dia, observaram células chatas e cúbicas, provenientes do tecido de granulação, a rodear as partículas enxertadas. Após 1 semana houve formação de osso osteóide ao redor das partículas que, na maioria dos casos, estavam junto aos bordos dos defeitos. Contudo, após 8 semanas a formação óssea foi incompleta e houve formação de tecido fibroso. Os autores explicam o sucedido devido à ausência de diferenciação dos osteoblastos ao redor das partículas de β -FTC (59).

Num estudo realizado por Jones *et al.*, foram utilizados 60 ratos Wistar para testar a regeneração óssea e as propriedades biomecânicas de três enxertos diferentes: hidroxiapatite coralina, osso autólogo desmineralizado, osso autólogo e, como controlo, o defeito crítico de 5mm sem preenchimento. Estes autores verificaram que, após 6 meses de cicatrização, os grânulos de HA ficaram rodeados de tecido fibroso, sem adesão a este. Em contraste com os controlos, em que houve igual formação de uma camada fibrosa, mas sem estar separada por grânulos. Relativamente ao osso autólogo, o desmineralizado obteve maior regeneração e resistência do que o osso autólogo em *chips* (73).

No que respeita ao fosfato de cálcio bifásico, um estudo realizado em 20 ratos Wistar testou a regeneração óssea de defeitos críticos de 5mm em espessura total com FCB. Como controlo deixaram o segundo defeito do osso parietal sem preenchimento. Os autores constataram, histologicamente, que os animais sacrificados aos 3 e 6 meses de cicatrização não tiveram regeneração dos

defeitos ósseos, apenas ficaram preenchidos por tecido denso de colagénio. Nas amostras foi possível observar a presença de células gigantes multinucleares, compatíveis com osteoclastos. O material não apresentou propriedades osteocondutoras (72). Um outro estudo avaliou a regeneração óssea a longo prazo, i. e., 24 meses, em defeitos criados no osso parietal de 12 ratos Wistar. Os autores concluíram que o FCB não promoveu a regeneração óssea dos defeitos críticos (com diâmetro de 5mm e espessura total) (93).

Existem outros fatores que podem influenciar a regeneração óssea e que são passíveis de serem avaliados mediante a utilização deste modelo animal. Num estudo realizado por Moreira e Vasconcelos (2011), foram utilizados 10 ratos Wistar para verificar a influência hormonal na regeneração óssea. Os autores realizaram dois defeitos ósseos de 4 mm no osso parietal dos ratos e preencheram os defeitos com matriz óssea equina. Dividiram os animais em três grupos: 3 animais receberam apenas o enxerto (grupo de controlo), 3 animais receberam o enxerto e injeções semanais de 0,05ml (2UI) calcitonina de salmão e os restantes 4 receberam enxertos e injeções semanais de 0,031ml grelina de rato. Após 5 semanas, a administração de grelina favoreceu a neoformação óssea em torno dos grânulos de biomaterial e os resultados foram ainda mais positivos na calcitonina à 7ª semana (5).

a. Defeito crítico

O termo defeito crítico define-se como sendo a lesão óssea mais pequena sem capacidade de regenerar por si só, mediante formação óssea durante a vida do animal. Embora existam divergências na literatura sobre o diâmetro do defeito crítico, vários autores confirmaram que um defeito ósseo de 5mm de diâmetro em espessura total funciona como um defeito crítico nos ratos Wistar, existindo apenas formação de tecido fibroso em vez de osso (72, 73, 92, 94, 96).

Um defeito ósseo crítico (5mm) realizado no crânio de ratos Wistar cicatriza através de tecido fibroso não por formação óssea (73).

II.2. Material e Métodos

II.2.i Amostra

O presente estudo experimental foi aprovado pela Direção Geral de Agricultura e Veterinária, de acordo com o disposto no artigo 8º da Portaria nº1005/92, de 23 de Outubro de 1992, relativo à “proteção dos animais utilizados para fins experimentais e/ou outros fins científicos”. Foram utilizados um total de 7 ratos Wistar com 19-21 semanas, cujo peso variou entre os 290 e 390g. Durante o período do ensaio experimental foram isolados em gaiolas e colocados num armário com as condições ideais de temperatura, circulação de ar, pressão e ciclos de luz/escuridão. Foram, igualmente, alimentados com a devida ração/água e vigiados todos os dias.

II.2.ii Preparação dos materiais

Neste ensaio experimental utilizou-se fosfato de cálcio bifásico sob a forma de grânulos de 400 a 700µm de diâmetro e 90% de porosidade, com o nome comercial Straumann®BoneCeramic e a membrana experimental de hidrogel de polietileno glicol, Straumann®MembraGel.

Antes da utilização do fosfato de cálcio bifásico, procedeu-se à hidratação deste material com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%, 250ml, Braun).

Foram utilizadas 7 seringas de hidrogel de PEG. Uma vez que este material tem que ser armazenado no frigorífico, as seringas foram sendo retiradas do frio 30min antes de cada uma das cirurgias, de modo a que pudessem ficar à temperatura ambiente. Na altura da aplicação, procedeu-se à ativação do hidrogel seguindo as instruções do fabricante:

1. Removeram-se as cápsulas de fecho das pontas das quatro seringas.

2. Ligaram-se as seringas de vidro com a etiqueta “PEG” às seringas de plástico com a etiqueta “Ativador”, de modo a que os símbolos (triângulos/retângulos) nas etiquetas das seringas correspondessem. Pressionou-se até fazer um clique.
3. Misturaram-se os componentes PEG e os respectivos ativadores 15 vezes. No final todo o hidrogel ficou contido na seringa de vidro com a etiqueta “PEG”.
4. Premiu-se o botão vermelho para separar as duas seringas.
5. Uniu-se a ponta aplicadora.

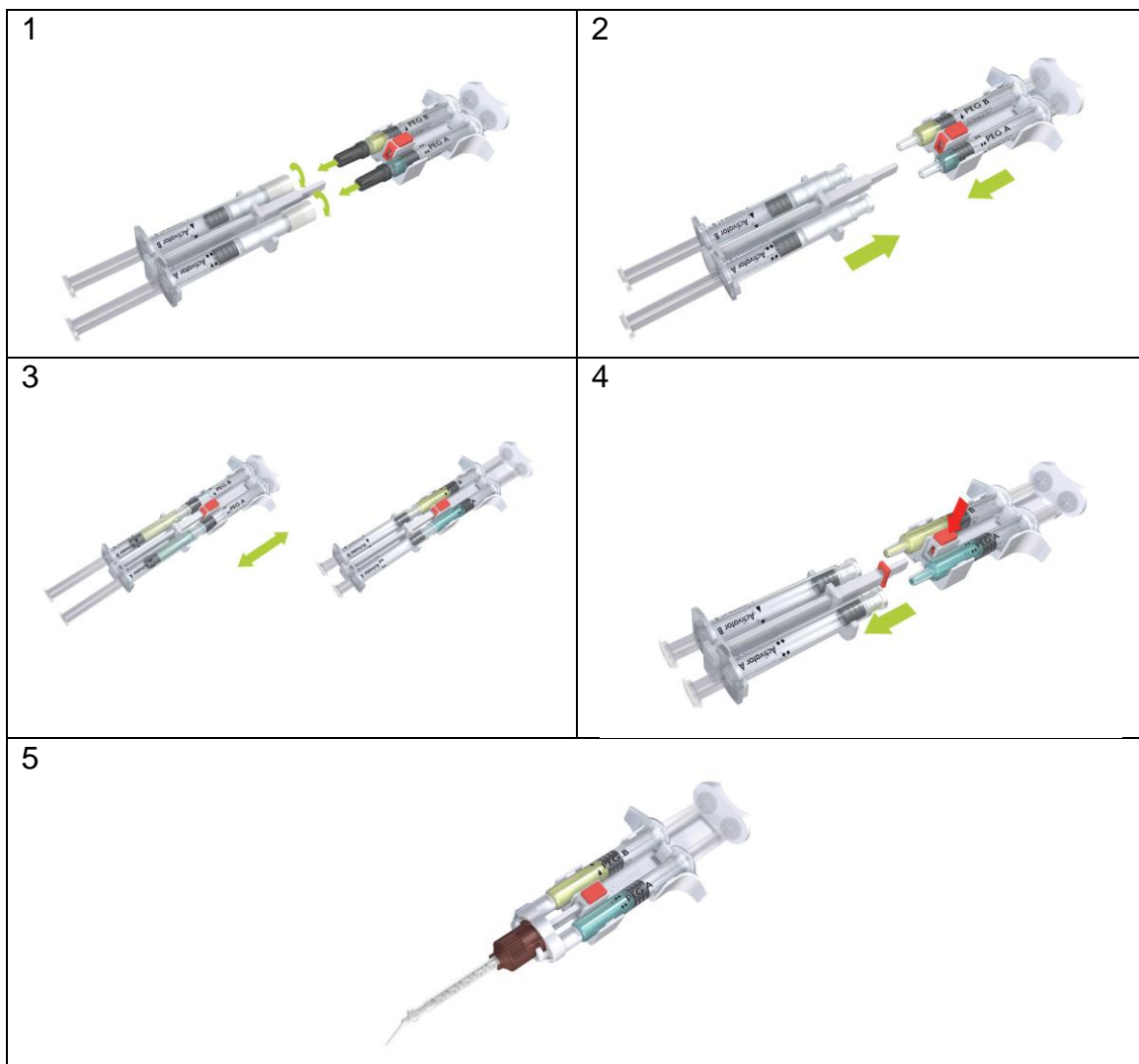


Ilustração 3 - Instruções de preparação da membrana de PEG – Strauman® MembraGel (102)

II.2.iii Procedimento cirúrgico

Os ratos Wistar foram submetidos a anestesia geral e operados, um de cada vez, pelo mesmo operador. Inicialmente foram introduzidos numa câmara e submetidos a anestesia inalatória com isoflurano (IsoGlo[®], veterinária Esteve). Seguiu-se uma injeção intra-peritoneal constituída por 7,5mg/Kg de Ketamina (Imalgène[®] 1000, Merial) e 5mg/Kg de Xizalina (Rompum[®], Bayer HealthCare), na proporção de 1:1.

Os ratos foram pesados e colocados sobre uma plataforma aquecida à temperatura corporal. A área da calote craniana foi desinfetada com uma solução iodada (Betadine[®], solução subcutânea 100mg/ml, MEDA Pharma).



Ilustração 4 - Rato Wistar sobre plataforma aquecida.

Utilizou-se um bisturi com a lâmina nº 15 para realizar-se uma incisão sagital ao nível da sutura interparietal, desde a parte posterior da sutura coronal até à sutura parieto-occipital. O plano cutâneo e o perióstio foram descolados, utilizando descoladores e pinças de dissecação, para aceder aos ossos parietais. Foram realizados dois defeitos ósseos circulares bilaterais nos ossos parietais, ambos com 5mm de diâmetro, em espessura total, e separados por uma distância de 2mm. Para esse efeito foi empregue uma chave de metal padronizada. Utilizaram-se brocas esféricas laminadas montadas em peças de baixa rotação, com irrigação de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%, 250ml,

Braun). Procurou-se realizar os defeitos sem atingir o seio sagital, nem a dura-máter. Os defeitos não interferiram com as suturas anteriormente mencionadas.

Os defeitos criados nos ossos parietais esquerdos foram utilizados como defeitos de controlo e, por conseguinte, definiram-se os defeitos realizados nos ossos parietais direitos com defeitos de teste. Esta seleção foi aleatória.

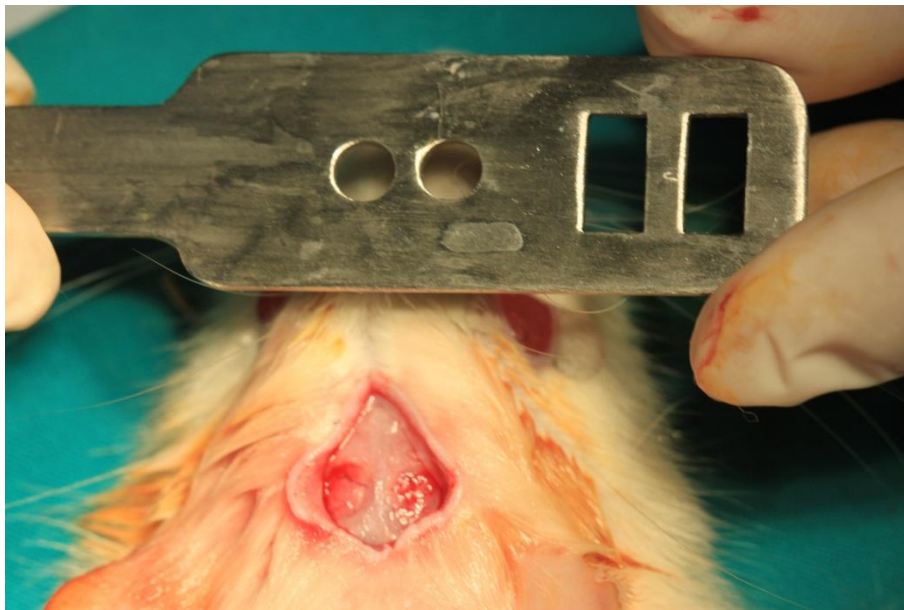


Ilustração 5 - Defeitos criados com auxílio a uma chave de metal padronizada.

Os defeitos ósseos foram regenerados da seguinte forma:

- **Controlos** (osso parietal esquerdo): defeitos cobertos com membranas de hidrogel de PEG.
- **Testes** (osso parietal direito): defeitos preenchidos com enxertos aloplásticos de FCB e cobertos com membranas de PEG.

Teve-se o cuidado de aplicar uma camada de hidrogel tão fina quanto o possível e de a prolongar 2 a 3mm além dos defeitos ósseos.

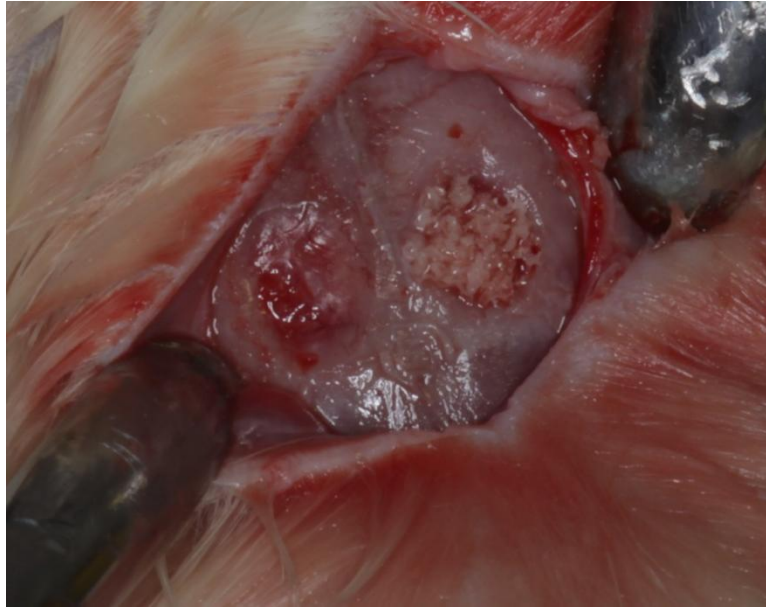


Ilustração 6 - Defeito crítico esquerdo sem preenchimento, defeito crítico direito com preenchimento de FCB particulado.

Após aproximadamente 90 segundos da aplicação do hidrogel de PEG, verificou-se a alteração da cor azul translúcido para opaco, resultante da sua solidificação. Não foram necessários meios retentivos, ocorrendo fixação da membrana *per si*.

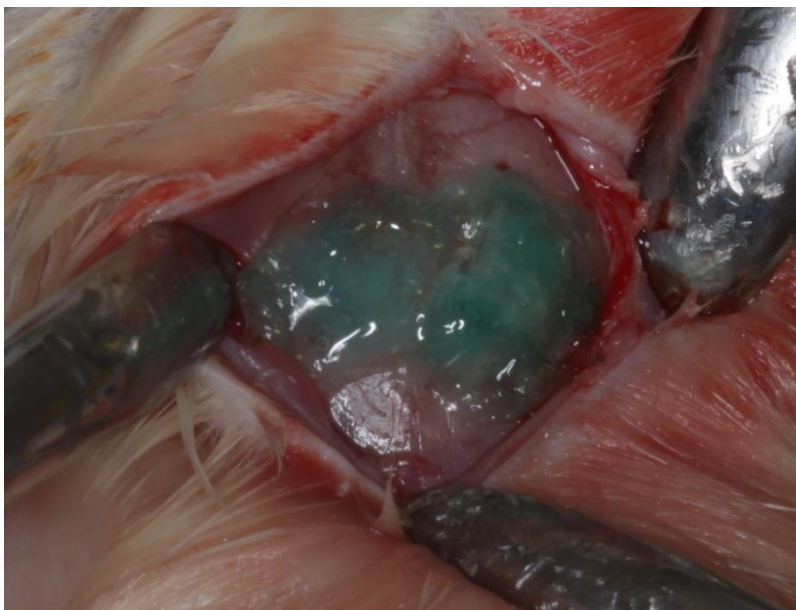


Ilustração 7 - Recobrimento dos defeitos com a membrana de hidrogel de PEG.

Procedeu-se à reposição e à sutura do perióstio e da camada cutânea, com pontos simples de sutura reabsorvível de ácido poliglicólico entrançado (Safil® 4/0, Braun).

II.2.iv Análise radiográfica

Antes da obtenção das amostras, foram realizadas radiografias coronais às calotes cranianas dos ratos, com um aparelho de raios-X móvel (Trophy®). Utilizaram-se películas fotossensíveis de fósforo, um sistema de leitura de películas (DenOptix™ Digital imaging System, Dentsply International Inc.) através do programa informático VixWin PRO. A ilustração seguinte demonstra o procedimento e a digitalização das imagens.

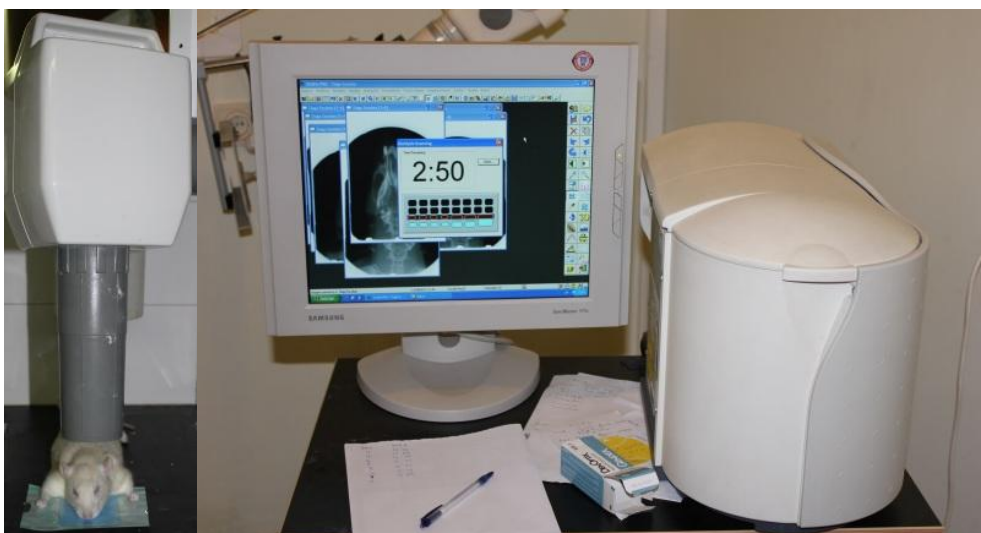


Ilustração 8 – Radiografia coronal à calote craniana do rato Wistar e digitalização através do programa informático VixWin PRO.

II.2.v Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados após 60 dias de espera, através da inalação de dióxido de carbono numa câmara fechada.

Fez-se uma incisão com as características referidas anteriormente e, cuidadosamente, dissecaram-se os tecidos moles até expor a zona dos

defeitos ósseos. Para obter a peça operatória, foram utilizados discos de tungsténio, montados em contra-ângulo de baixa rotação e irrigados com abundante soro fisiológico estéril. A osteotomia foi realizada num formato quadrangular, mantendo-se margens de segurança a toda a volta da zona operada, que era bem visível. Após destacar o bloco ósseo, marcou-se a zona anterior de ambas as amostras e dividiu-se o bloco pela sutura interparietal, separando o controlo, do teste. As amostras foram colocadas em frascos de plástico devidamente identificados, com formaldeído a 4% em tampão fosfato, pH=7,4 e remetidas para realizar o processamento histológico no Laboratório de Anatomia Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

II.2.vi Preparação das amostras para histologia

Mantiveram-se as amostras nas soluções de formaldeído, referidas anteriormente, durante 48h para obter a fixação das peças.

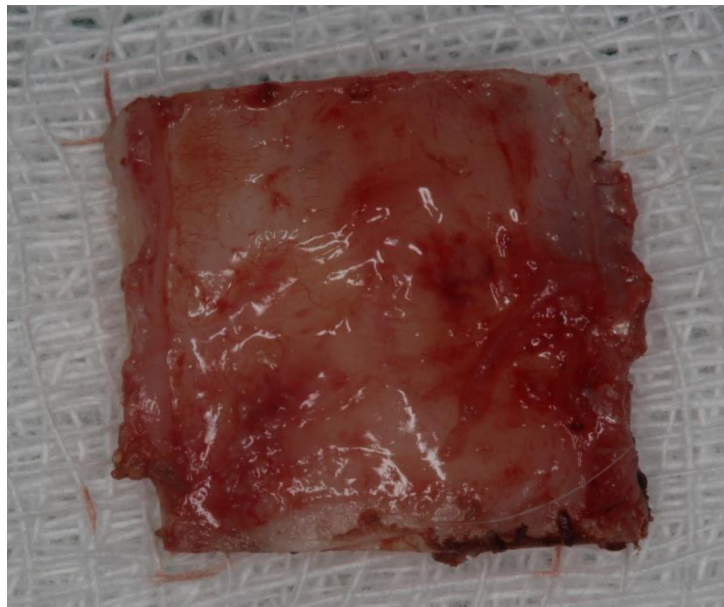


Ilustração 9 - Amostra de tecido ósseo, recolhida de um animal sacrificado.

A desidratação das amostras foi conseguida através da submersão em soluções de etanol sucessivamente mais concentradas: 70%, 80%, 90% e

100%, durante períodos de 48h. Foram feitos 3 ciclos na solução de etanol a 100%. Posteriormente, as amostras foram impregnadas com metilmetacrilato (Merck Schuchardt OHG - Merck KGaA, Hohenbrunn, Germany) e incluídas no mesmo produto. Aplicou-se vácuo nos frascos durante 15 minutos, para evitar bolhas, e já com os frascos fechados, colocou-se em banho-maria a 37°C durante 48h, para ocorrer total polimerização dos blocos. Os blocos foram cortados com um micrótomo de disco de diamante (Accutom - Struers A/S, Ballerup, Denmark) a 2500rpm, de modo a obter cortes com espessuras entre 150 e 200µm. Utilizou-se um equipamento de polimento (Struers DAP-8, Struers A/S, Ballerup, Denmark) para obter espessuras de aproximadamente 40µm, confirmadas por um micrótomo digital (Digimatic Micrometer[®], Mytotuyo Japão). As amostras foram coradas com “Solochrome” e montadas em lâminas de vidro, coladas com Permacol (Ind Permacol UV[®], Adhesive 327/3, Permacol Ind., Holanda), polimerizado com luz ultravioleta. A colocação da lamela sobre a amostra seguiu o mesmo procedimento. As lâminas foram devidamente identificadas.

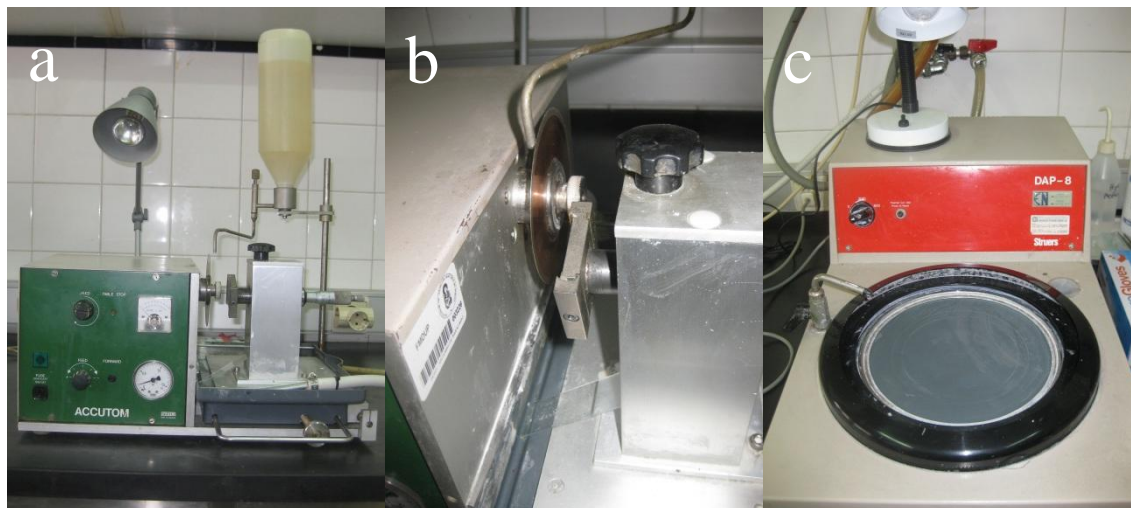


Ilustração 10 - a – micrótomo de disco de diamante (Accutom - Struers A/S, Ballerup, Denmark), com solução lubrificante; b – detalhe do disco de diamante; c – equipamento de polimento (Struers DAP-8, Struers A/S, Ballerup, Denmark).

II.2.vii Análise microscópica

As lâminas foram observadas num microscópio Leica DMLB[®] Type 020-519.010 LB30T (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heerbrugg, Germany). Foram obtidas imagens através de uma câmara fotográfica digital Leica DFC295 (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Germany). Utilizaram-se objetivas Leica de diversas ampliações (2,5x, 5x, 10x, 20x e 40x) e oculares Leica com aumento de 10x.



Ilustração 11 - Microscópio ótico Leica, câmara fotográfica Leica, sistema informático Leica Application Suite e mesa digital.

II.2.viii Análise histomorfométrica

As medições das áreas dos defeitos e da regeneração foram efetuadas através das imagens obtidas com a objetiva de 2,5x e utilizando o programa Leica Application Suite, Version 3.5.0 (Leica Microsystems, Ltd, Switzerland). Para melhor delineação das áreas a quantificar, foi empregue uma caneta e mesa digitais (Wamboo Pen & Touch, Wacom Company, Ltd), tendo-se medido a área total do defeito e área total de osso regenerado.

II.2.ix Análise Estatística

As áreas apuradas foram exportadas para o programa Microsoft Office Excel[®] 2010, em folhas individuais para cada um dos momentos de recolha de dados. Posteriormente, estes foram transferidos para o programa informático SPSS Statistics versão 18 (IBM, Armonk, New York, U.S.), através do qual se procedeu à análise estatística das variáveis. Após realizar uma análise descritiva da amostra, utilizou-se as percentagens de regeneração para continuar com a análise. Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnova para verificar a normalidade da amostra. A comparação dos grupos foi realizada através de um teste paramétrico, nomeadamente o Teste T. Em toda a análise estatística foi considerado um índice de confiança de 95%, com um erro α igual a 5%.

II.3. Resultados

II.3.i. Cirurgia experimental

Todos os animais sobreviveram durante o período de experimentação, não se verificando qualquer anomalia que levasse à exclusão de algum animal em estudo. No local da ferida cirúrgica não foram observados quaisquer sinais de infeção, nem de resposta inflamatória, Os ratos sofreram aumentos de peso compatíveis com o seu ciclo natural de crescimento, sendo a média de aumento de peso igual a 132g por animal.

Tabela 3 - Género e peso inicial/final dos ratos.

RATO	Peso Inicial (g)	Género	Peso Final (g)	Diferença (g)
1	300	F	435	+135
2	290	F	455	+165
3	350	F	466	+116
4	355	F	482	+127
5	330	M	420	+90
6	350	M	520	+170
7	370	M	490	+120

II.3.ii. Análise macroscópica

Através da observação macroscópica da área regenerada, pudemos constatar que a membrana de PEG se manteve intacta após 60 dias de ROG e que a área do osso parietal direito apresentava um aspeto mais irregular do que o controlo. Foi detetado um aumento do volume da membrana, em todas as amostras.



Ilustração 12 – Aspeto macroscópico das lesões após dois meses.

II.3.iii. Análise radiográfica

As radiografias coronais realizadas às cabeças dos ratos Wistar permitiram identificar a presença do enxerto particulado de FCB nos defeitos de teste e uma radioluscência nos defeitos de controlo, após 60 dias de ROG.

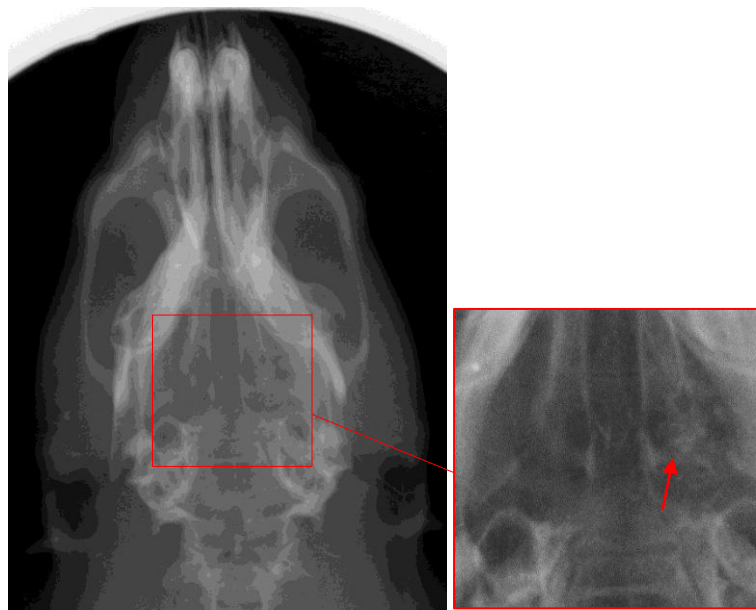
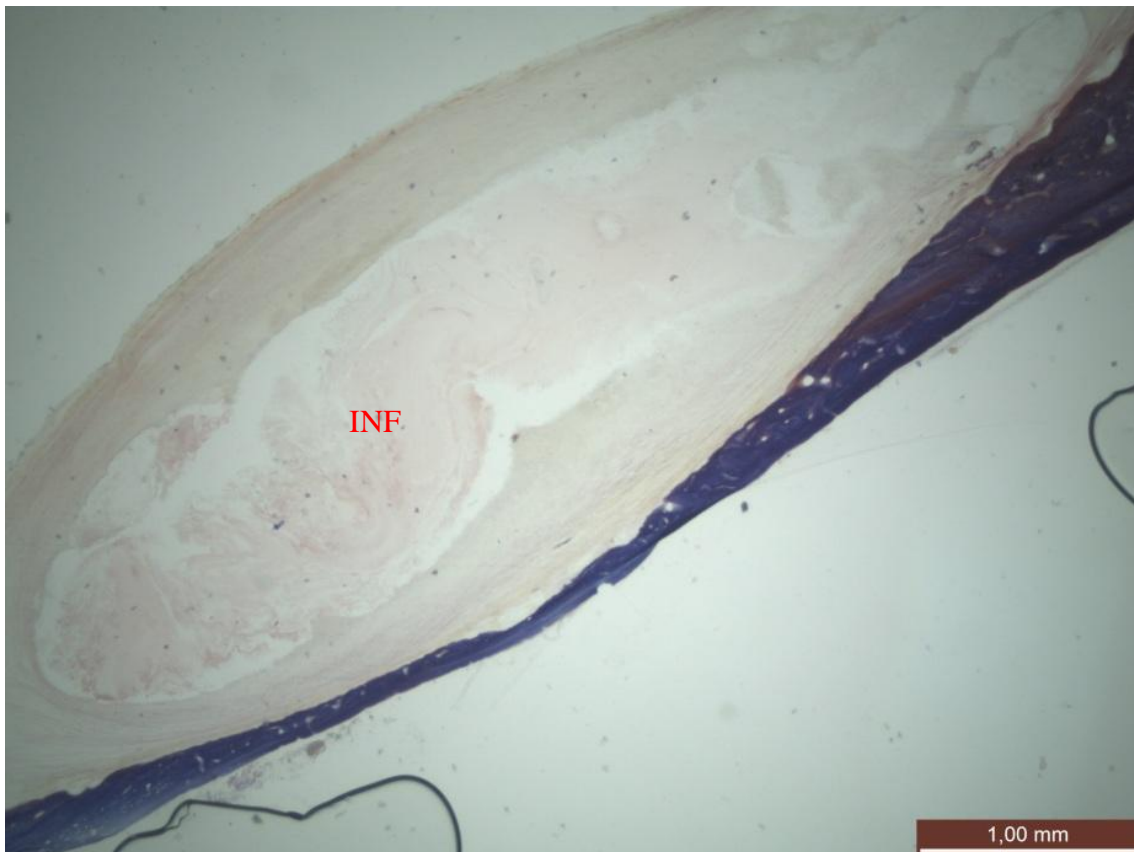


Ilustração 13 - Radiografia coronal da cabeça do rato e ampliação, a seta marca o defeito com preenchimento ósseo com FCB.

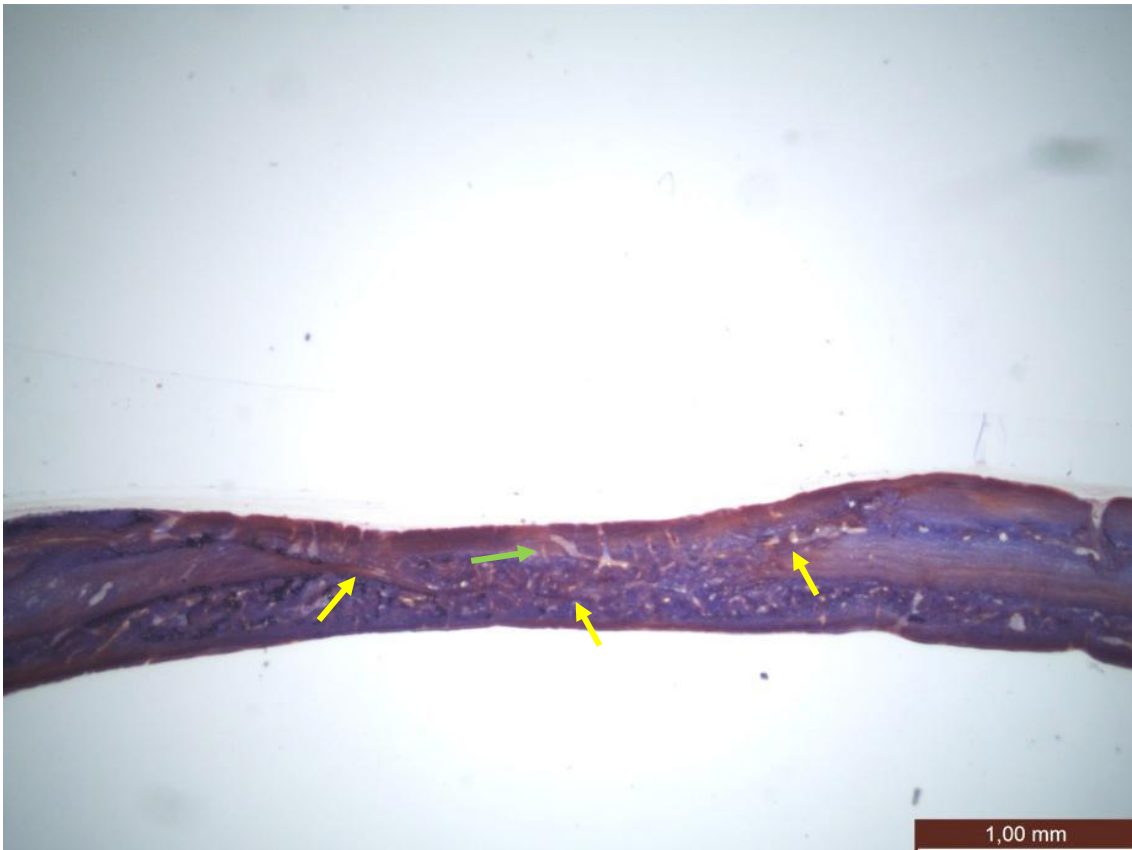
II.3.iv. Análise histológica

Através da observação das lâminas de controlo é possível verificar que o hidrogel de PEG se manteve intacto durante o período experimental. Não houve invasão dos defeitos pelos tecidos moles circundantes. A membrana teve uma boa adesão às margens ósseas, no entanto colapsou sobre o defeito. Verificou-se uma expansão da membrana para além da área dos defeitos ósseos.

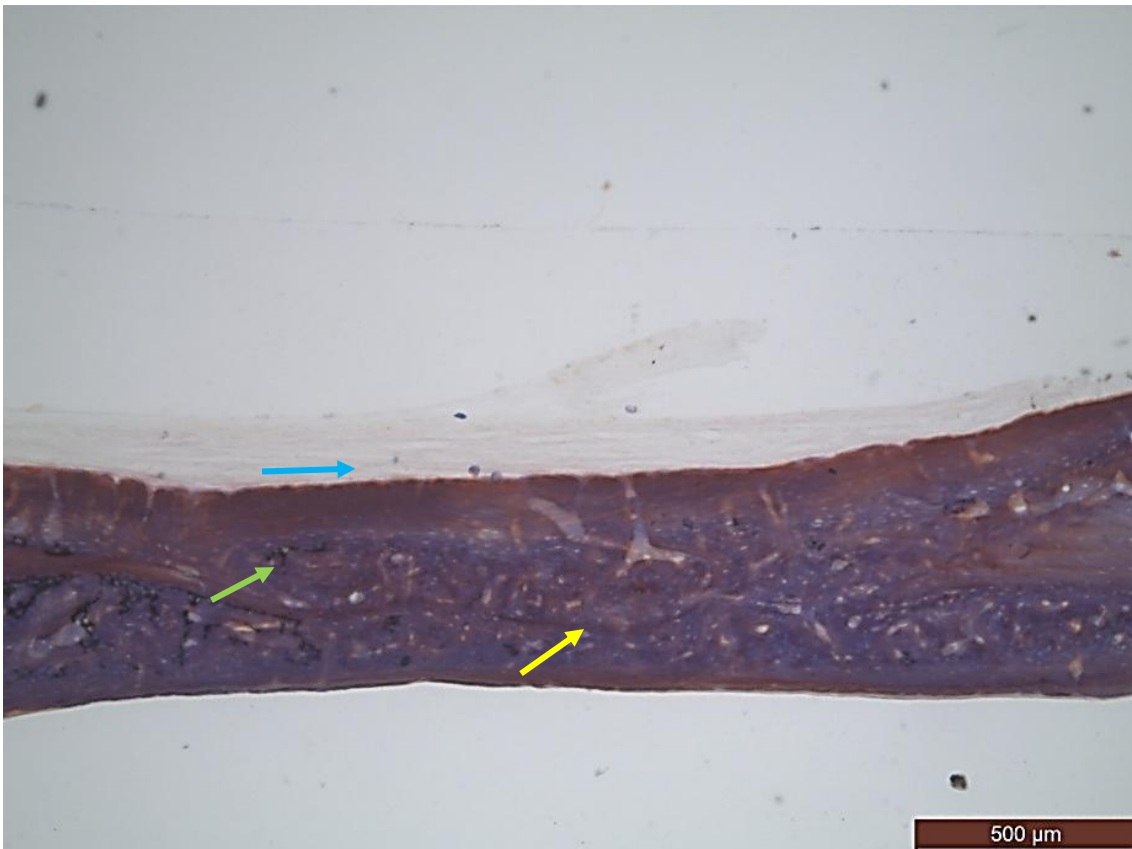
As regenerações ósseas diferiram entre os animais, obtendo-se cortes histológicos com diminutas áreas de formação de novo osso e áreas em que essa mesma formação óssea praticamente preencheu o defeito. Os cortes mais centrais obtiveram menor formação de novo osso do que as zonas mais periféricas dos defeitos. De facto, constatou-se que as zonas mais profundas dos defeitos não obtiveram regeneração óssea, ao passo que junto às paredes dos defeitos houve um crescimento abundante de novo osso. Foi possível observar zonas de exsudado inflamatório na face interna da membrana.



Fotomicrografia 1 - Defeito de controlo com membrana de PEG. Ampliação de 25x, num corte histológico realizado no centro do defeito ósseo. Marcações: INF – exsudado inflamatório.



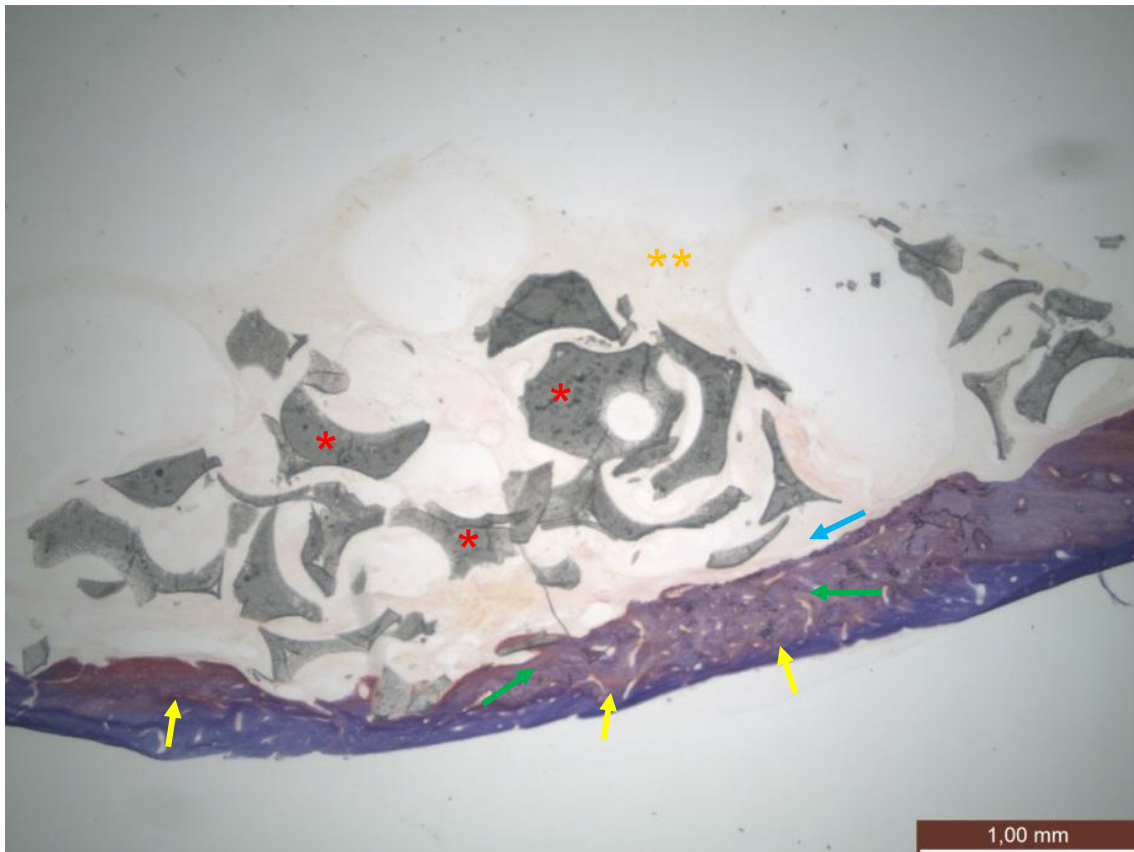
Fotomicrografia 2 - Defeito de controle com membrana de PEG. Ampliação de 25x, num corte histológico realizado na periferia do defeito ósseo. Marcações: seta verde – zona de neoformação, setas amarelas – base do defeito ósseo.



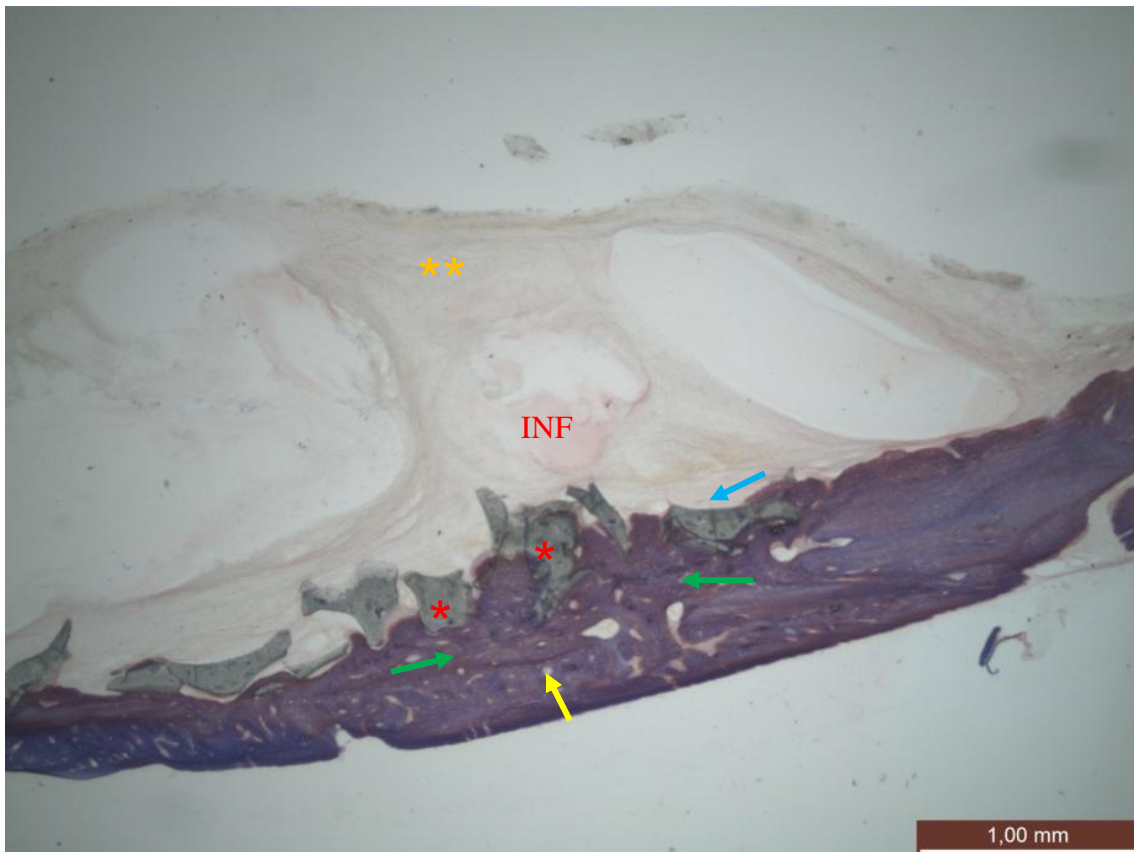
Fotomicrografia 3 - Defeito de controle com membrana de PEG. Ampliação de 50x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo.

Na zona interna da membrana de PEG, foram observados feixes de fibras de colagénio dispostos paralelamente, em relação à mesma.

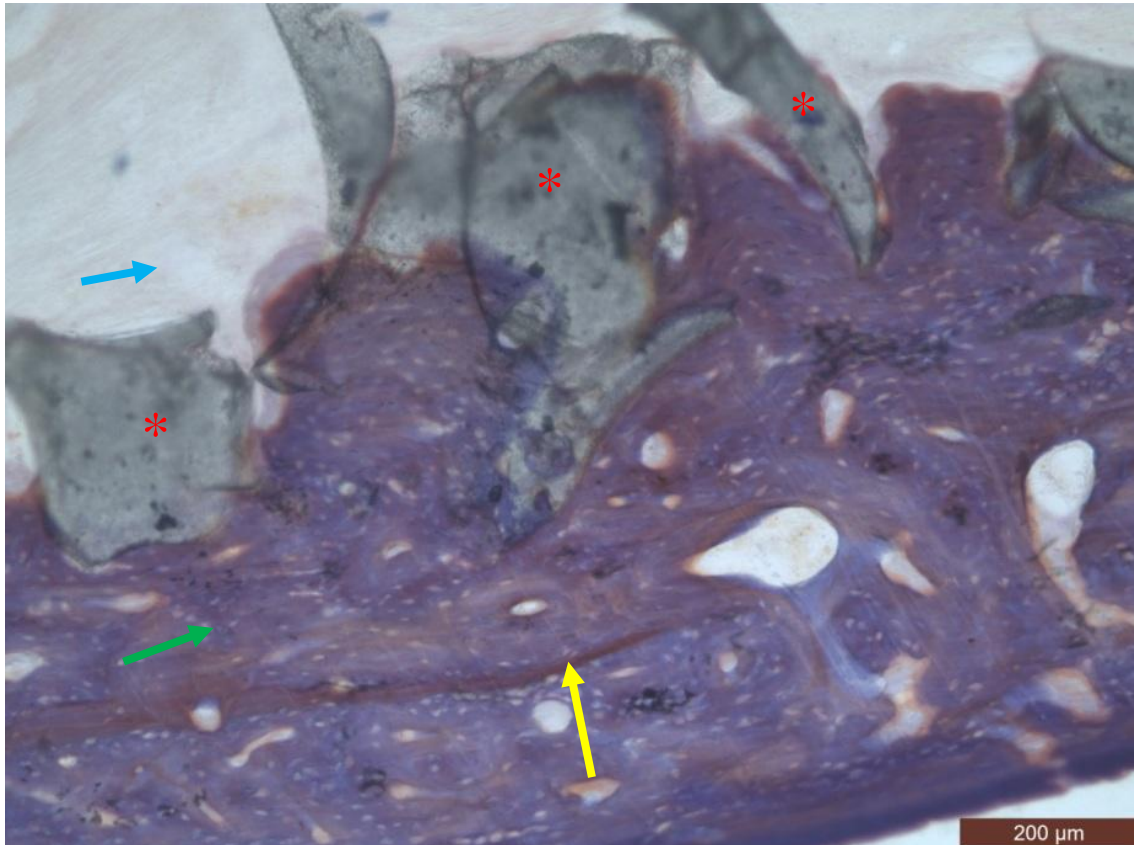
Nos defeitos preenchidos com FCB e hidrogel de PEG não se verificou o resultado esperado. Houve formação de novo osso, mas não associada ao efeito osteocondutor das partículas do substituto ósseo. Histologicamente foi possível comprovar que as partículas de FCB se mantiveram intactas e, na maioria das amostras, dispersaram-se no hidrogel. Em algumas das amostras foi observada a inclusão das partículas de FCB no osso recém-formado, embora de forma parcial e sem as recobrir totalmente.



Fotomicrografia 4 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB, ** - membrana de PEG.

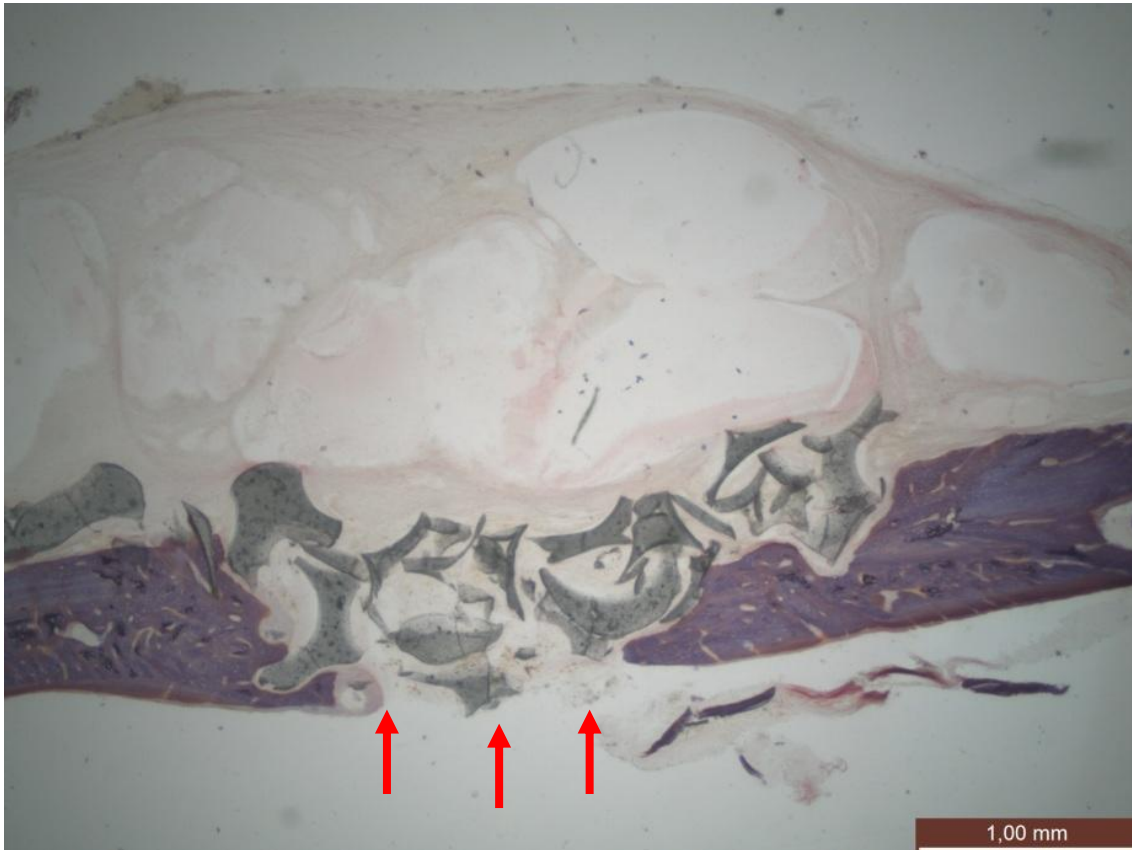


Fotomicrografia 5 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB, ** - membrana de PEG, INF – exsudado inflamatório.



Fotomicrografia 6 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 100x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB.

Os defeitos criados foram em espessura total. Em alguns casos houve quebra da tábua interna do osso parietal e atingimento das meninges, todavia nem sempre foi possível observar devido à localização no corte.

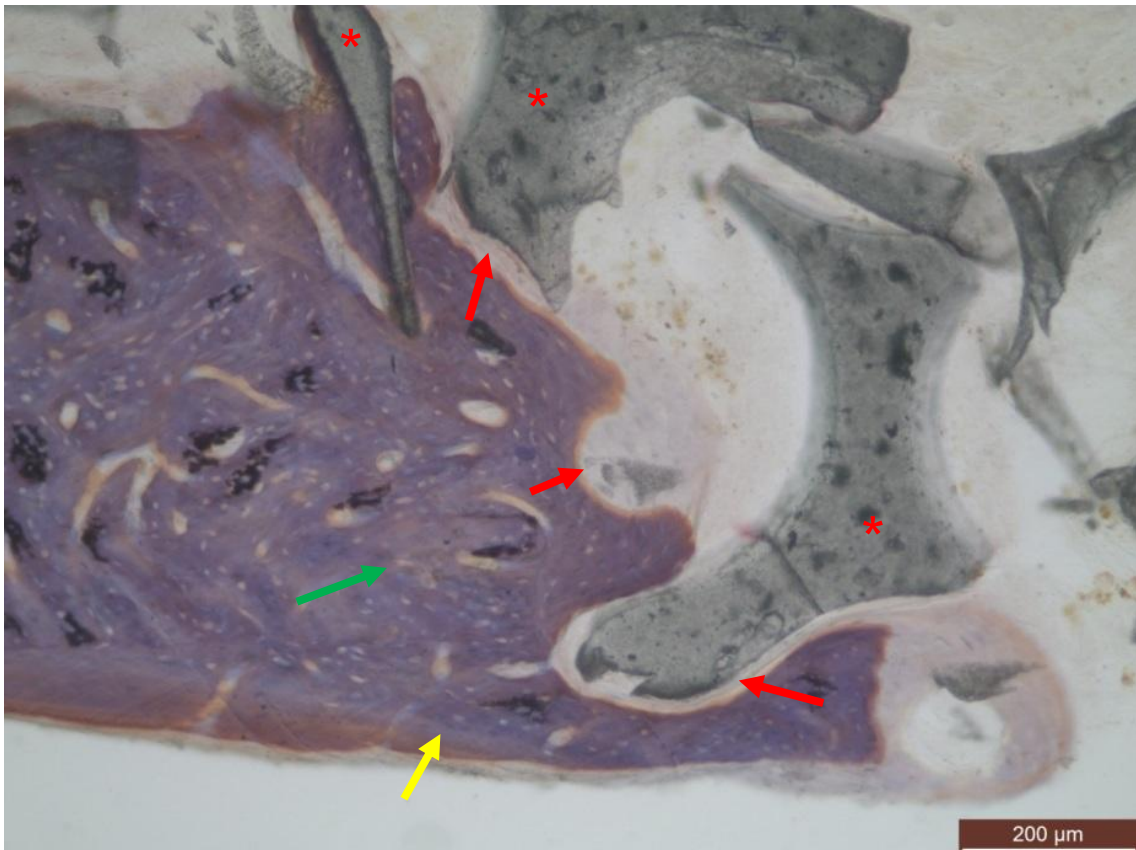


Fotomicrografia 7 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta vermelha – rutura da tábua interna do osso parietal.

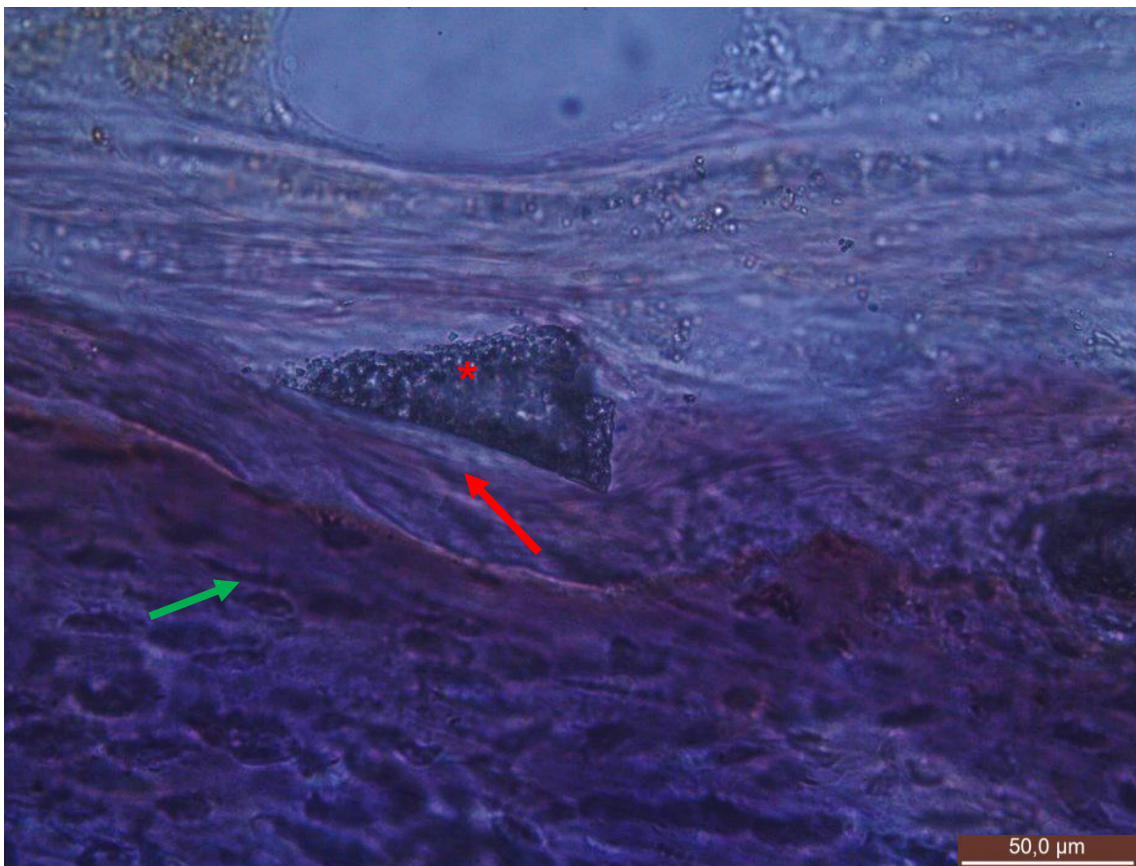
Frequentemente observaram-se as partículas de FCB rodeadas por tecido conjuntivo, em vez de ocorrer formação de novo osso. Foram identificadas partículas pequenas de FCB, igualmente rodeadas por tecido conjuntivo. Verificaram-se poucas zonas em que existiu um real contacto entre as partículas de FCB e o novo osso. O novo osso apresenta-se a contornar as partículas, sem uma verdadeira osteointegração.

Na fotomicrografia 9 é possível observar uma partícula não integrada e rodeada por tecido fibroso.

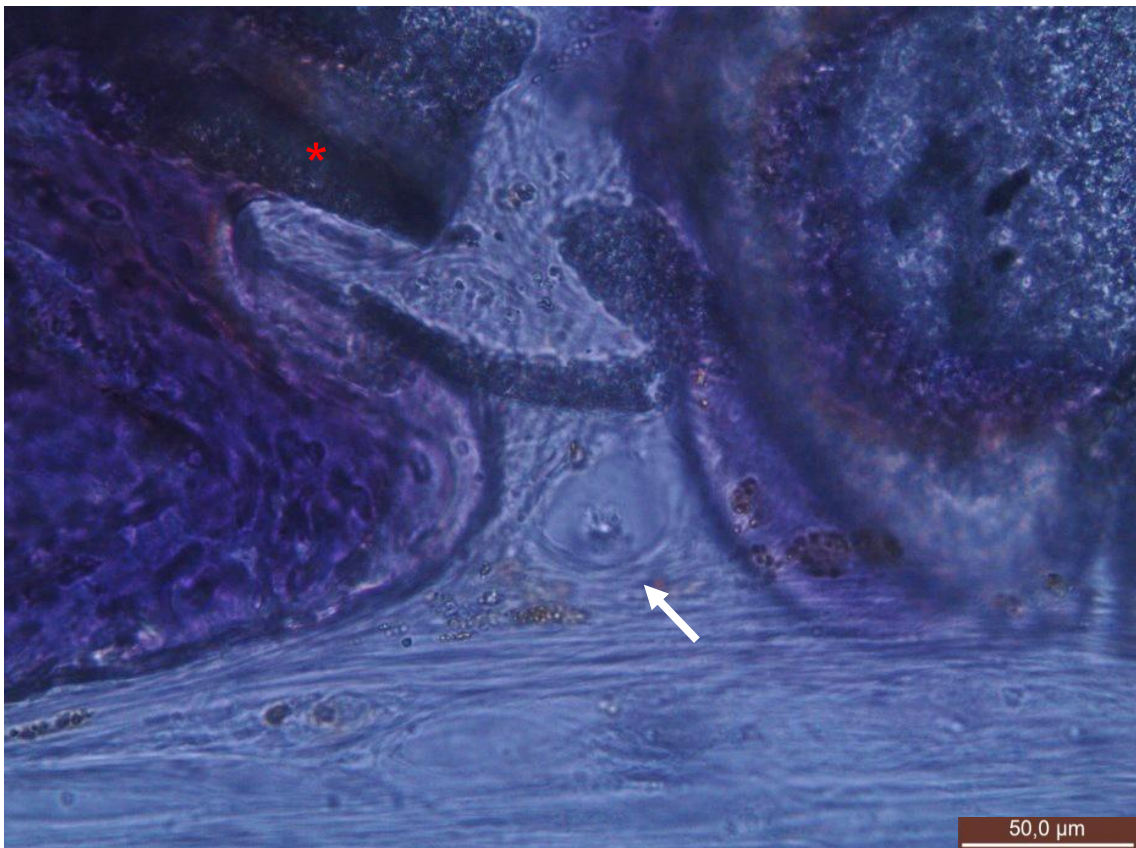
Junto às partículas de FCB foram identificadas estruturas celulares compatíveis com osteoclastos (fotomicrografia 10).



Fotomicrografia 8 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 100x. Marcações: seta vermelha – tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB.



Fotomicrografia 9 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 400x. Marcações: seta vermelha – tecido fibroso, seta verde – zona de neoformação, * - partícula de FCB.

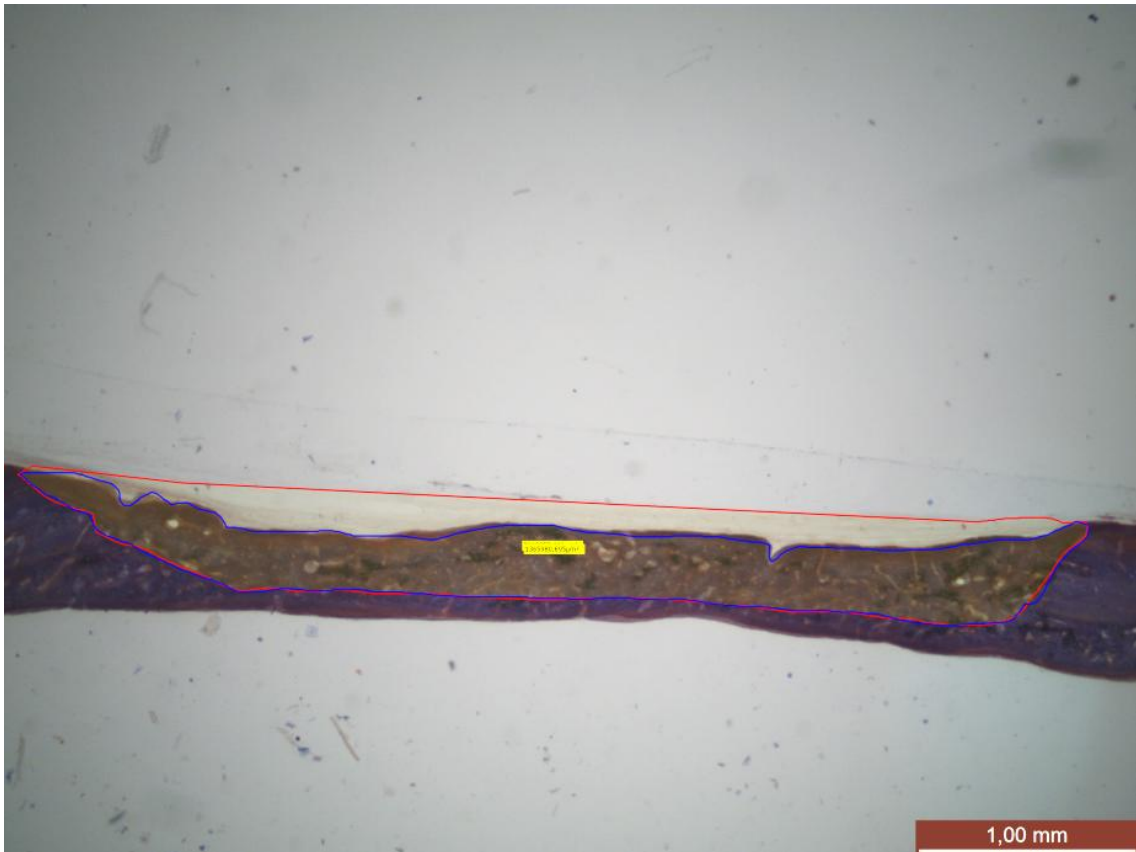


Fotomicrografia 10 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 400x. Marcações: seta branca – osteoclasto, * - partícula de FCB.

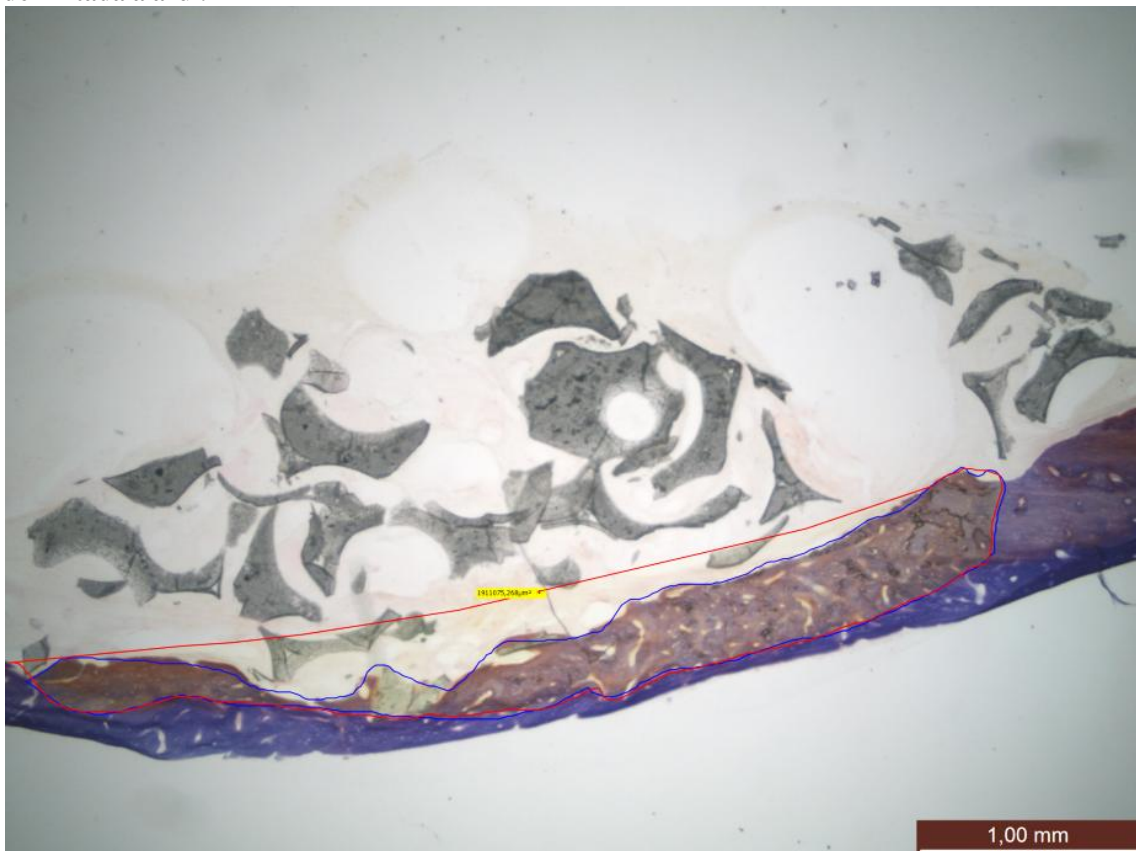
II.3.v. Análise histomorfométrica

Através dos materiais e métodos anteriormente descritos, foi possível delinear as áreas totais do defeito e as áreas regeneradas nas fotomicrografias dos defeitos de controlo e de teste.

A fotomicrografia 11 diz respeito a um defeito de controlo e a fotomicrografia 12 representa um defeito de teste. É possível observar-se a área total do defeito inicial com a cor vermelha e a neoformação óssea a azul.



Fotomicrografia 11 - Análise histomorfométrica de um dos defeitos de controlo. A marcação da área total do defeito corresponde à linha vermelha, enquanto a área de neoformação está delimitada a azul.



Fotomicrografia 12 - Análise histomorfométrica de um dos defeitos de teste. A marcação da área total do defeito corresponde à linha vermelha, enquanto a área de neoformação está delimitada a azul.

Nas tabelas número 4 e número 5 podemos observar o conjunto de dados resultantes da análise histomorfométrica realizada aos cortes de controlo e aos cortes de teste.

Tabela 4 – Dados utilizados na análise histomorfométrica dos defeitos de controlo.

	Cortes histológicos de controlo	Área (μm^2)		% de área Regenerada
		Total	Regenerada	
1	83-12 esq 1º bloco 1º corte	4216012,753	704428,097	17%
2	83-12 esq 1º bloco 2º corte	1848578,038	654449,91	35%
3	83-12 esq 2º bloco 1º corte	1659532,557	738405,471	44%
4	83-12 esq 2º bloco 2º corte	1649613,279	981737,402	60%
5	83-12 esq 2º bloco 3º corte	2019204,858	1441179,038	71%
6	85-12 esq 1º bloco 2º corte	1807721,62	942337,654	52%
7	85-12 esq 2º bloco 1º corte	1020253,833	864441,574	85%
8	85-12 esq 2º bloco 2º corte	1739075,243	1365980,695	79%
9	87-12 esq 1º bloco 2º corte	1399643,612	942980,797	67%
10	89-12 esq 1º bloco 1º corte	1200622,901	978388,8	81%
11	89-12 esq 1º bloco 2º corte	2122552,084	824672,145	39%

Tabela 5 - Dados utilizados na análise histomorfométrica dos defeitos de teste.

	Cortes histológicos de teste	Área (μm^2)		% de área Regenerada
		Total	Regenerada	
1	82-12 dt 1º bloco 1º corte	1845162,572	1151106,433	62%
2	82-12 dt 1º bloco 2º corte	2476530,889	1741530,017	70%
3	82-12 dt 2º bloco 1º corte	2384919,256	931452,27	39%
4	82-12 dt 2º bloco 2º corte	2311846,498	2168211,125	94%
5	84-12 dt 1º bloco 1º corte	1697566,229	1325531,666	78%
6	84-12 dt 1º bloco 2º corte	1468733,758	997238,893	68%
7	84-12 dt 2º bloco 1º corte	4401090,202	1833551,25	42%
8	84-12 dt 2º bloco 2º corte	1911075,268	1246147,06	65%
9	86-12 dt 1º bloco 1º corte	1434556,058	768222,387	54%
10	86-12 dt 1º bloco 2º corte	1825928,004	964418,298	53%
11	88-12 dt 1º bloco 1º corte	2420450,93	1665463,021	69%
12	88-12 dt 1º bloco 2º corte	824750,062	621350,705	75%
13	88-12 dt 1º bloco 3º corte	1509850,298	790455,554	52%
14	88-12 dt 2º bloco 1º corte	2439344,676	1366084,744	56%
15	88-12 dt 2º bloco 2º corte	2577409,835	1271686,248	49%

II.3.vi. Análise estatística

Os cortes de controlo e de teste analisados representaram 42,3% e 57,7% do total da amostra, respetivamente (tabela 6). Do total de lâminas, foram eliminadas 6 pertencentes aos controlos e 1 pertencente aos testes, devido a falhas no processamento das amostras.

Tabela 6 - Distribuição de frequências dos defeitos de controlo e dos defeitos de teste

Defeitos		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Controlo	11	42,3	42,3	42,3
	Teste	15	57,7	57,7	100,0
	Total	26	100,0	100,0	

Os defeitos de controlo, apenas preenchidos com membrana de hidrogel de PEG, obtiveram uma área média de regeneração dos defeitos ósseos de $57,3\% \pm 21,8\%$. Por sua vez, os defeitos de teste obtiveram uma regeneração média de $61,7\% \pm 14,6\%$ da área total, tal como refere a tabela 7.

Tabela 7 - Análise descritiva da percentagem de área regenerada nos defeitos de controlo e nos defeitos de teste.

Percentagem de área regenerada dos defeitos		Statistic	Std. Error	
Controlo	Mean	57,3283	6,57230	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	42,6843	
		Upper Bound	71,9723	
	5% Trimmed Mean	58,0628		
	Median	59,5132		
	Variance	475,147		
	Std. Deviation	21,79786		
	Minimum	16,71		
	Maximum	84,73		
	Range	68,02		
	Interquartile Range	39,69		
	Skewness	-,450	,661	
	Kurtosis	-,712	1,279	

Teste	Mean		61,7740	3,77470
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	53,6780	
		Upper Bound	69,8699	
	5% Trimmed Mean		61,2576	
	Median		62,3851	
	Variance		213,726	
	Std. Deviation		14,61937	
	Minimum		39,06	
	Maximum		93,79	
	Range		54,73	
	Interquartile Range		17,97	
	Skewness		,443	,580
	Kurtosis		,172	1,121

A ilustração 14 representa um diagrama de caixa de extremos e quartis onde é possível constatar uma menor dispersão dos valores no grupo de teste. A regeneração realizada no grupo de teste parece conduzir mais vezes a percentagens maiores de regeneração.

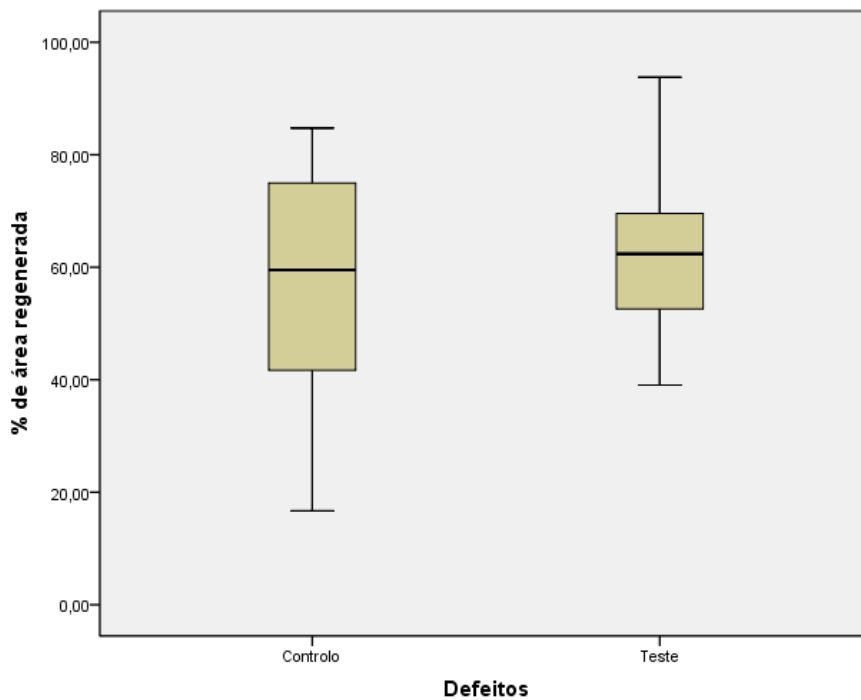


Ilustração 14 - Percentagem de área total regenerada nos defeitos de controlo e de teste, representados num diagrama de extremos e quartis.

No que respeita aos controlos, a percentagem mínima de regeneração óssea foi 16,7% e o máximo atingiu 84,7%. Relativamente aos defeitos de teste, obteve-se um mínimo e máximo de percentagem de regeneração óssea igual a 39,1% e 93,8%, respetivamente.

Foi assumida como hipótese nula a regeneração ser igual nos grupos de controlo e teste. Realizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnova para averiguar se a amostra segue uma distribuição normal. A significância calculada demonstrou ser superior a 0,05, pelo que não se rejeita a hipótese da variável seguir uma distribuição normal, com 95% de confiança.

Tabela 8 - Teste de normalidade.

Defeitos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Percentagem da área regenerada	Controlo	,132	11	,200*	,952	11	,670
	Teste	,120	15	,200*	,972	15	,881

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uma vez que a amostra segue uma distribuição normal, utilizou-se um teste paramétrico. Da análise do Teste T, não se rejeita a hipótese nula com 95% de confiança, i.e., não houve diferenças estatisticamente significativas entre a regeneração no grupo de controlo e no grupo de teste.

Tabela 9 - Teste T para amostras independentes.

Percentagem da área regenerada	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	2,864	,104	-,623	24	,539	-4,446	7,130	-19,161	10,270
Equal variances not assumed			-,587	16,410	,565	-4,446	7,579	-20,480	11,588

II.4. Discussão dos resultados

O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do fosfato de cálcio bifásico coberto por uma membrana de polietileno glicol na reparação óssea de defeitos críticos provocados experimentalmente no osso parietal da calote craniana de ratos Wistar e comparar esses resultados, com a utilização apenas da membrana de polietileno glicol.

O rato Wistar foi o modelo animal escolhido por ser fácil obter uma amostra homogénea, por ser simples de manusear (5) e por ter custos mais reduzidos do que outras espécies (76). O aumento ponderal deve-se ao facto da membrana de PEG e o FCB não interferirem com o desenvolvimento animal normal.

Foi utilizado um número reduzido de animais neste estudo experimental, uma vez que se trata de um estudo preliminar, com biomateriais ainda pouco testados neste modelo animal e cujos resultados obtidos poderão servir para aperfeiçoar a realização de mais estudos semelhantes.

Foram realizados defeitos circulares para melhorar a adaptação do FCB e optou-se por realizar defeitos de 5mm de diâmetro para conseguirmos realizar um defeito em cada osso parietal. Vários artigos referem este defeito como sendo um defeito crítico (72, 73, 92-94, 103). Uma revisão sistemática publicada recentemente está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Os autores concluíram que um defeito de 5mm de diâmetro realizado bilateralmente nos ossos parietais de ratos Wistar pode ser considerado como sendo um defeito crítico. Neste estudo, foram selecionados 61 artigos, dos quais 22 diziam respeito a defeitos de 5mm de diâmetro. Destes estudos, 77,5% realizaram defeitos bilaterais: um em cada osso parietal do rato. A execução de defeitos bilaterais revela-se vantajosa, devido à possibilidade de realizar uma experiência de controlo e de teste no mesmo animal, menor probabilidade de atingir o seio sagital e permite diminuir o número de animais (92).

A membrana de PEG foi aplicada na forma viscosa e estendeu-se 2 a 3mm além das margens do defeito, em todo o seu diâmetro, tal como recomendam vários autores (49, 54, 92). Devido a esse facto, a zona interparietal localizada entre os defeitos ficou totalmente preenchida com a membrana de PEG. A aplicação desta membrana revelou ser simples e rápida. Uma vez que a membrana de PEG adere à superfície óssea, não foram necessários elementos de fixação (20).

A regeneração óssea dos defeitos de 5mm de diâmetro criados no osso parietal de Ratos Wistar, após 60 dias de terem sido preenchidos com FCB e cobertos com hidrogel de PEG, foi superior aos controlos, nos quais os defeitos foram apenas cobertos pelas membranas de hidrogel de PEG, sem materiais de preenchimento. Em termos percentuais, o grupo de teste obteve $62\% \pm 14,6\%$ de regeneração óssea, enquanto que o grupo de controlo obteve $57\% \pm 21,8\%$. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas. Os resultados obtidos no grupo de controlo foram superiores à média apurada por Vajgel *et al.* relativamente a defeitos ósseos de 5mm de diâmetro em calotes cranianas de ratos, no entanto não foram utilizadas membranas sobre os defeitos. Nesta revisão sistemática, a percentagem de formação de novo osso foi igual a 20,2% após 2 meses de cicatrização (92). A inexistência de estudos realizados em ratos Wistar em iguais condições e a falta de quantificações histomorfométricas em estudos semelhantes (41, 59, 72, 73, 94, 95) dificulta a comparação dos resultados obtidos.

No que diz respeito a outros modelos animais, num estudo realizado em “*minipigs*” os autores obtiveram uma percentagem de neoformação óssea de 48,5%, após regenerarem defeitos ósseos de 7mm de diâmetro e 4mm de profundidade apenas com FCB, durante um período de cicatrização de 2 meses (76). Estudos realizados em coelhos revelam valores inferiores de neoformação óssea, no entanto trata-se de um modelo animal diferente do utilizado no presente estudo. Humber *et al.* obtiveram $22,1\% \pm 5,1\%$ de regeneração óssea em defeitos críticos de 15mm de diâmetro cobertos por membranas de PEG e sem utilizarem substitutos ósseos, após 6 semanas de

cicatrização. No que respeita aos defeitos preenchidos com FCB e cobertos com membranas de PEG, a percentagem de formação de novo osso foi superior à anterior ($25,9\% \pm 8,1\%$), mas inferior à do presente estudo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (104). Num outro estudo realizado em coelhos, os autores obtiveram as seguintes percentagens de neoformação óssea: 20,3%, 18,9% e 7,3%, em defeitos de 6mm de diâmetro preenchidos com FCB/PEG, FCB/e-PTFE e FCB. Nos defeitos ósseos de teste, as membranas foram colocadas nas superfícies externas e internas dos defeitos ósseos (20).

A membrana de PEG revelou ser biocompatível, possuir boa integração tecidual, e impediu a proliferação de tecidos não desejados para o interior dos defeitos, tal como outros autores já tinham demonstrado anteriormente mediante a avaliação do comportamento histológico de cilindros de PEG, previamente gelificados e introduzidos na área subcutânea de ratos Wistar. Os cilindros resistiram 4 meses sem que houvesse infiltração tecidual (51, 52). No presente estudo, a membrana de PEG resistiu intacta após 60 dias de cicatrização, inclusivamente parecia mais espessa do que na altura da aplicação. Também Jung *et al.* detetaram esta particularidade, após 1 mês de cicatrização e atribuíram este facto à reabsorção de líquido, devido ao efeito osmótico do modificador de viscosidade (carboximetil celulose) (20).

O enxerto aloplástico de FCB demonstrou ser biocompatível e, embora tivesse uma maior percentagem de regeneração óssea do que o grupo de controlo, não exibiu propriedades osteocondutoras. Embora as partículas de FCB se tenham mantido intactas durante o período experimental, foram escassas as que ficaram envolvidas em osso neoformado. Os resultados obtidos apontaram em variadas ocasiões para um possível efeito inibitório da regeneração, que poderá estar relacionado com o processo de reabsorção, a superfície do FCB e a forma das partículas, tal como referem outros autores (72, 93). Na maioria das amostras, a regeneração ocorreu na periferia do osso nativo, possivelmente pela migração de células osteogénicas provenientes desse mesmo osso nativo (59). Tem sido sugerido que o processo inflamatório após

criação de um defeito ósseo promove, diretamente ou indiretamente, a diferenciação das células progenitoras em osteoblastos (95).

No presente estudo foram observadas células multinucleadas semelhantes a osteoclastos. O facto deste substituto ósseo ser bifásico implica a degradação do componente mais solúvel - o β -FTC e, conseqüente, libertação de fosfatase alcalina. O pH alcalino não favorece a regeneração óssea (105). A presença de osteoclastos advém da necessidade de degradar este componente do FCB. No entanto, a presença de osteoclastos não implica necessariamente que estes sejam capazes de fagocitar o β -FTC (20, 59, 72, 73).

Uma explicação para a presença das partículas de FCB após períodos longos de cicatrização poderá ser a insolubilidade das partículas altamente cristalizadas de HA e, após a dissolução do β -FTC (caso ocorra), a HA remanescente e a HA precipitada à volta das partículas poderá abrandar ou interromper a continuação da dissolução ou reabsorção (88).

O facto do FCB testado neste estudo possuir uma cristalinidade de 100% pode explicar a sua reabsorção lenta, embora a porosidade de 90% devesse conduzir a reabsorção no sentido contrário (76).

Uma explicação para que os enxertos de osso bovino liofilizado tenham um contacto com o osso inicial superior ao FCB poderá residir na superfície inalterada do primeiro substituto ósseo. O FCB possui uma superfície lisa que necessita de ser alterada pelos macrófagos e osteoclastos para que se torne ideal para que ocorra aposição óssea. Este processo é demorado (75).

Lindgren *et al.* obtiveram quantidades similares de formação de novo osso entre o osso bovino inorgânico e o FCB. Contudo, visualizaram que a maioria do nosso osso identificado estava a ligar as partículas de FCB, enquanto as partículas de origem bovina estavam rodeadas por novo osso. O FCB obteve menor percentagem de partículas em contacto com o novo osso, pelo que os autores consideram que as partículas de FCB foram menos atrativas para as

células osteogénicas e apresentavam-se ocasionalmente rodeadas por tecidos fibrosos (88). No presente estudo foram identificados, frequentemente, tecidos fibrosos a rodear as partículas de FCB.

Num estudo efetuado por Jung *et al.* onde realizaram deiscências ósseas em mandíbulas de cadelas beagle, posteriormente colocaram implantes dentários e regeneraram com Straumann® BoneCeramic/PEG, os autores verificaram após o período de cicatrização que os grânulos de HA/FTC eram visíveis, mostravam fraca osteointegração e estavam encapsulados por tecido fibroconectivo. O número de células inflamatórias observadas foi bastante superior, comparativamente às ROG com as membranas de colagénio (54). Estes resultados estão de acordo com o presente estudo, no qual foram identificados exsudados inflamatórios.

A regeneração óssea realizada com FCB apresentou, histologicamente, um crescimento de novo osso entre as partículas enxertadas, com formação de um tecido conectivo ao redor das partículas. Foram identificadas células gigantes multinucleadas na superfície do FCB, mas sem sinais de lacunas de reabsorção (76).

Jones *et al.* utilizaram 60 ratos Wistar para testar o preenchimento ósseo de defeitos críticos de 5mm com HA (fase menos solúvel do FCB) e verificaram que, após 6 meses de cicatrização, os grânulos de HA ficaram rodeados de tecido fibroso, sem adesão a este (73).

É necessário ter em atenção que um defeito ósseo crítico (5mm) realizado no crânio de ratos Wistar cicatriza através de tecido fibroso e não por formação óssea (73). Develioglu *et al.* obtiveram resultados semelhantes num estudo onde realizaram defeitos críticos bilaterais no osso parietal de 20 ratos Wistar, preenchendo apenas um dos defeitos com FCB (65%HA:35% FTC). O tempo de cicatrização foi de 3 e 6 meses, tendo os autores concluído que o enxerto ósseo não exibiu propriedades osteocondutoras, devido à ausência de regeneração óssea. Os autores constataram a presença de tecido fibrovascular

na zona do enxerto, com as partículas afastadas da base do defeito ósseo, após o tempo máximo de cicatrização (72).

Por outro lado, Dupoirieux, *et al.* afirmam que os defeitos na calote craniana dos ratos Wistar são os modelos experimentais mais seletivos de regeneração óssea, uma vez que o pobre suprimento sanguíneo e a estrutura membranosa do osso impedem qualquer regeneração espontânea (41).

Num estudo realizado por Thoma *et al.* em “*minipigs*”, a membrana de PEG e a de APL preveniram o colapso dos tecidos moles no interior dos defeitos criados na mandíbula, e promoveram uma maior formação óssea. No entanto, os defeitos criados não foram “defeitos críticos”, uma vez que o controlo negativo (defeito ósseo sem membrana) também regenerou completamente ao final de dois meses (47).

O tempo de regeneração poderá ter influenciado o presente ensaio. Jensen *et al.* constataram que às 24 semanas ocorreu uma regeneração completa de defeitos criados em mandíbulas de “*minipigs*”, sem diferenças estatisticamente significativas entre os enxertos de osso autólogo, FCB, FTC e HA, cobertos por uma membrana de e-PTFE. No entanto, a regeneração às 8 semanas foi superior no osso autólogo, seguido do FTC, em terceiro lugar ficou o FCB e por último a HA. Os defeitos realizados foram, intencionalmente, não críticos e era esperada uma regeneração completa, mesmo sem qualquer substituto ósseo (76). Contudo, o modelo experimental utilizado não foi o mesmo do presente estudo.

No presente estudo, o maior crescimento ósseo observado nos controlos, tal como nos testes, ocorreu na periferia dos defeitos ósseos. Takeuchi *et al.* obtiveram resultados semelhantes numa análise histológica da regeneração óssea de defeitos sem qualquer material de preenchimento, utilizando como modelo experimental um grupo de 72 ratos Wistar. Após 8 semanas de cicatrização não ocorreu o preenchimento total dos defeitos ósseos. Observaram apenas uma pequena formação óssea nas extremidades do

defeito, explicada pela presença de osteoblastos provenientes da periferia dos defeitos. Ocorreu alguma formação óssea centrípeta, mas a área central dos defeitos ficou preenchida por tecido fibroso (59). Outros autores, num estudo onde pretendiam interpretar a longo prazo a regeneração com FCB em defeitos críticos criados na calote craniana de ratos Wistar, constataram igualmente que não ocorreu regeneração óssea após 24 semanas. Apenas formação de tecido fibroso (93).

A membrana de PEG, tal como as membranas reabsorvíveis de colagénio, não foi capaz de manter o espaço, observando-se o colapso da mesma. Este resultado foi semelhante noutros estudos (20, 51).

A forma das partículas e o rácio área/volume superficiais podem determinar a existência de formação óssea ou reabsorção (88).

Jensen *et al.* referem que uma possível explicação para o atraso da formação óssea no centro dos defeitos (não críticos) preenchidos por FCB 60:40 poderá ter sido a morfologia das partículas. As partículas de FCB são altamente irregulares, apresentando falanges aguçadas. Estes formatos diminuem a área das partículas e não permitem um condicionamento adequado das partículas sobre a superfície do defeito. Uma superfície esférica poderá ser vantajosa. Por outro lado, é necessário ter em conta que uma condensação excessiva das partículas pode causar o sobrepor das falanges ou mesmo a fratura das partículas, que poderá obstruir a neovascularização. O crescimento vascular é um dos requisitos da formação óssea. A hipótese da morfologia das partículas resultar num efeito inibidor da neoformação óssea poderia ser testada mediante a comparação de enxertos particulados e enxertos em bloco (75). No presente ensaio experimental, foram detetadas diversas partículas de dimensões reduzidas nas amostras. Estas partículas podem ter estado sujeitas a movimentos, os quais podem promover a formação de tecido fibroso, em detrimento da osteointegração (88). É possível que o tamanho dos grânulos tenha sido demasiado grande para o porte do animal, no entanto Dietze *et al.* (2006) desaconselham o triturar dos grânulos (77). O facto de as partículas

terem sido condensadas para melhor adaptação aos defeitos ósseos poderá ter estado na origem da invasão das meninges observada em algumas das amostras.

III. Conclusões

- Dentro das limitações inerentes a um estudo piloto, podemos concluir que o FCB coberto pela membrana de PEG obteve uma maior percentagem de neoformação óssea do que os defeitos apenas cobertos pela membrana de PEG, embora sem diferenças estatisticamente significativas.
- O FCB não apresentou propriedades osteocondutoras, foi eficaz na manutenção do espaço e demonstrou ser biocompatível.
- As partículas de FCB e a membrana de PEG mantiveram-se intactas após 2 meses.
- A membrana de PEG possui uma aplicação fácil e rápida *in situ*, fixou-se *per si* à superfície óssea, demonstrou ser biocompatível e ter boas capacidades oclusivas.
- O modelo experimental utilizado é indicado em estudos de ROG, embora apresente limitações relativamente ao porte físico do animal.

Considerações:

Em estudos posteriores, será vantajoso aumentar o número de ratos, o tempo de cicatrização e dever-se-á considerar a hipótese de utilizar partículas de FCB com menor dimensão.

IV. Bibliografia

1. Junqueira LCC, J. *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
2. Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: A review. *Bio-Med Mater Eng*. 2002;12(1):15-35. PubMed PMID: WOS:000173866600003. English.
3. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Current osteoporosis reports*. 2012 Jun;10(2):118-25. PubMed PMID: 22552701. Pubmed Central PMCID: 3366431.
4. Hib J. *Histología de Di Fiore. Texto y Atlas.*: Librerías Yenny S.A.; 2001.
5. Moreira A, Vasconcelos, M. Terapia hormonal na regeneração óssea. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2011 July–September 2011;53(3): 133-41.
6. Lindhe J, Lang, N. P., Karring, T. . *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 2008;5th.
7. Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S22-5. PubMed PMID: 21714966.
8. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University*. 2008 Jul;96(1):1-11. PubMed PMID: 18661198.
9. Hammerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000*. 2003;33:36-53. PubMed PMID: 12950840.
10. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*. 1982 May;9(3):257-65. PubMed PMID: 6954167.
11. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Jul;9(4):290-6. PubMed PMID: 6964676.
12. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984 Sep;11(8):494-503. PubMed PMID: 6384274.
13. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986 Jul;13(6):604-16. PubMed PMID: 3462208.
14. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J Clin Periodontol*. 1988 Apr;15(4):247-54. PubMed PMID: 3164333.
15. Pontoriero R, Lindhe J, Nyman S, Karring T, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree III involvements. *J Clin Periodontol*. 1989 Mar;16(3):170-4. PubMed PMID: 2723098.
16. Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J Clin Periodontol*. 1987 Nov;14(10):618-20. PubMed PMID: 3480298.

17. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi*. 1990;24(1):13-9. PubMed PMID: 2389116.
18. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and reconstructive surgery*. 1988 May;81(5):672-6. PubMed PMID: 3362985.
19. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989 Spring;4(1):19-25. PubMed PMID: 2599578.
20. Jung RE, Zwahlen R, Weber FE, Molenberg A, van Lenthe GH, Hammerle CH. Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Aug;17(4):426-33. PubMed PMID: 16907774. Epub 2006/08/16. eng.
21. Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10(5):376-91. PubMed PMID: 2098360.
22. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehisced defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992 Summer;7(2):233-45. PubMed PMID: 1398841.
23. Nevins M, Mellonig JT. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1992;12(2):96-111. PubMed PMID: 1521999.
24. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13(1):29-45. PubMed PMID: 8330945.
25. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995 Feb;15(1):10-29. PubMed PMID: 7591520.
26. Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990 Spring;5(1):9-14. PubMed PMID: 2391139.
27. Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(5):332-43. PubMed PMID: 2640210.
28. Schultz AJ, Gager AH. Guided tissue regeneration using an absorbable membrane (polyglactin 910) and osseous grafting. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10(1):8-17. PubMed PMID: 2394557.
29. Gager AH, Schultz AJ. Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane (polyglactin 910) with and without osseous grafting: case reports. *J Periodontol*. 1991 Apr;62(4):276-83. PubMed PMID: 2037959.
30. Gottlow J, Laurell L, Lundgren D, Mathisen T, Nyman S, Rylander H, et al. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue

- regeneration device: a longitudinal study in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994 Oct;14(5):436-49. PubMed PMID: 7751110.
31. Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 1992 Aug-Sep;20(6):257-60. PubMed PMID: 1401099.
32. Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Jun;5(2):66-74. PubMed PMID: 7918911.
33. Hurzeler MB, Strub JR. Guided bone regeneration around exposed implants: a new bioresorbable device and bioresorbable membrane pins. *Practical periodontics and aesthetic dentistry : PPAD.* 1995 Nov-Dec;7(9):37-47; quiz 50. PubMed PMID: 9002893.
34. Schliephake H, Neukam FW, Hutmacher D, Becker J. Enhancement of bone ingrowth into a porous hydroxylapatite-matrix using a resorbable polylactic membrane: an experimental pilot study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 1994 Jan;52(1):57-63. PubMed PMID: 8263645.
35. Hurzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 1998 Aug;27(4):315-20. PubMed PMID: 9698183.
36. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol.* 2009 Autumn;2(3):167-84. PubMed PMID: 20467628.
37. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA. Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Jun;13(3):274-80. PubMed PMID: 12010157.
38. Hanel KC, McCabe C, Abbott WM, Fallon J, Megerman J. Current PTFE grafts: a biomechanical, scanning electron, and light microscopic evaluation. *Annals of surgery.* 1982 Apr;195(4):456-63. PubMed PMID: 7065749. Pubmed Central PMCID: 1352527.
39. Jovanovic SA, Nevins M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1995 Feb;15(1):56-69. PubMed PMID: 7591524.
40. von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Aug;17(4):359-66. PubMed PMID: 16907765.
41. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2001 Feb;30(1):58-62. PubMed PMID: 11289623.
42. Ramel CF, Wismeijer DA, Hammerle CH, Jung RE. A randomized, controlled clinical evaluation of a synthetic gel membrane for guided bone regeneration around dental implants: clinical and radiologic 1- and 3-year

results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 Mar-Apr;27(2):435-41. PubMed PMID: 22442785.

43. Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Sep-Oct;11(5):667-78. PubMed PMID: 8908867.

44. Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, Matarasso S. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials*. 1998 May;19(10):889-96. PubMed PMID: WOS:000074637500002. English.

45. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2001 Apr;72(4):512-6. PubMed PMID: 11338304.

46. von Arx T, Broggin N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Nov-Dec;20(6):843-53. PubMed PMID: 16392340.

47. Thoma DS, Halg GA, Dard MM, Seibl R, Hammerle CH, Jung RE. Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):7-16. PubMed PMID: 19126102.

48. Jung RE, Kokovic V, Jurisic M, Yaman D, Subramani K, Weber FE. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Aug;22(8):802-7. PubMed PMID: 21198905.

49. Schwarz F, Mihatovic I, Golubovic V, Hegewald A, Becker J. Influence of two barrier membranes on staged guided bone regeneration and osseointegration of titanium implants in dogs: part 1. Augmentation using bone graft substitutes and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Jan;23(1):83-9. PubMed PMID: 21518008.

50. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):215-29. PubMed PMID: 11288796.

51. Herten M, Jung RE, Ferrari D, Rothamel D, Golubovic V, Molenberg A, et al. Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Feb;20(2):116-25. PubMed PMID: 19077154.

52. Wechsler S, Fehr D, Molenberg A, Raeber G, Schense JC, Weber FE. A novel, tissue occlusive poly(ethylene glycol) hydrogel material. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008 May;85(2):285-92. PubMed PMID: 17688293.

53. Jung RE, Halg GA, Thoma DS, Hammerle CH. A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Feb;20(2):162-8. PubMed PMID: 19191793.

54. Jung RE, Lecloux G, Rompen E, Ramel CF, Buser D, Hammerle CH. A feasibility study evaluating an in situ formed synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Feb;20(2):151-61. PubMed PMID: 19191792.

55. Mihatovic I, Becker J, Golubovic V, Hegewald A, Schwarz F. Influence of two barrier membranes on staged guided bone regeneration and

osseointegration of titanium implants in dogs. Part 2: augmentation using bone graft substitutes. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Mar;23(3):308-15. PubMed PMID: 21919971.

56. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24 Suppl:218-36. PubMed PMID: 19885447.

57. Hwang JW, Park JS, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials.* 2012 Nov;100(8):2044-52. PubMed PMID: 22865716.

58. Virolainen P, Heikkilä J, Yli-Urpo A, Vuorio E, Aro HT. Histomorphometric and molecular biologic comparison of bioactive glass granules and autogenous bone grafts in augmentation of bone defect healing. *J Biomed Mater Res.* 1997 Apr;35(1):9-17. PubMed PMID: 9104694.

59. Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y, et al. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of beta-tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. *Dental materials journal.* 2009 Sep;28(5):595-601. PubMed PMID: 19822991.

60. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 Jul-Aug;17(4):498-506. PubMed PMID: 12182292.

61. De Marco AC, Jardim MA, Lima LP. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Nov-Dec;20(6):867-74. PubMed PMID: 16392343.

62. Jardim MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2005 Dec;100(6):666-73. PubMed PMID: 16301146.

63. Sbordone C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Bufo P, Sbordone L. Volume changes of autogenous bone after sinus lifting and grafting procedures: a 6-year computerized tomographic follow-up. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 2013 Apr;41(3):235-41. PubMed PMID: 23084768.

64. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dento maxillo facial radiology.* 2001 May;30(3):157-61. PubMed PMID: 11420628.

65. Smolka W, Eggensperger N, Carollo V, Ozdoba C, Iizuka T. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):149-55. PubMed PMID: 16584410.

66. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol.* 2006 Sep;77(9):1555-63. PubMed PMID: 16945034.

67. Valimäki VV, Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for*

- the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society. 2006;95(2):95-102. PubMed PMID: 16821652.
68. Holmes RE. Bone Regeneration within a Coralline Hydroxyapatite Implant. *Plastic and reconstructive surgery*. 1979;63(5):626-33. PubMed PMID: WOS:A1979GV14000004. English.
69. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1599-606. PubMed PMID: 11374460.
70. Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol*. 1999 Sep;70(9):1053-63. PubMed PMID: 10505809.
71. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Nov-Dec;14(6):835-40. PubMed PMID: 10612920.
72. Develioglu D SS, Bolayir G, Dupoirieux L. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2006;10:627-31.
73. Jones L, Thomsen JS, Mosekilde L, Bosch C, Melsen B. Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1, 3, and 6 months after implantation with osteopromotive substances. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2007 Dec;35(8):350-7. PubMed PMID: 17951064.
74. Albee FH. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Annals of surgery*. 1920 Jan;71(1):32-9. PubMed PMID: 17864220. Pubmed Central PMCID: 1410453.
75. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2009 Jul;90(1):171-81. PubMed PMID: 19085941.
76. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Dec;18(6):752-60. PubMed PMID: 17888014.
77. Dietze S, Bayerlein T, Proff P, Hoffmann A, Gedrange T. The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic and NanoBone. *Folia morphologica*. 2006 Feb;65(1):63-5. PubMed PMID: 16783740.
78. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3230-7. PubMed PMID: 16488007.
79. Tirkkonen L, Haimi S, Huttunen S, Wolff J, Pirhonen E, Sandor GK, et al. Osteogenic medium is superior to growth factors in differentiation of human adipose stem cells towards bone-forming cells in 3D culture. *European cells & materials*. 2013;25:144-58. PubMed PMID: 23361609.
80. Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or

- PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Dec;19(12):1246-53. PubMed PMID: 19040439.
81. Froum SJ, Weinberg MA, Tarnow D. Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. *J Periodontol.* 1998 Jun;69(6):698-709. PubMed PMID: 9660339.
82. Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Happonen RP. Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Apr;15(2):135-41. PubMed PMID: 15008925.
83. Covani U, Orlando B, Giacomelli L, Cornelini R, Barone A. Implant survival after sinus elevation with Straumann((R)) BoneCeramic in clinical practice: ad-interim results of a prospective study at a 15-month follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2011 May;22(5):481-4. PubMed PMID: 21143534.
84. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803. PubMed PMID: 18705811.
85. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann(R) BoneCeramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013 May;24(5):576-85. PubMed PMID: 22324456.
86. Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008 Jun;28(3):273-81. PubMed PMID: 18605603.
87. Lindgren C, Mordenfeld A, Hallman M. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with synthetic biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone. *Clinical implant dentistry and related research.* 2012 Mar;14(1):41-50. PubMed PMID: 20491816.
88. Lindgren C, Hallman M, Sennerby L, Sammons R. Back-scattered electron imaging and elemental analysis of retrieved bone tissue following sinus augmentation with deproteinized bovine bone or biphasic calcium phosphate. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Sep;21(9):924-30. PubMed PMID: 20491837.
89. De Coster P, Browaeys H, De Bruyn H. Healing of extraction sockets filled with BoneCeramic(R) prior to implant placement: preliminary histological findings. *Clinical implant dentistry and related research.* 2011 Mar;13(1):34-45. PubMed PMID: 19681930.
90. Van Assche N, Michels S, Naert I, Quirynen M. Randomized Controlled Trial to Compare Two Bone Substitutes in the Treatment of Bony Dehiscences. *Clinical implant dentistry and related research.* 2012 Jan 11. PubMed PMID: 22236044.
91. Thoma DS, Subramani K, Weber FE, Luder HU, Hammerle CH, Jung RE. Biodegradation, soft and hard tissue integration of various polyethylene glycol hydrogels: a histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Nov;22(11):1247-54. PubMed PMID: 21518006.

92. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimoies R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jun 7. PubMed PMID: 23742162.
93. Develioglu H, Saraydin SU, Dupoirieux L, Sahin ZD. Histological findings of long-term healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2007 Feb;80(2):505-8. PubMed PMID: 17120224.
94. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *Journal of applied oral science : revista FOB.* 2010 Jul-Aug;18(4):346-53. PubMed PMID: 20835568.
95. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral diseases.* 2008 Jul;14(5):457-64. PubMed PMID: 18938272.
96. Silva RV, Camilli JA, Bertran CA, Moreira NH. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2005 Mar;34(2):178-84. PubMed PMID: 15695048.
97. Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen): an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct;19(10):1010-5. PubMed PMID: 18828817.
98. Verna C, Dalstra M, Wikesjo UM, Trombelli L, Carles B. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002 Sep;29(9):865-70. PubMed PMID: 12423301.
99. Paulo Ade O, Castro S, II, Oliveira DF, Machado ME, Bonetti-Filho I, Granjeiro JM. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. *Brazilian dental journal.* 2011;22(4):322-8. PubMed PMID: 21861033.
100. Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, et al. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials.* 2010 Apr;93(1):65-73. PubMed PMID: 20024970.
101. de Brito Bezerra B, Mendes Brazao MA, de Campos ML, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Aug;23(8):938-42. PubMed PMID: 21689163.
102. Straumann MembraGel® – The next generation membrane.: Straumann; 2010 [10-06-2013]. Available from: http://www.straumann.us/content/dam/internet/straumann_us/Resources/LIT335_MembraGel_Brochure.pdf.
103. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental materials journal.* 2009 Jul;28(4):396-400. PubMed PMID: 19721275.

104. Humber CC, Sandor GK, Davis JM, Peel SA, Brkovic BM, Kim YD, et al. Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010 Mar;109(3):372-84. PubMed PMID: 20060340.

105. Chilosi M, Gilioli E, Lestani M, Menestrina F, Fiore-Donati L. Immunohistochemical characterization of osteoclasts and osteoclast-like cells with monoclonal antibody MB1 on paraffin-embedded tissues. *The Journal of pathology*. 1988 Nov;156(3):251-4. PubMed PMID: 2904980.

Índice de Tabelas, Ilustrações e Fotomicrografias

Tabela 1 - Tempo aproximado para a reabsorção dos poliésteres sintéticos, adaptado de Hutmacher, <i>et al.</i> (1996) (43).....	36
Tabela 2 - Membranas de colagénio disponíveis no mercado, adaptado de Behring, <i>et al.</i> (2008) (8).....	38
Tabela 3 - Género e peso inicial/final dos ratos.	75
Tabela 4 – Dados utilizados na análise histomorfométrica dos defeitos de controlo.....	85
Tabela 5 - Dados utilizados na análise histomorfométrica dos defeitos de teste.	85
Tabela 6 - Distribuição de frequências dos defeitos de controlo e dos defeitos de teste.....	86
Tabela 7 - Análise descritiva da percentagem de área regenerada nos defeitos de controlo e nos defeitos de teste.....	86
Tabela 8 - Teste de normalidade.....	88
Tabela 9 - Teste T para amostras independentes.....	88
Ilustração 1 - Tipos de enxerto, adaptado de Lindhe, <i>et al.</i> (2008) (6).....	44
Ilustração 2 - Digitalização de imagens de microscopia eletrónica das partículas de Straumann®BoneCeramic, com ampliações de 20x, 80x, 500x e 2000x. Adaptação de Tirkkonen <i>et al.</i> (2013)	54
Ilustração 3 - Instruções de preparação da membrana de PEG – Strauman®MembraGel (102).....	66
Ilustração 4 - Rato Wistar sobre plataforma aquecida.....	67
Ilustração 5 - Defeitos criados com auxílio a uma chave de metal padronizada.	68
Ilustração 6 - Defeito crítico esquerdo sem preenchimento,.....	69
Ilustração 7 - Recobrimento dos defeitos com a membrana de hidrogel de PEG.	69
Ilustração 8 – Radiografia coronal à calote craniana do rato Wistar e digitalização.....	70
Ilustração 9 - Amostra de tecido ósseo, recolhida de um animal sacrificado. ..	71
Ilustração 10 - a – micrótomo de disco de diamante (Accutom - Struers A/S, Ballerup, Denmark), com solução lubrificante; b – detalhe do disco de diamante; c – equipamento de polimento (Struers DAP-8, Struers A/S, Ballerup, Denmark).....	72
Ilustração 11 - Microscópio ótico Leica, câmara fotográfica Leica,	73
Ilustração 12 – Aspeto macroscópico das lesões após dois meses.....	76
Ilustração 13 - Radiografia coronal da cabeça do rato e ampliação, a seta marca o defeito com preenchimento ósseo com FCB.....	76
Ilustração 14 - Percentagem de área total regenerada nos defeitos de controlo e de teste, representados num diagrama de extremos e quartis.....	87

Fotomicrografia 1 - Defeito de controlo com membrana de PEG. Ampliação de 25x, num corte histológico realizado no centro do defeito ósseo. Marcações: INF – exsudado inflamatório.....	77
Fotomicrografia 2 - Defeito de controlo com membrana de PEG. Ampliação de 25x, num corte histológico realizado na periferia do defeito ósseo. Marcações: seta verde – zona de neoformação, setas amarelas – base do defeito ósseo.	78
Fotomicrografia 3 - Defeito de controlo com membrana de PEG. Ampliação de 50x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo.....	78
Fotomicrografia 4 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB, ** - membrana de PEG.	79
Fotomicrografia 5 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB, ** - membrana de PEG, INF – exsudado inflamatório.....	80
Fotomicrografia 6 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 100x. Marcações: seta azul - feixes de tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB.....	80
Fotomicrografia 7 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 25x. Marcações: seta vermelha – rutura da tábua interna do osso parietal.....	81
Fotomicrografia 8 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 100x. Marcações: seta vermelha – tecido conjuntivo, seta verde – zona de neoformação, seta amarela – base do defeito ósseo, * - partículas de FCB.....	82
Fotomicrografia 9 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 400x. Marcações: seta vermelha – tecido fibroso, seta verde – zona de neoformação, * - partícula de FCB.	82
Fotomicrografia 10 - Defeito preenchido com FCB e recoberto pela membrana de PEG. Ampliação de 400x. Marcações: seta branca – osteoclasto, * - partícula de FCB.	83
Fotomicrografia 11 - Análise histomorfométrica de um dos defeitos de controlo. A marcação da área total do defeito corresponde à linha vermelha, enquanto a área de neoformação está delimitada a azul.....	84
Fotomicrografia 12 - Análise histomorfométrica de um dos defeitos de teste. A marcação da área total do defeito corresponde à linha vermelha, enquanto a área de neoformação está delimitada a azul.....	84

Anexo

Artigo	N	Idade/peso	Defeito	Meses				Biomaterial
				1	3	6	18	
Develioglu, 2006 (72)	20	250/300g	5mm Osso parietal bilateral	-	N=10	N=10		1- FCB (65%:35%) 900-1200µm 2- SP
Jones, 2007 (73)	60	6 meses	5mm Osso parietal bilateral	N=20	N=20	N=20		1-Hydroxihapatite de coral 400-1000 µm 2- DBM 100-500 µm 3- Autógeno 500 µm 4- SP
Develioglu, 2007 (93)	12	260-300g	6mm Osso parietal bilateral	-	-	-	N=12	1- FCB (65%:35%) 900-1200µm 2- SP
Guskuma, 2010 (94)	5	3 a 4 meses 200-300g	5mm Osso parietal bilateral	N=5	-	-		1- Osso removido do defeito contra lateral 150 µm 2- SP
Takeuchi, 2009 (59)	72	8 semanas	4,3mm Osso parietal (N=36) 2x10x3 mm Osso femoral (N=36)	3 dias N=12 5 dias N=12 1 semanas N=12 2 semanas N=12 4 semanas N=12 8 semanas N=12				1- β- FTC 300-500 µm 2- CAP 300-500 µm 3- SP
Moreira, A. 2011 (5)	10	19-21 semanas	4mm Osso parietal	5ª semana N=5 7ª semana N=5				1- Matriz óssea equina 2- Matriz óssea equina + grelina 3- Matriz óssea equina + calcitonina
Honma, T. 2008 (95)	94	12 semanas	3,8 e 8,8mm osso parietal	24 semanas				SP
Silva, R. V. 2005 (96)	29	8 semanas	5mm Osso parietal	Após a cirurgia n=1 2 semanas n= 8 4 semanas n=6 8semanas n=6 24 semanas n= 8				1- Bloco de HA 2- Osso autólogo esponjoso

SP – Sem preenchimento; DBM – Osso bovino inorgânico; CAP- Carbonato de apatite.