

Avaliação de hidroxiapatita bovina no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de rato

Evaluation of the bovine hydroxyapatite bone defect repair in rat calvaria critical

Lilian Souza Campos¹; Fabiana Paim Rosa²

¹Doutorada em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – ICS/UFBA; ²Professora Adjunta de Patologia – ICS/UFBA

Resumo

Introdução: Dentre os biomateriais para regeneração óssea, os de origem xenogênica têm se mostrado como alternativa ao autoenxerto devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas, além de sua grande disponibilidade e de minimizar a morbidade ao indivíduo. Vários trabalhos consideram o BioOss[®], uma hidroxiapatita bovina, como padrão ouro entre os biomateriais de substituição óssea, independentemente do tamanho de suas partículas, apesar de esse fator ser considerado importante nas reações tissulares envolvidas na neoformação óssea. **Objetivo:** Avaliar histologicamente o comportamento biológico de uma Hidroxiapatita Bovina, na forma de grânulos, entre 0,4 a 0,6 mm, implantados em defeitos ósseos críticos em calvária de rato. **Metodologia:** Foram utilizados 20 ratos distribuídos em 2 grupos experimentais: Grupo GC (controle com coágulo) e Grupo GBS (implantados com hidroxiapatita bovina) nos quais foi efetuado um defeito crítico de 8,5 mm de diâmetro na calvária. A eutanásia foi realizada em dois pontos biológicos, aos 15 e 45 dias pós-operatórios e os espécimes foram processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), e picrossírius-vermelho (PIFG), e foram analisados histologicamente em microscópio de luz comum. **Resultados:** No grupo controle, observou-se, neoformação óssea reacional restrita às bordas e presença de tecido fibroso na área do defeito. No grupo implantado com BioOss[®], observou-se mínima reação inflamatória, abundante angiogênese e alguma osteogênese, além das bordas, ao longo do defeito, especialmente em continuidade à dura-máter. **Conclusão:** Concluiu-se que o BioOss[®] foi biocompatível e promoveu osteogênese por osteocondução, mantendo-se parcialmente integrado ao osso neoformado.

Palavras-chave: Biomateriais. Bioengenharia. Regeneração óssea. Xenoenxerto.

Abstract

Introduction: Among the biomaterials for bone regeneration materials of xenogeneic origin have shown up as an alternative to autografts. This is, in addition to its wide availability, and its ability to minimize the morbidity of the individual, due to its biological and physical-chemical properties. Several papers consider BioOss[®], a bovine hydroxyapatite, as the gold standard among biomaterials for bone replacement. The size of its particles is irrelevant to this statement, although it is considered an important factor in tissue reactions during bone formation. **Objective:** The objective was to evaluate histologically the biological behavior of BioOss[®] in the form of granules (0.4 mm to 0.6 mm) implanted in critical bone defects in rat calvaria. **Materials and Methods:** 20 rats were divided into two experimental groups: GC (control, no implantation, defect filled with clot) and GBS (implantation with BioOss[®]). A critical defect of 8.5 mm was introduced into the calvaria of the rats. Euthanasia was performed at the biological time points of 15 and 45 days post operatively. In order to finalize the processing, the specimens i.e. the histological sections were either stained with hematoxylin and eosin (H&E stain), or picrossirius-red (PIFG). The analyses were made by common light microscopy. **Results:** In the GC-group reactive new bone formation, restricted to the edges of the defect, and the presence of fibrous tissue throughout the majority of the defect area, were observed. In the GBS-group minimal inflammatory response, abundant angiogenesis, and osteogenesis were detected beyond the edges of the defect, especially in proximity to the *dura mater*. **Conclusion:** In conclusion, BioOss[®] can be considered biocompatible. It promotes osteogenesis, by osteoconduction, and is partly integrated in newly formed bone.

Keywords: Biocompatible Materials. Bioengineering. Bone Regeneration. Xenograft.

INTRODUÇÃO

Defeitos críticos são aqueles em que o processo de reparo tecidual não é capaz de devolver as características naturais do tecido lesado. Eles estão ligados não somente às dimensões, mas também às

características locais da região do defeito, como a ausência de células progenitoras, a precária irrigação sanguínea, ou ainda as condições sistêmicas do indivíduo (CASTRO-SILVA, I. L., ZAMBUZZI, W. F., GRANJEIRO, J. M., 2009).

No caso dos defeitos ósseos críticos, além do restabelecimento estético, existe a necessidade de devolver a função a um tecido altamente especializado, capaz de suportar cargas e propiciar movimento tanto de locomoção quanto de mastigação. Assim, o enxerto ósseo ideal deve possuir características que supram tais necessidades, além de biocompatibilidade,

Recebido em 29/06/2012; revisado em 20/08/2012.

Correspondência / Correspondence: Secretaria do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: (55) (71) 3283-8959, Fax: (55) (71) 3283-8894. E-mail - ppgorgsistem@ufba.br

capacidade osteocondutora e osteoindutora, resistência e plasticidade (MAH, J., 2004; ROLIM, 2010).

Os enxertos autógenos ainda hoje são considerados padrão ouro quando implantados em defeitos ósseos. Entretanto, a necessidade de uma segunda cirurgia com relativa morbidade, além da possível indisponibilidade de um sítio doador que forneça quantidade suficiente de tecido para preencher o volume ausente da área receptora são fatores que estimulam a busca de um substituto ósseo biocompatível que restabeleça função e estética (MAH, J., 2004; MORDENFELD et al., 2010).

Os biomateriais oriundos de animais são denominados de xenoenxertos e têm sido amplamente estudados como alternativa ao enxerto autógeno. Quando adequadamente processados – com a remoção completa de proteínas, restos celulares, lipídios – e livres de patógenos, apresentam-se biocompatíveis e osteocondutores, formados basicamente por hidroxiapatita, com a vantagem da grande disponibilidade, ocupando um papel de destaque no auxílio ao reparo ósseo (CASTRO-SILVA, I. L., ZAMBUZZI, W. F., GRANJEIRO, J., M., 2009).

Graças à sua porosidade e a seu desenho tridimensional, o osso bovino tem grande importância entre os biomateriais, podendo ser utilizado também como carreador de células e de fatores de crescimento, fornecendo, ainda, um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais na neoformação óssea, além de propiciar o desenvolvimento de vasos sanguíneos importantes para a manutenção da vitalidade do enxerto (VOLKOV, 2010).

Atualmente, existem, no mercado, várias marcas comerciais para o osso bovino desproteínizado. O BioOss® tem sido amplamente estudado e comercialmente utilizado, com bons resultados clínicos. Consiste de uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular, e sua estrutura é química e fisicamente comparável à matriz mineral do osso humano (PEETZ, 1997; BENKE et al., 2001).

Estudos *in vivo* e clínicos baseados em análises histomorfométricas demonstraram melhor performance de xenoenxertos em relação aos materiais aloplásticos e alógenos, possivelmente em função das propriedades inerentes da apatita natural e, ainda, da arquitetura porosa naturalmente desenhada. Estudos recentes têm avaliado a associação de xenoenxertos a fatores de crescimento e células osteoprogenitoras, com o intuito de aproximar a sua resposta tecidual à dos enxertos autógenos (MAH et al., 2004; CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009).

Apesar de muito utilizado em procedimentos de aumento de altura e volume ósseo em cirurgias de levantamento de seio maxilar para futura reabilitação com implantes dentários, os enxertos xenogênicos têm como desvantagem uma baixa resistência às forças mecânicas. Assim, não é possível sua fixação com parafusos, nem a submissão de carga imediata, necessitando-se de um período relativamente longo para que a neoformação óssea ocorra, em geral de 6 a 9 meses, a depender da extensão do enxerto, com um índice maior de perda quando comparado a situações de suficiente quantidade e qualidade óssea originais, o que limita sua utilização (KRUSE, 2011).

Uma grande preocupação na utilização do xenoenxerto é quanto à possibilidade de transmissão de doenças, especialmente a encefalopatia espongiforme bovina (BSE). Para afastar a possibilidade dessa ocorrência, foram instalados rigorosos controles quanto à seleção de animais livres de BSE e o processamento adequado do osso com substâncias alcalinas capazes de remover o príon, agente etiológico da BSE (CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009).

O BioOss® é constituído de partículas de hidroxiapatita de origem bovina, produzido por Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça, e distribuído comercialmente em dois padrões de tamanhos médios, um entre 0,25 a 1mm e outro de 1 a 2mm, sendo, em seu processamento, desproteínizado e sinterizado a 1100°C. Tem porosidade entre 70% a 75%, com poros de tamanhos variáveis, compatíveis com a formação de capilares e vasos sanguíneos em seu interior (PEETZ, 1997; BENKE et al., 2001).

A caracterização físico-química de materiais de substituição óssea é fundamental, pois parâmetros como cristalinidade, área superficial dada pela porosidade, tamanho das partículas, além da composição do biomaterial, influenciam sua taxa de degradação após a implantação e, conseqüentemente, o reparo. Produtos com cristalinidade alta, decorrente de tratamento térmico de sinterização, podem ser de difícil reabsorção e permanecem presentes no local implantado mesmo depois de longos períodos de demora, o que contradiz uma das qualidades desejáveis na regeneração tecidual (CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009).

O tamanho das partículas do biomaterial relaciona-se diretamente com a velocidade de reabsorção e a conseqüente substituição pelo tecido do hospedeiro. Embora muitos estudos tenham sido efetuados com a forma macrogranular, de dimensões de até 2 mm, com resultados considerados positivos e sem diferenças significativas entre si, é possível que, ao modificarmos essa seleção, obtenhamos resultados diferentes.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar histologicamente o comportamento biológico do BioOss® (hidroxiapatita bovina), em um tamanho de partícula de 0,4 a 0,6 mm, após a implantação em defeito ósseo crítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com massa corpórea entre 350 e 400g, do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Para a realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (0,06 mL/kg) e cloridrato de quetamina (0,12 mL/kg).

Após tricotomia e antisepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi feita uma incisão semilunar na calvária e um retalho de espessura total rebatido em direção posterior.

Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 8,5 mm de diâmetro e 0,8 mm de espessura foi criado na calvária com uma broca trefina acoplada em peça de mão de

baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril.

Após um piloto de implantação de BioOss® em calvária de rato, no qual foram utilizadas partículas comercializadas no tamanho entre 0,25 a 1,0 mm, foi escolhida uma faixa de melhores resultados, que compreendia os tamanhos entre 0,4 a 0,6 mm. Para essa seleção, foram utilizados tamises manuais, e a amostra final foi esterilizada em autoclave a 121°C por 30 minutos, a 1 Atm de pressão.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais:

- 1) Grupo GI (controle com coágulo),
- 2) Grupo GII (implantados com hidroxiapatita bovina)

A eutanásia foi realizada em dois pontos biológicos, aos 15 e 45 dias pós-operatórios (tabela 1).

Cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, ao longo do centro do defeito cirúrgico original, e a porção anterior foi descalcificada em solução de EDTA 5% por 6 dias.

Tabela 1. Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico.

Ponto Biológico \ Grupo	Grupo		Total
	GI	GII	
15 dias	5	5	10
45 dias	5	5	10
Total	10	10	20

As peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 4 µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original na área, com 8,5 mm de extensão.

Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, e Picrossírius-vermelho, e foram analisados histologicamente em microscópio de luz comum.

RESULTADOS

Neste estudo, foram observadas partículas de 0,4 a 0,6 mm de osso bovino inorgânico, morfologicamente irregulares, implantadas em defeito crítico em calvária de ratos, por método visual, com o uso de microscópio óptico de luz comum, por avaliação de aspectos morfológicos do reparo ósseo, da evolução do fechamento do defeito e da presença ou não do biomaterial, por comparação desses eventos entre o grupo I (controle) e o grupo II (implantado com biomaterial), em cada ponto biológico. No Grupo I, aos 15 dias, foi observada a presença de células inflamatórias e alguma neoformação óssea a partir das bordas, com tecido conjuntivo frouxo por toda sua extensão. Após 45 dias, as bordas encontravam-se parcialmente reparadas, porém nenhuma neoformação óssea no centro do defeito foi verificada, mantendo-se reparado

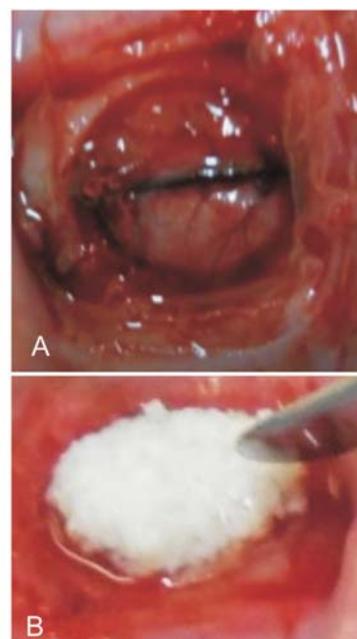


Figura 1: A) Defeito crítico antes da implantação de biomaterial. B) Defeito crítico após a implantação de biomaterial.

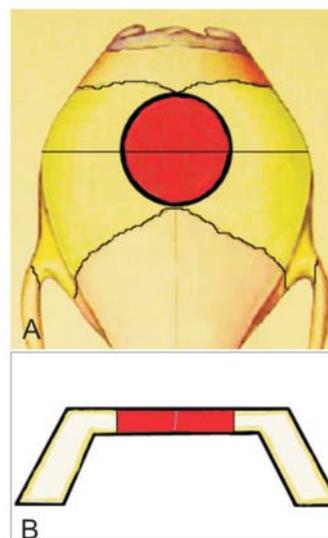


Figura 2: Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato A) Linha de referência para o corte transversal dos espécimes. B) Corte transversal da extensão linear e da área seccional (Adaptado de ROLIM, 2010).

apenas por tecido fibroso, agora mais denso do que aos 15 dias.

No Grupo II, com implantação de partículas de 0,4 a 0,6 mm, aos 15 dias, observou-se neoformação óssea reacional nas bordas do defeito, além do preenchimento completo do defeito pelo material, em espessura de 4 a 5 camadas, com partículas de tamanho semelhante, porém com formatos diversos, arestas evidentes e “artefactos de retração”, com fissuras e rupturas longitudinais. As partículas encontravam-se encapsuladas por tecido conjuntivo frouxo e escassa matriz osteoide, além da presença de vasos com alguns capilares de permeio e moderado infiltrado inflama-



Figura 3 : Padronização dos espécimes e áreas de corte no ponto biológico 45 dias: A) Vista dorsal do espécime com biomaterial preenchendo a região do defeito. B) Vista ventral do espécime C) Secção transversal na preparação dos espécimes para inclusão, a porção posterior para inclusão em resina e anterior para inclusão em parafina.

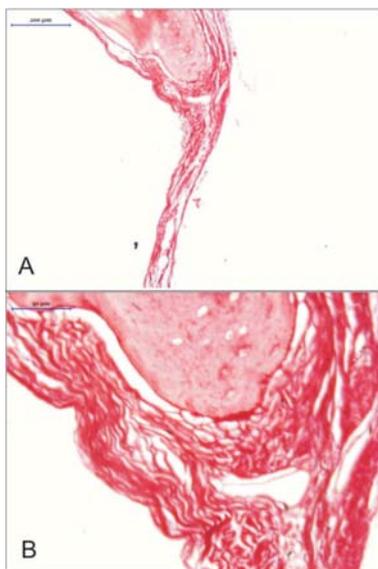


Figura 4: Controle A) Neoformação óssea restrita às bordas ósseas e tecido conjuntivo fibroso com espessura aquém a da borda óssea - 45 dias - PIFG - 4X B) Neoformação óssea restrita às bordas ósseas e tecido conjuntivo fibroso com espessura aquém a da borda óssea - 45 dias - PIFG - 10X

tório mononuclear, com predomínio linfocitário. Aos 45 dias, a formação óssea nas bordas estava intensificada com matriz osteoide entre as partículas, especialmente na região em contato com a dura-máter. O infiltrado inflamatório era menos conspícuo que aos 15 dias. O material permaneceu presente por todo o defeito, em espessura de 4 a 5 camadas, com partículas de tamanho semelhante e formas variadas, porém com uma superfície mais arredondada e encapsulada por um tecido conjuntivo mais denso, fibroso e estável, com capilares bem definidos. A fragmentação do material persiste, bem como os “artefactos de retração”.

DISCUSSÃO

A aplicação dos biomateriais classificados como substitutos ósseos em situações clínicas tem de obedecer a um planejamento com relação aos resultados que se pretende obter. Assim, o objetivo das pesquisas experimentais é proporcionar o conhecimento das respostas biológicas dos diversos materiais que estão à disposição no mercado e aplicá-los de forma consciente em situações clínicas.

A caracterização biológica *in vivo* possibilita evidenciar, em sítios ortotópicos como calvária, tíbia, fêmur ou rádio, o padrão de reparo ósseo, em diferentes modelos animais experimentais, tais como camundongo, rato, cobaia, porco-da-índia, porco, coelho, cão e ovelha. Assim, a avaliação do reparo ósseo em defeito crítico, nesta experimentação animal, possibilitou-nos investigar a capacidade osteogênica e a biocompatibilidade do material em uma região anatômica pobre em suprimento sanguíneo e osso medular. Deve-se considerar também que os defeitos em calvária não se reparam da mesma forma que defeitos em ossos longos, pela sua morfologia, com reduzida fonte de células osteoprogenitoras, grande carga funcional pela inserção de vários grupos musculares e metabolismo ósseo distinto. Além disso, não foram utilizadas membranas como barreira física e, assim, a proliferação de outros tipos celulares, como células do tecido conjuntivo, para o interior do defeito, pode ter contribuído para uma diminuição da diferenciação das células osteoprogenitoras, essenciais para a regeneração óssea da lesão.

Tanto aos 15 dias como aos 45 dias, o BioOss® manteve seu arcabouço a mimetizar a arquitetura óssea, fato esse observado nos estudos de Galindo-Moreno et al. (2007), Wallace, et al. (2005) e Traini, et al. (2007), que relataram uma interconectividade entre as partículas, através de pontes trabeculares de osso novo, o que propicia a formação de um enxerto integrado, sólido e de alta densidade.

A presença de vasos sanguíneos observada em nossos resultados foi muito importante para a ocorrência da osteogênese, pois permitiu a nutrição desse tecido neoformado, o que foi de encontro aos achados de Lee, et al. (2008) e Galindo-Moreno, et al. (2007), que mencionaram uma rica rede de vasos encontrados em suas peças, provavelmente devido à presença de poros biologicamente desenhados, por se tratar de um material oriundo de tecido ósseo.

Quanto ao infiltrado inflamatório discreto observado, ele não despertou reação granulomatosa, por ser inerte, o que também foi observado nos estudos de Traini, et al. (2007), Piattelli, et al. (1999), Degidi, et al. (2006) e Scarano, et al. (2006), corroborando a elevada biocompatibilidade do material.

Em nosso estudo, aos 45 dias, não foi verificada absorção significativa do material, observada apenas pelo arredondamento das espículas das partículas, devido à ação biológica no leito receptor, o que já foi

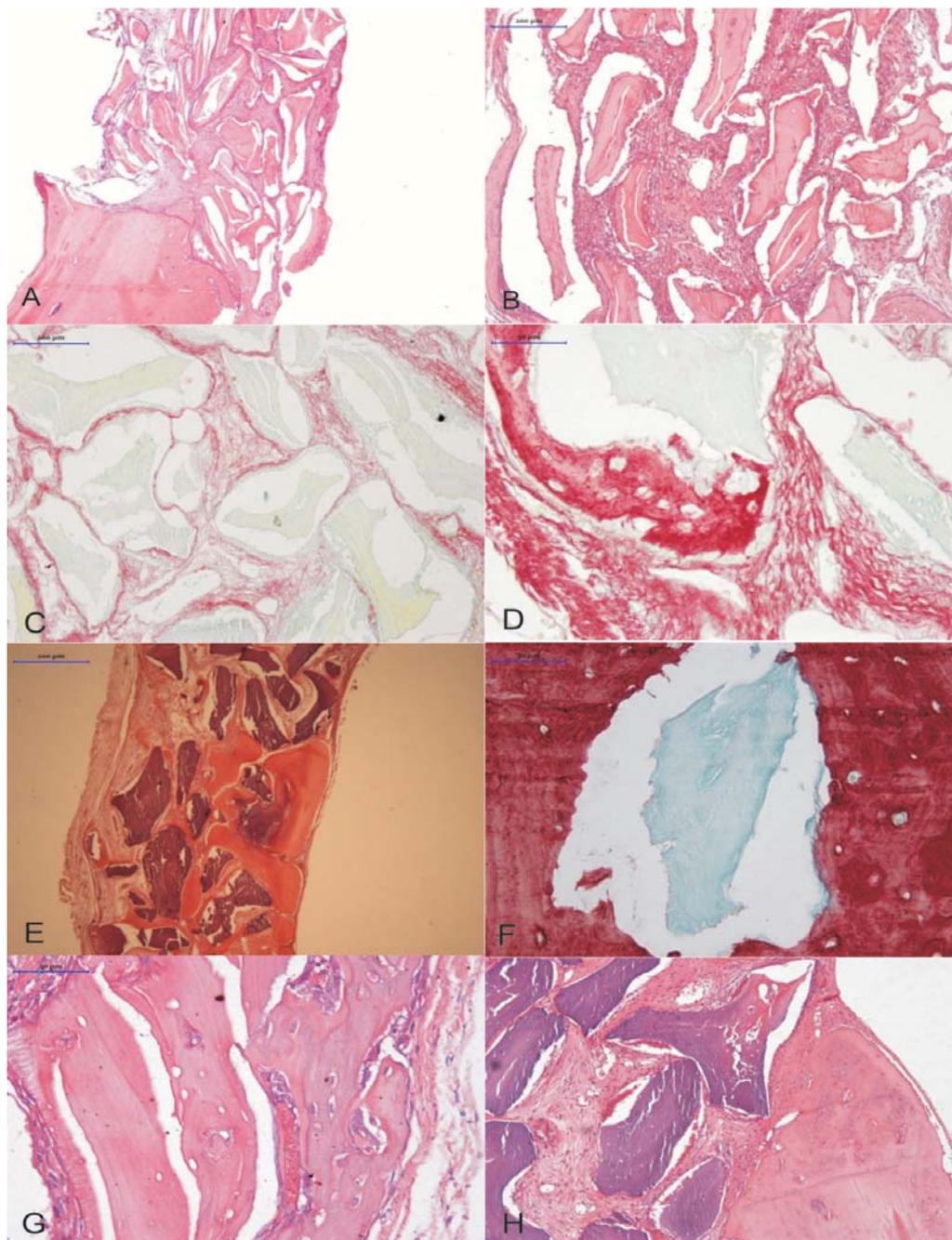


Figura 5: Grupo II A) Neoformação reacional na borda- 15dias – HE – 4X. B) Partículas encapsuladas por tecido fibroso e vasos- 15 dias – HE – 10X. C) Partículas com espículas evidentes já fragmentadas a apresentarem fissuras – 15 dias – PIFG 10X. D) Matriz osteoide próxima à partícula de biomaterial – 15 dias PIFG – 40X. E) Neoformação reacional na borda que continua em direção ao centro do defeito – 45 dias -HE -4X. F) Partícula de biomaterial integrado a matriz osteoide com artefacto de retração – 45 dias – PIFG – 40X. G) Poros do biomaterial a mimetizar o tecido ósseo e grande formação de vasos sanguíneos – 45 dias – HE – 40X. H) Arredondamento das arestas das partículas pela ação biológica no leito receptor – 45 dias – HE – 10X.

observado por Artzi et al. (2003), que avaliou enxertos de hidroxiapatita bovina com grânulos de tamanho entre 250 a 1000µm em mandíbula de cão, os quais permaneceram presentes nos sítios experimentais, sem absorção considerável, durante o acompanhamento da remodelação óssea, por dois anos.

Idealmente, um substituto ósseo deveria conduzir ou induzir a osteogênese, ao mesmo tempo em que é completamente absorvido. Para Lee, et al. (2008), em estudo de hidroxiapatita bovina, tal

reabsorção foi mesmo considerada ausente. Segundo Traini et al. (2007), uma hipótese que poderia justificar essa lenta reabsorção seria a das altas concentrações de Ca⁺⁺ lançadas no meio, devido aos ácidos secretados pelos osteoclastos sobre as partículas, as quais, por retroalimentação negativa, os inibiriam, o que pode parecer contraditório quando analisamos outros biomateriais.

Por serem parâmetros fundamentais, as propriedades físico-químicas de materiais de substitui-

ção óssea, como cristalinidade, área superficial e composição do biomaterial influenciam sua taxa de degradação após implantação. Assim, a sinterização a que o material foi submetido pode ter dificultado o processo de reabsorção.

A neoformação óssea observada neste estudo ocorreu em continuidade às bordas do defeito e preferencialmente em contato com a região da duramáter, o que caracteriza o potencial osteocondutivo do material, com ação de arcabouço que se manteve estável durante a osteogênese. Embora não tenhamos avaliado histomorfometricamente a neoformação óssea, nos estudos de Artzi et al. (2003), foi realizada essa mensuração, obtendo-se 23,10% de preenchimento de novo osso após 120 dias de implantação, resultado ainda aquém do desejado para um biomaterial cujo propósito é a regeneração desse tecido.

A qualidade desse novo osso formado também tem sido muito investigada. Apesar de Cordaro, et al. (2008), em suas peças, ter observado, no enxerto, uma alta porcentagem de tecido mineralizado, quando comparado ao tecido ósseo remanescente – o que lhe permitiu concluir que o enxerto com BioOss® produziu um trabeculado mais denso que o osso pré existente, devido, justamente, à presença residual de partículas de biomaterial –, podemos pensar que, a longo prazo, na interface entre o tecido ósseo e o biomaterial, poderão ocorrer novos processos de reabsorção, com a desagregação dessas partículas e o conseqüente risco ao enxerto e ao que ele suporta.

O BioOss® mostrou ser um material biocompatível, osteocondutor, de lenta reabsorção, que serviu de guia e foi incorporado pela neoformação óssea, mas, mesmo assim, existe a necessidade de se estudar melhor tanto o verdadeiro significado dessas partículas de BioOss® osseointegradas como suas conseqüências, focalizando-se a avaliação da qualidade desse tecido a longo prazo. Nos estudos de Lee, et al. (2008), Piattelli e colaboradores (1999), Scarano e colaboradores (2006) e Degidi e colaboradores (2006), são relatadas revitalizações dos Canais de Harvers nas partículas de BioOss®, com íntimo contato delas com o novo osso formado, parcialmente ou totalmente envolvidas por ele, com osteoblastos a depositarem matriz óssea diretamente sobre sua superfície. Porém tais estudos foram realizados em indivíduos saudáveis, o que pode ser diferente em situações com algum comprometimento sistêmico.

Embora o osso desmineralizado tenha sido utilizado em diversas pesquisas experimentais e aplicado clinicamente, é importante a comprovação científica de sua ação. Com a metodologia empregada neste trabalho, não foi possível confirmar a osteocondutividade desse material. No entanto, foi possível afirmar que se trata de material biocompatível, que favoreceu a formação de novos vasos, permitiu que o tecido ósseo neoformado tivesse contato íntimo com suas partículas e conduziu a osteogênese, como um arcabouço, o que caracteriza propriedades angiogênicas, de osseointegração e osteocondução.

Quanto aos locais de ausência do material e de “artefatos de retração”, não foi possível afirmar que as partículas foram reabsorvidas, pois há a possibilidade

de que elas tenham sido expulsas do defeito, devido ao processamento histológico da peça.

CONCLUSÃO

Neste estudo concluiu-se que o BioOss®, em grânulos de 0,4 a 0,6 mm, foi biocompatível, permitiu angiogênese e promoveu osteogênese, devido ao seu potencial osteocondutor, mantendo-se integrado ao tecido neoformado.

REFERÊNCIAS

- ARTZI, Z. et al. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 1: Description of a dog model and histological observations. *J periodontol.*, Indianapolis, v. 74, n. 8, p. 1143-1152, Aug. 2003.
- BENKE, D.; OLAH, A.; MOHLER, H. Protein chemical analysis of bio-oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials.*, Guildford, n. 22, p. 1005-1012, 2001.
- CARVALHO, A. L. **Efeitos do tamanho dos grânulos na osteocondutividade de hidroxiapatitas bovina e sintética:** estudo histológico e histomorfométrico em cães. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CASTRO-SILVA I.I.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. *Innov Implant J, Biomater Esthet.* São Paulo, v. 4, n. 3, p. 70-75, set./dez., 2009.
- CHACKARTCHI, T. et al. Sinus floor augmentation using large (1–2mm) or small (0.25–1mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin. oral implants res.*, Copenhagen, v.22, n. 5, p. 473-480, 2011.
- CORDARO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicentre clinical trial. *Clin. oral implants res.*, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 796-803, aug. 2008.
- DEGIDI, M. et al. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss. *Oral dis.*, Houndmills, v. 12, n. 5, p. 469-475, Sept. 2006.
- GALINDO-MORENO, P. et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin. oral implants res.*, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 376-382, jun. 2007.
- KRUSE, A. et al. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide -based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material. *Clin. oral implants res.*, Copenhagen, v.22, n. 5, p. 506 - 511, 2011.
- LEE, C. Y.; ROHRER, M. D. Prasad H.S., Immediate loading of the grafted maxillary sinus using platelet rich plasma and autogenous bone: a preliminary study with histologic and histomorphometric analysis. *Implant dent.*, Baltimore, v. 17, n. 1, p. 59-73, mar. 2008.
- MAH, J. et al. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur. j. orthod.*, Oxford, v.26, n. 5, p. 475-482, 2004.
- MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin oral implants res.*, Copenhagen, v.21, n. 9, p. 961-970, 2010.
- PEETZ, M. Characterization of xenogeneic bone material. In: BOYNE, P. J. (ed.). **Osseous Reconstruction of the Maxilla and Mandible**, Chicago: Quintessence, 1997, p. 87-93.
- PIATTELLI, M. et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Inter j oral maxillofac implants.*, Lombard, Ill, v. 14, n. 6, p. 835-840, nov./dec. 1999.

ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatitas dopadas ou não com estrôncio no reparo de defeito ósseo crítico em calvária de rato.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SCARANO, A. et al. Maxillary sinus augmentation with diferente biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. **Implant dent.**, Baltimore, v. 15, n. 2, p. 197-207, jun. 2006.

TRAINI, T. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus

augmentation procedure. **J. Periodontol.**, Indianopolis, v. 788, n. 5, p. 955-961, may. 2007.

VOLKOV, V. Regeneration of Skull Bones in Adult Rabbits after Implantation of Commercial Osteoinductive Materials and Transplantation of a Tissue-Engineering Construct. **Bull Exp Biol Med.**, New York, v. 49, n. 4, p. 505-510, 2010.

WALLACE, S.S.; FROUM, S. J. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 8, n. 1, p. 328-343, dec. 2003.