

ANDRÉA PANGRATZ STEILEIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIOMATERIAS PARA ENXERTO
ÓSSEO EM ODONTOLOGIA**

CAMPO GRANDE

2014

ANDRÉA PANGRATZ STEILEIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIOMATERIAIS PARA ENXERTO
ÓSSEO EM ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível de Mestrado da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior.

CAMPO GRANDE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDRÉA PANGRATZ STEILEIN

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE BIOMATERIAIS PARA ENXERTO
ÓSSEO EM ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Odontologia, da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior

Aprovada em _____ de _____ de _____, pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior (Membro) - UFMS

Prof^a. Dr^a. Nára Rejane S. Pereira (Membro) - UFMS

Prof. Dr. Anísio Lima da Silva (Membro) - UFMS

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva (Suplente) - UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Silvio e Rosane que sempre estiveram presentes me dando todo o apoio necessário, a minha irmã, Adriana pelo auxílio mesmo a distância. Ao meu esposo Lucas pela paciência, incentivo e contribuição para esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** porque sem Ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior** pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido ao longo desses dois anos. Obrigada por todo o apoio que foi imprescindível para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul** e a todos os seus professores e funcionários que sempre estiveram presentes auxiliando no desenvolvimento desse projeto desde o primeiro dia.

Ao meu esposo **Lucas Tristão Prieto**, companheiro de todas as horas, por estar ao meu lado me incentivando a percorrer esse caminho.

Aos meus pais **Silvio e Rosane** sem os quais a minha formação como profissional não teria se concretizado, agradeço pelos ensinamentos por todo o carinho e amor a mim dedicados. Sem os seus exemplos de perseverança e integridade nada disso seria possível.

À minha irmã **Adriana** pelo apoio, incentivo e contribuições na elaboração dessa pesquisa.

A todos que me ajudaram direta e indiretamente, colegas de mestrado, amigos e funcionários dessa Universidade sem os quais esse momento não ocorreria.

“A ciência consiste em substituir o saber que parecia seguro por uma teoria, ou seja, por algo problemático.”

(José Ortega Y Gasset)

RESUMO

STEILEIN, AP. **Análise Histológica de biomateriais para enxerto ósseo em Odontologia**. Campo Grande; 2013. [Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

A doença periodontal é uma inflamação dos tecidos de suporte dos dentes que leva a perda do ligamento periodontal e osso alveolar. Os objetivos da terapia periodontal são redução de bolsa, regeneração do aparato de inserção funcional e restauração do osso alveolar perdido. Pesquisas clínicas sugerem que uma das técnicas mais previsíveis para a obtenção de sucesso no tratamento, é a combinação da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) a biomateriais para enxerto. Há um aumento nos últimos anos do interesse no desenvolvimento de um biomaterial capaz de promover regeneração óssea, visto que apesar do osso autógeno ser um material com capacidade osteoindutora e osteogênica, apresenta inconvenientes que estimulam a busca por um material ideal. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar histologicamente três diferentes biomaterias, dois enxertos xenógenos - Bio-Oss®, o Gen-Ox® e o biopolímero quitosana, utilizando-se a membrana de quitosana da HemCon®. Pode-se concluir que devido à variabilidade da natureza física e química entre os enxertos para substituição óssea, a meta de reproduzir ou reconstruir as estruturas periodontais perdidas, o aumento de espessura e altura óssea para a colocação de implantes têm sido conseguida com taxas variáveis de sucesso. Ainda que uma infinidade de estudos procure estabelecer padronização no emprego desses biomateriais para enxertos ósseos na periodontia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial, assim como suas vantagens e desvantagens quando usados sozinhos ou em associações, há ainda muitas divergências em relação ao sucesso à longo prazo se comparados ao osso autógeno.

Palavras-chaves: Materiais Biocompatíveis; Quitosana; Regeneração Óssea.

ABSTRACT

STEILEIN, AP. **Histological evaluation of bone graft biomaterials in Odontology.** Campo Grande; 2013. [Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

Periodontal disease is an inflammation of the supportive tissues of the teeth that results in damage to the soft tissue and bone that support the teeth. The goal of periodontal therapy is pocket reduction, regeneration of the attachment apparatus and functional restoration of lost alveolar bone. Clinical trials suggest that a more predictable techniques for obtaining successful treatment is the combination of guided tissue regeneration (GTR) and biomaterials for grafting. There is an increased interest in the development of biomaterials capable of promoting bone regeneration. Therefore, despite a consensus about the autogenous bone be an osteogenic and osteoinductive potential, other biomaterials have been studied. The aim of this experiment was to investigate three different biomaterials, two xenograft material (Bio-Oss® Wolhusen Geistlich Pharma, Switzerland) and Gen-Ox® (Baumer - São Paulo-Brazil) and biopolymer chitosan membrane (HemCon® – USA). It can be concluded that due to the variability of the physical and chemical nature from the bone grafts to, the target reproduce or reconstruct the lost periodontal structures, the increased thickness and height for bone implants have been achieved with varying rates of success. Although recents studies seek to establish standardization in the use of these biomaterials in periodontics, implant dentistry and maxillofacial surgery, as well as advantages and disadvantages when used alone or in associations, there are still many differences in relation to successful long term compared to autogenous bone.

Key-words: Biocompatible Materials; Chitosan; Bone Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Enxerto ósseo bovino Gen Ox®.....	35
Figura 2 – Enxerto bovino Bio Oss®.....	36
Figura 3 – Membrana de quitosana HemCon®.....	36
Figura 4 – Ratos Wistar utilizados na pesquisa.....	37
Figura 5 – Administração de anestésico por via intraperitoneal.....	39
Figura 6 – Antissepsia.....	39
Figura 7 – Tricotomia da área a ser operada.....	40
Figura 8 – Complementação anestésica local.....	41
Figura 9 – Incisão inicial na pele.....	41
Figura 10 – Dissecção para exposição do osso da tíbia.....	42
Figura 11 – Perfuração inicial com broca lança.....	43
Figura 12 – Perfuração utilizando broca de implante com 2mm de diâmetro	43
Figura 13 – Defeitos de 2mm de diâmetro em tíbia.....	44
Figura 14 – Preenchimento do defeito com Bio Oss® e Gen Ox®	45
Figura 15 – Recobrimento do defeito com membrana Gem Derm®.....	46
Figura 16 – Sutura do músculo com fio Nylon 5.0.....	46
Figura 17 – Músculo suturado com fio Nylon 5.0.....	47
Figura 18 – Sutura finalizada.....	47
Figura 19 – Peça de tíbia contendo dois defeitos após a remoção.....	48
Figura 20 – Defeitos separados utilizando disco de Carburundum.....	49
Figura 21 – Peças após a separação.....	49
Figura 22 – Colocação das peças em formol.....	50
Figura 23 – Fotomicrografia do defeito preenchido com osso bovino Bio Oss®.....	52

Figura 24 – Fotomicrografia do defeito ósseo tratado com o osso bovino Gen Ox® (7 dias).....	53
Figura 25 – Fotomicrografia do defeito ósseo tratado com membrana de quitosana (7 dias)	54
Figura 26 – Fotomicrografia do defeito tratado com coágulo (7 dias).....	54
Figura 27 – Fotomicrografia do defeito tratado com Bio Oss® (11 dias)	55
Figura 28 – Fotomicrografia do defeito tratado com osso bovino Gen Ox®...	56
Figura 29 – Fotomicrografia do defeito tratado com a membrana de Quitosana (11 dias)	56
Figura 30 – Fotomicrografia do defeito tratado com coágulo (11 dias)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos biomateriais entre os grupos	38
Tabela 2 – Critérios de avaliação histológica.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Escores do infiltrado inflamatório após o período experimental de 7 dias.....	58
Gráfico 2 – Escores do infiltrado inflamatório após o período experimental de 11 dias.....	59
Gráfico 3 – Escores do preenchimento do defeito após o período experimental de 7 dias.....	60
Gráfico 4 – Escores do preenchimento do defeito após o período experimental de 11 dias.....	61
Gráfico 5 – Escores da presença de partículas do biomaterial após o período experimental de 7 dias.....	63
Gráfico 6 – Escores da presença de partículas do biomaterial após o período experimental de 11 dias.....	64
Gráfico 7 – Escores da presença de osso neoformado após o período experimental de 7 dias.....	65
Gráfico 8 – Escores da presença de osso neoformado após o período experimental de 11 dias.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	fosfatase alcalina
BA	área de contato entre osso e implante
BD	densidade óssea
BIC	contato do osso com implante
BMP	proteína morfogenética óssea
DBBM	Osso Bovino desproteinizado
DFDBA	alógeno desmineralizado congelado e seco
FDBA	enxertos alógenos congelados e secos
IC	componente intra-ósseo
HE	hematoxilina e eosina
OC	osteocalcina
PAL	profundidade de inserção clínica
PBBM	bovino desproteinizado
PPD	profundidade de sondagem de bolsa
PRG	plasma rico em fatores de crescimento
PRGF	plasma rico em fatores de crescimento
RBL	ganho de nível ósseo radiográfico
RTG	regeneração tecidual guiada
ROG	regeneração óssea guiada
TGF	beta 2 fator de crescimento tumoral beta 2
VBH	altura óssea

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	unidade de temperatura (graus Celsius)
mm	unidade de comprimento (milímetro)
±	mais ou menos
<	menor que
%	por cento
mg	miligramas
g	gramas
kg	quilograma
ml	mililitros
®	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Enxertos xenógenos.....	18
2.2 Quitosana.....	25
2.3 Comparação entre enxertos xenógenos e quitosana.....	26
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos gerais.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	35
4.1 Materiais avaliados.....	35
4.2 Seleção da amostra.....	37
4.3 Procedimento cirúrgico.....	38
4.4 Análise histológica.....	48
4.5 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	52
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO 1	80

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é definida como uma inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, causada por micro-organismos ou grupos de micro-organismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar. Os maiores objetivos da terapia periodontal inclui redução de bolsa, regeneração do aparato de inserção funcional e restauração do osso alveolar perdido. Ao longo dos anos, vários materiais e técnicas foram desenvolvidos para cumprir esse objetivo, obtendo-se variável grau de sucesso (CARRANZA et al., 2007).

Através do conceito da “compartimentalização” dos tecidos periodontais, estabeleceu-se o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (RTG), cujo maior objetivo seria a exclusão do tecido conjuntivo da ferida e a prevenção do crescimento epitelial. Esse procedimento favorece o crescimento de células com potencial regenerativo (ligamento periodontal, células ósseas e cementoblastos) para dentro da ferida (MELCHER, 1976).

Entretanto, um ponto crítico na RTG é a manutenção de um espaço preservado abaixo da barreira por um período de tempo suficiente para que se tenha a cicatrização e a regeneração possa ocorrer, ou seja, um tempo adequado para que se tenha formação de cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Portanto para compensar esse risco e promover formação óssea, vários materiais para enxerto ósseo têm sido utilizados como adjuntos à RTG (CORTELLINI; BOWERS, 1995).

De acordo com Willians (1987), o biomaterial para enxerto pode ser definido como uma substância ou a combinação de duas ou mais substâncias farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente tecidos e órgãos.

Para Schallhorn (1970) o substituto ósseo ideal deve apresentar potencial de osteogênese, cementogênese e formação de um ligamento periodontal funcional. Osteogênese é a formação de osso mineralizado através do transplante de osteoblastos e só é conseguido com o enxerto autógeno (elementos celulares e células progenitoras devem estar presentes para que isso ocorra). Os outros tipos

de substitutos ósseos não possuem qualquer elemento celular. O melhor que estes materiais podem oferecer é a osteoindução, que é um processo dinâmico de formação óssea induzido por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ativadas quando removidos minerais do osso.

Muitos substitutos ósseos apresentam potencial de osteocondução, a qual ocorre quando o osso cresce por aposição a partir de um osso ou sobre outro osso existente. (GARBIN; GARBIN, 1994).

Uma grande variedade de materiais está disponível para promoção da regeneração óssea e do aparato de inserção periodontal. Esses materiais podem ser classificados, de acordo com sua origem em: autógenos (obtidos do mesmo indivíduo), alógenos/homógenos (indivíduos da mesma espécie), xenógenos/heterógenos (espécies diferentes das do receptor) e aloplásticos (sintéticos) (CARRANZA et al., 2007).

O osso autógeno foi o primeiro substituto a ter aplicação periodontal. Nos anos 70, foram introduzidos os enxertos alógenos congelados e secos (FDBA) já osso alógeno desmineralizado congelado e seco (DFDBA) teve maior aplicação nos anos 80. Também nos anos 80 houve a introdução dos enxertos xenógenos e aloplásticos (BOWERS et al., 1989).

Segundo Buser et al., em 1993, o enxerto xenógeno é um tecido transplantado de uma espécie diferente da do receptor. Como exemplo pode-se citar dois materiais diferentes: o osso bovino e o coral natural (carbonato de cálcio). Ambas as fontes passam por técnicas de processamento e resultam em produtos biocompatíveis e estruturalmente similares ao osso humano.

O osso bovino inorgânico é um material tratado quimicamente para remover seus componentes orgânicos, mantendo sua estrutura microporosa natural e que permite sua reabsorção mediada por células.

Na implantodontia a necessidade de reabilitações em pacientes parcial ou totalmente desdentados, apresentando ossos maxilares deficientes, aumentou a busca por materiais para a reconstrução óssea. Tais procedimentos podem ser realizados antes ou durante a terapia com implantes e principalmente nos casos onde há uma preocupação maior com a estética. Esse resultado pode ser conseguido através da regeneração óssea guiada (combinação da técnica de RTG

com um material de preenchimento) em sítios pós-extração, com a utilização de enxertos ósseos particulados ou em bloco para o aumento de deficiências dos rebordos tanto verticais quanto horizontais (CARRANZA et al., 2007).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxertos xenógenos

Segundo Garbin e Garbin (1994), os mais utilizados são principalmente os de origem bovina. Para Cohen et al., 1994, os enxertos xenógenos são amplamente utilizados na periodontia e que apresentam como grandes vantagens sua provisão ilimitada e segurança provada. O osso bovino desmineralizado além de apresentar boa propriedade osteocondutora e integração com o tecido ósseo sofre reabsorção lentamente através da atividade osteoclástica. Entre suas vantagens cita-se: (1) facilidade de colocação no local, (2) facilidade de adaptação do material no defeito, (3) habilidade do material em apresentar adesão quando colocada no defeito, mesmo com hemorragia significativa, promovendo estabilidade do enxerto, (4) habilidade de manutenção do espaço (BERGLUNDH; LINDHE, 1997).

O osso bovino inorgânico é um material tratado quimicamente para remover seus componentes orgânicos, mantendo sua estrutura microporosa natural e que permite sua reabsorção mediada por células. A ampla utilização desse biomaterial na periodontia ocorre devido a sua provisão ilimitada e segurança provada (COHEN et al., 1994).

Para Stevenson et al., em 1997, o interesse do uso de enxertos ósseos tem aumentado na medicina no tratamento de reconstruções após ressecções tumorais e após perdas ósseas por trauma. De acordo com Nasr et al. (1999) são materiais osteocondutores prontamente disponíveis e livres do risco de transmissão de doenças

A cicatrização promovida através da utilização do Bio-Oss®, impregnado ou não com gentamicina, como adjunto para a regeneração tecidual guiada quando comparado à RTG sozinha foi avaliada em defeitos intra-ósseos de uma ou duas paredes. Sessenta pacientes com no mínimo um defeito ósseo interproximal com profundidade de sondagem de bolsa (PPD) maior que 7mm e evidências radiográficas do componente intraósseo (IC) maior que 4mm foram tratadas ao acaso com membrana reabsorvível (RTG), com membrana reabsorvível combinada com Bio-Oss® impregnado com solução salina, membrana reabsorvível em combinação com o Bio-Oss® impregnado com gentamicina ou apenas cirurgia a

retalho. Todas as modalidades de tratamento resultaram em significativos ganhos estatísticos de nova inserção. Defeitos tratados com apenas RTG apresentaram ganho de nova inserção (PAL) de 2,9mm, profundidade de sondagem (PPD) de 4.9mm, ganho de nível ósseo radiográfico (RBL) 3,1mm e defeito intraósseo residual (IC) de 2,7mm; na RTG combinada com o Bio-Oss® foi observado: ganho de PAL 2,5mm; PPD12: 4,9mm; RBL ganho de 2,8mm; IC 12,3mm). Com Bio-Oss® impregnado com gentamicina 2% foi observado: PAL ganho: 3,8mm; PPD 12: 4,2mm; RBL ganho de: 4,7mm; IC12: 2,1mm. Os defeitos tratados apenas com retalho foram os que demonstraram resposta clínica inferior (ganho de PAL: 1,5mm; PPD12: 5,1mm; ganho de RBL: 1,2mm; IC12: 4,2mm. Concluiu-se que os resultados falharam em demonstrar um efeito adicional do Bio-Oss® em combinação com a RTG na cicatrização de defeitos interproximais profundos de 1 ou 2 paredes ou a combinação de defeitos intraósseos de 1 e 2 paredes quando comparados à RTG sozinha. A aplicação local de gentamicina por outro lado demonstrou melhora nos resultados, mas não em extensões estatisticamente significantes (STAVROPOULOS et al., 2003).

Outro estudo observou que em um ano após o procedimento cirúrgico, tanto o tratamento usando osso bovino e membrana quanto o retalho e debridamento apresentaram significativa redução de sondagem e ganho de inserção. O tratamento com o Bio-Oss® e membrana de colágeno apresentou um aumento de inserção significativamente maior. O ganho de inserção para o grupo teste e controle foi de 4,0mm e 2,1mm respectivamente (SCULEAN et al., 2003).

De acordo com Tadic e Epple (2004) a desproteíntização do osso bovino Gen Ox ® (Baumer, São Paulo, Brasil) é obtida através de temperaturas entre 950 e 1000°C o que gera alta cristalinidade ao biomaterial promovendo um aumento do tempo de reabsorção.

Dois enxertos xenógenos (Gen Ox ® e Bio Oss®) tiveram suas características físico-químicas avaliadas. A análise morfológica foi realizada através de microscopia eletrônica, a presença de resíduos da fase orgânica e de diferentes formas de fosfato foi realizada através de termogravimetria e espectroscópio infravermelho respectivamente. Para a avaliação das diferentes fases de cristalinização foi utilizado o difractômetro de Rx e a cristalinidade foi determinada através do teste de degradação em HCl. Na análise microscópica ficou demonstrado que o Bio Oss ®

apresentou tamanho de partículas regulares, já o Gen Ox® apresentou coalescência de partículas de hidroxiapatita devido às altas temperaturas a que o material é submetido no seu processamento (entre 1000°C). Na análise espectral infravermelho ficou demonstrado que o Gen Ox® apresenta maior cristalinidade e que o Bio Oss® apresenta componentes da fase orgânica e cristais de dimensões nanométricas na sua constituição. Ao se realizar a análise termogravimétrica o Bio Oss® apresentou massa residual de 94,3% após o aquecimento a 950°C e o Gen Ox® de 99,4%, sugerindo que o Bio Oss® apresenta maior quantidade de massa orgânica residual, em torno de 3%. O teste de difração de RX e degradação em HCl também demonstraram a maior cristalinidade do Gen Ox® em relação ao Bio Oss®. Concluiu-se que o Bio Oss® por ter presente na sua constituição maior quantidade de componentes da fase orgânica, apresenta maior inclinação para a reabsorção (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008).

Outro estudo realizado comparou diferentes biomateriais para enxerto em defeitos de 1 parede. Foram utilizadas hemiesferas de titânio preenchidas com Bio Oss®, Ostem® (pasta aquosa de hidroxiapatita nanoparticular) e Osteoinductal® (suspensão de hidróxido de cálcio) e o grupo controle onde não houve o preenchimento com material. A avaliação histológica demonstrou capacidade osteocondutora do Bio Oss® com aproximadamente quatro quintos da esfera preenchida no período de 6 semanas, a maior parte do Bio Oss® foi convertida em osso e a porção não convertida se caracterizava por zonas claras ocupadas por células multinucleadas. As partículas de Ostim® foram quase que totalmente substituídas por novo osso, uma área intensamente corada demarcava a área entre as partículas de enxerto e o osso neoformado. O Osteoconductal® não promoveu formação óssea nem após 12 semanas de observação. A análise histomorfométrica demonstrou formação óssea por volume após 6 semanas de 29,1 ± 4,9% para o Bio Oss®; 19,8 ± 14,4% para Ostim® e 0,05 ± 0,02% para Osteoconductal®. Com 12 semanas observou-se 38,4 ± 13,3% para Bio Oss®; 23,3 ± 18,3 para Ostim® e 0,07 ± 0,02% para Osteoinductal®. Concluiu-se que não houve diferenças significativas entre Bio Oss® e Ostim® com 6 semanas. Após 12 semanas o grupo controle e Ostim® não apresentaram diferenças significativas (BUSENLECHNER et al., 2008).

Em 2008, Iezzi et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar as características ósseas e o processo de osseointegração em uma paciente de 47

anos que foi submetida a levantamento de seio unilateral utilizando Bio Oss® e posteriormente foi realizada colocação de implantes. Após 5 anos a porção distal do implante fraturou e teve que ser removida com broca trefina de 5mm. O resultado histológico demonstrou a presença de osso ao redor do implante. As partículas de enxerto presente encontravam-se em contato com o implante e em alguns casos lacunas de osteócitos foram verificadas ao redor do enxerto. Não foram observados GAPs na interface entre osso e partículas, nem células epiteliais, nem infiltrado inflamatório. Em algumas áreas pode ser observado tecido conjuntivo. A análise histomorfométrica demonstrou que a área ao redor dos implantes era composta por $40\% \pm 2,4\%$ de osso, $12 \pm 2,9\%$ de enxerto bovino e $50\% \pm 6,2\%$ de osso medular. O contato entre osso e implante foi de $48,6\% \pm 3,7\%$. Em muitas áreas ao longo da interface entre osso e implante foi observado $5\mu\text{m}$ de matriz osteóide não mineralizado. O uso de luz polarizada demonstrou que 50% do osso era lamelar e 50% do osso cortical. Os autores concluíram que o Bio Oss® é um material altamente biocompatível e que leva a regeneração óssea sem efeitos adversos como células inflamatórias ou resposta inflamatória, sendo estável após 5 anos, sem efeitos adversos na interface entre osso e metal.

De acordo com os achados de Calasans-Maia et al. (2009), os quais avaliaram a biocompatibilidade, biodegradação e osteocondução de enxertos xenógenos, além do contato direto entre o osso neoformado e as partículas do enxerto, os autores observaram que o material é biocompatível, apresenta reabsorção lenta e controlada e que sua superfície apresenta características físico-químicas que favorecem a proliferação celular.

O preenchimento ósseo ao redor de deiscências peri-implantares foram analisados utilizando o osso bovino desproteinizado (DBBM) sozinho, associado ao plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) e em associação com membrana colágena. Os grupos foram comparados entre si e com o grupo controle (apenas coágulo). Dezesesseis coelhos adultos receberam 2 implantes em fêmur cada um. Os animais foram sacrificados com 4 e 8 semanas para a realização de análise histológica. Os resultados demonstraram osseointegração em todos os grupos, não havendo espaço entre a superfície do implante e o osso neoformado. A porcentagem de novo osso ao redor do implante com 4 semanas foi de $55,66 \pm 24,39\%$ para o grupo que recebeu apenas DBBM; $58,62 \pm 20,37\%$ para o

grupo que recebeu DBBM + PRGF; $70,82 \pm 20,34\%$ para o grupo tratado com DBBM + membrana e $33,07 \pm 5,49\%$ para o controle. Com 8 semanas foi observado $63,35 \pm 27,69\%$ para DBBM; $58,42 \pm 24,77\%$ para DBBM+PRGF; $78,02 \pm 15,13\%$ para DBBM+membrana e $40,28 \pm 27,32\%$ para o grupo controle. Concluiu-se que a maior formação óssea ocorreu no grupo que recebeu DBBM+membrana. O crescimento ósseo foi muito similar entre DBBM e DBBM associado a PRGF, o grupo controle apresentou menor formação óssea entre os grupos analisados. Pode-se concluir que a associação entre DBBM e membrana é a técnica mais favorável para promover formação óssea nos casos de deiscência peri-implantares (GUERRA et al., 2011).

O uso do enxerto xenógeno Gen-Ox® Inorg (Baumer, SP, Brasil) foi avaliado histologicamente e histomorfometricamente em defeitos apresentando 2mm de diâmetro e 1mm de profundidade realizados em fêmur de ratos Wistar e comparando-os com defeitos preenchidos apenas com coágulo. Os animais foram sacrificados no 1°, 2°, 3°, 5°, 7°, 14° dias após o procedimento. No primeiro dia foi observado denso tecido fibroso, reação inflamatória, células mesenquimais, leucócitos, eritrócitos e estruturas vasculares. No terceiro dia foi observado coágulo apresentando leucócitos polimorfonucleares embebidos num tecido fibroso denso em ambos os grupos. No quinto dia nos 2 grupos foi visualizado grande intensidade de fibras colágenas e mineralização inicial. A formação de osso não foi estatisticamente diferente nos tempos 5, 7 e 14, $P = 0,695$, $P = 0,228$, $P = 0,576$ respectivamente. Os resultados confirmaram as propriedades osteocondutoras do material. No entanto não houve aceleração da formação óssea sugerindo que este biomaterial exige longos períodos para o reparo (SOTTO-MAIOR et al., 2011).

O preenchimento ósseo promovido pelo Gen-Ox® e o causado apenas por coágulo foi estudado em defeitos pós-extração em mandíbula de coelhos. Primeiramente foi realizada a exodontia de incisivos mandibulares bilaterais de coelhos. Os alvéolos foram preenchidos com osso bovino inorgânico Gen-Ox® (grupo teste) e apenas coágulo (grupo controle). Sessenta dias após as extrações os animais tiveram a inserção cirúrgica de implantes de titânio de 3,75mm x 8,5mm. As avaliações ocorreram nos tempos 0, 30, 60 e 180 dias através de radiografias periapicais. Foi avaliada a altura óssea (VBH), densidade óssea (BD). Após a remoção de tecidos verificou-se o contato do osso com o implante (BIC) e a área de contato entre osso e implante (BA). A análise radiográfica não demonstrou

diferenças estatísticas entre os grupos avaliados em relação a VBH e BA. O grupo teste apresentou BD significativamente maior. Na análise histológica verificou-se que no grupo controle em todos os períodos o osso estava em contato direto com o implante e alguma quantidade de tecido conjuntivo. Já no grupo teste o biomaterial encontrava-se em contato direto com o osso e eventualmente com o implante, havendo também tecido conjuntivo. A ausência de diferença significativa na altura da crista óssea e implante entre os dois grupos demonstra que o enxerto xenógeno utilizado não promoveu alterações verticais após a colocação de implantes. Os autores concluíram que o material testado não interferiu no processo de cicatrização. (MUNHOZ et al., 2011).

Kemper et al. (2011) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os métodos de esterilização e a interferência que estes teriam nas características dos biomateriais para enxerto. Foi observado que métodos de esterilização utilizando radiação não interferem nas características físicas e mecânicas dos enxertos bovinos, não havendo contra indicações na utilização desses materiais em cirurgias ortopédicas.

Gokhale e Dwarakanath realizaram um estudo em 2012, com o objetivo de avaliar a capacidade regenerativa do Bio Oss® após tratamento de defeitos periodontais. Foram realizados enxertos em 12 pacientes (5 homens e 7 mulheres) com idades entre 30 e 50 anos e que apresentaram periodontite com 2 ou mais bolsas com mais de 5 mm de profundidade de sondagem. Os defeitos teriam que apresentar 1, 2 ou 3 paredes ou combinação destes. No total foram tratados 12 defeitos com Bio Oss® e 12 com retalho e debridamento apenas. Para a pesquisa foram analisados profundidade de sondagem, inserção clínica e medição da recessão gengival. O ganho ósseo foi realizado através de análise radiográfica antes e após o procedimento. Após 24 semanas houve melhora em todos os grupos onde foi utilizado enxerto (preenchimento ósseo de 54,065% do defeito). O ganho de inserção foi de 0,583 para o grupo controle (retalho apenas) e 2,920 para o grupo teste (Bio Oss®). Em relação à recessão gengival, foi de 2,920mm para o grupo controle e 1,420mm para o grupo teste. A redução de profundidade de sondagem foi de 2,920mm para grupo controle e 4,33mm para o grupo teste. Preenchimento do defeito foi de 0,020mm para grupo controle e 1,936mm para grupo teste. O estudo demonstrou que o Bio Oss® teve significativo aumento em todos os parâmetros

clínicos. Além disso, os locais tratados com Bio Oss® demonstraram mínima recessão gengival quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que o Bio Oss® é um material para enxerto promissor, que se tornou eficiente em defeitos infra-ósseos periodontais.

Cook e Mealey, em 2013, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar dois diferentes protocolos no tratamento de sítios pós exodontia. O protocolo 1 recebeu osso bovino inorgânico combinado com 10% de fibras colágenas e membrana colágena, o protocolo 2 consistia em esponja xenógena composta por 70% de fibras, membrana de hidroxiapatita e recobertos por membrana de colágeno. O período de cicatrização para colocação de implantes foi de 20,73 semanas (SD=1,29) para o protocolo 1 e 20,96 semanas (SD=1,15) para o 2. Todos os espécimes foram avaliados em microscópio. O osso vital foi caracterizado pela presença de tecido mineralizado contendo osteócitos em lacunas. O material de enxerto residual do protocolo 1 se caracterizou pela presença de tecido mineralizado desprovido de osteócitos e células vitais. A maioria dos materiais de enxerto residual encontrava-se rodeado por osso neoformado em íntimo contato. No protocolo 2 não foi observado material de enxerto residual. Pacientes do protocolo 2 apresentaram porcentagem significativamente maior de osso vital ($P > 0.001$). Partículas residuais foram observadas apenas no protocolo 1. O grupo que utilizou osso bovino anorgânico apresentou $32,83\% \pm 14,72\%$ de osso vital e o grupo que utilizou o protocolo 2 apresentou $47,03 \pm 9,09\%$ de osso vital.

Hsu e Wang (2013) realizaram uma revisão de literatura onde foram avaliados diferentes biomateriais para enxerto e suas diferentes utilizações. Pode-se concluir que mesmo com o advento tecnológico os enxertos ósseos autógenos continuam sendo a melhor escolha como biomaterial para a realização de enxertos ósseos, mas não são a única opção na odontologia. Vários substitutos ósseos estão disponíveis e apresentam diferentes propriedades e quando usados corretamente com a indicação certa podem trazer bons resultados.

Moreno et al., em 2013, avaliaram a presença de biomaterial xenógeno nos tempos de 6 meses, 3 anos e 7 anos após 17 cirurgias de levantamento de seio maxilar em pacientes com média de idade de 46.29 ± 8.10 anos. Em todas as amostras histológicas células multinucleares foram encontradas na superfície óssea. Muitas apresentavam atividade osteoclástica. Pode-se verificar diminuição na

porcentagem de material enxertado ao longo dos anos ($21,44 \pm 19,60\%$ com 6 meses; $20,25\% \pm 10,44\%$ para 3 anos e $11,58 \pm 21,81\%$ para 7 anos). Os autores concluíram que a reabsorção do material aconteceu devido a atividade de células multinucleadas que se encontravam em menor número com o passar dos anos o que poderia explicar a persistência de partículas de enxertos mesmo após 7 anos.

Tovar et al., em 2014, avaliaram 4 enxertos xenógenos em defeitos realizados em calvária de coelhos. Entre os biomateriais avaliados encontrava-se o Bio Oss® (Bio Oss Geistlich Pharma AG, Switzerland). A formação óssea foi observada com 4 e 8 semanas através de análise histomorfométrica e de micro tomografia computadorizada. A análise por tomografia demonstrou que o Bio Oss® gerou formação óssea com 4 semanas. Não houve sinal de resposta imunológica, verificou-se áreas de remodelação óssea e intensa atividade osteoblástica. A mesma análise realizada com 8 semanas demonstrou uma grande quantidade de osso formado, ausência de resposta imunológica e intensa atividade osteoblástica. A análise histomorfométrica demonstrou formação óssea de 23,49% para o Bio Oss®, presença de biomaterial em 26,04 % do defeito e tecido conjuntivo em 50,46%. Com 8 semanas o resultado foi preenchimento do defeitos com 27% de formação óssea, 24,97% de biomaterial e 47,96% de tecido conjuntivo. Os autores concluíram que o Bio Oss ® promoveu formação óssea, mas que a degradação do material é lenta.

2.2 Quitosana

Tanto a quitina quanto a quitosana fazem parte de uma família de macromoléculas formadas por unidades de monossacarídeos, unidas por ligações glicosídicas. Esses materiais se destacam pela sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e atividades antimicrobianas (SUH; MATTHEW, 2000).

No campo da engenharia tecidual a quitosana apresenta grandes vantagens na formação óssea *in vitro*. É um biopolímero biodegradável que demonstra boa capacidade de cicatrização de feridas e na indução de formação óssea. É não tóxico e não imunogênico. Suas características estruturais tornam possível a aplicação clínica como substituto ósseo e um arcabouço para a proliferação celular. Pode ser

produzida em várias formas, filmes, esponjas e sua degradação pode ser controlada (LEE et al., 2000).

A quitosana é um biopolímero natural derivado da quitina, resíduo da indústria da pesca, sendo um material que apresenta várias aplicações em diversas áreas como no tratamento de águas, medicamentos, cosméticos e desenvolvimento de biomateriais (SANTOS et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar o efeito da quitosana na regeneração periodontal, Park et al., em 2003, realizaram defeitos periodontais em 4 cães beagle. Primeiramente foi realizada a extração do segundo pré-molar maxilar e terceiro pré-molar mandibular. Após 8 semanas foi realizado retalho e confecção de um defeito 4x4mm de 1 parede na distal do primeiro pré-molar superior e mesial do terceiro pré-molar superior, distal do segundo pré-molar inferior e mesial do quarto pré-molar mandibular. Os defeitos foram tratados com quitosana, coágulo (grupo controle) e esponja de colágeno/fosfato tamponado. A migração do epitélio juncional foi de $2,30 \pm 1,24$ mm para o grupo controle; $1,49 \pm 1,25$ mm no grupo tamponado e $0,26 \pm 0,59$ mm para o grupo que recebeu quitosana. Houve diferença significativa entre o grupo que recebeu quitosana e o controle ($p < 0.05$). A adesão de tecido conjuntivo foi de $0,68 \pm 0,60$ mm; $1,07 \pm 0,91$ mm; $0,41 \pm 0,42$ mm para o grupo controle, tamponado e quitosana respectivamente. Diferença significativa entre o grupo que recebeu quitosana e o restante ($p < 0.05$). A quantidade de regeneração do osso alveolar foi de $1,00 \pm 0,77$ mm, $1,52 \pm 0,37$ mm e $2,43 \pm 0,44$ mm no grupo controle, tamponado e quitosana respectivamente, havendo diferença significativa entre a quitosana e os demais ($p < 0.05$). Em relação a avaliação histológica, foi encontrada grande quantidade de regeneração óssea e de cemento no grupo que recebeu quitosana, demonstrando a eficácia do material em converter células mesenquimais em cementoblastos. Desta forma os autores puderam concluir que a quitosana apresentou bons resultados na regeneração periodontal.

Em 2004, Dhiman et al., verificaram que o grau desacetilação influencia grandemente nas características físico-químicas, no peso molecular e nas propriedades biológicas, na biodegradação pela lizozima e também na cicatrização e osteogênese. O grau de desacetilação tem uma relação inversa com as unidades

de N-acetil-D glicosaminoglicana. Na quitosana quando essa desacetilação é maior que 50% há maior solubilidade do polímero.

Li et al., em 2005, afirmaram que a quitosana não deve ser usada sozinha devido a falta de substâncias inorgânicas, mas que é normalmente utilizada para melhorar as características de outros materiais.

Pang et al., em 2005, realizaram um estudo para avaliar o efeito da quitosana no ligamento periodontal de humanos tanto *in vitro* como em defeitos realizados em calvária de ratos. Os fibroblastos foram obtidos de indivíduos saudáveis, a cultura de células continham quitosana nas concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 2mg/ml. Também foi realizados defeitos de 8mm na calvária de 30 ratos. Os animais foram divididos em 3 grupos cada um contendo 10 animais. Um grupo recebeu quitosana/esponja de colágeno, outro apenas quitosana e outro apenas coágulo (controle). A eutanásia ocorreu após 2 e 8 semanas e então foi realizada análise histológica e histomorfométrica, Pode-se concluir que a quitosana induziu a proliferação celular nas concentrações de 0,1mg/ml ($p < 0,01$). Em relação aos defeitos ósseos o grupo que recebeu quitosana e esponja de colágeno foi significativamente melhor, mas a densidade óssea foi menor nesse grupo ($p < 0,01$). Através desse estudo pode-se verificar que a quitosana apresenta propriedades biológicas e características estruturais que possibilitam sua aplicação clínica como um substituto ósseo e um arcabouço para o crescimento celular. Verificou-se também que a quitosana na concentração de 0,01mg/ml aumenta a síntese de colágeno tipo 2 e diferenciação das células do ligamento periodontal em células osteogênicas. A quitosana reconstruída com esponja de colágeno reabsorvível apresentou significante potencial para acelerar a formação óssea em defeitos críticos em calvária de ratos.

Shin et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a membrana de quitosana em defeitos ósseos de 10mm de diâmetro realizados em calvária de coelhos. Foi pesquisada também a proliferação celular a partir de células de osteossarcoma (MGG3) para verificar expressão de fosfatase alcalina. A membrana também foi implantada em tecido subcutâneo e observada por 2, 4 e 6 semanas. O teste *in vitro* demonstrou diferença significativa ($p < 0.05$) do tempo 1 para o 28, demonstrando boa adaptabilidade celular e condições favoráveis para a proliferação celular. Nenhuma alteração foi observada na implantação subcutânea. O início da reabsorção do material foi com 2 semanas, sendo então delimitada por tecido

conjuntivo e fibroblastos, não foram observadas células inflamatórias como linfócitos e macrófagos. Com 6 semanas, pode-se visualizar penetração de tecido conjuntivo na membrana. Nos defeitos ósseos cobertos com quitosana foi observada formação óssea após 4 semanas, foi verificado osso neoformado próximo as margens e também ilhas no centro do defeito. Formação óssea no grupo que usou quitosana foi de $28,8 \pm 6,9\%$ significativamente maior que o grupo que não usou nada ($10,6 \pm 5,0\%$) após 4 semanas. Os autores puderam concluir que a quitosana é um produto biocompatível e que houve indução de formação óssea.

A quitosana foi descoberta, em 1859, por Rouget, é um polissacarídeo linear, composto de unidade de glicosamina e N-acetil-glicosamina, ligada por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. Sua formação ocorre através da desacetilação alcalina da quitina, ligações N-acetil da quitina são rompidas formando D-glicosamina, quando o grau de desacetilação se torna maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel em meio aquoso tornando-se a quitosana (DALLAN, 2005).

A combinação da quitosana com coralina na regeneração óssea foi avaliada por Gravel et al., em 2006. A introdução da coralina na quitosana teve como objetivo modificar a superfície e criar uma superfície macroporosa. Esse processo ocorre devido a reação do carbonato de cálcio e o ácido acético com o polímero de quitosana. Há a geração de dióxidos de carbono formando poros na estrutura. Para a avaliação dessa estrutura foram utilizadas culturas de células tronco. A atividade celular, proliferação e diferenciação foram verificadas através do conteúdo de DNA, fosfatase alcalina (ALP) e atividade da osteocalcina (OC). Na cultura de células a proliferação celular foi maior na combinação quitosana/coralina que apenas na quitosana ($p < 0,001$). A atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior no grupo onde houve a combinação que no que foi usado apenas a quitosana ($p < 0,001$). A combinação quitosana/coralina influenciou positivamente a adesão celular e morfologia. A aceleração na formação de pseudópodos e o rápido espalhamento celular após 1 semana só ocorreu devido a afinidade e comportamento celular em relação a combinação. A superfície da coralina contribuiu para melhor adesão celular se comparada a apenas a quitosana.

A quitina poli ($\beta(1-4)$ -N-acetil-D-glicosamina) é um polissacarídeo descoberto por Branocot, em 1884, é insolúvel em água e apresenta baixa toxicidade. É sintetizada por vários animais formando o exoesqueleto dos artrópodes e paredes

celulares de fungos e leveduras. Por esse motivo é o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta. Industrialmente é extraída de carapaça de camarão e caranguejo por meio de um tratamento ácido para dissolver o carbonato, em seguida é feita extração alcalina para a solubilização de proteínas (RINAUDO, 2006).

Costa Silva et al. (2006) afirmaram que a quitina reduz o tempo de coagulação sanguínea devido à capacidade de agregar tanto plaquetas quanto eritrócitos. Grupos amínicos livres da quitosana interagem com receptores das hemácias. A ligação com as plaquetas promove liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas AB e também fator de transformação de crescimento $\beta 1$. Sua degradação no organismo ocorre devido à ativação dos macrófagos.

Malmquist et al., em 2008, avaliaram a eficácia da membrana de quitosana da HemCon (HemCon Medical Technology Inc, Beaverton,OR) na hemostasia de feridas orais. Participaram pacientes com idades entre 18 e 90 anos que faziam uso de anticoagulantes e que necessitavam de dois ou mais sítios cirúrgicos. A administração de anticoagulantes não foi alterada durante a pesquisa. Os resultados demonstraram que os locais que receberam a membrana tiveram hemostasia com 1 minuto enquanto o grupo controle, onde não houve preenchimento, com 9,53 minutos. Os locais que receberam quitosana tiveram cicatrização significativamente melhor. Além disso, pode-se perceber melhora no quadro de dor e também menor incidência de osteíte. Os autores concluíram que a membrana apresentou-se estatisticamente significativa na promoção da hemostasia e cicatrização no pós-operatório.

Em 2008, Thein-Han et al., observaram que quanto maior o grau de desacetilação maior a proliferação celular e a resistência mecânica.

Em 2008, Tang et al., avaliaram a quitina associada a hidroxiapatita (HA) e puderam concluir que essa combinação é biocompatível e osteocondutora, podendo ser usada com sucesso na regeneração óssea e também na engenharia tecidual.

De acordo com Spin-Neto et al., em 2008, a quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina existente na carapaça de crustáceos. É formada a partir da reação de desacetilação parcial da quitina por tratamento alcalino, podendo ser considerada um material biodegradável e biocompatível. Além disso, tem como vantagem a grande abundância, baixo custo, facilidade de obtenção, pode ser manipulada de diferentes formas, mas ainda existem questionamentos em

relação ao método de esterilização e variações na sua eficácia de acordo com sua formulação.

Chesnutt et al., em 2009, avaliaram a capacidade regenerativa dos substitutos ósseos formados por microesferas constituídas por quitosana combinada a fosfato de cálcio e apenas quitosana. Tanto o composto quanto a quitosana foram formadas por esferas apresentando 500-900µm de diâmetro, porosidade entre 33 – 35%, e poros de 100- 800µm. Foi avaliado porosidade, degradação e crescimento celular. Pode ser observado que o composto apresentava irregularidade de superfície 20 vezes maior que apenas a quitosana. Estruturas formadas pela quitosana não apresentaram cálcio nem fósforo em sua constituição o que estava presente no composto. A cristalinidade da quitosana foi de 79,7% ± 1,2% e caiu para 67,3% ± 1,5% para o composto foi verificada diferença de degradação entre os grupos com 1, 4, 7 e 14 dias. A adsorção da fibronectina, importante para a adesão dos osteoclastos, foi avaliada com 30 minutos, 1,2,3 e 4 horas. Não houve diferença entre os grupos até 2 horas, mas após 4 horas a quantidade de adsorção foi muito maior no composto que na quitosana ($p < 0.05$). A proliferação celular foi avaliada com 0,5, 1 e 2 horas. Após 30 minutos a proporção de células aderidas foi muito maior no composto, com 1 e 2 horas, a porcentagem foi similar (60% das ligações após 2 horas). Com o estudo foi possível verificar que a quitosana é eficiente na formação óssea, mas quando associada a outros materiais esse efeito pode ser potencializado.

Canter et al. (2010) utilizaram 240 ratos Wistar divididos em 8 grupos com o objetivo de avaliar diferentes biomateriais utilizados para enxerto ósseo. Foi confeccionado 1 defeito de 8mm em cada calvária. O grupo 1 foi preenchido por coágulo, grupo 2 recebeu osso autógeno, 3 osso alógeno, 4 quitosana, 5 quitosana associada ao osso alógeno e sexto recebeu quitosana/alógeno e fator de crescimento tumoral beta 2 (TGF beta 2), 7 foi preenchido pela associação alógeno, quitosana e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) o grupo oito recebeu quitosana, osso alógeno TGF beta 2 e BMP-2. Em relação à análise histológica com 2 semanas, não existiram diferenças estatísticas entre os grupos que receberam osso alógeno, autógeno, quitosana, quitosana e alógeno e apenas osso alógeno. A diferença começou a ser aparente na oitava semana e persistiu até a décima quarta. A cicatrização no grupo que recebeu BMP foi melhor que no grupo que recebeu

osso autógeno. Foi verificado que não houve grandes vantagens usando osso alógeno BMP e TGF beta 2 ao mesmo tempo. Não houve diferença estatística significativa entre enxerto alógeno, quitosana, alógeno/quitosana em qualquer intervalo em relação ao reparo e resposta tecidual em todos os intervalos avaliados. Não foi observada formação óssea no grupo que recebeu a quitosana nem na segunda, nem na oitava semana, existindo apenas biomaterial e tecido conjuntivo. O TGF beta 2 foi efetivo apenas nos primeiros estágios de cicatrização. A BMP-2 foi efetiva em todas as fases de cicatrização, a combinação dos dois não teve vantagens superiores, concluiu-se também que a quitosana pode ser utilizada na engenharia tecidual sendo um material biocompatível.

A quitosana e a quitosana hidrocloreídrica em forma de gel foram avaliadas, em 2010, por Spin-Neto et al. Foram realizados defeitos de 8mm em calvária de 50 ratos. Os defeitos foram preenchidos com coágulo (grupo controle) quitosana de baixo peso molecular, quitosana de alto peso molecular e quitosana hidrocloreídrica de baixo peso molecular e quitosana hidrocloreídrica de alto peso molecular. Cada grupo era formado por 10 animais que foram divididos em 2 subgrupos, avaliados com 15 e 60 dias. A análise histológica foi baseada na morfologia do osso neoformado. Os grupos tratados com quitosana apresentaram grande quantidade de tecido conjuntivo e células inflamatórias próximas às bordas do defeito. Pode-se observar áreas pontuais de necrose. O infiltrado inflamatório foi sempre moderado e severo, contendo grandes quantidades de células inflamatórias, normalmente macrófagos. Os autores concluíram que nenhum dos modelos foi eficiente na formação de osso.

Ardakani et al., em 2011, realizaram um estudo utilizando sítios pós exodontia de pré-molares de 24 pacientes com idades entre 15 e 24 anos. Os defeitos de um lado foram preenchidos com quitosana e o outro apenas com coágulo. Após 10 semanas foram avaliadas as radiografias da região. Pode-se observar que a porção média e apical da lesão apresentou maior densidade no grupo teste. Na região apical houve uma regeneração de 98,2% no grupo teste. Houve aumento de densidade na região média e apical de 29,3% e 10,8% do osso normal, concluindo que a quitosana pode ser usada no reparo de defeitos ósseos.

Azargoan et al., em 2011, avaliaram os efeitos da membrana de quitosana HemCon® (Patterson Dental, St Paul, MN) em cirurgias periapicais realizadas em 12

coelhos. O objetivo do trabalho foi avaliar a ação da quitosana na hemostasia, cicatrização e se existiam efeitos na formação óssea. Os animais foram divididos em grupo controle, que utilizou apenas coágulo e dois grupos experimentais que usaram ou quitosana ou sulfato férrico a 15,5%. A membrana da HemCon[®] apresentou hemostasia com 2,17 (SD±0,98) minutos e sulfato férrico 2,33 (SD±0.52). Os grupos experimentais apresentaram melhores resultados que o grupo controle. A análise histológica demonstrou que o osso neoformado foi de 28,3% (SD±7.4) para o grupo controle, 32,4% (SD±10.2) para o sulfato férrico e 46,1% (SD±21.0) para membrana HemCon[®]. A diferença foi significativamente maior entre quitosana e controle, mas não foi observada diferença significativa entre a membrana e o sulfato férrico na formação óssea. Os autores concluíram que a membrana de quitosana da HemCon[®] apresenta capacidade de hemostasia e também maior formação óssea quando comparada apenas ao coágulo.

Lotfi et al., em 2011 avaliaram o uso da quitosana no tratamento de defeitos gengivais realizados em 5 cachorros e puderam concluir que o material apresentou bons resultados na regeneração tecidual, demonstrando-se biocompatível. A análise histológica demonstrou que houve aceleração no processo de cicatrização devido à promoção de infiltrado polimorfonuclear e aumento da circulação. Não foi observada reação de corpo estranho.

Em 2011, Luca et al., avaliaram o uso da quitosana como carreador da rhBMP-2 com a quitosana e rhBMP-2/quitosana/fosfato tricálcico. Para a pesquisa foi realizada aplicação intramuscular em rádio de coelho. Após 3 semanas a avaliação foi feita utilizando-se tomografia computadorizada da região e análise histológica. Verificou-se maior formação óssea na combinação rhBMO-2/quitosana/fosfato tricálcico. Regeneração incompleta com 8 semanas e extravazamento dos compostos.

A aplicação e características da quitosana dependem basicamente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica, este grau está normalmente entre 60 e 100% e influencia nas propriedades físico químicas como conformação, deformação, tensão de ruptura, biodegradabilidade e atividade imunológica (HSU; WANG, 2013).

Farrugia et al., em 2014 verificaram *in vivo* e *in vitro* a atividades dos mastócitos em enxertos de quitosana através de marcadores produzidos pelos

próprios mastócitos e que são responsáveis pela resposta inflamatória. Através do estudo verificou-se que a exposição à quitosana leva a liberação de mastócitos e que mediadores liberados além de gerar resposta inflamatória também promovem grande impacto na formação da cápsula fibrose formada ao redor do enxerto. A análise histológica após a implantação subcutânea em ratos demonstrou intensa resposta inflamatória, presença de macrófagos e células gigantes que se estendem entre a superfície do biomaterial e o tecido e cápsula de tecido conjuntivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho foi comparar histologicamente duas diferentes marcas de enxertos ósseos bovinos, a quitosana material derivado da quitina e apenas o coágulo.

3.2 Objetivos específicos

Na pesquisa o osso xenógeno bovino Gen Ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil); o enxerto ósseo bovino Bio Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça); a membrana de quitosana (HemCon® - HemCon Medical Technologies, Inc, Oregon, EUA) e o preenchimento do defeito apenas com o coágulo foram avaliados histologicamente com o objetivo de verificar qualitativamente:

- capacidade de formação óssea no período de 7 e 11 dias;
- resposta inflamatória;
- quantidade de partículas do enxerto remanescentes;
- preenchimento do defeito.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa, o projeto foi primeiramente aprovado pela Comissão de Ética e uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, além de estar de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.1 Materiais avaliados

Durante o estudo foram avaliados o osso bovino inorgânico, Gen Ox Inorg® (Baumer, São Paulo, Brasil), o osso bovino inorgânico, Bio Oss Inorg® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça); a membrana de quitosana (HemCon® - HemCon Medical Technologies, Inc, Oregon, EUA) e o preenchimento do defeito apenas com o coágulo (Figuras 1, 2 e 3).

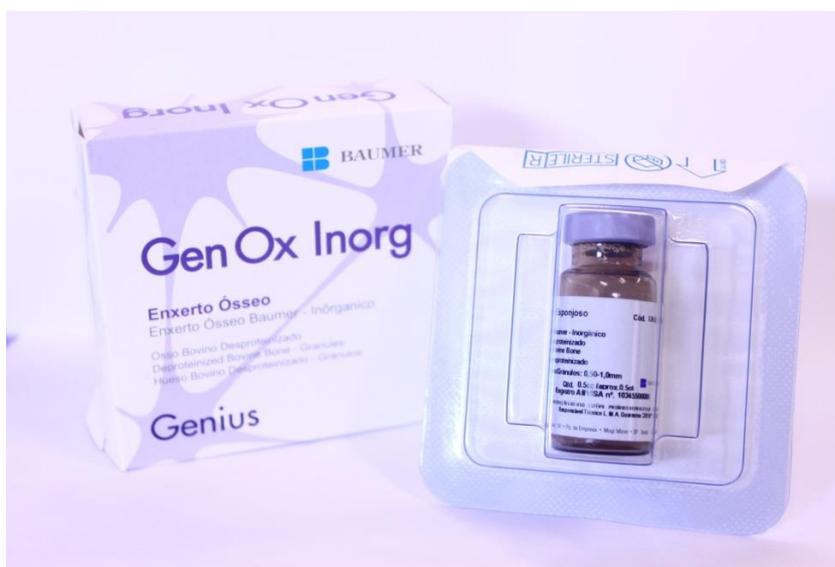


Figura 1- Enxerto ósseo bovino Gen Ox®



Figura 2 – Enxerto Bovino Bio Oss®



Figura 3 – Membrana de Quitosana HemCon®

4.2 Seleção da amostra

Foram utilizados 30 ratos *Wistar*, machos, pesando em média 350g, apresentando 3 meses de vida, (Figura 4). Os animais foram mantidos em gaiolas à temperatura ambiente sendo alimentadas duas vezes ao dia com rações (Nuvilab CR - 1®, Nuvital Nutrientes SA, Colombo, Paraná, Brasil).



Figura 4 – Ratos Wistar utilizados na pesquisa

Para a realização da pesquisa foram confeccionados quatro defeitos ósseos, 2 na tíbia direita e 2 em tíbia esquerda de cada animal (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos biomateriais entre os grupos.

GRUPO	LOCALIZAÇÃO DO DEFEITO	BIOMATERIAL
Grupo A	Superior direito	OssO Bovino (Bio Oss®)
Grupo B	Inferior direito	OssO Bovino(Gen Ox®)
Grupo C	Superior esquerdo	Quitossana (HemCon®)
Grupo D	Inferior esquerdo	Coágulo

4.3 Procedimento cirúrgico

No pré-operatório todos os animais foram pesados e então foi administrada uma dose única de *Pentabiótico Veterinário* (benzilpenicilina benzatina) 600.000UI, benzilpenicilina procaína 300.000UI, benzilpenicilina potássica 300.000UI, sulfato de dihidroestreptomicina 250mg e sulfato de estreptomicina 250mg (*Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte*®) por via intramuscular, na dose de 0,1ml para cada 100g de peso corpóreo do rato.

A cirurgia ocorreu após a anestesia por via intraperitoneal, utilizando agulhas de 25x5mm, com Cloridrato de Ketamina a 5% (Koning do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na dose de 58 mg/kg associado ao cloridrato xilazina 2% (Bayer SA, São Paulo, Brasil) na proporção de 9,2mg/Kg (Figura 5). Após a obtenção da anestesia realizou-se a tricotomia da região a ser operada, utilizando lâmina de barbear estéril (Gillette®, São Paulo, Brasil), antissepsia com álcool iodado a 2% (Povidini®, Amazonas, Brasil) (Figuras 6 e 7).



Figura 5 – Administração de anestésico por via intraperitoneal.



Figura 6 – Antissepsia



Figura 7 – Tricotomia da área a ser operada.

A complementação da anestesia foi realizada através de infiltração subperiosteal do anestésico Mepiadre® (Cloridrato de Mepivacaína a 2% com adrenalina 1:100.000 – DFL, Rio de Janeiro – Brasil) na região do procedimento, para hemostasia local (Figura 8).



Figura 8 – Complementação anestésica local.

Após isso se realizou uma incisão longitudinal de 40 mm, com lamina nº 15 montada em cabo de bisturi nº 3, para a exposição do osso da tíbia dissecando pele músculo e periósteo (Figuras 9 e 10).



Figura 9 – Incisão inicial na pele.



Figura 10 – Dissecação para exposição do osso da tíbia.

Com o auxílio de uma broca lança (Neodent, Paraná, Brasil) foi feito o rompimento da cortical (Figura 11) e o defeito ósseo utilizando uma broca para colocação de implantes (Neodent, Paraná, Brasil) apresentando 2,0mm de diâmetro adaptada a um contra-ângulo com redução de 16:1 sob refrigeração abundante com solução fisiológica (Figura 12). Foram realizadas 2 perfurações em cada tíbia, havendo uma distância de 2 mm entre elas, cada perfuração apresentou 2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade (Figura 13).



Figura 11 – Perfuração inicial com broca lança.

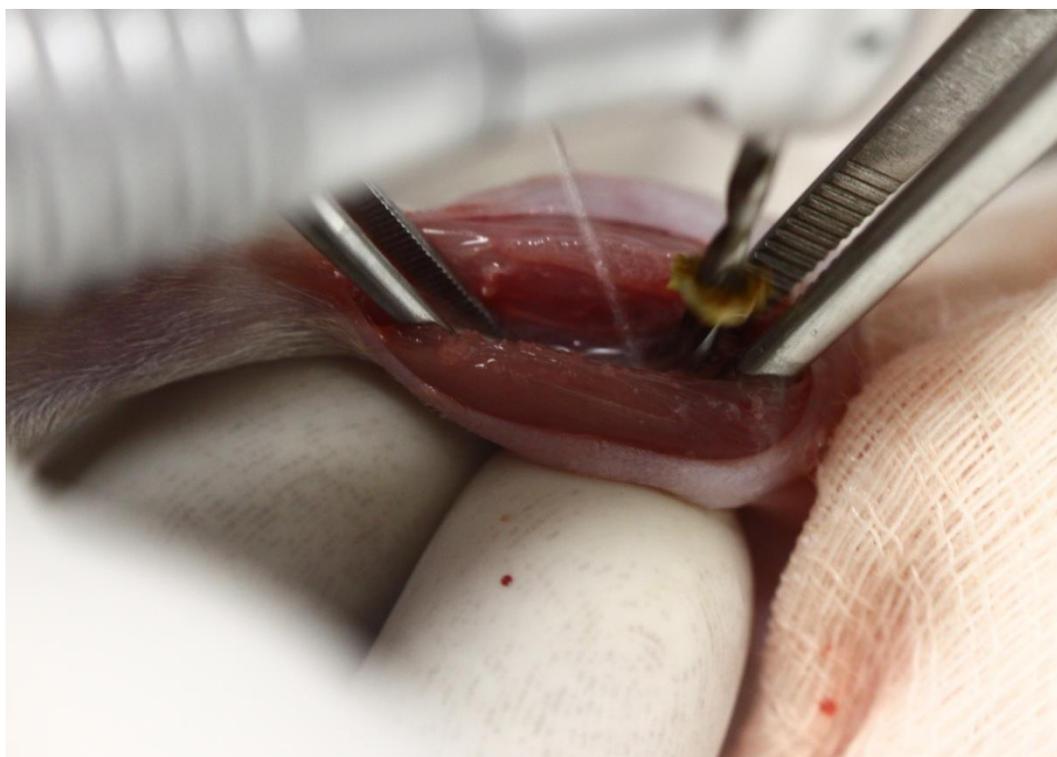


Figura 12 – Perfuração utilizando broca de implante com 2 mm de diâmetro.

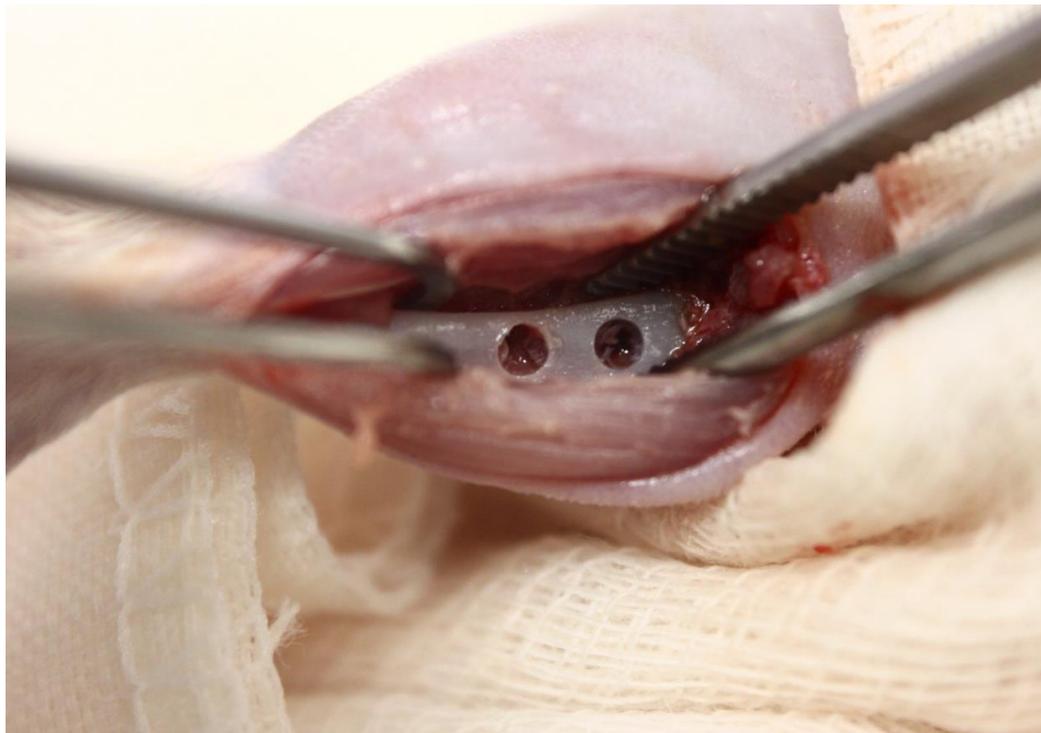


Figura 13 – Defeitos de 2 mm de diâmetro em tíbia.

Os defeitos foram preenchidos com diferentes biomateriais formando 4 grupos. O grupo A (defeito superior direito) foi preenchido com Bio Oss®. O grupo B (defeito inferior direito) recebeu Gen Ox Inorg; o grupo C (defeito superior esquerdo) recebeu a membrana de quitosana HemCon® colocada no interior do defeito; o Grupo D (defeito inferior esquerdo) foi preenchido apenas com coágulo (Figura 14).

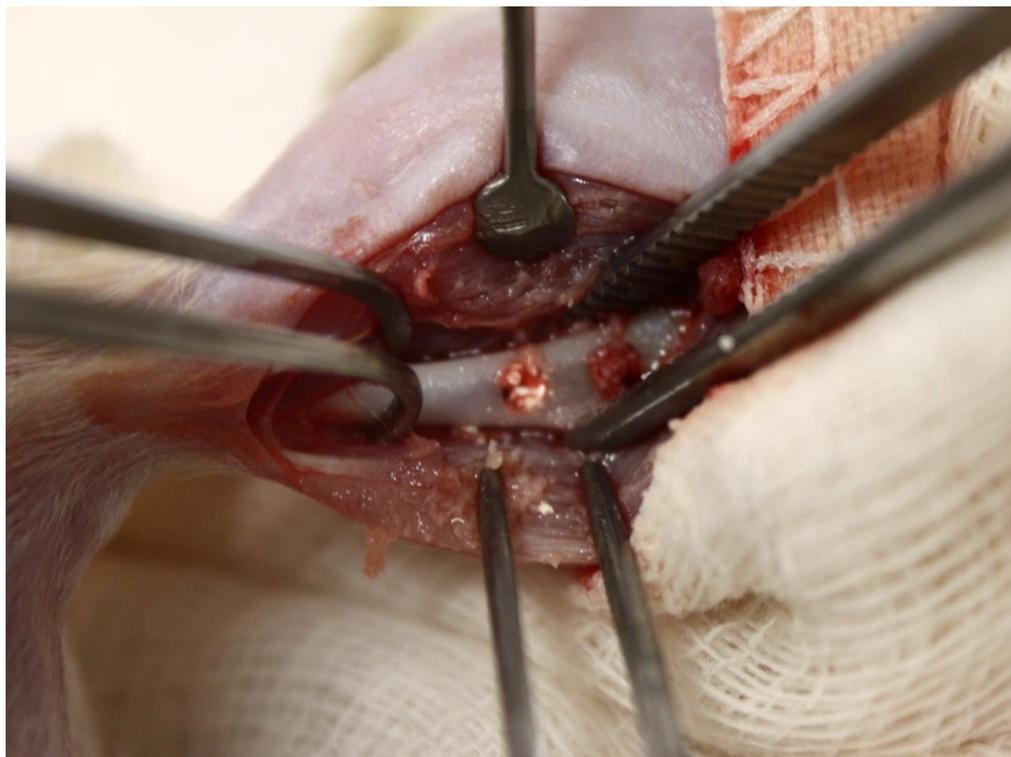


Figura 14 – Preenchimento do defeito com Bio Oss® e Gen Ox®.

Para a finalização, os defeitos receberam uma membrana colágena bovina (Gen Derm® - Baumer, São Paulo, Brasil) com o objetivo de recobrir totalmente a cavidade e ultrapassar 2mm a borda de cada lesão (Figura 15). Para a sutura foi utilizado o fio de nylon 5.0 (Shalon®, Brasil), a sutura foi realizada em camadas, primeiro periósteo e músculo (Figura 16) e depois a pele (Figuras 17 e 18). Após a realização do procedimento cirúrgico os animais receberam doses de Analgésico butorfanol (Torbugesic®, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Iowa, Estados Unidos) na dosagem de 2mg/kg, via subcutânea a cada 6 horas.



Figura 15 – Recobrimento do defeito com membrana Gem Derm®.

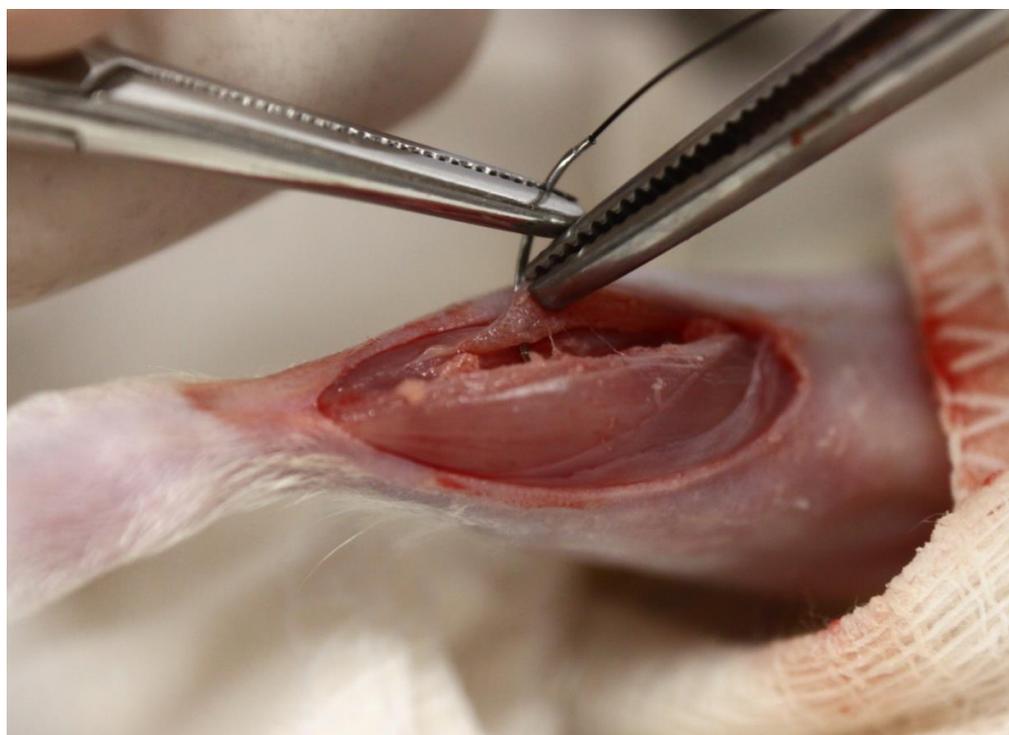


Figura 16 – Sutura do músculo com fio Nylon 5.0.



Figura 17 – Músculo suturado com fio Nylon 5.0.



Figura 18 – Sutura finalizada.

4.4 Análise histológica

Para a realização na análise histológica, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, cada um contendo 15 animais. O grupo 1 sofreu eutanásia com 7 dias e o grupo 2 com 11 dias.

Os animais foram sacrificados utilizando Pentobarbital Sódico (Nembutal®, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Brasil) administrado por via intraperitoneal, na dose de 100mg/Kg.

As peças foram removidas utilizando o mesmo acesso cirúrgico através do descolamento dermo-periosteal (Figura 19). Os defeitos foram separados com disco de carborundum (Figuras 20 e 21). Foram então colocadas em tubos de ensaio contendo formaldeído 10% durante 24 horas (Figura 22) e após isso descalcificados com EDTA 4,12% durante 2 meses. As amostras foram incluídas em parafina para a confecção de cortes histológicos de 5 μ m de espessura, os quais apresentavam apenas a porção central do defeito. As lâminas foram coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE) e a análise histológica realizada por microscópio óptico.

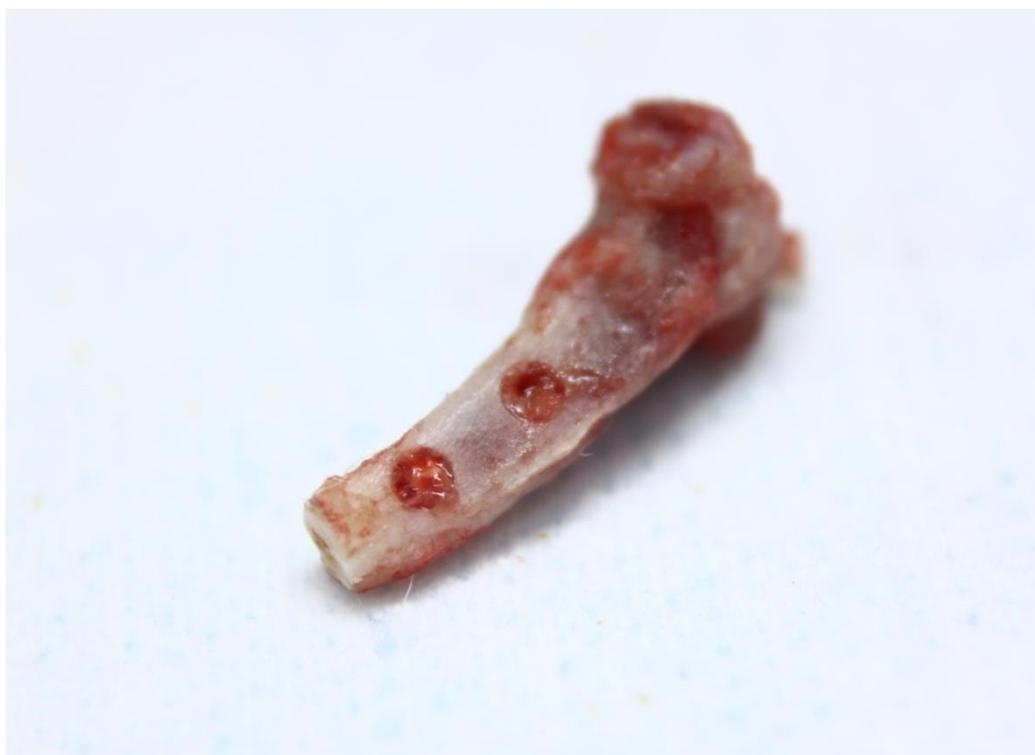


Figura 19 – Peça de tíbia contendo dois defeitos após a remoção.



Figura 20 – Defeitos separados utilizando disco de Carburundum.

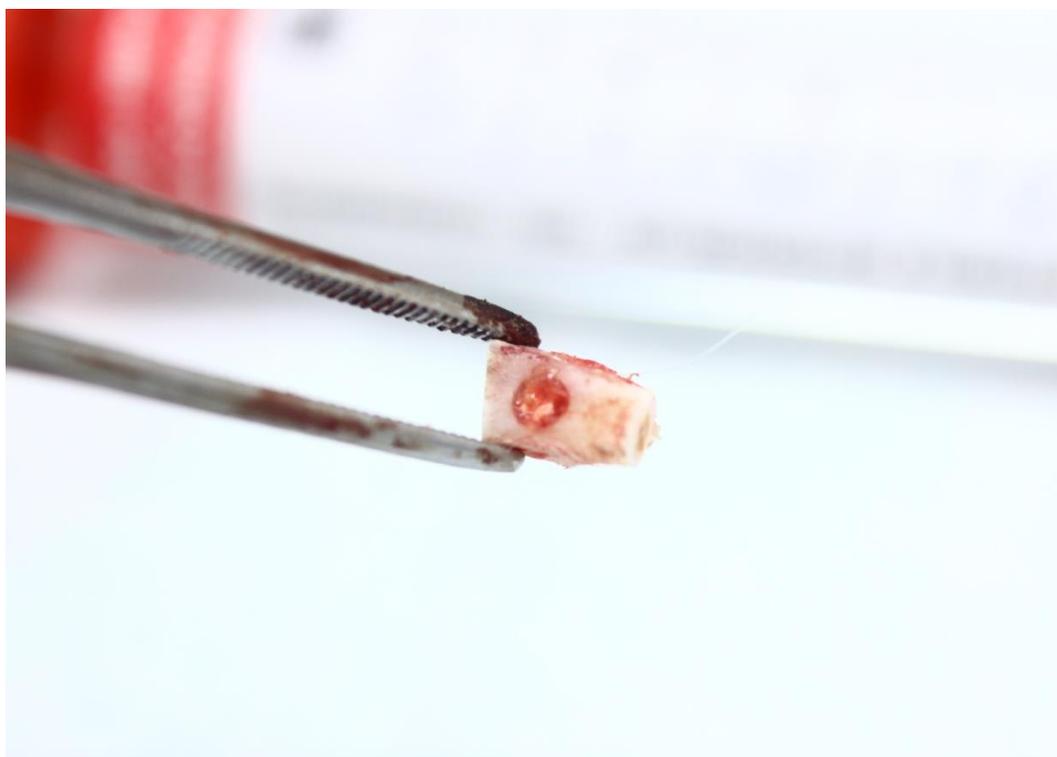


Figura 21 – Peças após a separação.

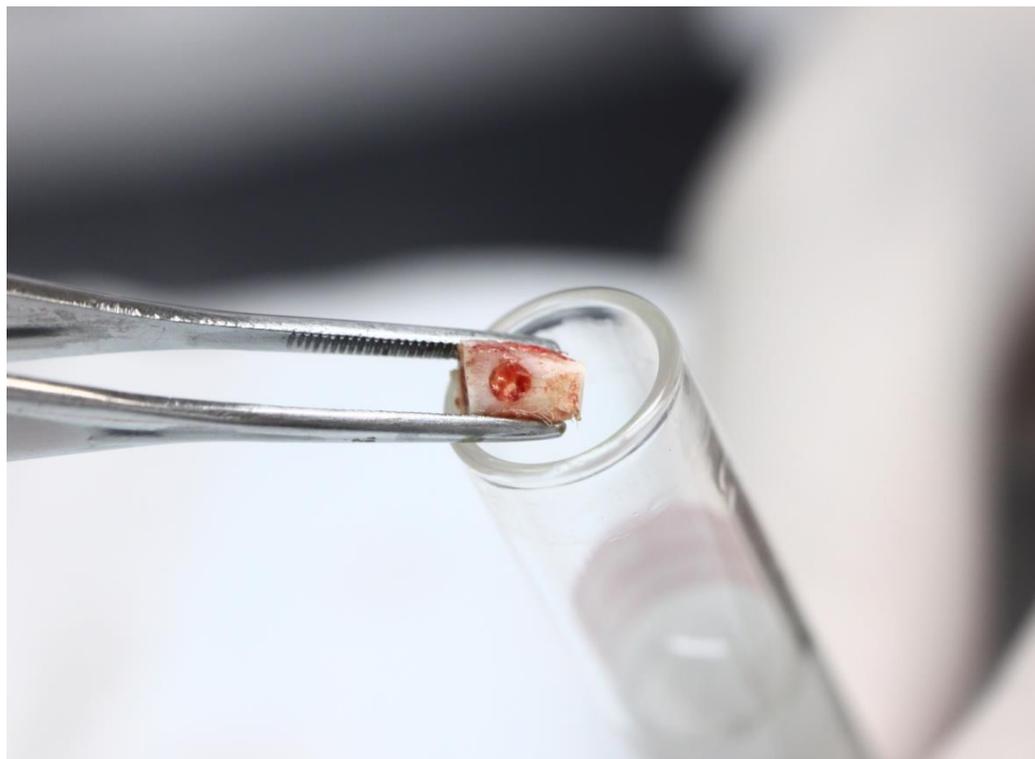


Figura 22 – Colocação das peças em Formol.

Na avaliação histológica foi observada a presença e infiltrado inflamatória, neoformação óssea, preenchimento do defeito, assim como a presença de partículas do biomaterial remanescentes.

A avaliação histológica foi realizada de acordo com escores definidos (Tabela 2).

Tabela 2 – Critérios de avaliação histológica

Escores	Infiltrado Inflamatório	Preenchimento do Defeito	Partículas do Biomaterial	Osso Neoformado
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
1	Pequeno (presença em ¼ do defeito)	Pequeno (preenchimento ¼ do defeito)	Pequeno (presença em ¼ do defeito)	Pequeno (presença em ¼ do defeito)
2	Moderada (presença em ½ do defeito)	Moderado (preenchimento ½ do defeito)	Moderada (presença em ½ do defeito)	Moderado (presença em ½ do defeito)
3	Abundante (presente em mais da ½ do defeito)	Abundante (preenchimento de mais da ½ do defeito)	Abundante (presença em mais da ½ do defeito)	Abundante (presença em mais da ½ do defeito)

4.5 Análise estatística

Os resultados obtidos na avaliação histológica foram submetidos a uma análise estatística realizada pela Disciplina de Bioestatística da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Para a realização da análise foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.01.

O universo amostral foi composto por 4 grupos distintos (Bio Oss®, Gen Ox®, HemCon e coágulo) sendo testados em 2 tempos experimentais (7 e 11 dias) para 4 variáveis independentes (infiltrado inflamatório, preenchimento do defeito, partículas do biomaterial e osso neoformado). Foi utilizado um sistema de atribuição de escores variando de 0 a 3, o que implica no uso de testes estatísticos não-paramétricos.

Para a análise entre materiais em um mesmo tempo experimental, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para comparações duas a duas. As comparações entre tempos diferentes de um mesmo biomaterial foram realizadas pelo teste de Mann Whitney. Todos os testes foram realizados com um nível de significância (α) igual a 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica

5.1.1 Grupo A – Bio Oss® – 7 dias

Os cortes histológicos de tecidos ósseos revelaram exuberante presença de células inflamatórias mononucleares, representadas por macrófagos ativados, alguns linfócitos e plasmócitos. Na maioria das amostras foi possível observar osso neoformado. Pode-se verificar também a presença de biomaterial em todos os defeitos (Figura 23).

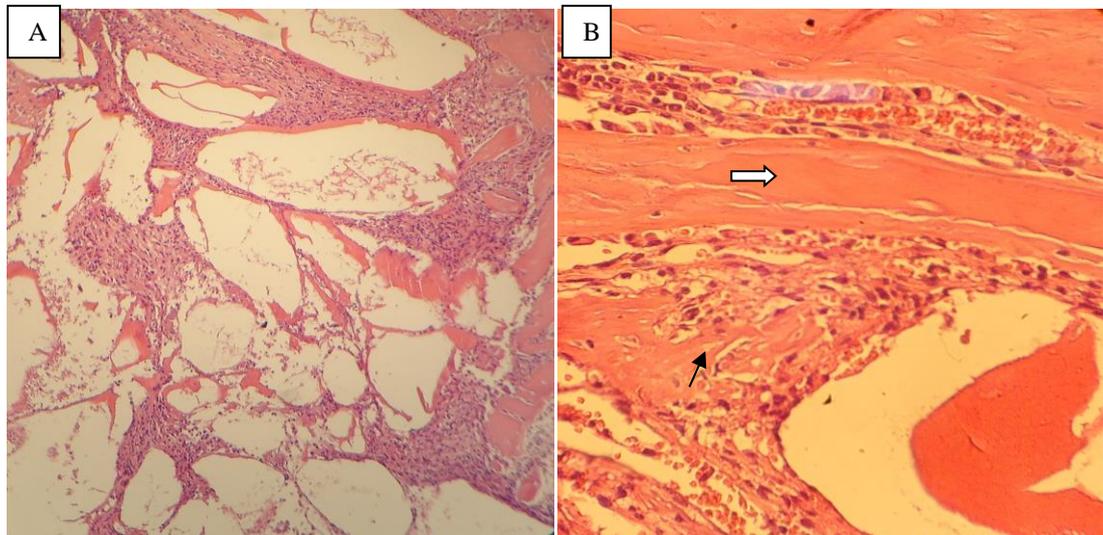


Figura 23 - Fotomicrografia de defeito preenchido com osso bovino Bio Oss® (7 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com o osso bovino Bio Oss avaliada com sete dias, coloração HE 10x de aumento, onde foi possível observar osso neoformado. B) Fotomicrografia do defeito tratado com o osso bovino Bio Oss® com sete dias, coloração HE 40x de aumento, onde foi possível observar osso neoformado (seta preta), partículas do biomaterial (seta branca).

5.1.2 Grupo B - Gen Ox® – 7 dias

Observou-se células inflamatórias mononucleares representadas por macrófagos ativados, alguns linfócitos e plasmócitos. Discreta formação óssea em alguns defeitos. Em relação a remanescentes do biomaterial esses puderam ser visualizados em todas as amostras (Figura 24).

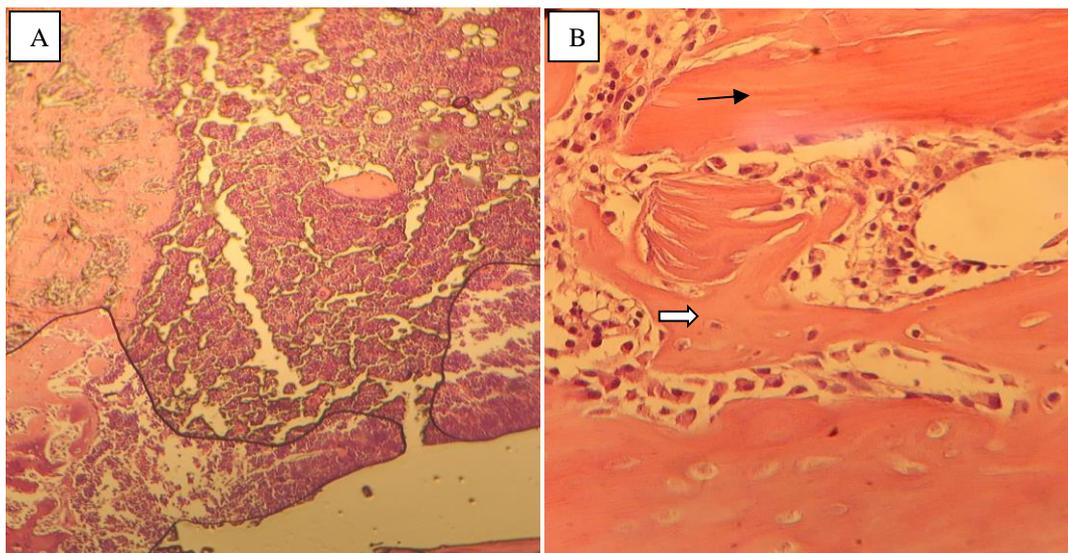


Figura 24 - Fotomicrografia do defeito ósseo tratado com o osso bovino Gen Ox® (7 dias). A) Fotomicrografia do defeito ósseo tratado com o osso bovino Gen Ox® avaliado com sete dias, coloração HE, 10x de aumento, onde foi possível observar osso neo formado e partículas do biomaterial. B) Fotomicrografia do defeito ósseo tratado com o osso bovino Gen Ox® avaliado com sete dias, coloração HE, 40x de aumento, onde foi possível observar osso neo formado (seta preta), partículas do biomaterial (seta branca).

5.1.3 Grupo C – Membrana HemCon® – 7 dias

Os defeitos apresentaram infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, além de macrófagos, alguns linfócitos e plasmócitos. Não foi verificado remanescentes dos materiais com 7 dias (Figura 25).

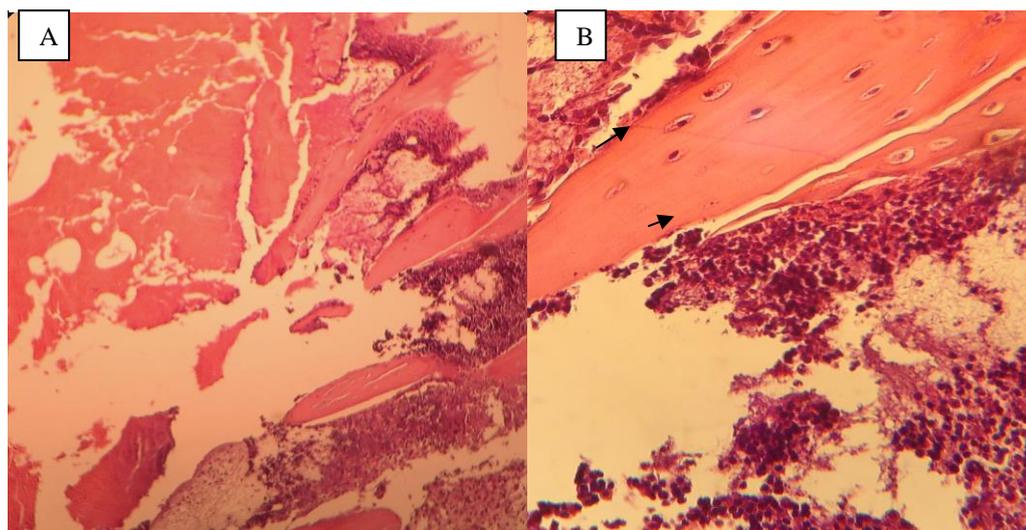


Figura 25 - Fotomicrografia do defeito tratado com membrana de quitosana (7 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com a membrana de quitosana avaliada com sete dias, coloração HE 10x de aumento, onde foi possível observar osso neoformado, sem a presença de partículas do biomaterial. B) Fotomicrografia da membrana de quitosana avaliada com sete dias, coloração HE 40x de aumento, onde foi possível observar osso neoformado (seta preta), sem a presença de partículas do biomaterial.

5.1.4 Grupo D – Coágulo – 7 dias

Os defeitos tratados apenas com coágulo apresentaram resposta inflamatória formada por células mononucleares e discreta formação óssea em alguns defeitos (Figura 26).

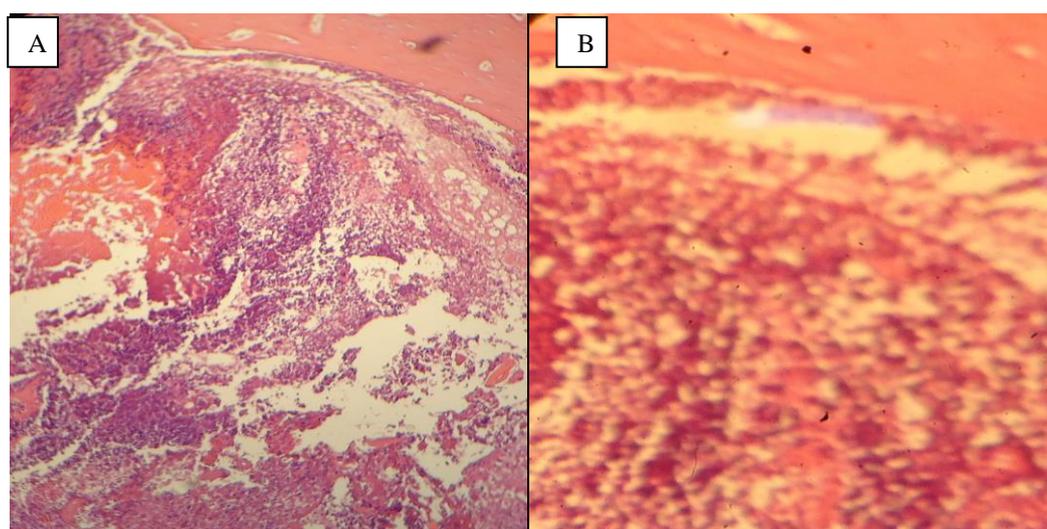


Figura 26 - Fotomicrografia do defeito tratado com coágulo (7 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com coágulo avaliada com sete dias, coloração HE, 10x de aumento, onde foi possível observar osso neo formado (seta preta). B) Fotomicrografia do defeito tratado com coágulo avaliada com sete dias, coloração HE, 40x de aumento.

5.1.5 Grupo A- Bio Oss® – 11 dias

Pode ser observada presença de infiltrado inflamatório como no grupo com 7 dias sem a presença de diferença significativa entre os 2 tempos. Em relação a formação óssea houve um aumento de osso neoformado significativo em todas as amostras. Em alguns defeitos foi verificada a diminuição nos escores em relação a partículas do biomaterial (Figura 27).

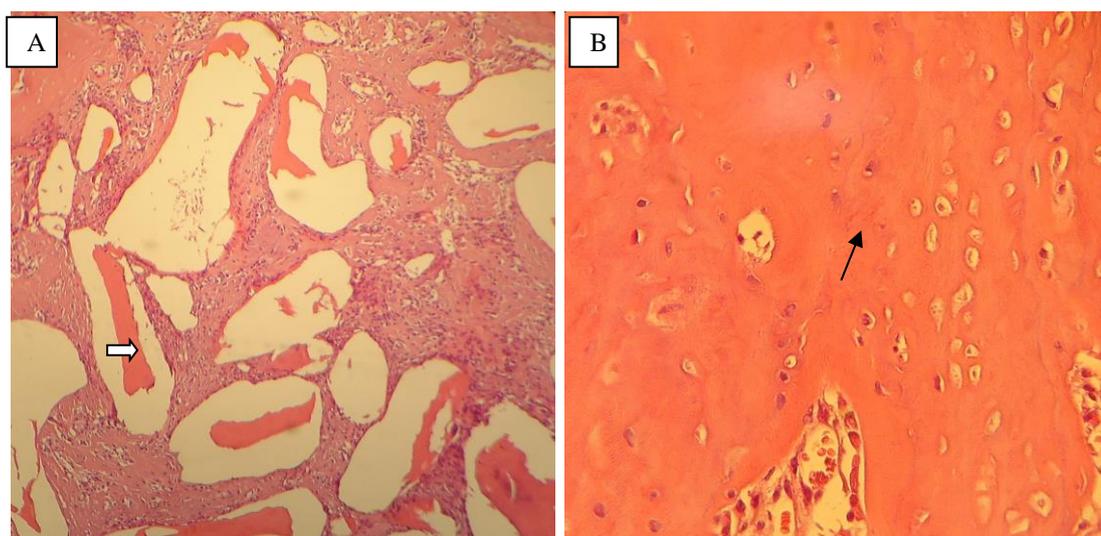


Figura 27 - Fotomicrografia do defeito tratado com Bio Oss® (11 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com enxerto ósseo bovino Bio Oss® com 11 dias, coloração HE, aumento 10x. Onde foi possível verificar remanescente do biomaterial enxertado (seta branca). B) Fotomicrografia de defeito tratado com enxerto ósseo bovino Bio Oss® com 11 dias, coloração HE, aumento 40 x. Onde foi possível verificar osso neoformado (seta preta).

5.1.6 Grupo B – Gen Ox® – 11 dias

Poucas amostras apresentaram infiltrado inflamatório. O osso neoformado foi observado em todas as amostras, quando comparado ao grupo que recebeu Gen Ox® com 7 dias esse aumento foi significativo. Em relação à presença de biomaterial, esse ainda pode ser encontrado em grande quantidade (Figura 28).

B

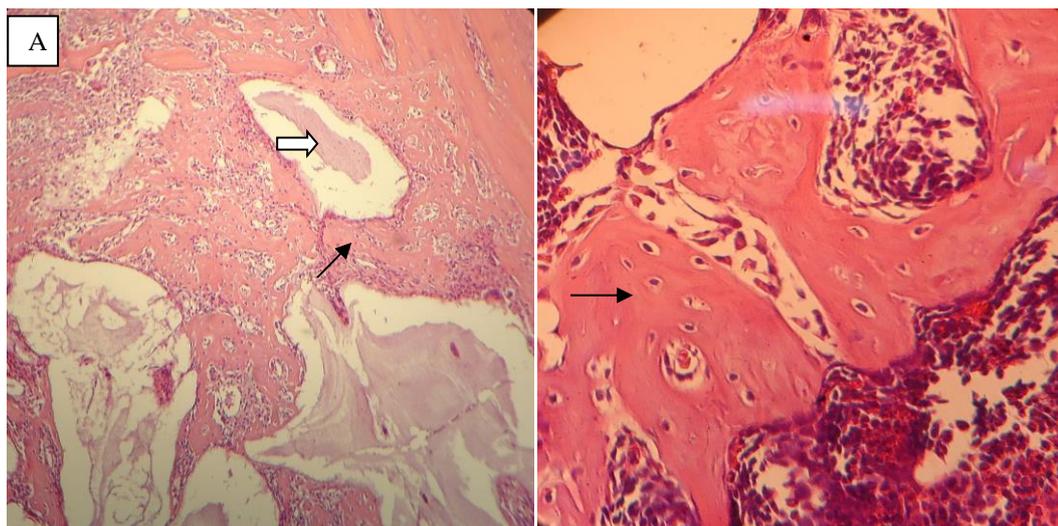


Figura 28 - Fotomicrografia do defeito tratado com Gen Ox® (11 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com osso bovino Gen Ox® com 11 dias, coloração HE, 10 x de aumento. Onde foi possível verificar osso neoformado (seta preta) e remanescente do biomaterial (seta branca). B) Fotomicrografia do defeito tratado com osso bovino Gen Ox® com 11 dias, coloração HE, 40 x de aumento. Onde foi possível verificar osso neoformado (seta preta).

5.1.7 Grupo C – Membrana Hemcon® – 11 dias

Houve um aumento significativo da resposta inflamatória com 11 dias, esse número foi maior quando esse resultado foi comparado aos defeitos que receberam Bio Oss® e Gen Ox®. No período avaliado não foi verificada presença de biomaterial em nenhuma das amostras além de discreta formação óssea em poucos defeitos (Figura 29).

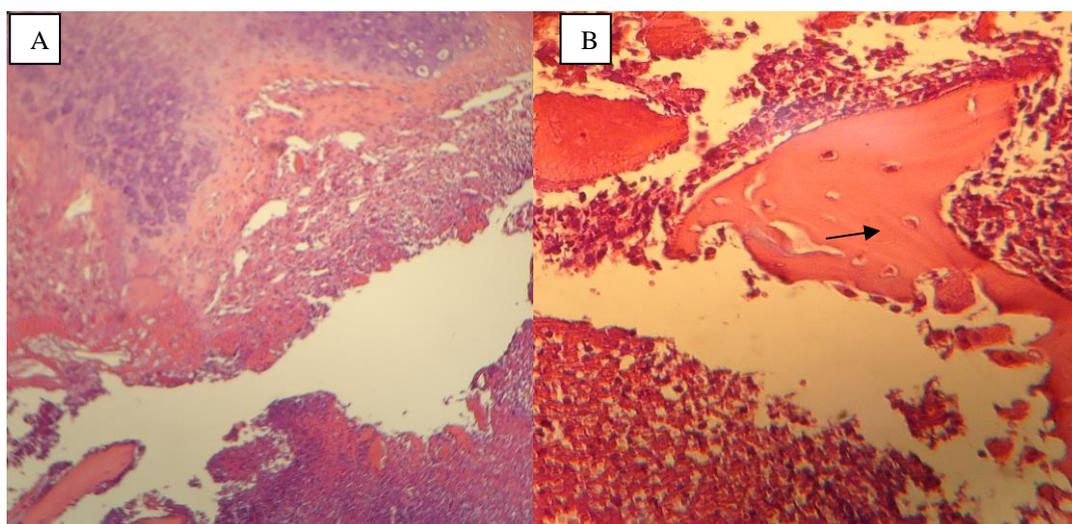


Figura 29 - Fotomicrografia do defeito tratado com a membrana de quitosana (11 dias). A) Fotomicrografia do defeito tratado com membrana de quitosana com 11 dias, coloração HE, 10 x de aumento. B) Fotomicrografia do defeito tratada com membrana de quitosana com 11 dias, coloração HE, 40 x de aumento. Possível visualizar osso neoformado (seta preta).

5.1.8 Grupo D – Coágulo – 11 dias

A resposta inflamatória encontrada nesse tempo não foi significativamente menor que a verificada com 7 dias. Em algumas amostras pode-se visualizar formação óssea, mas esta não foi estatisticamente significativa quando os dois tempos foram analisados.

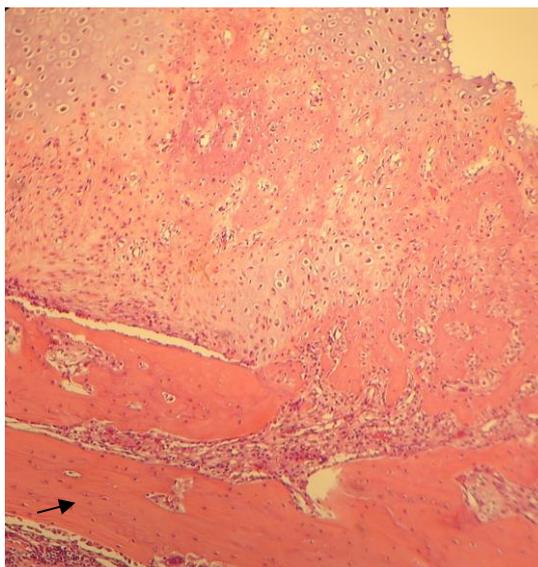
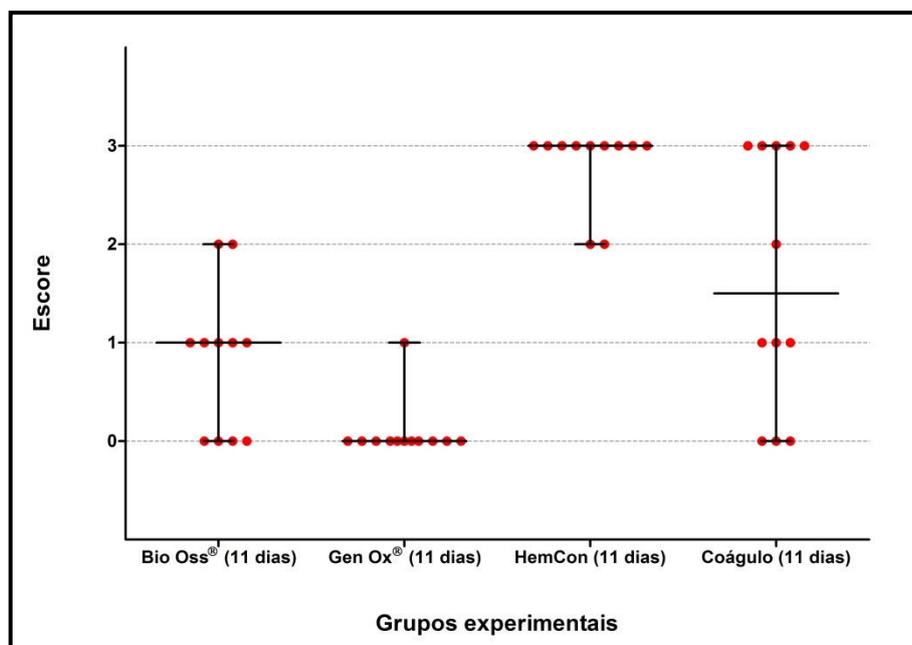


Figura 30 - Fotomicrografia de defeito tratado com coágulo com 11 dias. Presença de formação óssea (seta preta).

HemCon® (11 dias) *versus* Coágulo (11 dias) $p>0,05$ (não-significante)

Os resultados da resposta inflamatória encontram-se no gráfico 2.

Gráfico 2 - scores do infiltrado inflamatório após o período experimental de 11 dias. A barra horizontal representa a mediana, enquanto a linha vertical indica a variância.



A análise em relação a resposta inflamatória dentro do mesmo grupo nos tempos de 7 e 11 dias demonstrou:

Bio Oss® (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,103$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

Gen Ox® (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p<0,001$ (significante para $\alpha=5\%$)

HemCon (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,002$ (significante para $\alpha=5\%$)

Coágulo (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,838$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,257$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

HemCon (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p<0,001$ (significante para $\alpha=5\%$)

Coágulo (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p<0,001$ (significante para $\alpha=5\%$)

5.2.3 Partículas do Biomaterial

A avaliação em relação à presença de partículas remanescentes demonstrou:

Resultado do teste de Kruskal-Wallis: $p<0,001$ (significante para $\alpha=5\%$).

Resultados do pós-teste de Dunn:

Bio Oss[®] (7 dias) *versus* Gen Ox[®] (7 dias) $p>0,05$ (não-significante)

Bio Oss[®] (7 dias) *versus* HemCon (7 dias) $p<0,001$ (significante)

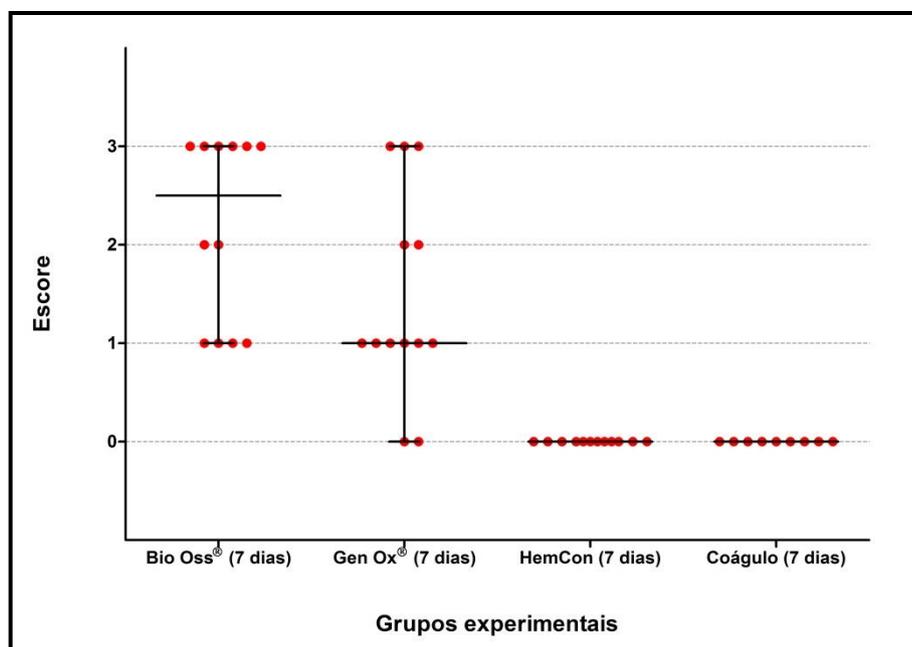
Bio Oss[®] (7 dias) *versus* Coágulo (7 dias) $p<0,001$ (significante)

Gen Ox[®] (7 dias) *versus* HemCon (7 dias) $p<0,01$ (significante)

Gen Ox[®] (7 dias) *versus* Coágulo (7 dias) $p<0,01$ (significante)

HemCon (7 dias) *versus* Coágulo (7 dias) $p>0,05$ (não-significante)

Gráfico 5 - Escores da presença de partículas do biomaterial após o período experimental de 7 dias. A barra horizontal representa a mediana, enquanto a linha vertical indica a variância.



A avaliação das partículas do material remanescente com 11 dias através do teste de Kruskal-Wallis resultou em $p < 0,001$ (significante para $\alpha = 5\%$).

O pós-teste de Dunn resultou em:

Bio Oss[®] (11 dias) *versus* Gen Ox[®] (11 dias) $p > 0,05$ (não-significante)

Bio Oss[®] (11 dias) *versus* HemCon (11 dias) $p < 0,01$ (significante)

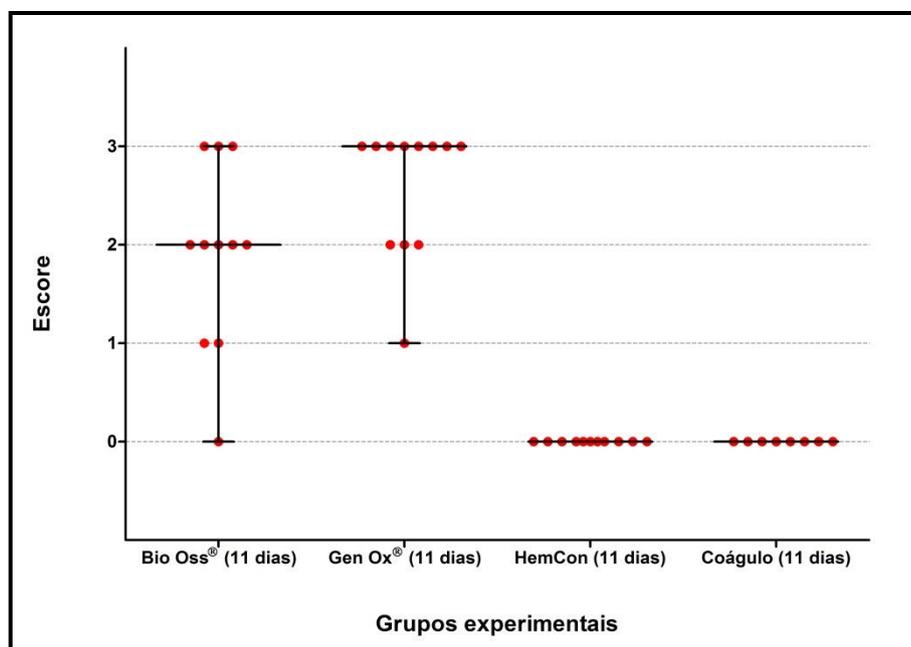
Bio Oss[®] (11 dias) *versus* Coágulo (11 dias) $p < 0,01$ (significante)

Gen Ox[®] (11 dias) *versus* HemCon (11 dias) $p < 0,001$ (significante)

Gen Ox[®] (11 dias) *versus* Coágulo (11 dias) $p < 0,001$ (significante)

HemCon (11 dias) *versus* Coágulo (11 dias) $p > 0,05$ (não-significante)

Gráfico 6 - Escores da presença de partículas do biomaterial após o período experimental de 11 dias. A barra horizontal representa a mediana, enquanto a linha vertical indica a variância.



A avaliação individual de cada grupo nos 2 tempos estudados tiveram como resultado:

Bio Oss® (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,537$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

Gen Ox® (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p=0,009$ (significante para $\alpha=5\%$)

HemCon (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p>0,05$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

Coágulo (7 dias versus 11 dias)

Resultado do teste de Mann Whitney: $p>0,05$ (não-significante para $\alpha=5\%$)

5.2.4 Osso neoformado

O resultado entre os diferentes grupos em relação ao osso neoformado com 7 dias através do teste de Kruskal-Wallis demonstrou $p=0,316$ (não-significante para

6 DISCUSSÃO

Devido à variabilidade da natureza física e química entre os enxertos para substituição óssea, a meta de reproduzir ou reconstruir as estruturas periodontais perdidas (osso alveolar, ligamento periodontal e cimento), o aumento de espessura e altura óssea para a colocação de implantes têm sido conseguidos com variadas taxas de sucesso. Ainda que uma infinidade de estudos procure estabelecer uma padronização no emprego desses materiais, assim como suas vantagens e desvantagem quando usados sozinhos ou em associações, há muitas divergências em relação ao sucesso a longo prazo.

A combinação de RTG com materiais de enxerto é uma das técnicas mais previsíveis para ganho de inserção clínica e preenchimento ósseo em periodontia (CORTELLINI; BOWERS, 1995). Apesar de o osso autógeno ser o primeiro material com aplicação periodontal (BOWERS et al., 1989), existem hoje uma infinidade de materiais disponíveis para a promoção da formação óssea (CARRANZA et al., 2007). O osso autógeno é considerado o material “padrão ouro” para a realização de enxertos. Ele apresenta capacidade osteoindutora e osteogênica, mas tem como desvantagens a alta morbidade, área doadora intra-oral limitada e possíveis complicações no pós-operatório. Desta forma existe um grande estímulo para o desenvolvimento de um biomaterial capaz de promover regeneração óssea e que apresente características muito próximas das ideais (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; PELEGRINI et al., 2011). Baseado nesses questionamentos o objetivo do trabalho foi avaliar dois biomateriais de origem bovina muito utilizados na odontologia, tanto para promover formação óssea como regeneração periodontal. A principal dúvida foi em relação às diferentes respostas que esses enxertos poderiam promover. Apesar de serem materiais xenógenos, passam por diferentes técnicas de processamento, que de acordo com Accorsi-Mendonça, et al., 2008, causam interferências no seu comportamento. A membrana de quitosana, material muito utilizado na hemostasia de feridas, também teve a sua capacidade de formação óssea avaliada pela pesquisa.

O osso bovino inorgânico é um enxerto xenógeno tratado quimicamente para a remoção dos componentes orgânicos (COHEN et al., 1994). Esse processo torna o produto biocompatível e livre da transmissão de doenças (NASR et al., 1999). Os

enxertos xenógenos principalmente os bovinos apresentam boa integração com o osso neoformado. Além disso, o processo de remodelação é lento, fisiológico e mediado por células, contribuindo dessa forma para o processo regenerativo (JARCHO, 1981; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; ITO et al., 2005; CALASANS-MAIA et al., 2009).

O osso bovino Bio Oss® tem sido muito pesquisado nos últimos anos e muitos trabalhos demonstraram a capacidade que esse material apresenta na formação óssea, sem grandes efeitos adversos (IEZZI et al., 2008; GOKHALE e DWARAKANATH et al., 2012; TOVAR et al., 2014). No entanto, Stavroupolos et al. (2003) não encontraram efeitos adicionais do Bio Oss® combinado a RTG no tratamento de defeitos interproximais quando comparado a RTG sozinha. Sculean et al., também em 2003, observou que o Bio Oss® quando associado a membranas torna-se eficiente na regeneração periodontal quando comparado a apenas o debridamento cirúrgico. O mesmo resultado foi observado por Gokhale e Dwarakanath et al., 2012, os autores puderam afirmar que a associação entre Bio Oss® e membrana promoveram melhoras em todos os parâmetros clínicos. Iezzi et al., em 2008, ao usar o Bio Oss® em procedimentos de levantamento de seio maxilar concluíram que o material é altamente biocompatível e que leva a regeneração óssea sem efeitos adversos. Guerra et al., em 2011 utilizaram o osso bovino no tratamento de deiscências peri-implantares e concluíram que a combinação de enxerto ósseo bovino e membrana seria a técnica mais previsível para a formação óssea nesse tipo de defeito. Foi possível verificar no presente estudo que o Bio Oss® promoveu formação óssea nos dois tempos avaliados, mas quando comparado ao coágulo apenas não foi verificado estatisticamente a presença de efeitos adicionais.

Apesar de tanto o Bio Oss® quanto o Gen Ox® serem enxertos de origem bovina, essas materiais passam por diferentes técnicas de processamento que segundo Accorsi-Mendonça et al., em 2008, as altas temperaturas a que o Gen Ox® é submetido causam uma coalescência das partículas do biomaterial fazendo com que o produto apresente maior grau de cristalização quando comparado ao Bio Oss®. Por esse motivo os autores puderam concluir que o osso bovino Bio Oss® apresenta uma reabsorção mais rápida que o Gen Ox®. Foi verificado também que o Bio Oss® apresenta na sua constituição maior quantidade de componentes da

fase orgânica. Em 2004, Tadic e Epple já haviam afirmado que as altas temperaturas de processamento a que o Gen Ox® é submetido provocariam aumento no tempo de reabsorção desse material. Apesar dos autores acima afirmarem que o Bio Oss® apresentaria uma reabsorção mais rápida, um estudo de Moreno et al., em 2013, demonstraram que mesmo após 7 anos foi possível verificar a presença de biomaterial em pacientes que passaram por procedimento de levantamento de seio maxilar. Na pesquisa pode ser observada a presença do material enxertado nos dois tempos avaliados. Tovar et al. (2014) também concluíram em seus estudo que apesar de o Bio Oss® promover formação óssea sua reabsorção é lenta. Em relação à reabsorção do Gen Ox®, Sotto-Maior et al., em 2011, ao avaliaram o produto em defeitos realizados em fêmur de ratos e puderam verificar que o material apresenta capacidade osteocondutora, mas que precisa de grande períodos para o reparo devido a sua reabsorção ser mais lenta. Os resultados de Accorsi Mendonça et al. (2008), não foram confirmados pela pesquisa, visto que não foi encontrada diferença estatística entre Bio Oss® e Gen Ox® em relação a remanescentes do biomaterial no dois tempos avaliados. Foi possível verificar remanescentes com 7 e com 11 dias, sendo que para o Bio Oss® esta diferença não foi significativa.

No que diz respeito à formação óssea pode ser verificado que tanto Gen Ox® quanto o Bio Oss® apresentaram capacidade osteocondutora, esse resultado está de acordo com os trabalhos de Busenlechner., 2008; Iezzi et al., 2008; Guerra et al., 2011; Sotto-Maior et al., 2011; Munhoz et al., 2011; Tovar et al., 2014, que verificaram a eficiência dos dois materiais individualmente. O estudo realizado teve como um dos objetivos comparar a formação óssea promovida pelos 2 enxertos, não sendo encontrada diferença significativa entre eles no que diz respeito a formação óssea no dois períodos avaliados nem efeitos adicionais quando comparados ao coágulo.

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina e que apresenta diversas aplicações na mais variadas áreas (SANTOS et al., 2003). São materiais biodegradáveis, não tóxicos e que apresentam atividade antimicrobiana (SUH; MATTHEW, 2000; SPIN-NETO et al., 2008). Costa e Silva et al., em 2006, verificaram que a quitosana apresenta grande capacidade de agregar plaquetas o que contribui grandemente para o processo de coagulação. Além da liberação de

fatores de crescimento os quais teriam grandes efeitos na cicatrização de feridas. Lotfi et al., em 2011, ao avaliarem histologicamente a quitosana observaram que havia um aumento da circulação e nenhuma reação de corpo estranho. O que pode ser observado no estudo foi que a inflamação promovida pela quitosana com 7 dias, osso bovino Gen Ox®, Bio Oss® e apenas o coágulo, não apresentou diferenças estatísticas entre eles ($p = 0,448$). Mas que a resposta inflamatória da quitosana foi significativamente maior com 11 dias quando comparada com a inflamação provocada pelo Bio Oss® e Gen Ox®. Ao compararmos a membrana HemCon® ao coágulo não houve diferença estatística significativa. Ao contrario do resultado de outros estudos que demonstraram que a quitosana é uma membrana que apresenta sucessos na promoção de hemostasia e aceleração da cicatrização (COSTA E SILVA et al., 2006; MALMQUIST et al., 2008). Além dessas características alguns autores verificaram a capacidade desse biomaterial em promover a formação óssea (PARK et al., 2003; SHIN et al., 2005; PANG et al., 2005. ARDAKANI et al., 2011). O que pode ser observado no estudo foi que além da quitosana apresentar uma resposta inflamatória significativamente maior com 11 dias se comparada aos demais materiais avaliados, quando a formação óssea foi analisada esse material não se demonstrou eficiente, apresentando formação significativamente menor que os enxertos bovinos. Quando a quitosana foi comparada ao coágulo essa diferença não foi significativo. Os resultados encontrados estão de acordo com Spin-Neto et al. (2010) ao avaliarem a quitosana em calvária de ratos verificaram grande quantidade de tecido conjuntivo próximo às bordas dos defeitos, presença de intenso infiltrado inflamatório, além de áreas pontuais de necrose. Em relação à formação óssea os autores concluíram que o biomaterial não foi eficiente. Li et al., 2005, defenderam que a quitosana sozinha não apresenta bons resultados na formação óssea, devido a falta de substâncias inorgânicas, sendo necessária sua combinação com outros biomateriais para a obtenção de melhores resultados. Para compensar essa deficiência alguns autores avaliaram a associação da quitosana a outros materiais, foi o que demonstrou Chesnutt et al., em 2009, combinando- a ao fosfato de cálcio. Resultado parecido foi obtido por Carter et al., em 2010, ao associá-la a fatores de crescimento. Diferente do resultado encontrado na pesquisa e dos autores acima Malmquista et al., em 2008, ao avaliarem a membrana de quitosana da HemCon® no tratamento de feridas orais, puderam verificar a eficiência do biomaterial na hemostasia e cicatrização de tecidos. O trabalho de Park et al. (2003), avaliaram o

efeito da quitosana em defeitos periodontais demonstrando que esse material apresenta grande capacidade de converter células mesenquimais em cementoblastos, confirmando dessa forma sua capacidade de promover regeneração em defeitos periodontais. Pang et al., em 2005, verificaram que a quitosana apresenta propriedades biológicas e características estruturais que possibilitam a sua aplicação clínica como um substituto ósseo e um arcabouço para o crescimento celular. Shin et al., em 2005, também puderam observar crescimento ósseo promovido pela quitosana em defeitos realizados em calvária de rato. Os resultados foram estatisticamente superiores aos obtidos nos defeitos preenchidos apenas com coágulo. Ardakani et al., em 2011, também demonstraram a eficiência da quitosana na formação óssea em sítios pós-exodontia. Azaroon et al., em 2011, avaliaram a utilização da membrana de quitosana da HemCon® em cirurgias periapicais. Os resultados em relação à formação óssea e hemostasia foram estatisticamente superiores ao encontrados nos defeitos que receberam apenas coágulo.

Hsu e Wang, em 2013, realizaram uma revisão de literatura onde foram avaliados diferentes biomateriais para enxerto e suas diferentes utilizações. Pode-se concluir que mesmo com o advento tecnológico os enxertos ósseos autógenos continuam sendo a melhor escolha como biomaterial para a realização de enxertos ósseos, mas não são a única opção na odontologia. Vários substitutos estão disponíveis e apresentam diferentes propriedades e quando usados corretamente com a indicação certa podem trazer bons resultados.

Atualmente existe uma infinidade de materiais disponíveis para a realização de enxertos ósseos tanto na periodontia quanto na implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial. A literatura tem demonstrado, nos últimos anos, que o osso autógeno seria o material “padrão ouro” para a formação óssea, mas que apresenta como grande desvantagem sua alta morbidade. Desta forma torna-se importante a busca de um substituto ósseo ideal através de pesquisas que demonstrem as repostas dos diferentes materiais, principalmente no que diz respeito às características histológicas e grau de formação óssea.

7 CONCLUSÃO

Através do presente trabalho pode-se concluir:

- Gen Ox® e Bio Oss® foram eficientes na formação óssea não havendo diferenças estatísticas entre eles, nem em relação ao coágulo. Quando comparados á quitosana os enxertos bovinos tiveram resultados superiores, o mesmo não ocorreu com o coágulo.
- A resposta inflamatória não apresentou diferença significativa entre os grupos com 7 dias, mas aos 11 dias a quitosana apresentou inflamação significativamente superior aos demais.
- Tanto Gen Ox® quanto Bio Oss ® apresentaram remanescentes com 7 e 11 dias, essa diferença não foi significativa entre eles.

REFERÊNCIAS*

Accorsi-Mendonça TA, Conz MB, Barros TC, Sena LA, Soares GA, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two desproteinized bovine xenograft. *Braz Res Oral*. 2008; 22(1):5-10.

Accorsi-Mendonça TA, Zambuzzi WF, Bramante CM et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting. An evaluation in critical-size calvarial defect. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(4):997-1004.

Ardakani EF, Azam AN, Yassaci S, Zatehi F, Rouhi G. Effects of chitosan on dental bone repair. *Health*. 2011; 3(4):200-6

Azargoon H, Willian BJ, Solomon ES, Kessler HP, Spears R. Assesment of hemostatic efficacy and osseous wound healing using HemCon dental dressing. *J Endond*. 2011; 37(6):807-11.

Bowers GM, Chadroff B, Carnevale R, Mellonig J, Corio R, Emerson J, Stevens M, Romberget E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Parte III. *J Periodontol*. 1989; 60(12):683-93.

Busenlechner D, Tangl S, Mair B, Fugger G, Gruler R, Redl H, Watzek G. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *J Biomaterials*. 2008; 29(22):3195-200.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration in surgical procedure in the maxilla. I *J Periodont Rest Dent*. 1993; 13(1):29-45.

*Estilo Vancouver apresentado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, publicadas inicialmente em 1979.

Carranza FA, Newmann MG, Takei HH, Klokkevold PR. *Periodontia Clínica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATNA, Rossi AM, Granjeiro JM. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. *Acta Ortop Bras*. 2009; 17(6):340-3.

Canter HI, Vargel I, Korkusuz P, Oner F, Gungorduk D, Cel B, Karabulut E, Sargon MF, Er KY. Effect of use of slow release of bone morphogenetic Protein-2 and transforming growth factor beta -2 in chitosan gel matrix on cranial bone graft survival in experiment critical size defect model. *Ann Plast Surg*. 2010; 64(3):342-50.

Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, Guda I, Appleford M, Ong JL, Haggard WO, Bumgardner JD. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2009; 88A:491-502.

Cohen R, Mullarky RH, Noble B, Comeau CL, Neiders ME. Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine implantation in rats. *J Periodontol*. 1994; 65(11):1008-15.

Cook DC, Mealey BL. Histologic Comparison of healing following tooth extraction with ridge preservation using two different xenografts protocols. *J Periodontol*. 2013; 84(5):585-94.

Cortellini P, Bowers GM. Periodontal regeneration of intrabony defects: and evidence-based treatment approach. *J Periodont Res Dent*. 1995; 15:128-45.

Costa Silva HSR, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana e derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quimica Nova*. 2006; 29(4):776-85.

Dallan PRM. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação em regeneração de pele [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 2005.

Delfino HL, Castro CHFD, Cabral NC, Paccolla CAJ, Xavier C. Banco de osso: organização e utilização clínica no Hospital das clínicas da F.M.R.P. – USP. Rev Bras Ortop. 1991; 26(3):61-6.

Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Characterization and evaluation of chitosan matrix for in vitro growth of MCF-7 breast cancer cell lines. Biomat. 2004; 25:5147-54.

Farrugia BL, Whitlock JM, Jung M, McGrath B, O'Grady RL, McCarthy SJ, Lord MS. The Localisation of inflammatory cells and expression of associated proteoglycans in response to implanted chitosan. Biomater. 2014; 35:1462-77.

Garbin CM, Garbin NM. Enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada: noções básicas. São Paulo: Pancast. 1994.

Gokhal ST, Dwarakanath CD. The use of natural osteoconductive porous bone mineral (Bio Oss) in infrabony periodontal defects. J Indian Soc Periodontol. 2012; 16(2):247-52.

Gravel M, Groes I, Vago R, Iabrizian M. Responses of mesenchymal Stem cell to chitosan-coraline composites microstructured using coraline as gas forming agent. Biomater. 2006; 27:1899-906.

Guerra I, Branco FM, Vasconcelos M, Afonso A, Figueiral H, Zita R. Evaluation of implant osseointegration techniques in the treatment of bone defects around implants: an experimental study in rabbit model. Clin Oral Impl Res. 2011; 22:314-22.

Hsu Yung-Tung, Wang Ham-Lay. How to select replacement grafts various periodontal and implant indications. Clin Adv Periodont. 2013; 3(3):167-79.

Iezzi G, Scarano A, Mangano C, Cerotti B, Piatelli A. Histologic Results from a Human Implant Retrieved Due to fracture 5 years after insertion in a sinus Augmented with anorganic bovine bone. J Periodontol. 2008; 79(1):192-286.

Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potencial of injectable tissue-engineered bone. A comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-Oss®), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res.* 2005; 73:63-72.

Kemper N, Davison N, Fitzpatrick D, Marshall R, Lin A, Mundy K, Cobb R. characterization of mechanical properties of bovine cortical bone treated with a novel tissue esterelization process. *Cell Tissue Bank.* 2011; 12:273-9.

Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Han SB, Choi SM, Klokkevoold D, Chung CP. Tissue Engeneered Bone Formation using Chitosan/Tricalcium Phosphate Esponges. *J Periodontol.* 2000; 71(3):410-7.

Li Z, Yobao L, Aiping Y. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as a bone substitute material. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16:213-9.

Lotfi G, Shokrgozar MA, mofed R, Abbas FM, Ghanavatti F, Bagheban AA, Shariati RP. A clinical and histologic evaluation of gingival chitosan-based scaffold and its effects on the width of keratinized gingival in dog. *J Periodontol.* 2011; 82(9):1367-75.

Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Bowe L, Tami A, Anderson JM, Jordan O, Gurny R. Injectable rhBMO-2 loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and segmental long bone defect. *J Biomed Mater Res Part.* 2011; 96(1):66-74.

Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, Wilson SL. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon dental dressing. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66:1177-83.

Melcher AH. Potencial de reparo dos tecidos periodontais. *J Periodontol.* 1976; 47(5):256-60.

Moreno GP, Cortes PH, Mesa F, Carranza N, Juodzbaly G, Aguilar M, O`Valle I. Slow resorption of anorganic Bovine Bone by osteoclasts im maxillary Sinus Augmentation. Clin Imp Dent Res. 2013; 15(6):858-66.

Munhoz EA, Bodanez A, Cestari TM, Perri de Carvalho PS, Ferreira Júnior O. Long Term rabbits bone response to titanium implants in the presence of bovine inorganic derived graft. J Biomater. 2011.

Pang EK, Paik JW, Jung UI, Kim CS, Cho KS, Kim CK, Choi SH. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol. 2005; 76(9):1527-33.

Park JS, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Kim CK. Eight week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dog. J Clin Periodontol. 2003 ;30:443-53.

Park JW, Jang JH, Bae SR, Ann CH, Suh JY. Bone formation with various bone grafts substitutes in critical-sized rat calvarial defect. Clin Oral Impl Res. 2009; 20:372-8.

Pelegri AA, Da Costa CE, Sendy WR, Gromatzki A. Cell Tissue Bank 2011; 12:171-84.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and application. Prog Pol Sci. 2006; 26:1-21.

Santos JE, Soares JP, Dockal ER. Caracterização de quitosana comerciais de diferentes origens. Pol Cienc Biotecnol. 2003; 13(4):242-9.

Schallhorn RG, Hiatt WH, Boyce W. Iliac transplants in periodontal therapy. J Periodontol. 1970; 41(10):566-80.

Sculean A. et al. Healing of intrabony defects following treatment with a bovine-derived xenograft and collagen membrane: a controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:73-80.

Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Lee SJ, Chung CP. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. *J Periodontol.* 2005; 76(10):1778-84.

Sotto-Maior BS, Senna PM, Aaristrup BJV, Ribeiro RA, Assis NMSP, Cury AADB. Effect of bovine hydroxiapatite on early stages of bone formation. *Rev Odonto Cienc.* 2011; 26(3):198-202.

Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio Júnior E. Chitosan based biomaterials with medical and dental application. A literature Review. *Rev Odontol UNESP.* 2008; 37(2):155-61.

Spin-Neto R, Freitas RM, Pavone C, Cardoso MB, Campano-Filho SP, Marcantonio RAC, Marcantonio Júnior E. Histological evaluation of chitosan based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. *J Biomed Mater Res.* 2010; 93:107-14.

Stavropoulos A. et al. Desproteinized bovine bone (Bio-Oss) and bioactive glass (Biogran) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR). An experiment study in the rat. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:636-46.

Stevenson S, Li XQ, Davy D, Klein L, Goldberg VM. Critical Biological Determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. *J Bone and Joint Surg.* 1997; 79(1):1-15.

Suh JKF, Matthew HWT. Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering. *A Review Biomater.* 2000; 26:1-21.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium-phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004; 25(6):987-94.

Tang XJ, Gui L, Xiao YL. Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite. *Biomed Mater*. 2008; 3:1-9.

Thein-Han WW, Kitiyanant Y, Mirce RDK. Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering. *Mat Sci Technol*. 2008; 24(9):1062-75.

Tonino T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piatelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol*. 2008; 79(7):1232-40.

Tovar N, Jumbo R, Gongolle R, Perez L, Manne L, Yoo D, Lorenzone E, Witik L, Coeljo PG. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenograft: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43:251-60.

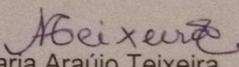
Williams DF. *Definitions in Biomaterials*. New York: Editora Elsevier; 1987.

ANEXO 1

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 496/2013 do Pesquisador José Peixoto Ferrão Júnior, referente ao projeto de pesquisa "Análise histológica de biomaterias para enxerto ósseo utilizados na periodontia", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 19 de junho de 2013 .


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 20 de junho de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184