

**TÁRIK OCON BRAGA POLO**

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO DE  
CAVIDADES CIRÚRGICAS PREENCHIDAS COM OSSO INORGÂNICO DE  
ORIGEM BOVINA (BONEFILL<sup>®</sup>) EM TÍBIA DE RATOS**

**ARAÇATUBA - SP**

**2013**

**TÁRIK OCON BRAGA POLO**

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO DE  
CAVIDADES CIRÚRGICAS PREENCHIDAS COM OSSO INORGÂNICO DE  
ORIGEM BOVINA (BONEFILL®) EM TÍBIA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof. Ass. Dra. Daniela Ponzoni.  
Coorientadora: Prof. Ass. Dra. Alessandra Marcondes Aranega.

**ARAÇATUBA - SP**

**2013**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família, que sempre esteve presente nessa caminhada, me estruturando nos momentos mais difíceis. E ao minha namorada, que sempre esteve disposta a me ajudar em todos os dias. Quero que saibam que eu não conquistaria nada se não estivessem ao meu lado. Obrigado, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, me dando carinho, apoio, incentivo, coragem e principalmente pelo amor.

## **Agradecimentos**

À José Wilson Polo e Silvana Montanari Ocon Braga Polo, meus pais, por todo amor, carinho e confiança em mim depositados. Pelos conselhos dados que tanto procurei seguir, pela família sólida que tanto prezou em construir e pelos valores passados, que sempre me servem de alicerce para construir minha vida.

À Renata, minha irmã, que sempre me inspirou e servia de grande exemplo, que sempre me escutava e me apoiava antes mesmo de iniciar o curso de Odontologia que ela me apresentou.

À Mariane, minha namorada, que esteve comigo por toda minha graduação, que sempre foi uma grande companheira, que estava comigo nos momentos de dificuldade e de desespero e que me mantinha firme quando pensava em fraquejar frente às dificuldades da vida.

À minha orientadora, professora Doutora Daniela Ponzoni, que aceitou de imediato trabalhar comigo em seu primeiro projeto de pesquisa como docente desta universidade, e que teve uma imensa tranquilidade ao cumprir com sua função de orientadora. Graças à experiência que me foi proporcionada, hoje mais que nunca sei que a iniciação científica pode estimular um melhor relacionamento dentro da universidade entre os docentes, discentes e demais funcionários. Esta prática me despertou uma vontade de seguir uma carreira acadêmica, seguindo os bons exemplos que tive aqui durante esses anos de estágio.

Aos meus colegas de graduação e todos que conquistei no Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada durante todo o tempo em que realizei meu estágio, pela amizade e companheirismo.

Aos professores, funcionários, mestrandos e doutorandos que muito me ajudaram e ensinaram todos esses anos.

À PROPE, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela oportunidade de realização desse sonho.

**POLO, T. O. B. Análise histomorfométrica do processo de reparo de cavidades cirúrgicas preenchidas com osso inorgânico de origem bovina (Bonfill®) em tibia de ratos.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

### **Resumo**

O objetivo do presente estudo foi avaliar qualitativa e quantitativamente o processo de reparo ósseo de defeitos cirúrgicos preenchidos com coágulo de sangue (CS), osso autógeno (OA), ou osso bovino inorgânico (BB) em tíbias de ratos Wistar machos adultos. Defeitos cirúrgicos foram criados nas tíbias direita e esquerda de quarenta animais que foram divididos nos seguintes grupos: o grupo controle, em que os defeitos cirúrgicos nas tíbias direita e esquerda foram preenchidos com OA e CS, respectivamente, do Grupo BB, em que o defeito cirúrgico foi preenchido com osso bovino inorgânico. Os animais foram sacrificados aos 10 e 30 dias pós-operatórios e um bloco de tecido da tibia foi dissecado e descalcificado. As amostras foram processadas histologicamente e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e em Tricrômico de Masson e submetidos à análise histométrica. O reparo completo do defeito ósseo foi observado em todos os grupos aos 30 dias, no entanto, o osso bovino inorgânico não foi absorvido no grupo BB. A análise histomorfométrica revelou um aumento significativo do tecido mineralizado no grupo BB em comparação com os tratamentos do grupo controle. O osso bovino inorgânico utilizado mostrou biocompatibilidade e potencial osteocondutor.

Palavras-chave: Biomateriais. Regeneração óssea. Aloenxerto. Implantodontia.

POLO, T. O. B. **Histomorphometrical analysis of the healing process of surgically created defects in rat tibiae filled with inorganic bovine bone (Bonfill®)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013.

### **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate qualitatively and quantitatively the process of bone repair surgical defects filled with blood clot (CS), autogenous bone (OA), or inorganic bovine bone (BB) in the tibia of adult male Wistar rats. Surgical defects were created in the right and left tibia forty animals were divided into four groups: the control group, in which the surgical defect in the right and left tibia were filled with OA and CS, respectively, the BB group, in which the defect surgery was filled with inorganic bovine bone. The animals were sacrificed after 10 and 30 days post-operative tissue block and tibia were dissected and decalcified. The samples were processed histologically and stained with hematoxylin and eosin technique (HE) and Masson trichrome and subjected to histometric analysis. The complete repair of the bone defect was observed in all groups at day 30, however, the inorganic bovine bone was not absorbed in the BB group. Histomorphometric analysis revealed a significant increase mineralized tissue in the BB group compared to the control treatment group. The inorganic bovine bone used showed biocompatibility and osteoconductive potential.

Key words: Biomaterials. Bone regeneration. Allograft. Implantology.

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Tricotomia da região anterolateral da tíbia de membros posteriores	21
Figura 2 -	Acesso cirúrgico à tíbia	21
Figura 3 -	Preparo da cavidade por meio de trefina	21
Figura 4 -	Fragmentos ósseos obtidos	21
Figura 5 -	Cavidade preenchida por enxerto autógeno particulado (Grupo OA)	22
Figura 6 -	Cavidade preenchida por coágulo (grupo CS)	22
Figura 7 -	Cavidade preenchida pelo biomaterial (grupo BB)	22
Figura 8 -	Sutura	22
Figura 9 -	Quadro de toda extensão do defeito cirúrgico	23
Figura 10 -	Área total do defeito selecionada (AT)	23
Figura 11 -	Delimitação de espaços trabulares para cálculo da área de tecido mineralizado (AON)	23
Figura 12 -	CS 10 dias. Grupo Controle – coágulo sanguíneo. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X	24
Figura 13 -	AO 10 dias. Grupo Controle - enxerto autógeno particulado. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X	24
Figura 14 -	BB 10 dias. (Grupo tratado - biomaterial Bonefill®). HE. Aumento original 25X	24
Figura 15 -	CS 30 dias. Grupo Controle - coágulo sanguíneo. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X	24
Figura 16 -	AO 30 dias. Grupo Controle - enxerto autógeno particulado. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X	25
Figura 17 -	BB 30 dias. Grupo Tratado - biomaterial Bonefill®. HE. Aumento original 25X	25

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 -	Distribuição dos grupos estudados	25
Tabela 2 -	Testes aplicados em análise estatística	26

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Teste estatístico aos 10 dias	26
Gráfico 2 -	Teste estatístico aos 30 dias	27
Gráfico 3 -	Porcentagem da área mineralizada no interior dos defeitos cirúrgicos em cada um dos grupos	27

## Lista de Abreviaturas

AO = Enxerto ósseo autógeno particulado

AON = Área de osso neoformado

AT = Área total

ET = Espaço Trabecular

BB = Osso bovino inorgânico

CS = Coágulo sanguíneo

HE = Hematoxilina e eosina

## Sumário

1. Introdução.....	11
2. Material e Métodos.....	12
2.1 Procedimento cirúrgico.....	12
2.2 Análise histológica.....	13
2.2 Análise histométrica.....	13
2.3 Análise estatística.....	14
3. Resultados.....	14
3.1. Resultados histológicos.....	14
3.1.1. Grupo CS - 10 dias.....	14
3.1.2. Grupo OA - 10 dias.....	15
3.1.3. Grupo BB - 10 dias.....	15
3.1.4. Grupo CS - 30 dias.....	15
3.1.5. Grupo OA - 30 dias.....	16
3.1.6. Grupo BB - 30 dias.....	16
3.2. Análise histométrica.....	16
4. Discussão.....	17
5. Conclusões.....	18
Referências.....	19
Anexos.....	21

## 1. Introdução

Substitutos ósseos são biomateriais utilizados para diminuir a morbidade causada pelo enxerto autógeno (RAGHOEBAR; LOUWERSE; KALK, 2001; JOSH, 2004). No entanto, as propriedades biológicas dos materiais homogêneos e heterogêneos, e aloplástica diferem das autógenas por ser predominantemente osteocondutor, osteoindutor, ou osteogênico (PERRI DE CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004). Portanto, os substitutos ósseos devem ser recomendados nos casos em que a neoformação óssea não ocorre no seu próprio defeito ósseo, como o preenchimento, na qual existem paredes ósseas, a fim de melhorar o contorno do rebordo. Nestes casos, os substitutos ósseos podem proteger parcialmente os implantes que apresentam fenestração vestibular do osso alveolar (CARVALHO; BASSI; PEREIRA, 2004). Em tais condições, as propriedades inerentes de estabilidade dos substitutos de osso seriam benéficas.

Entre os substitutos ósseos heterogêneos comercialmente disponíveis estão o osso desmineralizado, osso mineralizado, osso compacto e proteína morfogenética do osso, os quais são de origem bovina. Materiais de origem bovina são teoricamente biocompatíveis (TAGA et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1999; SICCA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003) e devem ser investigados para compreender melhor as suas propriedades biológicas, dada a sua grande utilização clínica. É importante ressaltar que a estrutura de hidroxiapatita do osso é semelhante entre espécies (HERCULANI et al., 2000). Vários estudos têm mostrado a biocompatibilidade da matriz bovina (HERCULANI et al., 2000; BERJLUNDH; LINDHE, 1997; MELO et al., 2005; MENDES et al., 2006). O osso bovino é obtido a partir de uma fonte abundante, é barato, e seguro em relação ao risco de contaminação cruzada, tal como o processo de tratamento a que é submetido, o que elimina qualquer risco de uma resposta imunogênica (CARBONARI et al., 2010; CORDIOLI et al., 2001).

É considerado material de osso desmineralizado quando a parte inorgânica do osso é removida. De acordo com Urist (1965) e Taga et al. (1997) estes são materiais que podem apresentar, dependendo do doador, o potencial osteoindutivo, devido a presença de fatores de crescimento solúveis na sua matriz.

O presente estudo teve como objetivo investigar histológica e histomorfologicamente o comportamento de um novo osso bovino inorgânico (Bonefill<sup>®</sup>) no interior do tecido ósseo, comparando-o com osso autógeno particulado e coágulo de sangue em tíbias de ratos.

## 2. Material e Métodos

Quarenta ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) foram utilizados pesando aproximadamente 250 g. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com comida sólida e água *ad libitum*. O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais – CEUA. (protocolo número FOA - 6066/10). Dos quarenta ratos, vinte animais foram submetidos a defeitos cirúrgicos em ambas as tíbias e divididos nos seguintes grupos de controle:

- a) grupo CS deixou tibia preenchida com coágulo sanguíneo;
- b) grupo AB, tibia direita preenchida com osso autógeno particulado.

E os outros vinte animais foram submetidos a um defeito cirúrgico na tibia direita preenchida de Bonefill<sup>®</sup> biomaterial (grupo BB) (Bionnovation Implantes e Biomateriais, SP, Brasil).

### 2.1. Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram anestesiados por via intramuscular com xilazina (8-10 mg / kg, Coopazine, Coopers, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (50 mg / kg, Vetaset, Fort Dodge, SP, Brasil). Em seguida foi realizada a tricotomia e antisepsia com iodo polvidona realizada na região da tibia anterolateral de ambos os membros posteriores (Figura 1). Uma incisão linear longitudinal de 15 milímetros foi feita usando uma lâmina cirúrgica em cada membro. As incisões foram estendidas ao periósteo, permitindo o seu deslocamento na direção transversal (Figura 2).

Nos animais do grupo controle (CS e grupos OA), dois defeitos cirúrgicos foram criados nos membros pélvicos direito e esquerdo usando uma trefina de 2 mm (Sistema de Implantes Nacional, SIN<sup>®</sup>, SP, Brasil) acoplado a um contra-ângulo (NSK, Neodent<sup>®</sup>, PR, Brasil) e peça de mão elétrico sob refrigeração com soro fisiológico. As profundidades de defeito eram restritas a espessura do osso cortical da tibia (Figura 3). Os fragmentos ósseos circulares foram removidos em blocos durante a criação do defeito e posteriormente foram armazenados em solução salina, durante um período máximo de 20 minutos, até que os passos seguintes fossem efetuados (Figura 4). Estes fragmentos foram reduzidos a partículas utilizando uma lâmina cirúrgica e inserida no interior da tibia direita dos respectivos animais

(grupo OA, figura 5). A cavidade da tíbia esquerda foi preenchida com coágulo de sangue (grupo CS, figura 6). Nos animais tratados com o biomaterial Bonefill<sup>®</sup> (grupo BB), os defeitos foram criados nas tíbias direitas, como nos grupos de controle. Estes defeitos foram preenchidos com partículas inorgânicas de Bonefill<sup>®</sup> osso bovino (Figura 7).

Os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 5.0 (Nylon 5-0, Ethicon<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 8). Os animais foram sacrificados aos 10 e 30 dias de pós-operatório com uma dose letal de anestésico cetamina. As tíbias dos ratos foram dissecadas, removidas e fixadas em formol neutro a 10% durante 24 horas. Os espécimes foram descalcificados em solução de EDTA a 20% e incluídos em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson para análise histológica e histométrica.

## **2.2 Análise histológica**

A análise histológica foi realizada utilizando um microscópio de luz (Leica<sup>®</sup> Leitz DM RXE). A intensidade do processo inflamatório foi observada para quantificar o número de células inflamatórias em cinco campos diferentes da mesma amostra com uma ampliação de 400x. O processo inflamatório foi considerado discreto quando o número de células inflamatórias era inferior a 100; moderada, entre 100 e 500, e intenso, acima de 500. Outras características histológicas também foram analisadas, tais como a proliferação capilar e fibroblástica, a presença de osteoblastos de neoformação óssea, macrófagos, células multinucleadas ou osteoclastos e reabsorção ou incorporação do material implantado no interior do defeito cirúrgico.

## **2.3 Análise histométrica**

O corte histológico mais centralizado na direção latero-lateral do defeito cirúrgico de cada animal foi selecionado para análise histométrica. Para isso, o microscópio com aumento de 25x capturará cortes usando uma câmera digital (Câmera DFC 500, Leica<sup>®</sup>) acoplado a um microscópio (Leica<sup>®</sup> DM 4000 B), e assim, imagens eletrônicas foram analisadas quantitativamente usando software BIOESTAT<sup>®</sup> (versão 5.3).

Para padronizar a análise histométrica, foram estabelecidos os seguintes critérios: 1) O campo do microscópio deve incluir a extensão total do defeito cirúrgico anteriormente mencionado (Figura 9). Nesta imagem total do defeito cirúrgico, a individualização da área a ser analisada foi realizada, na qual a área correspondente à região cortical da tíbia, em que o defeito cirúrgico previamente criado, foi delimitado. Esta área foi denominada "área total" (AT) (Figura 10). 2) Dentro da AT, a delimitação de espaços trabeculares (ET) foi realizada. Subtraindo-se estes dados a partir da AT, foram obtidos valores das áreas correspondentes à área de osso neoformado (AON) (Figura 11). O valor AT foi considerado 100% da área total analisada. A porcentagem de AON foi calculada como  $\% \text{ AON} = 100 \times \text{AON} / \text{AT}$ . Valores de AON foram usados para o cálculo das médias e dos desvios-padrão de cada grupo.

## **2.4 Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados obtidos na análise histométrica, o teste de aderência curva normal foi aplicado a cada grupo experimental usando Software Bioestat<sup>®</sup>. Com a distribuição anormal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para isolar as diferenças entre os grupos, foram utilizados postos médios no teste de comparação múltipla de Dunn. Todos os grupos foram avaliados individualmente em 10 e 30 dias de pós-operatório, com os respectivos defeitos cirúrgicos preenchidos com coágulo sanguíneo (1), enxerto autógeno (2), ou Bonefill<sup>®</sup>(3). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados**

### **3.1. Os resultados histológicos**

#### **3.1.1. Grupo CS - 10 dias**

O defeito mostrou trabeculado ósseo imaturo com espaços intratrabeculares ocupados por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e feixes de fibras colágenas organizadas com um elevado número de fibroblastos. Um número moderado de células inflamatórias,

consistindo principalmente de linfócitos e macrófagos. Observou-se também uma série de osteoblastos ao longo das margens do tecido ósseo neoformado (Figura 12).

### **3.1.2. Grupo OA - 10 dias**

Observou-se trabéculas de osso imaturo com amplos espaços intratrabecular no interior da área cirúrgica. Numerosos osteoblastos e intensa aposição óssea foram observados ao longo das margens do tecido ósseo neoformado. Em todos os espécimes estudados, o enxerto ósseo foi revascularizado e incorporado, com atividade discreta dos osteoclastos nas margens. A área intratrabecular nesta região medular foi ampla, apresentando muitos vasos sanguíneos (Figura 13).

### **3.1.3. Grupo BB - 10 dias**

Observaram-se trabéculas de osso imaturo aderido ao implante fragmentado na região do defeito cirúrgico. No interior da área cirúrgica, a presença de amplos espaços intertrabeculares demonstraram que a ferida não foi fechada por tecido duro na maioria dos espécimes e que o processo de reparação estava ligeiramente atrasado em comparação com os outros grupos no mesmo período de tempo. Os implantes presentes no interior do defeito foram rodeados por trabéculas de osso imaturo e por um número de osteoblastos intenso, bem como um número discreto de osteoclastos perto de trabéculas de osso neoformado. A reação tipo de corpo estranho de células gigantes multinucleadas não foi observada perto dos grânulos de biomateriais, sugerindo que a incorporação do material estava ocorrendo (Figura 14).

### **3.1.4. Grupo CS - 30 dias**

A área do defeito foi totalmente reparada por tecido ósseo bem desenvolvido em todos os espécimes. Na maioria dos espécimes, o tecido ósseo mais neoformado foi observado ao longo das margens do defeito, diminuindo para a área central. A área do osso neoformado diferia do osso cortical adjacente por primitivas lamelas de osso desorganizado e um grande número de osteócitos, uma vez que, exceto na área cirúrgica, lamelas ósseas foram mais paralela ao longo do eixo da tíbia (Figura 15).

### 3.1.5. Grupo OA - 30 dias

A ferida foi completamente preenchida com o osso bem desenvolvido. Esta ferida era mais espessa do que a do grupo de controle CS, devido à incorporação do enxerto ósseo. Havia poucos espaços intratrabeculares cheios de fibras colágenas, numerosos osteoblastos, e um número discreto de células inflamatórias. A maioria dos enxertos ósseos foi incorporada no tecido ósseo neoformado (Figura 16).

### 3.1.6. Grupo BB - 30 dias

Fragmentos de biomaterial no interior do defeito da tíbia foram incorporados no tecido ósseo neoformado na sua porção cortical em todas as amostras. O defeito foi totalmente reparado por um tecido duro, que consiste em incorporar osso neoformado e fragmentos do biomaterial. Ocasionalmente, os osteoclastos podem ser vistos nas trabéculas do osso neoformado, adjacente aos grânulos de biomateriais (Figura 17).

## 3.2. Análise histométrica

A quantificação do tecido mineralizado nos grupos tratados e controle é mostrada no gráfico 3. Nos grupos OA e BB, os dados representam a quantificação da área mineralizada (enxerto de osso incorporado ao osso neoformado, ou osso neoformado e partículas de biomaterial).

- a) CS 10 dias – 29%; OA 10 dias – 31%; BB 10 dias – 68%.
- b) CS 30 dias – 58%; OA 30 dias – 62%; BB 30 dias – 76%.

## 3.3. Análise Estatística

Na análise estatística, os valores numéricos das áreas mineralizadas foram submetidos ao teste de aderência à curva normal. Os grupos CS(1), AO(2) e BB(3) de 10 dias foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis onde o  $p < 0,0001$ . Os grupos (1),(2) e (3) de 30 dias submetidos ao mesmo teste revelou um valor de  $p = 0,0014$ . Os resultados estatisticamente significativos obtidos sugeriram a necessidade da aplicação de um novo teste para identificar

em qual posto está localizada à diferença. Nos testes emparelhados (Dunn) entre os grupos com o mesmo período de tempo em 10 e 30 dias, o grupo BB demonstrou uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos de controle. ( $p < 0,05$ )

#### **4. Discussão**

A aplicação de biomateriais, que são classificados como substitutos ósseos devem ser inicialmente testados antes de aparecer em situações clínicas. Este é o objetivo principal destes estudos experimentais, que é a de compreender as respostas biológicas de materiais comercialmente disponíveis e aplicá-los de forma adequada em situações clínicas. Embora o osso desmineralizado tenha sido utilizado em vários estudos experimentais e clínicos, é indicada a validação científica de sua ação esperada. Urist (1965) e Taga et al. (1997) relataram que este material pode ter potencial osteoindutivo, devido à presença de fatores de crescimento solúveis na sua matriz. Não foi possível confirmar esta propriedade com o método utilizado no presente estudo, uma vez que um local diferente de um defeito do osso seria necessário, exceto em defeitos críticos, em que o processo de reparação gerada por células osteoprogenitoras possa ocorrer. No entanto, Bonefill é um material biocompatível e permite que o tecido ósseo neoformado entre em contato com as suas partículas, o que caracteriza a atividade osteocondutora.

Na análise quantitativa do tecido mineralizado, é impossível distinguir com precisão os limites das partículas enxertadas (autógena ou biomaterial) e do osso neoformado, pelo fato das partículas de enxerto serem incorporadas ao tecido ósseo neoformado. Entre os grupos de estudo, na avaliação histológica observou-se que o grupo de biomaterial apresentou melhores resultados na quantificação da área mineralizada no interior dos defeitos cirúrgicos. Isto pode ser observado pela área estar ocupada por grânulos incorporados no tecido ósseo neoformado no interior dos defeitos, o que confirma a sua função osteoindutora. É importante mencionar que nenhuma reabsorção do biomaterial foi observada durante o período experimental. Aos 30 dias, o biomaterial continuou a ser incorporado no tecido ósseo e não foi reabsorvido, enquanto que no grupo OA, não foi possível identificar ou isolar as partículas do osso autógeno durante a quantificação.

Os resultados histológicos mostraram que o biomaterial testado não gerou nenhuma reação de corpo estranho no interior do tecido ósseo, em qualquer dos períodos de estudo,

uma vez que este seria um resultado que iria atrasar o processo de formação óssea. Este achado é importante para a utilização deste biomaterial em situações clínicas em que é necessário o preenchimento de defeitos ósseos, tal como nas áreas periimplantares. Também é importante salientar que em algumas situações clínicas em que a finalidade do enxerto, é a manutenção da espessura alveolar ou mesmo elevação do seio maxilar, a utilização de substitutos ósseos é uma opção viável, desde que as limitações biológicas do material bem como indicações de uso sejam rigorosamente respeitadas.

## **5. Conclusões**

De acordo com a metodologia utilizada, pode ser concluído que os defeitos dos grupos controle e o grupo tratado foram completamente reparados.

O biomaterial bovino demonstrou biocompatibilidade e potencial osteocondutor.

A maior área de tecido mineralizado, no interior do defeito cirúrgico foi encontrado no grupo tratado com o biomaterial bovino.

## Referências

- BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: an experimental study in dog. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.8, p. 117-124, 1997.
- CARBONARI, M.; et al. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios – Parte 1. **Impl. News.**, v. 7, p. 103-110, 2010.
- CORDIOLI, G.; et al. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. **Clin. and histol. Find. Clin Oral Implants Res.**, v. 12, p. 270-278, 2001.
- HERCULANI, P. P.; et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Rev. Bras. Impl.**, v. 6, p. 7-14, 2000.
- JOSHI, A. An investigation of post-operative morbidity following chin graft surgery. **Br. Dent. J.**, v. 196, p. 215-218, 2004.
- MELO, L. G.; et al. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 16, p. 683-691, 2005.
- MENDES, S. M.; et al. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso desmineralizado ou por osso composto com sem proteína morfogenética do osso (BMP). Ver. **Odontol. Ata.**, v. 27, p. 34-40, 2006.

OLIVEIRA, R. C.; et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo do osso xenógeno. Ver. **Bras. Ortop.**, v. 38, p. 551-560, 2003.

OLIVEIRA, R. C.; et al. Efeito da temperatura da desproteínização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Rev. Fac. Odontol. Bauru.**, v. 7, p. 85-93, 1999.

PERRI DE CARVALHO, P. S.; BASSI, A .P. F.; PEREIRA, L. A. V. D. Review and proposal of nomenclature for biomaterials. **Impl. News.**, v. 1, p. 255-260, 2004.

RAGHOEBAR, G. M.; et al. Morbidity of chin bone harvesting. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 503-507, 2001.

SICCA, C. M.; et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev. Fac. Odontol. Bauru.**, v. 8, p. 1-10, 2000.

TAGA, R.; et al. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de Osseobon. **Rev. Bras. Impl.**, v. 3, p. 13-20, 2007.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science.**, v. 150, p. 893-899, 1965.

**ANEXO A - Figuras, tabelas e gráficos.**



Figura 1 – Tricotomia da região anterolateral das tíbias dos membros posteriores.



Figura 2 – Acesso cirúrgico à tibia.



Figura 3 – Preparo da cavidade por meio de trefina.

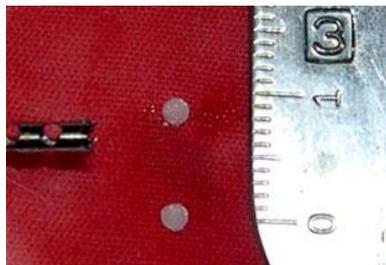


Figura 4 – Fragmentos ósseos obtidos



Figura 5 – Cavidade preenchida por enxerto autólogo particulado (Grupo OA)

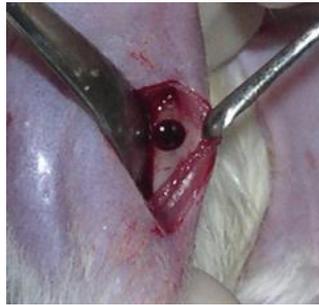


Figura 6 – Cavidade preenchida por coágulo (Grupo controle CS)



Figura 7 – Cavidade preenchida pelo biomaterial (Grupo BB)



Figura 8 – Sutura.

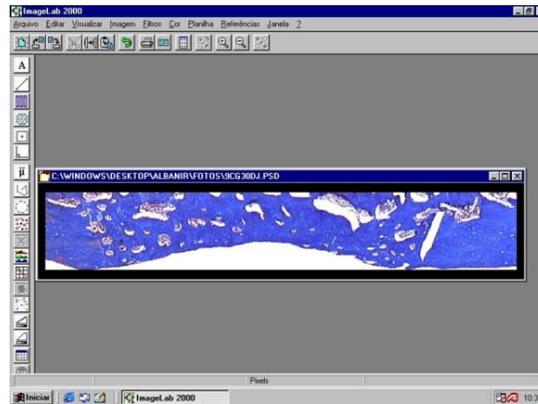


Figura 9 – Quadro de toda extensão do defeito cirúrgico

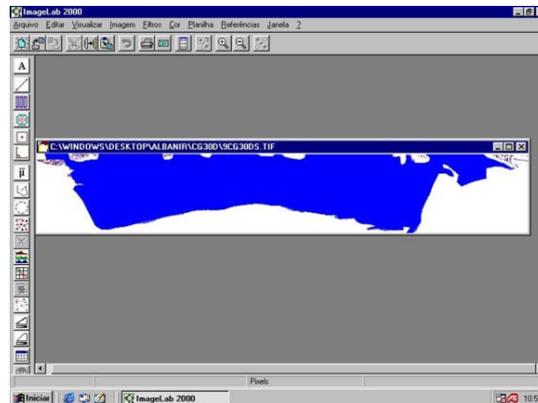


Figura 10 – Área total do defeito selecionada (TA)

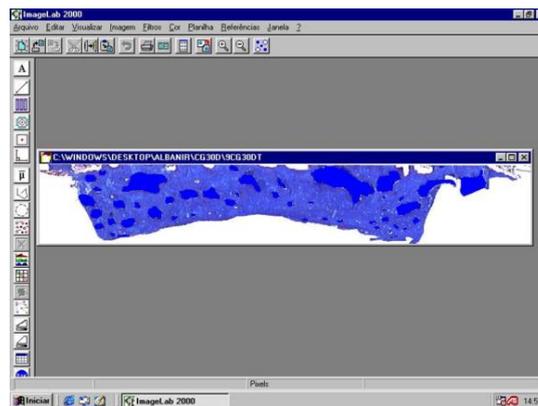


Figura 11 - Delimitação dos espaços trabeculares para cálculo da área de tecido mineralizado (AON).

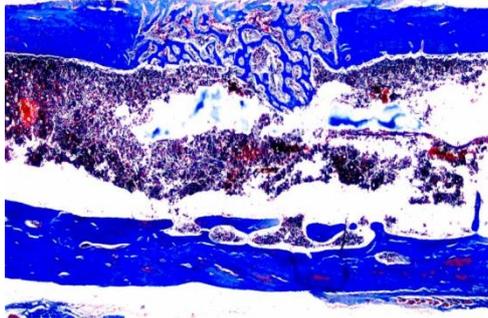


Figura 12 - CS 10 dias .Grupo Controle – coágulo sanguíneo. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X

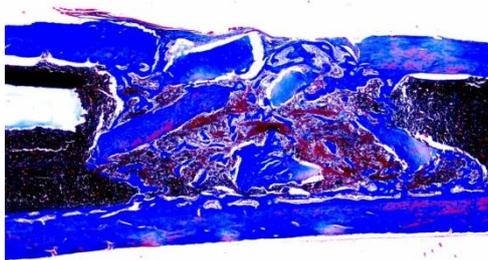


Figura 13 - OA 10 dias . Grupo Controle – enxerto autógeno particulado. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X

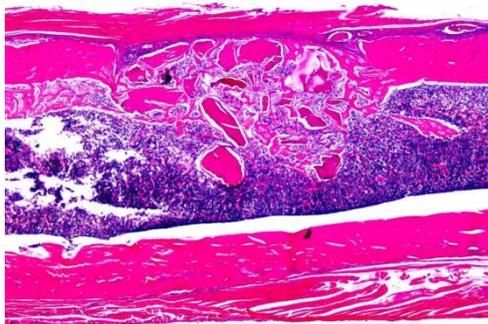


Figura 14 - BB 10 dias (Grupo tratado – biomaterial Bonefill®). HE. Aumento original 25X



Figura 15 - CS 30 dias . Grupo Controle – coágulo sanguíneo. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X

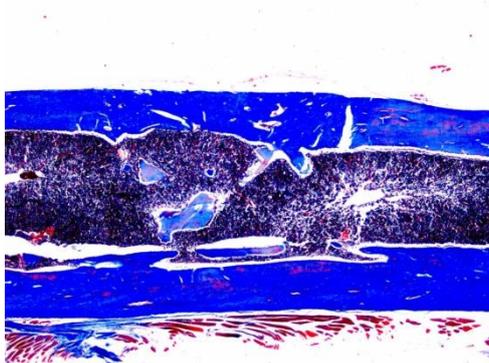


Figura 16 - OA 30 dias . Grupo Controle – enxerto autógeno particulado. Tricrômico de Masson. Aumento original 25X

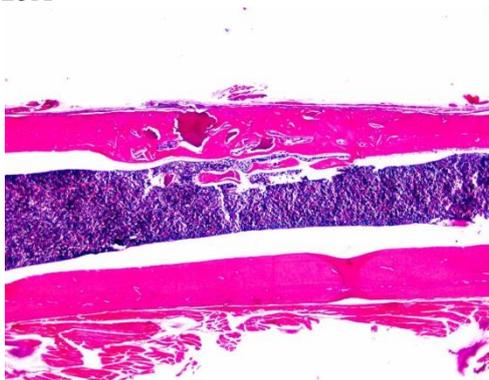


Figura 17 - BB 30 dias. Grupo tratado – biomaterial Bonefill® . HE. Aumento original 25X

Tabela 1 – Distribuição dos grupos estudados

CÓDIGO	GRUPO	TRATAMENTO	TEMPO DE SACRIFÍCIO	NÚMERO DE AMOSTRAS
CS	Controle	Coágulo	10 dias	10
CS	Controle	Coágulo	30 dias	10
AO	Controle	Enxerto autógeno	10 dias	10
AO	Controle	Enxerto autógeno	30 dias	10
BB	Tratado	Bonefill	10 dias	10
BB	Tratado	Bonefill	30 dias	10

Tabela 2 – Testes aplicados em análise estatística

Resultados 10 dias		(p) Kruskal-Wallis = < 0.0001			
H = 29.2790		R 1 =	389.0000		
Graus de liberdade = 2		R 2 =	491.0000		
		R 3 =	950.0000		
		R 1 (posto médio) =	19.4500		
		R 2 (posto médio) =	24.5500		
		R 3 (posto médio) =	47.5000		
Resultados 10 dias		Comparações (método de Dunn)			
Postos médios 1 e 2	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p	
	5.1000	0.9235	2.394	ns	
Postos médios 1 e 3	28.0500	5.0791	2.394	< 0.05	
Postos médios 2 e 3	22.9500	4.1556	2.394	< 0.05	
Resultados 30 dias		(p) Kruskal-Wallis = 0.0014			
H = 13.0843		R 1 =	457.0000		
Graus de liberdade = 2		R 2 =	537.0000		
		R 3 =	836.0000		
		R 1 (posto médio) =	22.8500		
		R 2 (posto médio) =	26.8500		
		R 3 (posto médio) =	41.8000		
Resultados 30 dias		Comparações (método de Dunn)			
Postos médios 1 e 2	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p	
	4.0000	0.7243	2.394	ns	
Postos médios 1 e 3	18.9500	3.4313	2.394	< 0.05	
Postos médios 2 e 3	14.9500	2.7070	2.394	< 0.05	

### Kruskal-Wallis - Diferença entre as Médias dos Postos

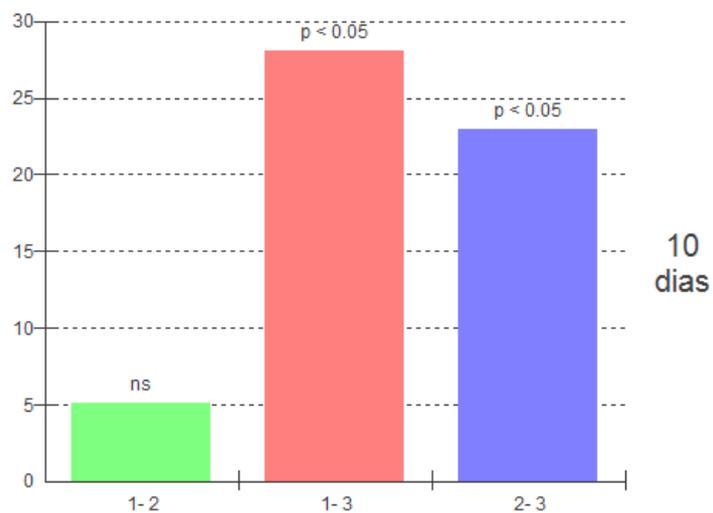


Gráfico 1 – Teste estatístico aos 10 dias

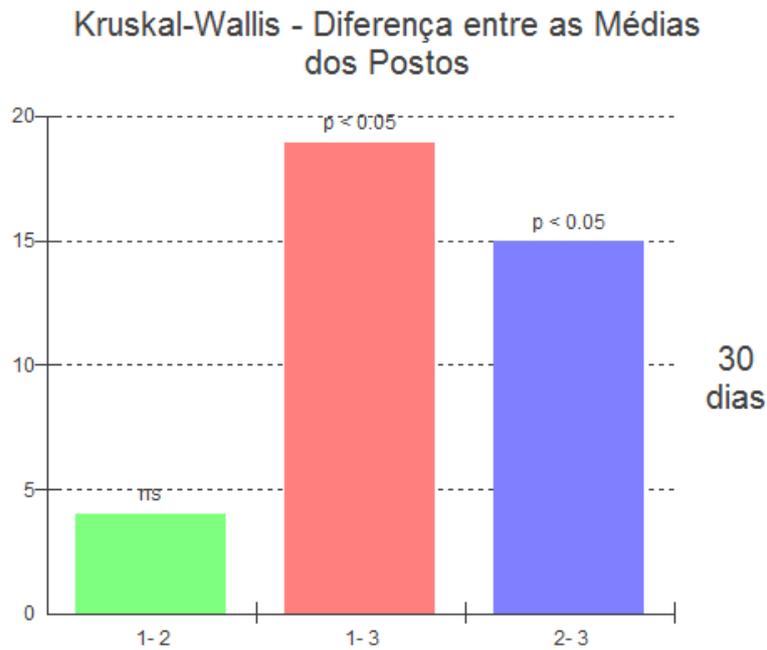


Gráfico 2 – Teste estatístico aos 30 dias

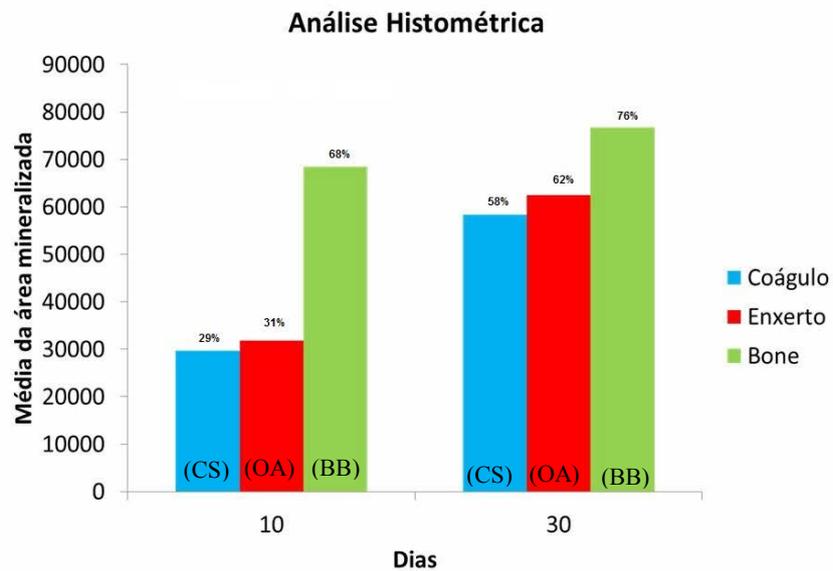


Gráfico 3 - Porcentagem da área mineralizada no interior dos defeitos cirúrgicos em cada um dos grupos.

**CS** = Coágulo de Sangue **OA** = Osso Autógeno **BB** = Biomaterial Bovino.

**ANEXO B - Certificado da Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal**



**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "*Análise histomorfométrica do processo de reparo de cavidades cirúrgicas preenchidas com osso inorgânico de origem bovina (Bonefill®) em tibia de ratos*", sob a responsabilidade de **DANIELA PONSONI** está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado em 09/02/2011, de acordo com o Protocolo FOA-6066/10.

Araçatuba, 09 de fevereiro de 2011.



**FABIANO ANTONIO CADIOLI**  
Vice-Presidente da CEUA

mfsr.