



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

**HELDO CESAR FIGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DE IMPLANTES ORIUNDOS DE OSSO EQUINO E BOVINO  
ASSOCIADOS OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM CAVIDADES  
MANDIBULARES: ESTUDO MICROSCÓPICO EM CÃES.**

**MARINGÁ**  
**2013**

**HELDO CESAR FIGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DE IMPLANTES ORIUNDOS DE OSSO EQUINO E BOVINO  
ASSOCIADOS OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM CAVIDADES  
MANDIBULARES: ESTUDO MICROSCÓPICO EM CÃES.**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada, orientada pelo Professor Dr. Edevaldo Tadeu Camarini e co-orientada pela Professora Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni.

**MARINGÁ**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

F475a Figueira Júnior, Heldo Cesar  
Avaliação de implantes oriundos de osso equino e bovino associados ou não ao plasma rico em plaquetas em cavidades mandibulares: estudo microscópico em cães / Heldo Cesar Figueira Júnior. -- Maringá, 2013.  
29 f. : il. color., figs.  
Orientador: Prof. Dr. Edevaldo Tadeu Camarini.  
Coorientadora: Prof.a Dr.a Jacqueline Nelisis Zanoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2013.  
1. Materiais biocompatíveis. 2. Transplante ósseo. 3. Transplante heterólogo. 4. Osso. I. Camarini, Edevaldo Tadeu, orient. II. Zanoni, Jacqueline Nelisis, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Integrada. IV. Título.

CDD 21.ed.617.605

ECSL-00984

**HELDO CESAR FIGUEIRA JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DE IMPLANTES ORIUNDOS DE OSSO EQUINO E BOVINO  
ASSOCIADOS OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM CAVIDADES  
MANDIBULARES: ESTUDO MICROSCÓPICO EM CÃES.**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora da  
Universidade Estadual de Maringá como requisito  
para obtenção do título de Mestre em Odontologia  
Integrada, orientada pelo Professor Dr. Edevaldo  
Tadeu Camarini e co-orientada pela Professora  
Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni.

Aprovada em:

---

**Profº Dr. José Roberto Pinto**

Universidade Estadual de Londrina

---

**Profº Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni**

Universidade Estadual de Maringá

---

**Profº Dr. Edevaldo Tadeu Camarini**

Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo apoio, amor, paciência e incentivo. Pelo exemplo de simplicidade, coragem, caráter, fé e persistência que tento seguir todos os dias, e levo para minha vida profissional.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus bons e velhos grandes amigos: **Edson Campos, Rafael Armando e Bruno Ceribelli**. Vocês estiveram comigo em inúmeros momentos, nos tristes, nos sofridos, nos felizes, nos ótimos, nos inacreditáveis, e vocês já sabem o resto. Saibam que se eu não estivesse com vocês os bons não seriam tão bons e os ruins teriam me consumido. A vocês a minha eterna gratidão e parceria.

À **Fairuzze Kassab Bonetti**, pela parceria inimaginável e pelo o amor imensurável.

Aos professores **Edevaldo Tadeu Camarini, José Roberto Pinto e Jacqueline Nelisis Zanoni**, pela participação ativa nesta pesquisa, pela orientação, pela paciência e disposição durante estes anos de desenvolvimento do trabalho.

Aos professores **Robson Ravel, Gustavo Jacobucci Farah, Halim Abil Russ, Eduardo Moreschi, Newton Kamei, Laurindo Furquim, Renato Zardetto, Murilo de Melo e Adílson Luiz Ramos**, vocês foram os maiores mestres que tive nestes quase 8 anos de odontologia. Vocês me abriram portas e confiaram no meu trabalho. Digo a vocês que os terei sempre como amigos, e não apenas colegas de profissão. Cada um de vocês é dono de uma parte das minhas conquistas. Espero poder um dia retribuir. Vossa motivação me trilhou até aqui e seu exemplo me faz ser um profissional cada dia melhor.

À minha irmã **Jéssica**, pela chatice diária, pelo carinho esporádico, por saber que ela sempre estará bem perto torcendo por mim assim como torço por ela.

Aos amigos **Leila e Antônio Bonetti, Renata Santiago, Cláudia Surita, André Shill, Marcia e Luiz Carlos Ferreira, João Fagan, Amanda Meger, Ana Carolina Barros, Marival Oliveira, Camila Nakashima, Érika Bander, Jordan Kassab e Nathália Abrão**, por se dedicarem também aos meus problemas, pela alegria que sinto com a nossa amizade, pelo respeito que têm por mim, por me tratarem como família, por dividirem minhas angústias e comemorações. Prezo pela felicidade ilimitada de vocês.

Aos **amigos e colegas de mestrado** que por muitas vezes me aturaram e riram das minhas besteiras.

Às minhas “instrutoras”: **Maria Eurides, Maria dos Anjos, Sara Gusman e Flávia**, que se dedicaram e me suportaram com sorriso no rosto e vontade de ajudar.

Aos **meus familiares** e a **todos** que me apoiaram, que torcem por mim, que me orientam, que me dão palavras de vitória, que oram por mim, que se dedicaram também a este trabalho, e aos que acreditam no meu trabalho, contem comigo. Sou eternamente grato.

Ao **Departamento de Odontologia, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, aos seus professores e funcionários**, em especial a **Sônia Maria Borean Borghi**, pelas inúmeras colheres de chá, pela paciência, e pela qualidade de conhecimento que vocês nos oferecem.

*“Se não for o SENHOR o construtor da casa,  
será inútil trabalhar na construção.  
Se não é o SENHOR que vigia a cidade, será inútil a  
sentinela montar guarda.  
Será inútil levantar cedo e dormir tarde,  
trabalhando arduamente por alimento.  
O SENHOR concede sustento aos seus amados  
enquanto dormem.” (Salmo 127:1-3)*



## RESUMO

A inserção maciça de biomateriais no mercado, embasada pela ampla pesquisa, nos oferece continuamente alternativas eficientes aos enxertos ósseos autógenos. Objetivando o restabelecimento da função e morfologia de áreas que antes comprometiam a fixação dos implantes dentários, a escolha do material a ser implantado requer critério. Bio-Gen®, material osteocondutor sem colágeno de origem óssea equina, e GenOx®, matriz bovina inorgânica, são exemplos de biomateriais que podem ser utilizados para reconstrução óssea. O uso de plasma rico em plaquetas (PRP) associado às diversas opções de enxertia é bem estabelecido na literatura, a grande porção de fatores de crescimento nele disponível acaba por induzir a diferenciação celular e controlar de forma positiva o processo de reparo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo usando os biomateriais GenOx e Bio-Gen conjugados ou não ao PRP, comparando os osteocondutores entre si e a inserção do PRP quantitativamente, qualitativamente e morfométricamente. Foram utilizados 6 cães fêmeas da raça *beagle*, pesando aproximadamente 10 Kg cada. Os cães foram submetidos à medicação pré-operatória e anestesia geral. Foram confeccionados 6 defeitos ósseos circulares com 4 mm de diâmetro em corpo de mandíbula, sendo 3 cavidades na hemimandíbula direita e outras 3 na porção esquerda. Cada cavidade em ambos os lados foi preenchida com os diferentes materiais: Bio-Gen, controle (coágulo), e GenOx isoladamente. Do lado esquerdo da mandíbula as mesmas cavidades sofreram ainda adição de PRP do próprio animal. Nos intervalos de 30, 60 e 90 dias foram coletadas duas amostras de todos os grupos, o material foi submetido à descalcificação e posteriormente a rotina histológica. Utilizando microscopia óptica, três análises foram realizadas: Análise quantitativa de osteoblastos e osteócitos por campo com objetiva de 40x; Análise qualitativa por meio da observação do processo de reparo que se encontrava o tecido ósseo coletado com magnificação de 20x; Análise morfométrica por meio da mensuração das áreas de tecido ósseo primário e secundário em *software*, em aumento de 4x. Os dados foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA seguido do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os grupos GenOx e Bio-Gen+PRP apresentaram a maior contagem de osteócitos em 90 dias, sugerindo maturidade óssea. Com a análise qualitativa das lâminas, observou-se maior quantidade de osso maduro no grupo Bio-Gen+PRP quando comparado aos demais, o grupo de Bio-Gen isolado apresentou índices próximos com pouca quantidade de osso primário em 90 dias. Os grupos com a adição de PRP demonstraram osso secundário já nos cortes de 30 dias. Na análise morfométrica observou-se que Bio-Gen e Bio-Gen+PRP apresentavam maiores áreas de osso maduro em todos os períodos analisados. O grupo Bio-Gen+PRP foi superior aos demais, e demonstrou diferença estatística com todos os grupos. O osso equino demonstrou os melhores resultados quanto à formação de osso maduro, sua eficácia foi superior quando combinado ao PRP. Todos os biomateriais apresentaram superioridade ao grupo controle.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis; Transplante ósseo; Transplante heterólogo; Osso.

## ABSTRACT

The massive commercial insertion of biomaterials, grounded by extensive research, offers an efficient alternative to autogenous bone grafts. Aiming to restore function and morphology of areas that compromise dental implants fixing, the choice of material to be implanted requires criterion. Bio-Gen®, osteoconductive material without bone collagen from equine origin, and GenOx®, bovine inorganic matrix, are examples of biomaterials which can be used for bone reconstruction. The use of platelet rich plasma (PRP) associated with the options of grafting is well established in the literature, the large portion of growth factors leads to cell differentiation and a positive repair process. The purpose of this study was to evaluate the bone repair process using the biomaterials GenOx and Bio-Gen conjugated or not to PRP, comparing the osteoconductive materials each other and the insertion of PRP quantitatively, qualitatively and morphometrically. Six female beagle dogs were used weighing approximately 10 kg each. The dogs were submitted to preoperative medication and general anesthesia. Six circular bone defects with 4 mm of diameter were made in body of mandible, 3 on right hemimandible and 3 on the left side. Each cavity on both sides was filled with different materials: Bio-Gen, control (clot), and GenOx. On the jaw's left side the same materials suffered addition of PRP from the own animal. At intervals of 30, 60 and 90 days were collected two samples of all groups, the material was subjected to decalcification and to histological examination. Using optical microscopy, three analyzes were performed: Quantitative analysis of osteoblasts and osteocytes by field of view with a 40x objective lens; Qualitative analysis by observing the bone repair process in the collected tissue with 20x magnification; Morphometric analysis by measuring the areas of primary and secondary bone tissue in a software, in a 4x increase. Data were statistically analyzed using ANOVA followed by Tukey's test at a significance level of 5%. The groups GenOx and Bio-Gen + PRP had the highest count of osteocytes in 90 days, suggesting bone maturity. By the qualitative analysis, was observed a higher number of mature bone in the group Bio-Gen + PRP compared to the others, the group of Bio-Gen isolated had similar rates with a small amount of primary bone in 90 days. The groups with addition of PRP demonstrated secondary bone in the 30 days cuts. The morphometric analysis shows that Bio-Gen and Bio-Gen + PRP have had larger areas of mature bone in all analyzed periods. The group Bio-Gen + PRP was superior to the others, and showed statistical difference between all groups. The equine bone showed the best results by the formation of mature bone, his effectiveness was greater when combined with PRP. All biomaterials demonstrate superiority to the control group.

Key-Words: Biocompatible materials; Bone transplantation; Heterologous transplantation; Bone.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	11
Obtenção do PRP.....	12
Procedimento Cirúrgico.....	12
Processamento Histológico.....	14
Análise Microscópica.....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	17
Análise Quantitativa.....	17
Análise Qualitativa.....	19
Análise Morfométrica .....	21
<b>DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>CONCLUSÕES</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>ANEXOS</b> .....	29
ANEXO A.....	29

## INTRODUÇÃO

A procura por materiais biocompatíveis visando o restabelecimento de tecidos perdidos ou comprometidos, tem aumentado de forma positiva o aparecimento de novas opções e o incentivo à pesquisa. Não somente na odontologia, mas se tratando de tecido ósseo, especialidades médicas e veterinárias podem vir a se beneficiar com o frequente progresso dos biomateriais.

A utilização de tecido ósseo autógeno, do próprio indivíduo, é considerada primeira escolha na reconstrução de defeitos ósseos. Sua aplicação se faz dificultada pela necessidade de um segundo leito cirúrgico, a morbidade não desejada pelo paciente, e pela disposição de materiais conceituados como substitutos ósseos.<sup>1</sup>

Biomateriais são substâncias, de origem natural ou sintética, utilizadas com o intuito de alterar, interagindo com tecido vivo, um dado procedimento ou diagnóstico. Podem ser utilizados isoladamente ou associados a outros materiais. Restabelecem função, formato ou quantidade no tecido implantado.<sup>2,3</sup>

Tecidos ósseos de origem heterógena ou ainda implantes aloplásticos são biomateriais de ampla comercialização e aplicação clínica. Aqueles designados heterógenos são obtidos de espécies diferentes do receptor, sendo um exemplo o osso bovino. Os implantes aloplásticos têm origem sintética, utilizados para preenchimento de defeitos ósseos.<sup>3,4</sup>

Implante é o termo que designa um dispositivo formado por biomaterial, ausente de matéria orgânica, que venha a ser colocado em ser vivo.<sup>3</sup>

Como opção de biomaterial heterógeno recentemente descrito, o Bio-Gen® (Bioteck, Arcugnano, Itália) é um tecido ósseo sem colágeno, hidrofílico, não antigênico, de origem equina, capaz de completa remodelação e reabsorção. Produzido por meio de processos enzimáticos de baixa temperatura, o produto mantém matriz óssea sem modificação a nível estrutural durante a eliminação da matéria orgânica. Dada a substituição da calcinação no processamento de Bio-Gen, comumente observada em biomateriais de origem bovina, preserva-se as propriedades biológicas do osso, conferindo alta capacidade osteogênica.<sup>5</sup>

Sendo um biomaterial de ampla utilização, o GenOx® (Genius, Baumer S.A., Mogi-Mirim, Brasil) é oriundo de matriz inorgânica de osso bovino esponjoso, de estrutura similar ao osso humano. A remodelação ocorre de forma fisiológica quando se usa osso bovino inorgânico em humanos, sugerindo biocompatibilidade<sup>6</sup>. Conforme o fabricante, sua lenta reabsorção e carga inorgânica preservam o volume ósseo e a arquitetura das paredes quando inseridos em alvéolo.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido do processamento de sangue coletado. Por possuir demasiada quantidade de fatores de crescimento, sabe-se que a adição sobre um biomaterial a ser implantado, resulta no aumento da densidade óssea da região, na aceleração da formação e no crescimento ósseo. A presença do PRP modula a atividade celular no local implantado, facilitando a cicatrização tecidual, reduzindo o sangramento e o edema.<sup>7,8</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente, qualitativamente e morfométricamente o processo de reparo ósseo, utilizando os biomateriais GenOx Inorg® e Bio-Gen Mix® conjugados ou não ao PRP, comparando-os entre si e entre os grupos controle preenchidos por coágulo e coágulo + PRP. Também visa aferir a eficácia do recente material Bio-Gen, pouco difundido na literatura e com proposta, dado o processamento para obtenção, de ser superior aos implantes de tecidos que vêm sendo utilizados.

## MATERIAIS E MÉTODO

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o protocolo n° 026/2010.

Foram utilizados 6 cães fêmeas da raça *Beagle* com aproximadamente dois anos de idade e pesando cerca de 10 Kg. Os animais ficaram em jejum alimentar de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico e foram pré-medicados com Diazepam® 0,5mg/kg associado a Fentanil® 5 µg/kg. A indução foi realizada com propofol na dose de 4mg/kg complementado com Fentanil 5-10 µg/kg. A manutenção foi realizada com isofluorano, fluxo de oxigênio em 1 litro/kg/hora e bloqueio local com 2 tubetes de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000. Executou-se o monitoramento não invasivo da pressão arterial por meio

de *doppler* vascular, assim como da frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar, temperatura (°C), aspecto de mucosas e pulso.

Com os cães sedados foi realizada a antisepsia intra e extra bucal utilizando solução de clorexidina 0,2% e 2%, respectivamente.

### **Obtenção do PRP**

Para a confecção do PRP foram retirados 20 ml de sangue venoso, facilitada pela sedação e monitoramento para procedimento cirúrgico. Utilizando o citrato de sódico 10% como anticoagulante, o recipiente contendo sangue foi homogeneizado e colocado em centrífuga por 10 minutos a 1200 rotações por minuto (SIN-1200, SIN Sistema de Implante Nacional Ltda., São Paulo, Brasil). Com a separação do plasma e células vermelhas, realizou-se nova centrifugação para diferenciar o plasma rico em plaquetas do plasma pobre em plaquetas (PPP), dado pela heterogeneidade das porções.

Com o real PRP separado do PPP, iniciou-se a geleificação através da adição de trombina, gluconato de cálcio e ar. Assim o material pôde ser manipulado para a inserção no sítio a ser enxertado durante a implantação dos biomateriais.

### **Procedimento Cirúrgico**

Iniciou-se com incisão e descolamento mucoperiosteal para confecção de 6 cavidades com broca trefina, em abundante irrigação, de 4mm de diâmetro e 5mm de profundidade, sendo 3 em cada lado do corpo mandíbula, inferior às raízes dos dentes (Figura 1). As cavidades foram organizadas em grupos e preenchidas por Bio-Gen Mix (BGM-05); Coágulo; GenOx Inorg, para ambos os lados. Na hemimandíbula esquerda foi adicionado o plasma rico em plaquetas (PRP) sobre os implantes, diferente do lado direito, colhido do próprio cão (Figura 2). Para melhor disposição, siglas foram criadas para cada grupo, sendo: Coágulo (C), Coágulo + PRP (CP), GenOx (G), GenOx + PRP (GP), Bio-Gen (B) e Bio-Gen + PRP (BP). Todos os 6 cães possuíam a mesma conformação de distribuição cirúrgica dos materiais (6 cavidades/cão), porém houve diferença no prazo para coleta do material, sendo 2 amostras a cada 30, 60 e 90 dias. Realizou-se sutura com fio 4-0 de ácido poliglicólico, violeta, sintético, trançado, bioabsorvível (Figura 3).

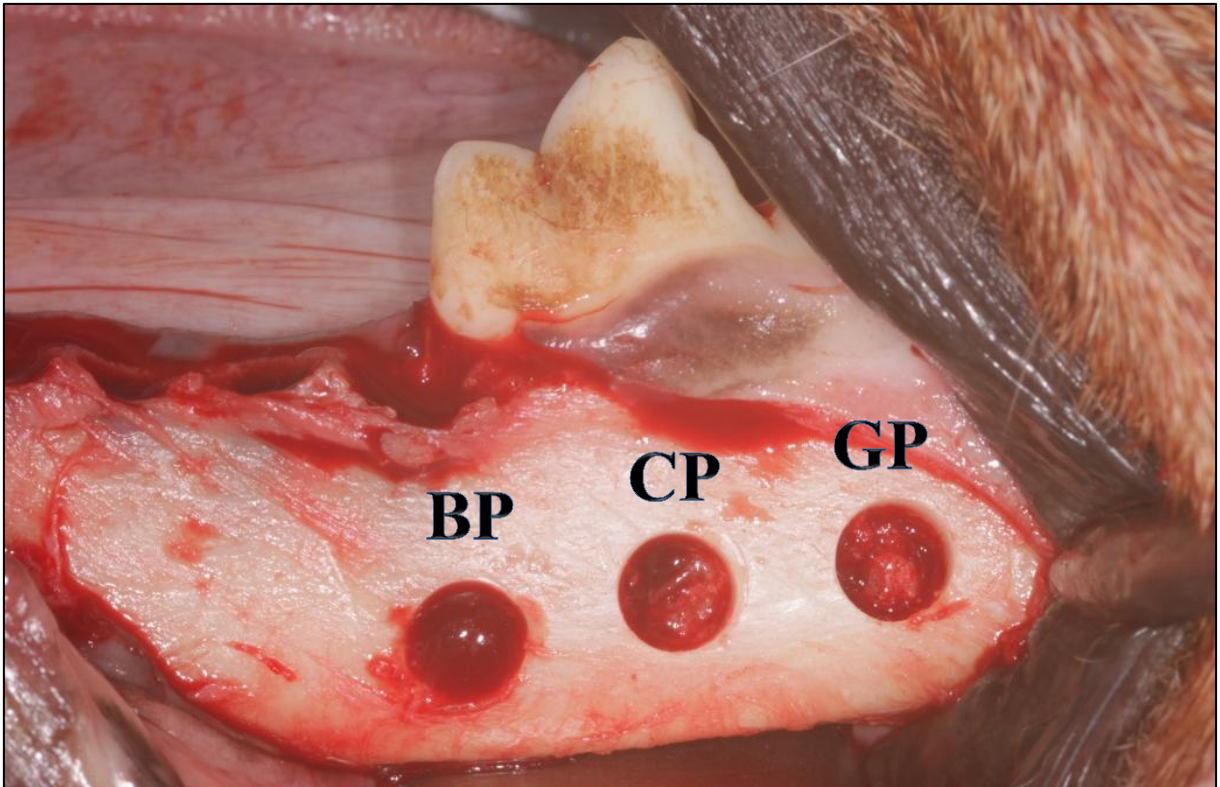


Figura 1 - Perfurações confeccionadas em corpo de mandíbula, hemimandíbula esquerda (GP: Cavidade a ser preenchida por GenOx+PRP; CP: Cavidade a ser preenchida por coágulo+PRP; BP: Cavidade a ser preenchida por Bio-Gen+PRP)

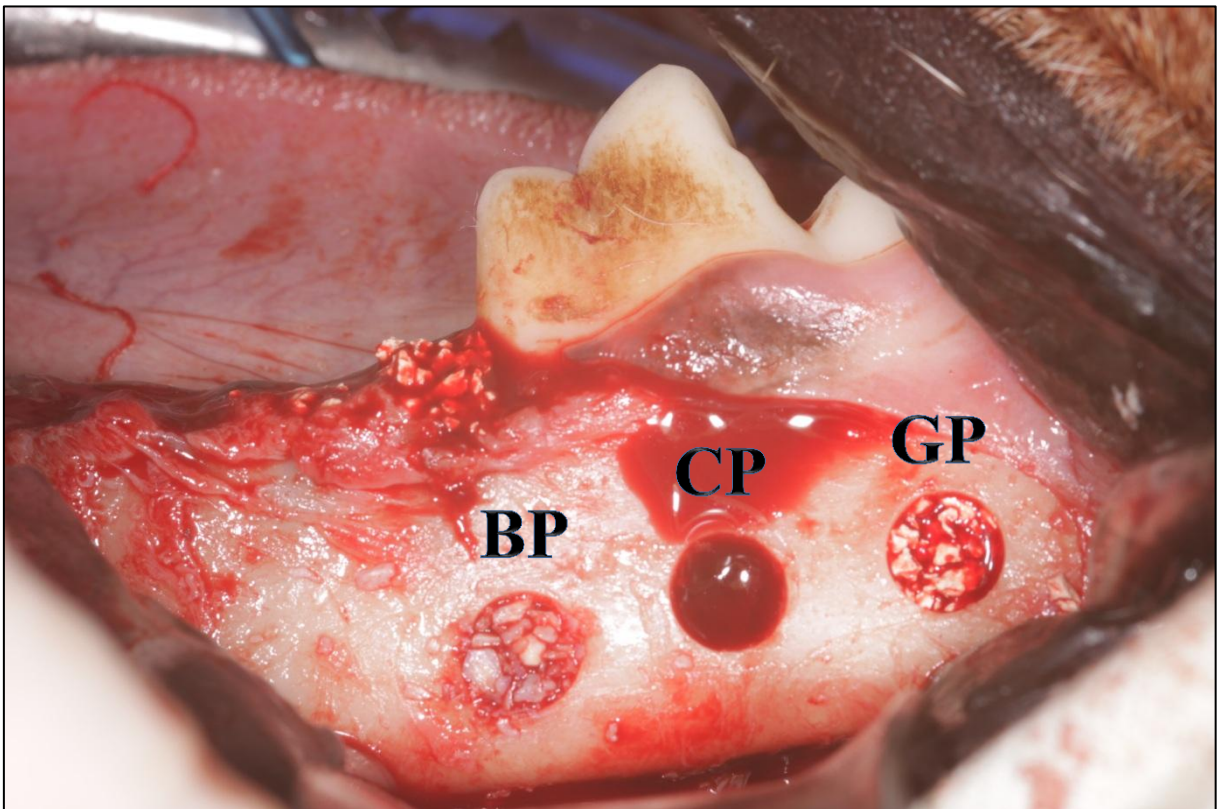


Figura 2 - Preenchimento das cavidades em hemimandíbula esquerda (GP: Cavidade preenchida por GenOx+PRP; CP: Cavidade preenchida por coágulo+PRP; BP: Cavidade preenchida por Bio-Gen+PRP)



Figura 3 – Sutura

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam injeção subcutânea de Tramadol® 2mg/kg e Meloxicam® 15mg em dose de 0,2mg/kg. Além disso, também foi administrado 0,2mg/Kg de Meloxicam por 3 dias e Cefotiofur sódico (Topcef®, PEARSON - Eurofarma, São Paulo, Brasil) 0,1ml/kg por 7 dias por via subcutânea. Os animais foram colocados nos canis em duplas onde receberam a dieta pastosa por 7 dias.

Durante o período do experimento os animais receberam água *ad libitum*, e após a primeira semana foram alimentados com ração canina industrializada convencional.

Após 30, 60 e 90 dias, conforme divisão dos grupos, os animais foram submetidos à eutanásia com tiopental 25mg/kg, Fentanil 3 µg/kg e cloreto de potássio 19,1% em dose de 20 ml por animal. As peças foram então removidas para processamento histológico.

### **Processamento Histológico**

As amostras obtidas foram fixadas em solução de *Bouin* por 48 horas e lavadas por imersão em álcool 70% até remoção total do fixador. A descalcificação foi realizada com mistura de ácido fórmico 20%, citrato de sódio 50% e completados com água destilada.



Os recipientes receberam nova solução do descalcificador semanalmente até se completar o processo (Figura 4).



Figura 4 – Amostra em descalcificador

Após descalcificadas, as amostras foram lavadas em água corrente por 5 horas e submersas em sequência de álcoois para desidratação.

Dado por completo o processo de desidratação as peças foram emblocadas em parafina. Os blocos foram hidratados em água por 12 horas para serem cortados e as lâminas aplicadas adesivo de Haupt com 7 dias de antecedência. Os cortes das peças foram realizados em micrótomo Leica RM2245 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), com espessura de  $6\mu\text{m}$ , pescados individualmente em cuba de água aquecida, e montados nas lâminas através de protocolo semi-seriado de 6 cortes, sendo 5 lâminas por amostra. Os 1.080 cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) (Figura 5). Todos os grupos foram submetidos à análise do processo do reparo ósseo em microscópio óptico Motic BA400 (Motic, Xiamen, China), capturados por câmera Moticam 2500 5.0 megapixels (Motic, Xiamen, China).



Figura 5 – Lâminas com 6 cortes montadas e coradas

### **Análise Microscópica**

Por meio de microscopia óptica, as cavidades submetidas aos implantes foram divididas em 40 campos por grupo, analisados em aumento de 40x, sendo a área de 0,89 mm<sup>2</sup>/campo. Foram contados osteoblastos aderidos e osteócitos presentes em lacunas no tecido ósseo neoformado para análise quantitativa. Qualitativamente, a disposição dos tecidos no sítio implantado assim como a regularidade e quantidade de osso foram comparadas. As imagens observadas foram obtidas em magnificações de 20x, em resolução de 1024x768 pixels, formato TIFF (*Tagged Image File Format*), através do *software* Motic Images Plus 2.0 ML (Motic, China Group Co Ltd, 1999-2006, Xiamen, China).

Para a análise morfométrica utilizou-se o *software* Image-Pro Plus Versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc, 1993-2001, Rockville, MD, EUA), a fim de mensurar as áreas (em µm<sup>2</sup>) de osso primário e secundário encontrados nos sítios submetidos aos implantes. Foram

capturados 20 cortes por grupo totalizando 360 fotomicrografias, com calibração padronizada e magnificação de 4x, selecionando a área implantada total.

As análises, assim como o processo de montagem das lâminas, foram realizadas por um único operador, as marcações dos grupos foram tapadas a fim de que não houvesse influência na contagem por se conhecer o conteúdo dos grupos.

Utilizando o *software* GraphPad Prism Versão 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) realizou-se a análise estatística de variância *one-way* ANOVA, seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5%, para a morfometria e análise quantitativa de osteócitos e osteoblastos.

## RESULTADOS

### Análise Quantitativa

Com a obtenção dos resultados estatísticos comparou-se, em unidades/campo, as médias de osteoblastos e osteócitos presentes nos grupos C, CP, G, GP, B e BP, num prazo de 30, 60 e 90 dias de reparo (Figura 6).

Para as peças coletadas com 30 dias, observou-se contagem superior tanto para osteoblastos quanto para osteócitos em todos os grupos analisados quando comparados ao grupo C (controle), sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo GP em ambas as células. Maior quantidade celular se deu no grupo GP, apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos osteoblastos dos grupos BP e C.

Com 60 dias de implantação dos biomateriais houve maior proximidade no número de osteócitos em todos os grupos. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) apenas quando comparados os osteoblastos do grupo GP com os grupos C, CP, G e B. Dentre os grupos avaliados em 90 dias, BP e G apresentaram maiores índices de osteócitos, com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos demais grupos. O grupo G ainda apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com todos os grupos quando comparadas as quantidades de osteoblastos. Nas análises de 90 dias visualizou-se contagem superior de osteócitos em lacunas quando comparadas aos anteriores, sugerindo progressão na maturação óssea (Figura 7).

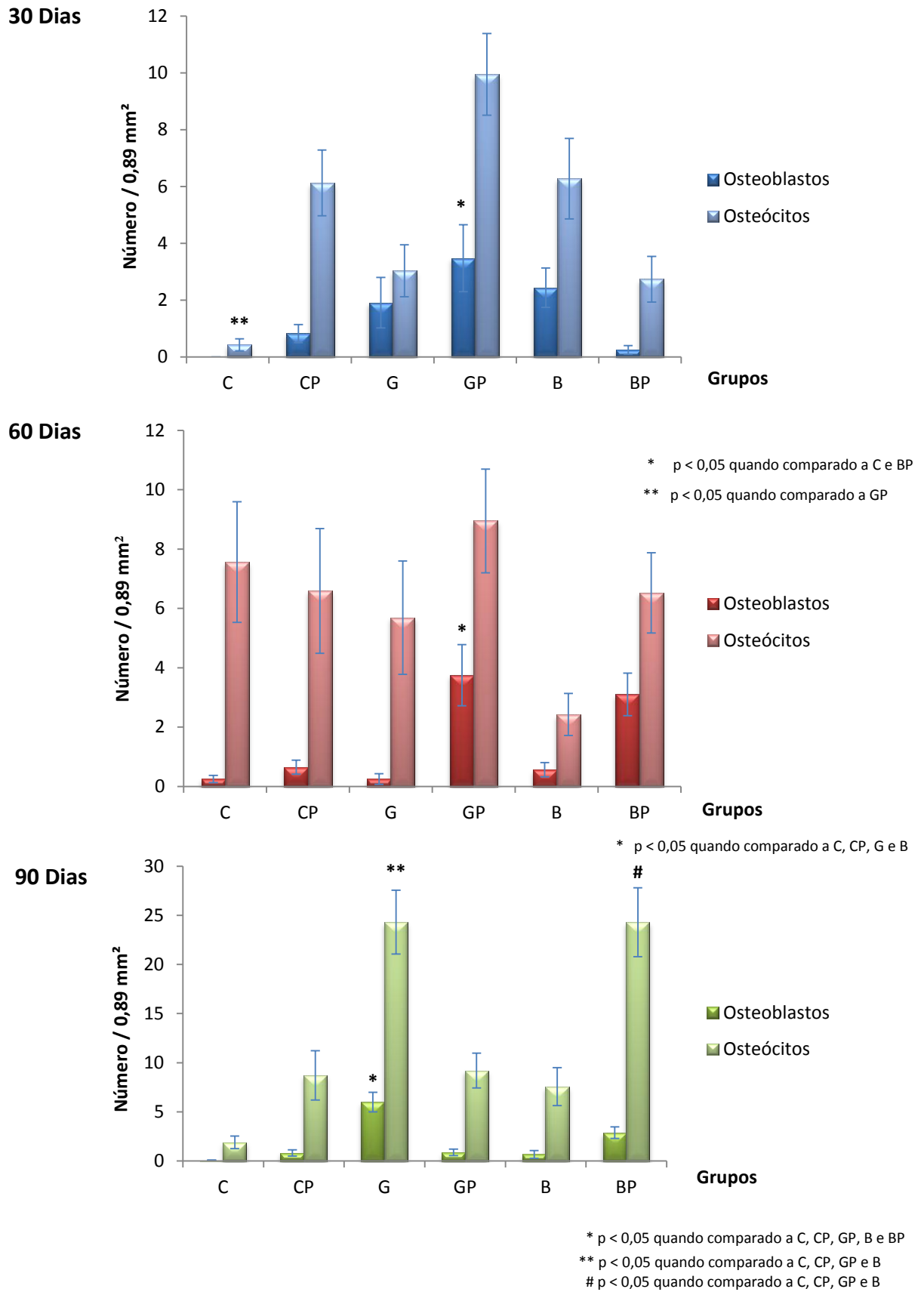


Figura 6 – Análise quantitativa de osteoblastos e osteócitos. Dados cruzados entre os grupos em 30, 60 e 90 dias (C: coágulo, CP: coágulo+PRP, G: GenOx, GP: GenOx+PRP, B: Bio-Gen, BP: Bio-Gen+PRP), representados por média, erro padrão e diferença estatística.

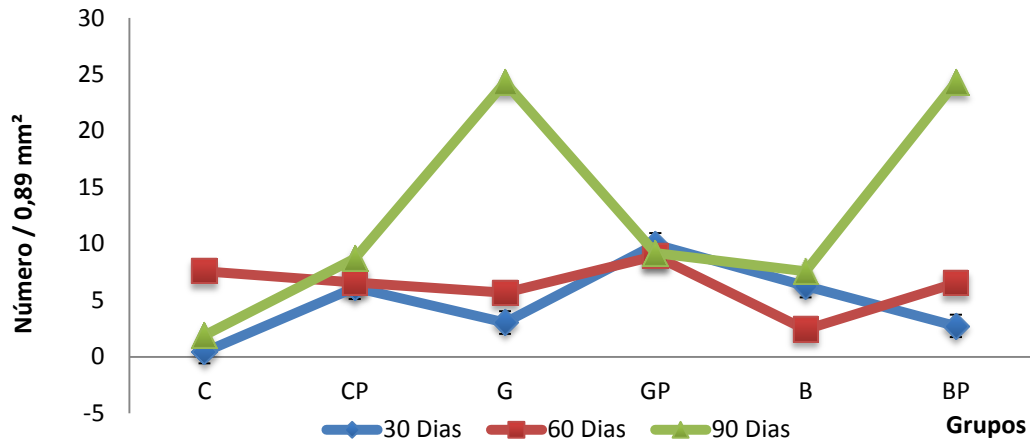


Figura 7 – Comparativo da quantidade de osteócitos por campo, através das médias, em 30, 60 e 90 dias. Dados cruzados entre os grupos (C: coágulo, CP: coágulo+PRP, G: GenOx, GP: GenOx+PRP, B: Bio-Gen, BP: Bio-Gen+PRP).

### Análise Qualitativa

Para os grupos de 30 dias a maior parte do tecido ósseo foi representada por osso primário, com osteócitos e osteoblastos em meio a matriz abundante de osso imaturo. Os osteoblastos aderidos e bem organizados foram contados assim como os osteócitos presentes em lacunas quando osso maduro se fazia presente. Foi observada a interface entre sítio implantado e osso do cão com facilidade nesses grupos. As amostras que continham o PRP apresentavam prematuramente zonas de tecido secundário (maduro) próximos às interfaces, diferente daquelas com os biomateriais e grupo controle isolados (Figura 8). Por meio da captura das lâminas, observou-se que para 30 dias o grupo BP apresentou maior quantidade de osso secundário quando comparado aos demais grupos.

Com exceção do grupo CP, todos os grupos possuíam osso secundário com 60 dias de reparo. A faixa de transição entre tecido implantado e osso do cão se fazia menos evidente. Centros de ossificação primários e grande quantidade de vasos sanguíneos foram observados em G e B. Um recém-formado osso secundário foi amplamente observado em GP e BP, onde células eosinófilas com núcleo não evidente percorriam o interior do osso imaturo.

Analisando as fotomicrografias de 90 dias, observou-se que os grupos CP, G e GP possuíam níveis de maturação semelhantes, com osso secundário em sua maioria e pouco tecido ósseo primário. Os implantes dos grupos B e BP apresentaram maior quantidade de tecido maduro que os demais grupos, com tecido primário praticamente inexistente em alguns cortes. O grupo controle ainda apresentava extensa faixa de osso primário e pouco osso secundário que se diferenciava dos bordos para o centro.

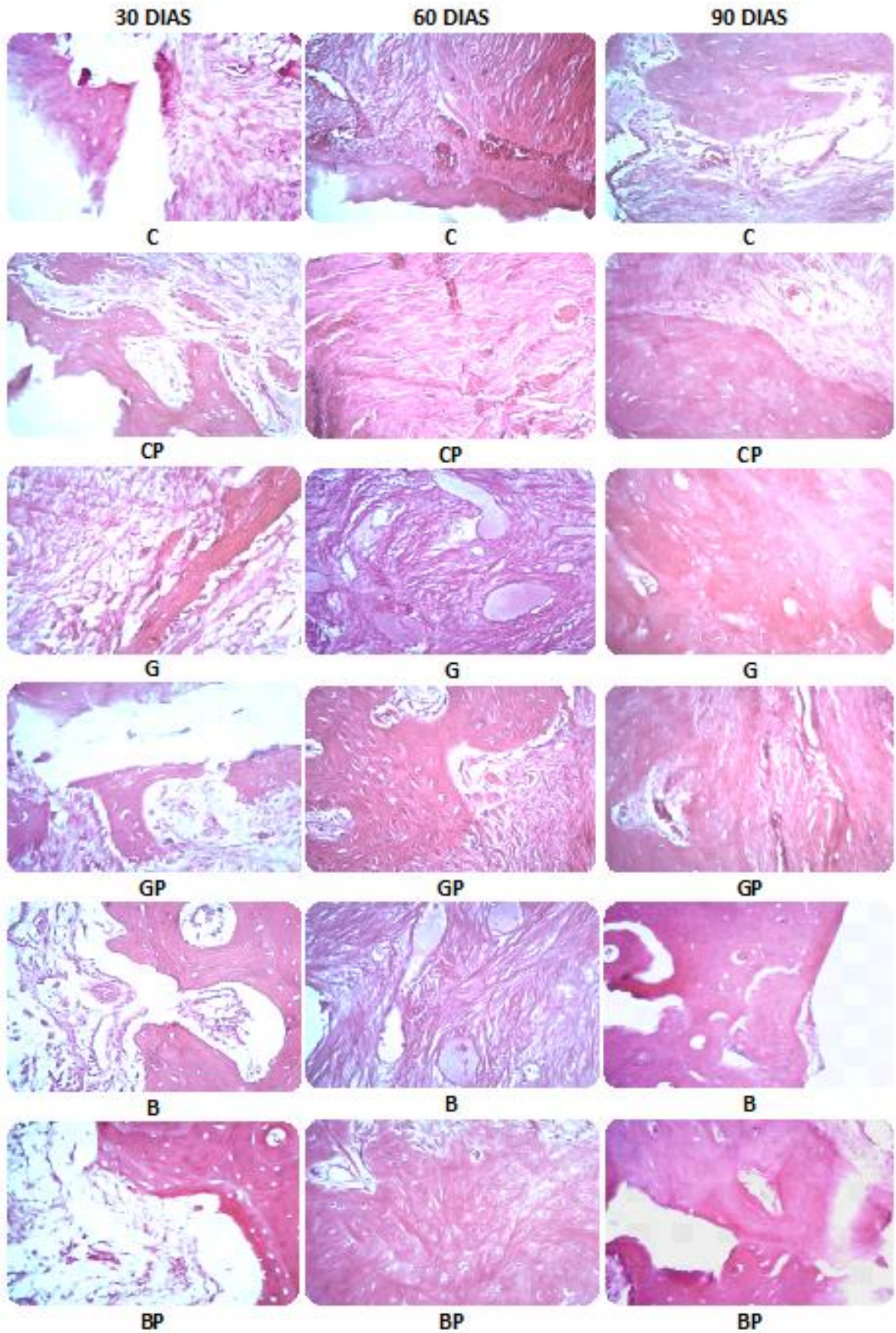


Figura 8 – Fotomicrografias ópticas em objetiva de 20x dos grupos (C: coágulo, CP: coágulo+PRP, G: GenOx, GP: GenOx+PRP, B: Bio-Gen, BP: Bio-Gen+PRP) em 30, 60 e 90 dias.

## **Análise Morfométrica**

A Figura 9 possibilita a comparação dos grupos entre 30, 60 e 90 dias por meio das médias das áreas de osso primário e secundário. Para melhor compreensão e expressão dos dados, converteu-se a unidade aferida  $\mu\text{m}^2$  para  $\text{mm}^2$ .

Na análise de 30 dias observou-se maior presença de osso primário quando comparado ao osso maduro, sendo que GP demonstrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para C, CP, G e BP, assim como BP para C. Os Grupos B e BP foram os responsáveis pelos maiores valores de osso secundário, e apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados a C, CP e G.

De forma geral, com 60 dias, todos os grupos apresentaram aumento de área óssea tanto para osso primário quanto para secundário. Os grupos B e BP demonstraram maturidade óssea superior aos outros grupos, tendo o grupo B diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com os grupos C, CP, G e GP, e o grupo BP com os grupos CP, G e GP. Com exceção do grupo controle todos os grupos obtiveram altas áreas de osso primário.

Com 90 dias após a cirurgia observou-se que os grupos B e BP apresentavam superioridade quando comparados aos demais grupos em área de osso secundário. O grupo B apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com os grupos C, CP G, estes com amostras inferiores ao grupo B. O grupo BP não demonstrou porções de osso primário, obtendo os maiores valores de tecido ósseo maduro com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre todos os demais grupos. Na análise do grupo C observou-se grande quantidade de osso primário, o que não foi observado nos demais grupos, porém sem diferença estatística.

Os sítios onde foram implantados B e BP foram os responsáveis pelas maiores áreas de osso maduro indiferente do prazo de coleta do material (Figura 10).

Tanto os implantes com PRP quanto o grupo controle e os biomateriais isolados, com exceção dos grupos B e BP, mantiveram suas proporções próximas dentre todos os períodos.

Não foram observadas células inflamatórias nos cortes analisados, independentemente do grupo.

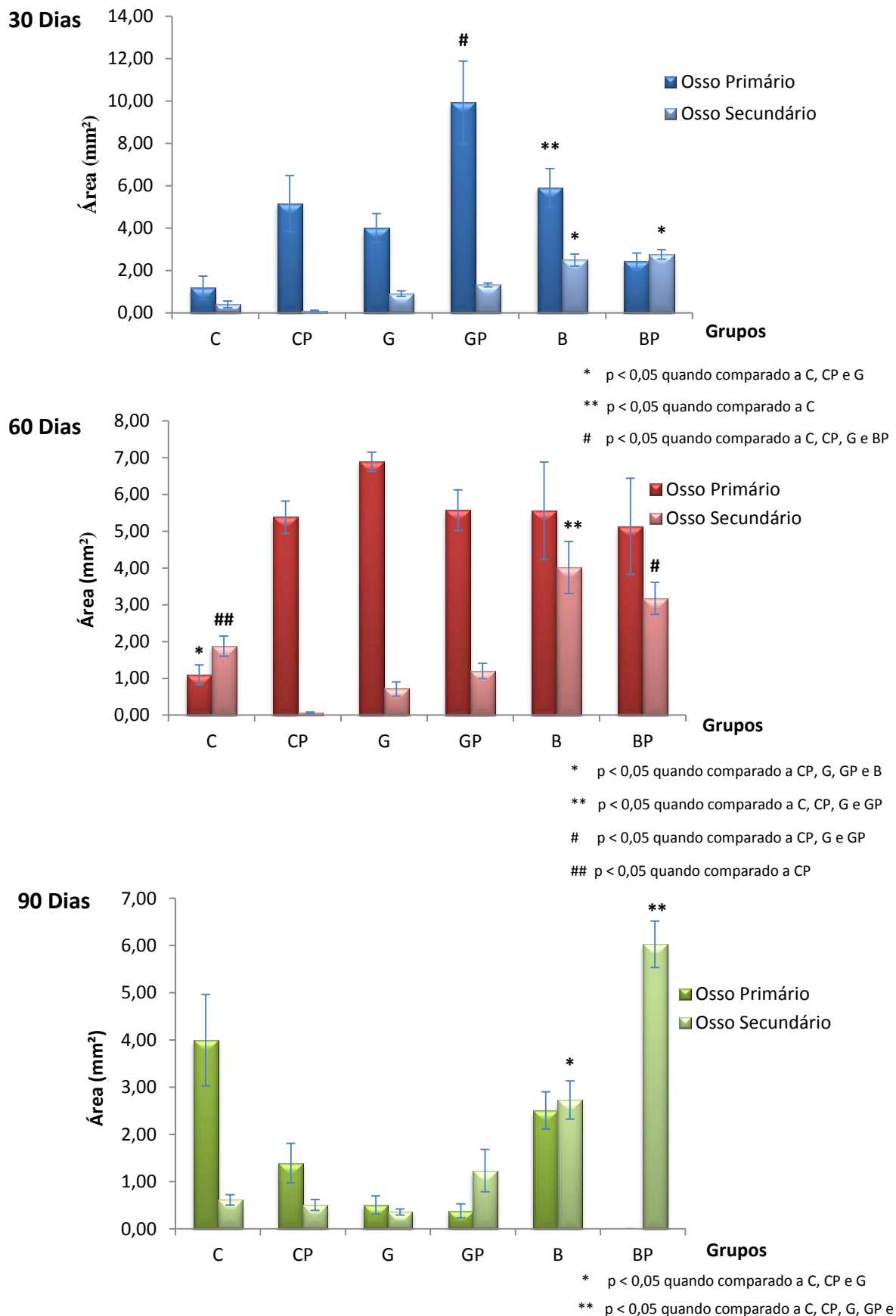


Figura 9 – Análise morfométrica. Dados cruzados entre os grupos em 30, 60 e 90 dias (C: coágulo, CP: coágulo+PRP, G: GenOx, GP: GenOx+PRP, B: Bio-Gen, BP: Bio-Gen+PRP), representados por média, erro padrão e diferenças estatísticas.



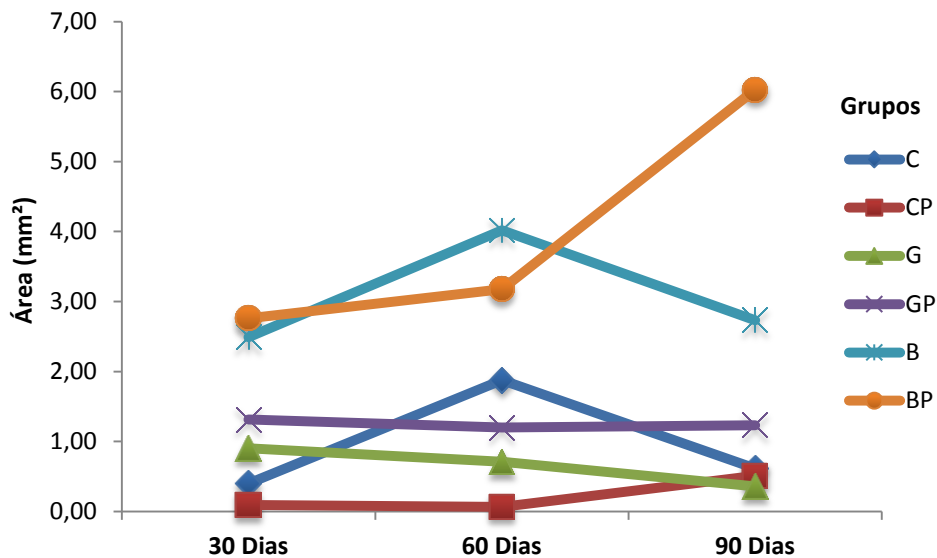


Figura 10 – Análise morfométrica. Presença de tecido ósseo secundário. Médias dos grupos em 30, 60 e 90 dias (C: coágulo, CP: coágulo+PRP, G: GenOx, GP: GenOx+PRP, B: Bio-Gen, BP: Bio-Gen+PRP).

## DISCUSSÃO

Os biomateriais escolhidos para obtenção deste trabalho, Bio-Gen e GenOx, cumprem os requisitos para indicações como substitutos ósseos, apresentando compatibilidade fisiológica, composição física e química semelhante ao osso implantado, fornecendo arcabouço para a formação óssea, são osteocondutores, porosos, não patogênicos, de fácil inserção e manipulação.<sup>9</sup>

Tecidos ósseos primários, imaturos, são sintetizados por osteoblastos jovens por meio da deposição de matriz de forma aleatória e irregular. Trabéculas irregulares, tecido conjuntivo, coágulos e tecido de granulação podem ser observados neste osso recém-formado, cujo principal função é o preenchimento rápido da região a ser reparada. Gradativamente o osso primário é substituído por osso secundário, osso este maduro e responsável por resistir aos estímulos mecânicos dependentes da área onde exercerá função.<sup>10</sup>

O osso equino disposto nos grupos B e BP apresentou maior área de tecido ósseo maduro em todos os períodos analisados quando comparados ao implante de osso bovino, ao controle ou à adição do PRP aos demais locais. Os dados corroboram com os resultados de De Oliveira *et al.* (2012)<sup>11</sup>, onde observaram reparos ósseos, em cães, superiores nos grupos onde

o PRP foi adicionado, havendo também maior evolução óssea nos sítios com implantes de Bio-Gen.

Zielak *et al.* (2011)<sup>12</sup>, mostram que o osso equino, comparado aos ossos de origem bovina e ovina, foi o que mais se aproximou ao tecido ósseo humano quanto a rugosidade visual, assim como quando comparada a área dos poros. A presença de porosidade, o diâmetro, a conformação, a presença de intercomunicações e a quantidade de poros estão diretamente relacionadas com a vascularização e migração celular, influenciando positivamente o reparo ósseo.<sup>13,14</sup>

O processamento do osso equino para implantação não utiliza calcinação, técnica de aquecimento de 600 a 1200 °C, uma vez que o processo pode alterar a estrutura do tecido dificultando a colonização celular.

Levando em conta o processamento do material e o controle da patogenicidade dos biomateriais de origem animal, o tecido ósseo de origem equina se faz livre de infecções preocupantes de origem bovina, ovina e suína. Encefalopatias espongiformes bovinas e o *scrapie* em ovinos são doenças infecciosas neurodegenerativas transmissíveis, de mecanismos desconhecidos, de sério comprometimento humano. Evidências comprovam que a doença de Creutzfeldt-Jakob, doença fatal que ataca o sistema nervoso central em humanos, compartilha o mesmo agente etiológico (proteína príon) das encefalopatias que comprometem ovinos e bovinos.<sup>15,16,17</sup>

A fim de afastar a possibilidade de contágio, o controle dessa infecção é realizado através da seleção de animais livres de encefalopatias espongiformes e o processamento feito com substâncias capazes de remover príons.<sup>1</sup>

Não há relatos de reações inflamatórias locais de células-B ou células-T com o uso do tecido bovino inorgânico.<sup>18,19</sup>

O processo de esterilização de Bio-Gen se dá por radiação por íons Beta em dose de 25 KgJ. A eliminação de partes orgânicas é feita por processo químico enzimático de baixa temperatura.<sup>5</sup>

Sugere-se que além das propriedades superiores como rugosidade e porosidade, o osso equino possa ser mais seguro quanto à contaminação, em relação aos demais supracitados.

Śmieszek-Wilczewska *et al.* (2010)<sup>5</sup>, realizaram estudo, com acompanhamento de 6 meses, comparando o preenchimento de defeitos ósseos em cavidade oral humana, preexistentes, com Bio-Gen e com o biomaterial de origem bovina Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça) isoladamente. Por meio de análise radiológica, observou-se aumento significativo da densidade óptica de Bio-Gen em relação ao Bio-Oss.

O tempo médio de remodelação dado pelo fabricante de Bio-Gen é de 4 a 12 meses, os prazos estipulados para a coleta do material de 30, 60 e 90 dias foram determinados a fim de se comparar os níveis de ganho estrutural previamente a um reparo fisiológico.

O osso bovino tem papel importante na odontologia como substituto ósseo desde a década de 60. Considerado bom osteocondutor e fundamentado pela literatura, esses biomateriais possuem boa aceitação pelo cirurgião-dentista e comportamento fisiológico seguro.<sup>20</sup>

No presente estudo as amostras que continham o PRP apresentavam, com 30 dias, zonas irregulares de tecido secundário próximas às interfaces com o osso do animal, diferentemente dos grupos com os biomateriais isolados.

Tanto para GenOx quanto para Bio-Gen, a inserção do PRP resultou em maiores áreas de osso maduro durante a análise morfométrica, em 90 dias, quando comparados aos substitutos ósseos isolados.

Camarini *et al.* (2009)<sup>21</sup>, relataram que a associação do PRP em alvéolos de cães acelera o processo de reparo ósseo quando comparada a inserção de biomateriais isolados.

Boyapati *et al.* (2006)<sup>22</sup>, relataram que o PRP estimula a mineralização dos implantes e reduz, quando associados, o tempo de cicatrização em cerca de 50% em cirurgias de levantamento de seio. Houve ainda ganho de 15 a 30% na densidade óssea.

Mazor *et al.* (2004)<sup>23</sup>, relataram que a utilização do PRP reduz em média 3 meses o tempo de cicatrização de biomateriais após levantamento de seio.

Ambos os materiais escolhidos para o estudo, Bio-Gen e GenOx, comprovaram boa indicação como substitutos ósseos com efetividade no processo de reparo.

## CONCLUSÃO

Observou-se maior quantidade de osso maduro nos sítios submetidos aos implantes com Bio-Gen e GenOx associados ao PRP. Os grupos com PRP obtiveram maior ganho ósseo secundário que GenOx e Bio-Gen isoladamente em 90 dias. Foi observado que o grupo Bio-Gen+PRP possuía apenas osso maduro com 90 dias. O biomaterial de origem equina se mostrou superior aos demais, mostrando melhores resultados quando associado ao PRP.

## REFERÊNCIAS

1. CASTRO-SILVA, I. I.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. *Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica*. Innov Implant J, Biomater Esthet. São Paulo, v. 4, n. 3, p. 70-75, set./dez., 2009.
2. DALAPICULA, S. S.; CONZ, M. B. *Caracterização Físico-Química de Biomateriais para Enxerto Ósseo de Origem Alógena e Xenógena*. Rev. ImplantNews, São Paulo, v. 5, n. 2, p.205-213, mar./abr., 2008.
3. CARVALHO, P. S. P. *et al. Biomateriais aplicados a Implantodontia*. Rev. ImplantNews, São Paulo, v.7, n.3a-PBA, p.56-65, Maio/Jun. 2010.
4. FERNANDES, R. G.; FAIG-LEITE, H.; CARVALHO, Y. R. *Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e da sua associação com a hidroxiapatita*. Rev. de Odontologia da Unesp, Marília, v. 33, n. 3, p.123-130, ago., 2004.
5. ŚMIESZEK-WILCZEWSKA, J.; KOSZOWSKI, R.; PAJAŁ, J. *Comparison of postoperation bone defects healing of alveolar processes of maxilla and mandible with the use of Bio-Gen and Bio-Oss*. J Clin Exp Dent. 2010;2(2):e60-6.
6. OBARRIO, J. J. *et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: Platelet gel biotechnology- Case reports*. Int J Periodontics Restorative Dent 2000; 20: 487-497.
7. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. *Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85: 267-57.
8. STEIGMANN, M.; GARG, A. *A comparative study of bilateral sinus lift performed with platelet-rich plasma alone versus alloplastic graft material reconstituted with blood*. Implant Dent. 2005; 14: 261-6.
9. AL RUHAIMI, K. A. *Bone graft substitutes: a comparative qualitative histological review of current osteoconductive grafting materials*. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001; 16: 105-14.
10. CONSOLARO, A.; FURQUIM, L. *Mecânica intrusiva gera forças de inclinação e estímulos ortopédicos com reposicionamento dentário e remodelação óssea simultâneos OU Na mecânica intrusiva não se aplica forças de intrusão, mas obtém-se o efeito intrusivo*. Dental Press J. Orthod., Maringá, v. 16, n. 5, Oct. 2011 .
11. DE OLIVEIRA, B.; CAMARINI, C.; SALAZAR, M.; PAVAN, A. J.; CAMARINI, E. T. *O uso de osso equino (Bio-Gen) e bovino (GenOx) associados ou não ao PRP em alvéolos mandibulares de cães: Desenho split-mouth com análise histológica*. ImplantNews, São Paulo, v.9, n.6a-PBA, p.195-199, Nov./Dez. 2012.

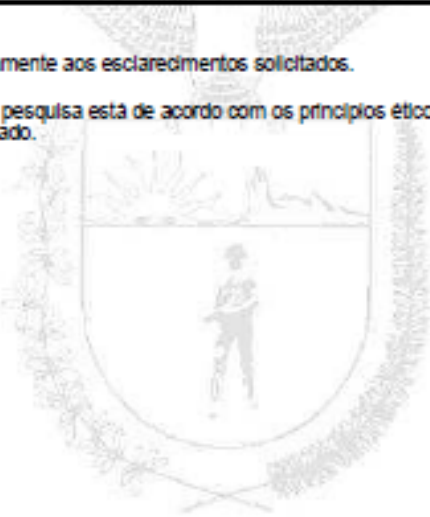

- 12.ZIELAK, J. C. *et al.* Avaliação ultraestrutural comparativa de biomaterial particulado de origem ovina. RSBO. 2011 Jan-Mar;8(1):40-7
- 13.LEONEL, E. C. F.; MANGILLI, P. D.; RAMALHO, L. T. O.; ANDRADE SOBRINHO, J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea – estudo em ratos. Ciênc Odontol Bras. 2003,6(3):19-25.
- 14.TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações – revisão de literatura. Rev Bras Cir Plást. 2008;23(3):234-9..
- 15.BRUCE, M. E.; WILL R. G.; IRONSIDE J. W.; MCCONNELL I.; DRUMMOND D.; SUTTIE A.; MCCARDLE L.; CHREE A.; HOPE J.; BIRKETT C.; COUSENS S.; FRASE H.; BOSTOCK C. J. Transmission to mice indicates that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. Nature. 1997.389:498-501.
- 16.BAYLIS, M.; HOUSTON, F.; ROWLAND, R. K.; MCLEAN, A. R.; HUNTER, N.; GRAVENOR, M. B. BSE—a wolf in sheep's clothing? Trends Microbiol. 2003.10:563-570.
- 17.THURING, C. M. A.; ERKENS, J. H. F.; JACOBS, J. G.; BOSSERS, A.; VAN KEULEN, L. J. M.; GARSSSEN, G. J. *et al.* Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. J Clin Microbiol. 2004;42(3):972-80.
- 18.MCALLISTER, B. S. *et al.* Residual lateral wall defects following sinus grafting with recombinant human osteogenic protein-1 or Bio-Oss in the chimpanzee. Int J Periodontics Restorative Dent 1998; 18: 227-239.
- 19.VENDRAMIN, F. S. *et al.* Plasma rico em plaqueta e fatores de crescimento: Técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. Rev Col Bras Cir 2006; 33:24-28.
- 20.FERREIRA, J. R. M. *et al.* Enxertos Ósseos Xenógenos Utilizados na implantodontia oral. Rev. ImplantNews, São Paulo, v. 4, n. 3, p.303-306, mai./jun., 2007.
- 21.CAMARINI, E. T. *et al.* Use of biomaterials with or without platelet-rich plasma in portextraction sites: a microscopic study in dogs. The Int J of Oral & Maxillofacial Implants 2009; 24 (3): 432-438.
- 22.BOYAPATI, L.; WANG, H. L. The role of platelet- rich plasma in sinus augmentation: a critical review. Implant Dent. 2006; 15: 160- 70.
- 23.MAZOR, Z.; PELEG, M.; GARG, A. K.; LUBOSHITZ, J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. Implant Dent. 2004; 13: 65- 70.



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 5 /10/2010 Parecer nº 103/2010

Pesquisador: Edevaldo Tadeu Camarini	Setor: DOD	
Título:	Protocolo nº 026/2010	
Avaliação de implantes de biomateriais associados ou não à plasma rico em plaquetas em cavidades mandibulares: Estudo microscópico em cães		
Entrada: 30/8/2010	Início: 1/8/2010	Término: 31/7/2011
Situação do Projeto:	Aprovado	
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto	
<p><b>ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.</b></p>		
<p><b>Considerações e Parecer:</b></p> <p>O pesquisador respondeu adequadamente aos esclarecimentos solicitados.</p> <p>Por julgar que o presente projeto de pesquisa está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, somos de parecer que o mesmo seja aprovado.</p>		
		
 Dr <sup>a</sup> Vânia Antunes Presidente do CEAE/UEM		
<p>Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:</p> <p>I - aprovado;</p> <p>II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;</p> <p>III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;</p> <p>IV - não aprovado</p>		

www.ppg.uem.br - e-mail: csea@uem.br