



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Niterói
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO XENOENXERTO DE ORIGEM BOVINA
ASSOCIADO A OXIGENOTERAPIA NO REPARO ÓSSEO**

CAMILA SAGGIORO DE ALMEIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. José de Albuquerque Calasans Maia

Niterói
2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BNO
Gerada com informações fornecidas pelo autor

A447a Almeida, Camila Saggioro de
Avaliação in vivo do xenoenxerto de origem bovina
associado a oxigenoterapia no reparo ósseo / Camila Saggioro
de Almeida ; José De Albuquerque Calasans Maia, orientador.
Niterói, 2019.
29 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGO.2019.m.11710976624>

1. Reparo ósseo. 2. Alvéolos dentários. 3. Ratos. 4. In vivo. 5. Produção intelectual. I. De Albuquerque Calasans Maia, José, orientador. II. Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Lúcia Espogeiro - CRB7/4708



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



Aluna

Camila Saggiore de Almeida

Orientador

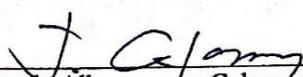
Professor Doutor Jose de Albuquerque Calasans Maia

Banca Examinadora

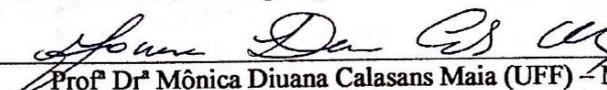
- Professor Doutor Jose de Albuquerque Calasans Maia
- Professora Doutora Monica Diuana Calasans Maia
- Professora Doutora Suelen Cristina Sartoretto Lorenzi

Aos trinta dias do mês de abril do ano de dois mil e dezenove, reuniram-se na sala C, situada à Rua Mário Santos Braga, n.º 28, no quarto andar, no prédio da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, os Professores Doutores: Jose de Albuquerque Calasans Maia (UFF), Monica Diuana Calasans Maia (UFF) e Suelen Cristina Sartoretto Lorenzi (UNIG), para constituírem a Banca Examinadora encarregada de julgar a Dissertação de conclusão do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, elaborada pela candidata *Camila Saggiore de Almeida*, com o título: **AVALIAÇÃO IN VIVO DO XENOENXERTO DE ORIGEM BOVINA ASSOCIADO A OXIGENOTERAPIA NO REPARO ÓSSEO**, tendo como orientador o Professor Doutor Jose de Albuquerque Calasans Maia, Presidente da Banca Examinadora conforme regimento interno do curso. Terminada a exposição do assunto pela candidata e a arguição e defesa do trabalho, os membros da Banca Examinadora pediram aos presentes que se retirassem para o julgamento. Após análise dos pareceres individuais e após o parecer conclusivo resolvem APROVAR a candidata. Novamente foi aberta a sessão ao público, e anunciado o resultado pelo senhor Presidente. Recomenda a Banca Examinadora à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – nível Mestrado, em caso de aprovação, o encaminhamento da documentação pertinente à candidata, aos órgãos superiores da Universidade Federal Fluminense, para que lhe seja concedido o título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração: Clínica Odontológica, caso tenha cumprido os demais requisitos.

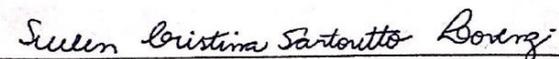
Niterói, 30 de abril de 2019.



Prof. Dr. Jose de Albuquerque Calasans Maia (UFF) – Presidente



Prof.ª Dr.ª Mônica Diuana Calasans Maia (UFF) – Membro



Prof.ª Dr.ª Suelen Cristina Sartoretto Lorenzi (UNIG) – Membro

DEDICATÓRIA

Uma grande etapa se encerra hoje. Durante estes dois anos de trabalho árduo, de renúncias, mas de muito aprendizado, preciso agradecer algumas pessoas especiais que contribuíram para que eu pudesse concretizar esse objetivo na minha vida profissional.

À Deus, que guia meus passos e que me surpreende com seus planos.

Ao meu Amado Pai, Juliano, meu maior incentivador na vida e na profissão. Essa vitória também é sua.

À minha mãe Rosângela que sempre me apoia em todas as minhas decisões, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu noivo David, que em meio a tantas incertezas me mostra que sou capaz. Obrigada pelo companheirismo e zelo.

À minha querida avó Rianez (in memoriam), quem sempre teve carinho e um amor imensurável por mim. Sei que estás comigo a todo momento.

Às minhas irmãs, pela companhia e pelo carinho, e a toda minha família que sempre torceu por mim. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor José de Albuquerque Calasans Maia a quem tenho enorme admiração, e que tive a honra de aprender desde a graduação com a disciplina de Ortodontia, logo após com a monitoria de ortodontia, e hoje como orientador da minha dissertação do Mestrado. Você faz parte de uma grande parcela do meu desenvolvimento profissional. Obrigada.

À Professora Mônica Diuana Calasans Maia, por todos os ensinamentos. Você é uma grande inspiração profissional para mim.

À Professora Adriana, pela delicadeza ao ensinar, e ao carinho que sempre teve comigo.

Ao Professor Rodrigo Resende, que nunca se hesitou em me ajudar. Obrigada por toda a ajuda durante o trabalho.

Aos professores do estágio docente por me acolher na Clínica e me ensinar tanto. Sou muito grata pela oportunidade de aprender com grandes profissionais. Obrigada a cada um de vocês: Professor Raphael Monte Alto, Professor Gustavo dos Santos, Professor Alexandre Elias, Professor Aldir Machado e Professor Ronaldo Barcellos.

Finalizo agradecendo aos alunos da graduação por todo cuidado e ajuda no desenvolvimento do trabalho, e a todos os funcionários da UFF que são peças-chave para o sucesso das nossas pesquisas.

RESUMO

Almeida CS. Avaliação *in vivo* de xenoenxerto de origem bovina associado a oxigenoterapia no reparo ósseo [Dissertação]. Niterói: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), 2019.

O objetivo do presente estudo foi comparar e avaliar o reparo ósseo, através da análise histológica de enxertos de origem bovina liofilizado (Bonefil[®] Bionnovation) porous, granulação fina ($0,10 < x < 0,60$ mm), em alvéolos dentários de ratos, associado ou não ao Blue M[®] gel. Vinte ratos *Wistar*, fêmeas, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos para extração do incisivo central superior esquerdo. Após a extração, no grupo controle, o alvéolo foi preenchido com grânulos de Bonefill[®] (n=10) e, no grupo experimental, grânulos de Bonefill[®] associado ao Blue M[®] gel (n=10). Após os períodos experimentais de 7 e 42 dias, os animais foram eutanasiados e as amostras obtidas foram processadas para avaliação histológica descritiva. Não houve diferença sugestiva na análise descritiva entre os grupos. Os biomateriais estudados foram compatíveis, osteocondutores, porém a associação com o Blue[®] M gel não apresentou diferença na neoformação óssea após os períodos estudados.

Palavras chave: reparo ósseo, alvéolos dentários, ratos, *in vivo*, Blue M gel.

ABSTRACT

Almeida CS. In-vivo evaluation of bovine xenograft associated with oxygen therapy in bone repair. [Dissertation]. Niterói: Dentistry School, Fluminense Federal University (UFF), 2019.

The present study aimed to compare and evaluate bone repair in the dental alveoli of rats through the histological analysis of fine-grained ($0.10 < x < 0.60$ mm) lyophilized bovine bone grafts (Bonefill® Porous, Bionnovation), either associated or not with Blue M® gel. Twenty female Wistar rats were randomly distributed into two groups for extraction of the left upper central incisor. After extraction, the alveolus was filled with Bonefill® particles ($n = 10$) in the control group, and with Blue M® gel-associated Bonefill® particles ($n = 10$) in the experimental group. After experimental periods of 7 and 42 days, the animals were euthanized, and the collected samples were processed for descriptive histological evaluation. Analysis showed no obvious difference between the groups. While the biomaterials analyzed were compatible and osteoconductive, association with Blue® M gel showed no difference in new bone formation after the study period.

Key words: Bone repair. Dental alveoli. Rats. In vivo. Blue M gel

1 - INTRODUÇÃO

A busca por biomateriais que apresentem taxa de bioabsorção e capacidade de regeneração óssea mais próximas do osso autógeno é fonte de intensa investigação científica. A hidroxiapatita (HA) é, sem dúvida alguma, o composto mais pesquisado e utilizado para essa finalidade. Substitutos ósseos com propriedades que favoreçam a regeneração óssea é um desafio para as ciências biomédicas, razão pela qual a literatura apresenta crescente interesse por biomateriais que possam apresentar maior similaridade com os tecidos mineralizados, especialmente os materiais sintéticos que mimetizam o osso natural humano.¹²

Durante o reparo ósseo quando o tecido cicatricial estiver permeado por células indiferenciadas da linhagem fibroblástica, teremos como resultado final tecido fibroso. Se o tecido de granulação for invadido por células da linhagem osteoblástica, progredirá para um tecido conjuntivo ósseo ou, simplesmente, osso propriamente dito.^{9,15}

Nos últimos anos houve aumento expressivo no uso de biomateriais xenógenos na Odontologia, o uso da técnica de regeneração óssea guiada pelo cirurgião-dentista e a associação do biomaterial aos concentrados plaquetários tem se mostrado eficiente quanto a aceleração do processo de neoformação óssea. Os defeitos ósseos decorrentes de traumas, patologias, atrofia maxilofaciais e alveolares têm sido um dos grandes desafios da implantodontia, particularmente em relação à sua reconstrução para possibilitar a instalação imediata ou futura de implantes dentários.¹²

Com o intuito de preservar o osso alveolar em espessura e largura, após a exodontia, estratégias clínicas têm sido adotadas para reduzir ou eliminar futuras intervenções cirúrgicas para aumento do rebordo alveolar, tais como: regeneração óssea guiada (ROG), enxertos ósseos, implantes dentários, utilizados separadamente ou associados.¹⁸

O biomaterial ideal deve ser biocompatível e gradualmente substituído por novo tecido ósseo, além de possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva.⁴ A tendência atual é desenvolver e usar biomateriais que

acelerem ou, pelo menos, permitam o reparo normal e completo de defeitos ósseos, reduzindo assim a taxa de falha pós-operatória.^{7,14}

O objetivo da engenharia tecidual é produzir um biomaterial osteocondutor que seja propício para a neoformação óssea ou mesmo que otimize as propriedades dos enxertos presentes no mercados.⁹

Visto que as dimensões do rebordo são tão importantes para o sucesso da instalação do implante dentário, seria vantajoso preservá-los pós-extração, ao invés de reconstruí-los num segundo momento, assegurando assim a manutenção das dimensões ideais (vertical e horizontal), diminuindo a morbidade para o paciente.¹³

Procedimentos de regeneração óssea que assegurem a preservação, o aumento ou a reconstrução da altura, espessura e qualidade do rebordo alveolar imediatamente após a extração dentária parecem ser essenciais para a manutenção destas dimensões. Isto reduziria a necessidade de um enxerto tardio, simplificando e otimizando o sucesso da reabilitação “*in loco*”.¹¹

Os enxertos ósseos são classificados como: enxertos autógenos, enxertos aloplásticos, enxertos alogênicos e xenoenxerto.

O enxerto autógeno é definido quando o tecido é transferido do mesmo indivíduo, de uma local para outro, não provocando reação imune, podendo ser osso cortical ou medular.⁷ Os enxertos aloplásticos ou sintéticos são exemplificados como as cerâmicas de fosfato de cálcio sendo a mais utilizada a hidroxiapatita, biocerâmica que é considerada corpo inerte.⁷ Os enxertos alógenos são obtidos de doadores vivos ou cadáveres e disponíveis em banco de ossos humanos. Os enxertos xenógenos são obtidos de doadores de outras espécies, sobretudo bovinos. O alto poder osteocondutor químico e físico do biomaterial, se assemelha ao osso.^{21,22}

O Bonfill® (Bionnovation Biomedical, Bauru, São Paulo, Brasil) é produzido através do processo de desmineralização da porção cortical e esponjosa de ossos bovinos.²

A matriz óssea inorgânica mineralizada do Bonfill®, possui estrutura macro e micro porosas, similar aos ossos cortical e esponjoso humano. Por ser remodelado por ação dos osteoclastos e osteoblastos, este biomaterial é

considerado uma alternativa viável ao osso autólogo quando usado em defeitos ósseos, respeitando a sua indicação.²

O oxigênio é essencial no processo de cicatrização de feridas, sendo o principal componente da fórmula do Blue[®] M.

O uso de oxigênio ativo aumenta o metabolismo celular e a redução de energia³ previne e repara as inflamações, acelera o processo de cicatrização de feridas e úlceras orais aliviando a dor rapidamente, elimina as bactérias patogênicas, estimula o fluxo sanguíneo pela formação de vasos sanguíneos e, estimula a regeneração óssea. O gel oral Blue[®] M foi desenvolvido para tratar a periodontite, eliminando as bactérias nocivas, e conseqüentemente diminuindo e prevenindo a inflamação da gengiva.³

O oxigênio é importante para processos intracelulares, como biossíntese, movimento e transporte. A energia é essencial para a funcionalidade e sobrevivência das células, aumentando a taxa de proliferação celular e a re-epitelização. As células epiteliais migram das laterais para fechar as feridas e formar uma barreira entre a ferida e o ambiente, esse processo será crucial para a formação da nova pele. Com isso, aumenta-se a síntese de colágeno e elasticidade.³

O Blue[®]M aumenta a atividade antibacteriana e o uso de baixas concentrações de perborato de sódio e da enzima glicose oxidase (GOX), encontrada no mel (enzima presente em sua composição), aumenta o oxigênio ativo nas áreas de feridas promovendo um processo mais rápido de cicatrização. A presença de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio estão contidas na fórmula, o que conseqüentemente aumenta a eficácia para eliminar as bactérias patogênicas como já descritos na literatura através de pesquisas.

Dentre as vantagens do uso do Blue M[®] antes da cirurgia se destacam: melhoria das condições gerais da boca, eliminação das bactérias nocivas, redução de infecção durante a cirurgia e dos riscos de complicações pós-cirúrgicas. Dentre as vantagens do uso do Blue M[®] após a cirurgia: Aceleração do processo de cura através da estimulação e do crescimento de novas células e novos vasos sanguíneos.³

Cabe salientar que poucos trabalhos sobre o tema foram encontrados na literatura avaliando aspectos como revascularização, síntese de colágeno e ação

antibacteriana em um único produto, e resultados neste sentido podem apontar novas perspectivas de pesquisas ou até mesmo de formas de utilização do gel Blue M[®] associado a osso bovino liofilizado como conduta para preservação do rebordo alveolar pós-extração, bem como para regeneração óssea em defeitos alveolares.

2-PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar através da análise histológica descritiva o reparo ósseo de alvéolos pós exodontia submetidos ao tratamento de enxertia com enxertos de origem bovina (Bonefill[®] porous granulação fina), associado ou não ao Blue[®] M gel (gel oral Blue[®] M, Blue M care).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BIOMATERIAL

O biomaterial utilizado para este estudo foi o Bonefill[®] Porous granulação fina. O mesmo apresenta granulometria de $0,10 < x < 0,60$ mm da empresa Bionnovation Biomedical (Bauru - São Paulo), tem propriedade osteocondutora por ser uma hidroxiapatita (HA) bovina liofilizada. Além da porosidade, a aglutinação de partículas apresenta maior liberdade para determinar formas para produzir *scaffolds*. Devido a origem natural, este material é comparável à estrutura mineral e morfológica do osso humano mineralizado. É biocompatível, não apresenta citotoxicidade, toxicidade sistêmica aguda, toxicidade sub-crônica, carcinogenicidade, genotoxicidade e não é um produto sensibilizante (ISO 10993-1).³

O Bonefill[®], é produzido através do processo de desmineralização da porção cortical de ossos bovinos. O Bonefill[®] Porous é produzido através do mesmo processo de descalcificação aplicado à porção esponjosa de ossos bovinos. A matriz óssea inorgânica mineralizada do Bonefill[®], possui uma

estrutura macro e micro porosas, similar aos ossos cortical e esponjoso humano. (Figura 1). Este biomaterial é parcialmente remodelado por ação de osteoclastos e osteoblastos, sendo uma alternativa viável ao osso autólogo em defeitos adequados para o seu uso e indicação. Ao colocarmos partículas de biomaterial no coágulo sanguíneo estamos procurando ajudar na ancoragem da rede de fibrina para que não ocorra a retração do coágulo. Na forma granulada, Bonfill® Porous, atua como mecanismo osteocondutor favorecendo o crescimento e regeneração óssea. Devido ao grande volume dos poros de interligação e da composição natural, produzem comumente a formação e o crescimento de osso novo no local do implante.

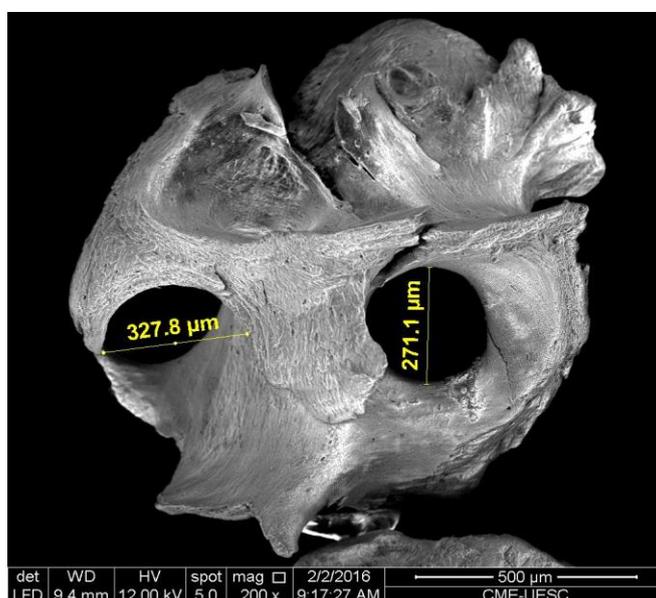


Figura 1: Microscopia eletrônica de Varredura do Bonfill® granulação fina (Bionnovation Biomedical). Observar na imagem a presença dos poros interconectados que favorecem o carreamento de drogas, medicamentos como o Blue® M, bem como a proliferação de sistemas capilares durante o evento de proliferação endotelial. (CME-UESC)

3.2-ESTUDOS *IN VIVO*

3.2.1 Princípios éticos no estudo animal

Esta pesquisa foi realizada seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA– 2013) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (CONCEA – 2013), ambas disponíveis em <http://concea.mct.gov.br>. O presente estudo é relatado de acordo com as diretrizes do ARRIVE, aprovado à Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) sob o número 949 (Anexo II).

De acordo com o programa dos 3 Rs (*Reduction, Replacement and Refinement*), devemos reduzir o número de animais em experimentação, tanto quanto possível, sem perder a precisão da análise estatística. O tamanho da amostra baseou-se em estudos anteriores que seguiram o mesmo protocolo animal.

3.2.2 Caracterização dos animais

Nesta pesquisa foram utilizados vinte ratos *Wistar* (n=20) fêmeas, com peso médio de 300 gramas, que foram distribuídos aleatoriamente em dois períodos experimentais de 7 dias (T1) e 42 dias (T2) após os procedimentos cirúrgicos e dois grupos experimentais.

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo:

Grupo 1 - controle (enxerto bovino): alvéolo preenchido com microesferas de Bone-fill®, porous granulação fina.

Grupo 2 - experimental (gel Blue ® M): alvéolo preenchido com enxerto bovino Bonefill® associado com gel Blue M® com proporção de 1:1.

Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em mini-isoladores, contendo dois animais por caixa, no laboratório de Experimentação Animal do Núcleo de

Animais de Laboratório (LEA-NAL) da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói. Os animais receberam água e ração peletizada *ad libitum*.

3.2.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados intra muscular com 75 mg/kg de Cloridrato de cetamina (Ketalar®, Veltbrands, São Paulo, Brasil) e 1,5 ml/kg de cloridrato de xilazina (Rompun®, Veltbrands, São Paulo, Brasil), respectivamente. Os animais foram posicionados na mesa operatória destinada para este fim, deitados em decúbito ventral, seguido de antissepsia da região peri-oral e mucosa oral com solução de clorexidina 2% (Riohex 2% , São Paulo, SP, Brasil) e antissepsia da mucosa oral com solução de clorexidina a 0,12% (Riohex 0,12%, São Paulo, SP, Brasil) respectivamente. Logo, a sindesmotomia e a extração do incisivo central superior esquerdo foram realizadas com um explorador dentário número 5 (Duflex®, São Paulo, SP, Brasil) e um fórceps pediátrico número 151 (Duflex®, São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. O procedimento cirúrgico foi realizado, com cautela e com o mínimo de intervenção possível com o intuito de preservar as paredes alveolares. Em seguida, 0,2mg dos biomateriais foram implantados na cavidade alveolar de acordo com cada grupo, seguidos de sutura simples até o fechamento primário do tecido (5-0, Ethicon® - Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) e limpeza final com água oxigenada 10 volumes. (Farmax®, Divinópolis, MG, Brasil). (Figura 2)

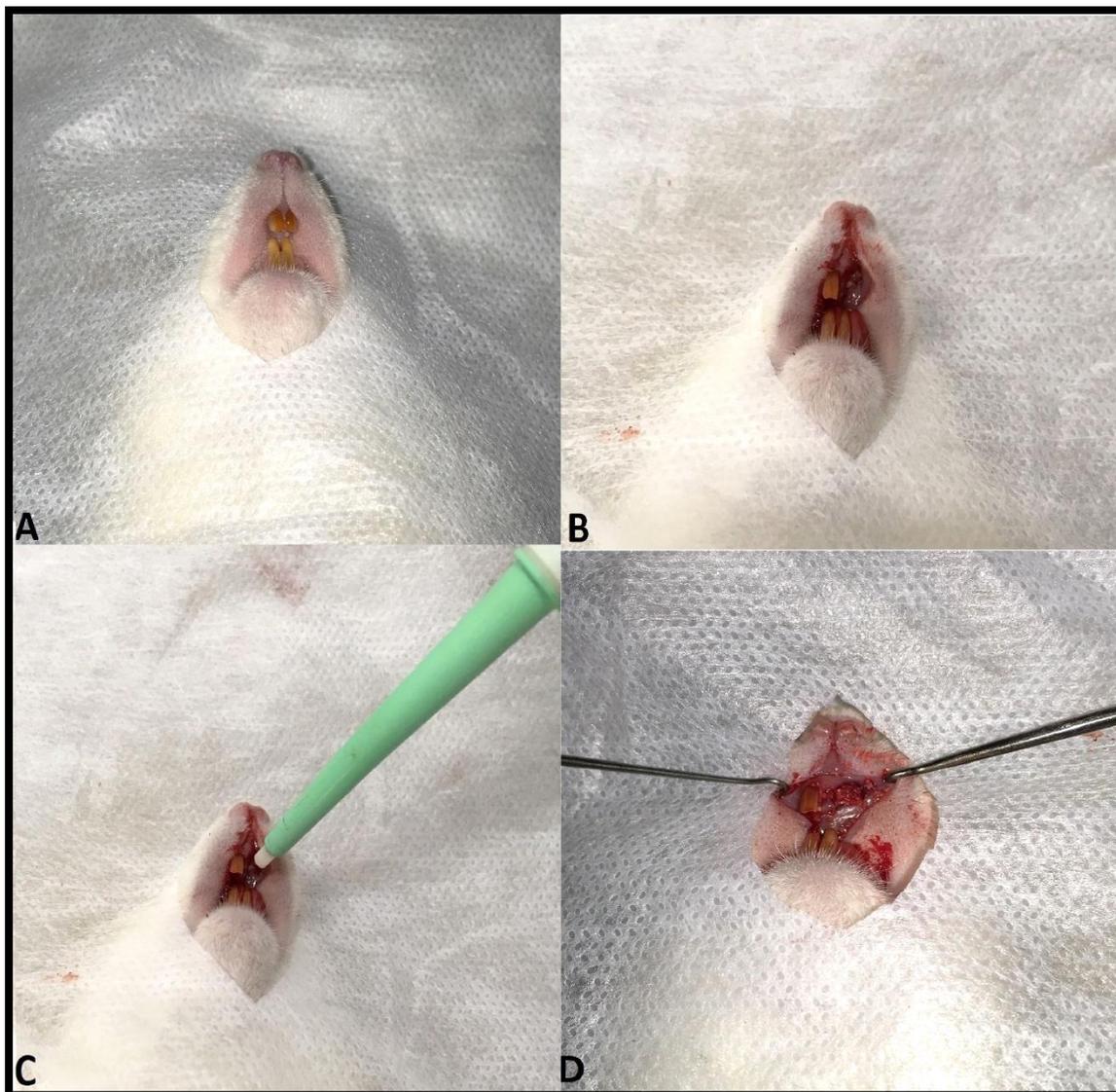


Figura 2: Procedimentos cirúrgicos realizados para implantação dos biomateriais. (A) Anti-sepsia da região; (B) Extração do incisivo central superior esquerdo; (C) Implantação do biomaterial Bonefill® e Blue® M gel; (D) Bonefill® e Blue M® gel já implantados na cavidade alveolar.

3.2.4- Cuidados pós-operatórios:

Após o término dos procedimentos cirúrgicos, foi ministrado Meloxicam 1mg/kg (Duprat®, Rio de Janeiro, Brasil) via subcutânea a cada 24 horas, durante

três dias, sendo iniciado no mesmo dia da cirurgia, para analgesia pós-operatória. Os animais foram inspecionados diariamente a fim de avaliar e registrar qualquer complicação pós-cirúrgicas.

3.2.5- Obtenção das amostras:

As etapas descritas a seguir do processamento histológico seguem os critérios estabelecidos pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada – Setor Histologia da Universidade Federal Fluminense (LABA-UFF).

Após eutanásia, os alvéolos foram mantidos em paraformaldeído 4% – PH 7,2 por um período mínimo de 24 horas, para fixação das amostras. Após fixados, foram seccionados em 3 terços, sendo utilizado o terço médio para avaliação. (Figura 3). Para este procedimento utilizou-se o EXAKT SYSTEM de corte. As amostras seccionadas foram descalcificadas utilizando-se o descalcificador ALLKIMIA® (ácido descalcificante) por 7 dias. Logo após descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente por 30 minutos. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100% - Rialcool® – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 1 hora em cada concentração, e diafanizadas em dois banhos de xilol (Xileno® - Coremal – Recife, PE, Brasil). Finalizando com dois banhos em parafina e emblocamento das amostras (Tabela A). Cortes longitudinais (n=3) com 5µm de espessura nos blocos de parafina foram obtidos em um micrótomo e montadas em lâminas para microscópio e posteriormente coradas com Tricrômico de Masson.

Tabela A. Etapas do processamento histológico e inclusão em parafina.

Passo	Etapa	Reagente	Duração
1	Desidratação	Álcool 70%	1 h
2	Desidratação	Álcool 80%	1h
3	Desidratação	Álcool 90%	1h
4	Desidratação	Álcool 95%	1h
5	Desidratação	Álcool 100%	1h
6	Desidratação	Álcool 100%	1h
7	Desidratação	Álcool 100%	1h
8	Clarificação/Diafanização	Xilol 1	1h
9	Clarificação/Diafanização	Xilol 2	1h
10	Impregnação	Parafina 1	1h
11	Impregnação	Parafina 2	2hs
12	Inclusão	Parafina	-
13	Microtomia – 5 µm	-	-
14	Pescagem	-	-

Método de Coloração Tricrômico de Masson

- 1-Desparafinizar e hidratar os cortes
- 2-Lavar em água destilada
- 3-Colocar em fixador de Bouin por 1 hora a uma temperatura de 56 °C ou por uma noite em temperatura ambiente (se o material foi fixado em formalina)
- 4-Deixar esfriar e lavar em água corrente até que desapareça a cor amarela.
- 5-Lavar em água destilada
- 6-Hematoxilina férrica, por 10 min
- 7-Lavar em água corrente, por 10 min
- 8-Lavar em água destilada
- 9-Colocar na solução de Biebrich Escarlata – Fucsina Ácida por 15 min
- 10-Lavar em água destilada

11-Colocar na solução de Ácido Fostotúngstico - Fosfomolibdico por 10 ou 15 minutos se, for usar solução de anilina azul. Solução aquosa de ácido fosfotúngstico 5%, por 15 minutos se for usar Light Green como contrastante.

12-Escorrer a solução das lâminas

13-Corar na solução de Light – Green, por 5 ou 10 minutos, ou, solução de Azul de Anilina por 1 minuto

14-Lavar em água destilada

15-Diferenciar na solução de Ácido Acético Glacial 1%, por 1 ou 3 minutos

16-Desidratar em álcool 95%, dois álcoois absolutos e clarear em xilol

16- Montar

A resposta tecidual foi avaliada na área referente às regiões de implantação dos biomateriais. Para a análise histológica descritiva das lâminas utilizou-se um microscópio óptico de Luz de Campo Claro (OLYMPUS® BX43, Tóquio, Japão). As capturas das imagens selecionadas foram realizadas através de uma câmera (OLYMPUS® SC100, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio, associada a um software de alta resolução (CELLSENS® 1.9 Digital Image). Utilizou-se as objetivas de 4x para visualização mais ampla da área de interesse e em 40x para obtenção de maiores detalhes celulares e teciduais. Em cada lâmina, foram observados presença de osso neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo.



Figura 3- Cortes do terço apical, médio e cervical pelo sistema EXAKT (EXAKT System® Germany) para posterior histologia e processamento para inclusão em parafina.

As carcaças dos animais foram congeladas em sacos plásticos especiais (com indicação de risco biológico) e mantidos no freezer do LEA, (Laboratório de Experimentação Animal) até o recolhimento por uma empresa especializada para posterior incineração, conforme protocolo do NAL.

3.2.6- Análise histológica

Os cortes histológicos foram analisados quanto à presença de tecido conjuntivo, osso neoformado e biomaterial residual. Para essa análise foi utilizado o microscópio de luz comum (Eclipse E400, Nikon®, Tóquio, Japão). Os cortes histológicos foram capturados por uma câmera digital de alta resolução (Evolution ® MP color; 5.0 megapixels; Media cybernetics, Silver Spring, EUA) no Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da UFF, com 10 campos consecutivos e não sobrepostos.

3.2.7 – Local

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) e no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

4-RESULTADOS

4.1-Análise Descritiva histológica do Blue® M gel e Bonfill®

4.1.1 Bonfill®

Aos 7 dias, foram encontrados na área do defeito, fragmentos de biomaterial entremeados por feixes delicados de tecido conjuntivo, exsudato hemorrágico e infiltrado inflamatório. Nota-se parede de osso pré-existente circundando o defeito e neoformação óssea a partir das extremidades. (Figura A-B)

Aos 42 dias, encontra-se área do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso na porção central, exibindo algumas ilhas de trabéculas ósseas. Nota-se neoformação óssea da periferia do defeito em direção ao centro, e presença de pequeno resíduo de biomaterial. (Figura E- F)

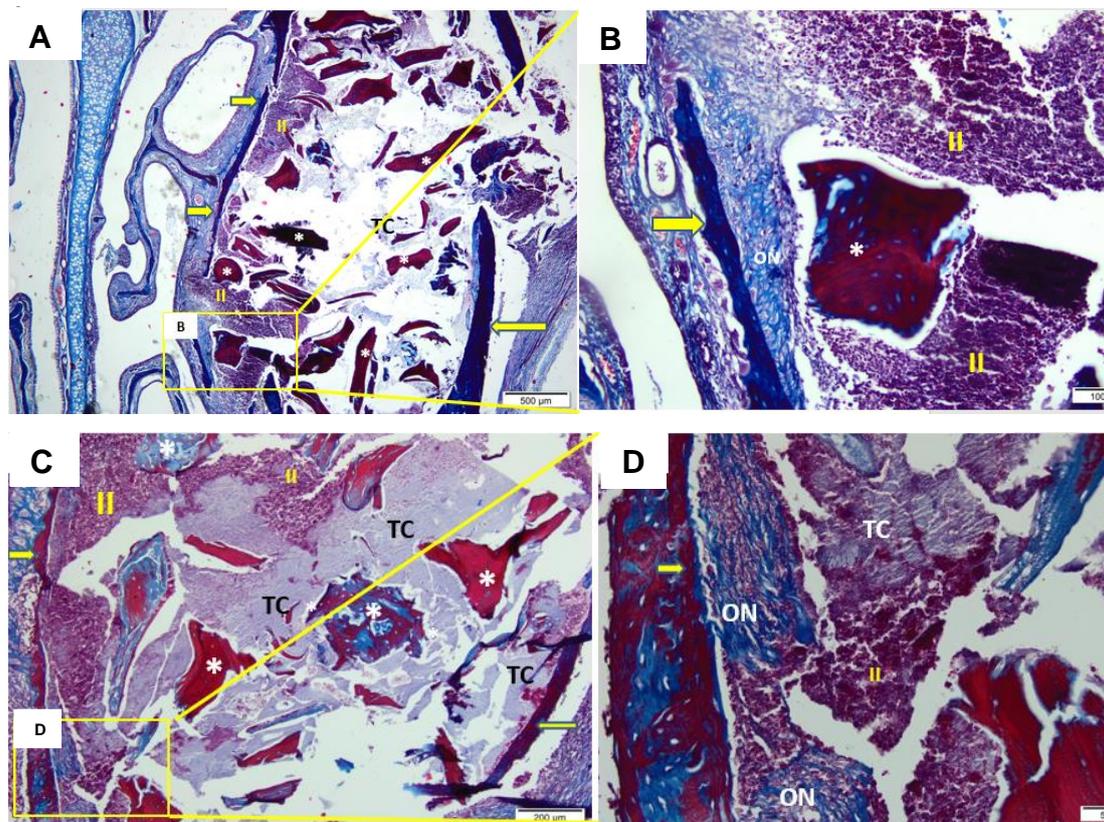


Figura 4- Fotomicrografia do Bonefill[®] 7 dias(A-B) e Bonefill[®] com Blue[®] M gel 7 dias (C, D) após implantações. Coloração: TM; Escala: 50μm ON: Neoformação óssea . TC: Tecido Conjuntivo e Setas: paredes de osso pré-existente.

4.1.2 Blue® M gel e Bonefill®

Aos 7 dias, nota-se fragmentos de biomaterial entremeados por tecido conjuntivo com material basofílico amorfo sugerindo gel, exsudato hemorrágico e infiltrado inflamatório. Circundando o defeito nota-se parede de osso pré-existente e neoformação óssea a partir das extremidades.(Figura C-D)

Aos 42 dias, observa-se área do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso na porção central, com pequenas ilhas de reação de granulação.

Nota-se neoformação óssea da periferia do defeito em direção ao centro.(Figura G-H)

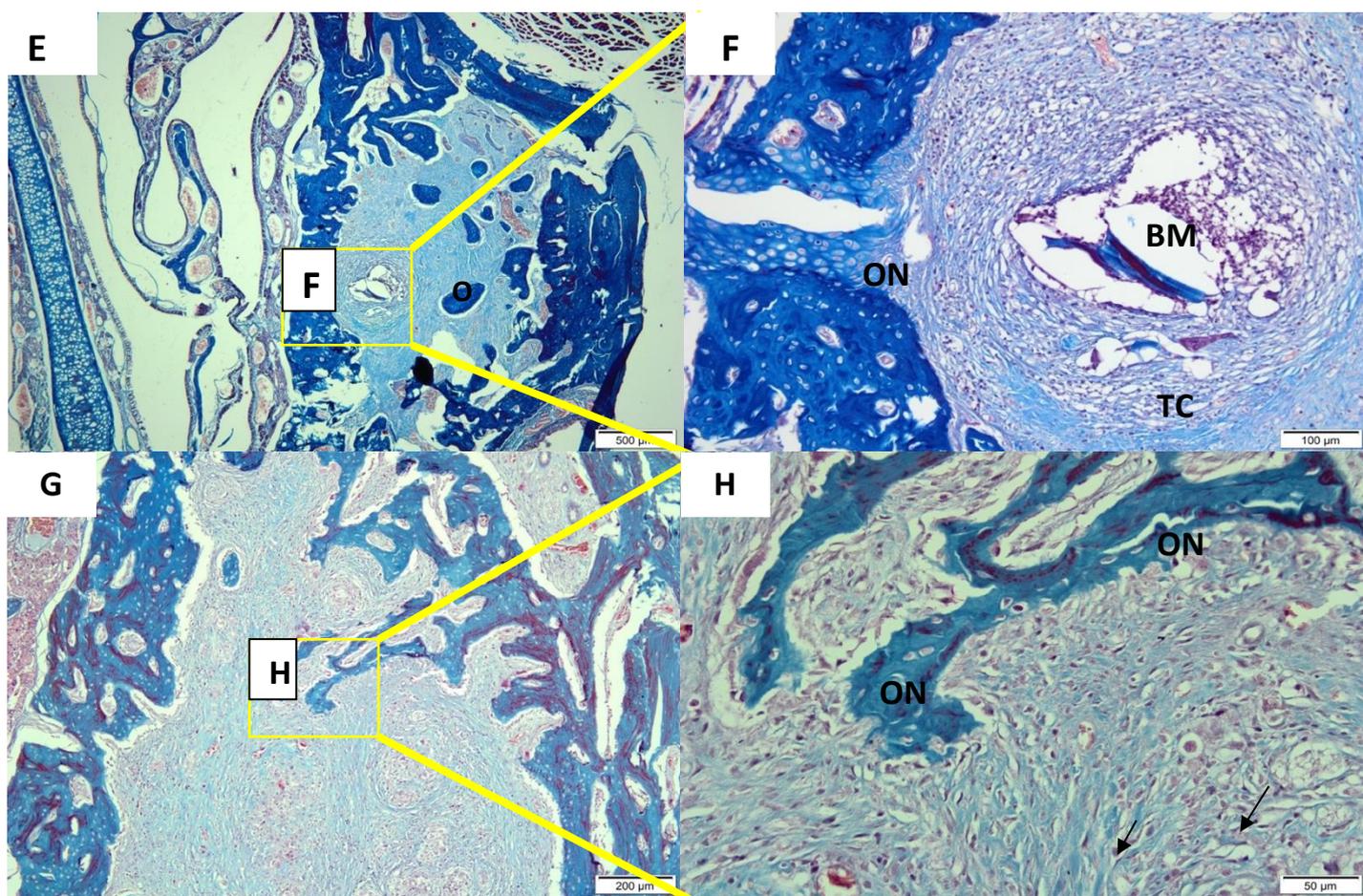


Figura 5: Fotomicrografia do Bonefill® 42 dias(E-F) e Bonefill® com Blue® M gel 42 dias(G-H)após a implantação.Coloração:TM; Escala: 50µm. BM: Biomaterial, ON:Neoformação óssea. CT: Tecido Conjuntivo O: pequenas ilhas ósseas e Setas: Ilhas de reação de granulação.

5-DISCUSSÃO

O aspecto mais importante no desenvolvimento de novos biomateriais é o teste pré-clínico para posterior avaliação em ensaios clínicos. Neste estudo foram utilizados ratos que são animais de pequeno porte e possuem baixo custo, o que facilita o experimento. Os ratos também apresentam semelhanças com os seres humanos no que diz respeito à composição óssea, densidade mineral óssea e resistência à fratura.²⁴ Essas semelhanças são importantes porque experimentos utilizando animais com maiores similaridades fisiológicas, anatômicas e orgânicas para humanos produzem resultados de pesquisa mais aplicáveis ao uso em humanos.

Nenhuma ou pouca inflamação clínica foi observada no pós-cirúrgico, o que confirma a biocompatibilidade de ambos materiais utilizados e que já estão disponíveis comercialmente para uso em humanos. O Blue[®] M utiliza um mecanismo para levar oxigênio ativo (H_2O_2) de maneira controlada diretamente ao local cirúrgico. Em contato com o soro fisiológico, o perborato de sódio é convertido em borato de sódio, em concentrações baixas de 0,003% - 0,015%, desta forma, o peróxido de hidrogênio tem ação desinfetante, apresenta efeito quimioestático sobre os leucócitos e ação antibacteriana durante o "burst" respiratório dos neutrófilos no fluido normal da ferida. Neste estudo, não foi observado abscesso, necrose tecidual ou retardo cicatricial gengival em ambos os grupos. Os neutrófilos são fagócitos que emitem prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as partículas estranhas. Logo, essas partículas são digeridas por enzimas presentes nos vacúolos celulares. Ao fagocitar, forma-se um fagossomo. Dessa forma, o fagossomo libera enzimas hidrolíticas e de espécie reativa do oxigênio. O consumo de oxigênio durante a reação de oxigênio é chamado de queima respiratória, ou "burst" inflamatório. Essa queima respiratória não tem nenhuma ligação com a respiração celular ou produção de energia. A queima respiratória ativa a enzima NADPH – oxidase, que produz quantidades de superóxido (uma espécie reativa do oxigênio). O superóxido gera o peróxido de hidrogênio que se converte em ácido hipocloroso (HClO) pela enzima mieloperoxidase. É o HClO que tem a propriedade para matar a bactéria

fagocitada. Dessa forma, esses eventos parecem favorecer o mecanismo cicatricial e de reparo na ferida cirúrgica, uma vez que o oxigênio é essencial na formação e organização do colágeno, aumentando a sua síntese e resistência do tecido, além de intensificar a angiogênese e promover a revascularização.³ Apesar desta ação comprovada da oxigenoterapia não foi observada nenhuma diferença no reparo alveolar entre os grupos com e sem o Blue-M®.

O biomaterial utilizado para este estudo foi o Bonefill® Porous granulação fina. O mesmo apresenta granulometria de $0,10 < x < 0,60$ mm da empresa Bionnovation Biomedical (Bauru - São Paulo), tem propriedade osteocondutora por ser uma hidroxiapatita (HA) bovina liofilizada. Além da porosidade, a aglutinação de partículas apresenta maior liberdade para determinar formas para produzir *scaffolds*. Devido a origem natural, este material é comparável à estrutura mineral e morfológica do osso humano mineralizado. É biocompatível, não apresenta citotoxicidade, toxicidade sistêmica aguda, toxicidade sub-crônica, carcinogenicidade, genotoxicidade e não é um produto sensibilizante (ISO 10993-1). O oxigênio é essencial para a explosão respiratória, a qual está relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) usadas por fagócitos, tais como, os neutrófilos e macrófagos na atividade anti bacteriana, e também na remoção de detritos de células mortas. Os níveis de oxigênio afetam o crescimento e a taxa de crescimento de novos vasos sanguíneos. A criação desses novos vasos sanguíneos (angiogênese) junto a revascularização, é essencial para o crescimento e sobrevivência do tecido de reparação. O oxigênio ativo promove a transdução de sinalização do fator de crescimento; as espécies reativas de oxigênio (ERO), são cruciais para os processos de sinalização dos fatores e processos de crescimento tais como mobilidade celular, recrutamento de leucócitos, angiogênese e formação de matriz extracelular.³ Neste estudo foram avaliadas as imagens histológicas da região do terço médio do alvéolo dentário e foi observada a presença de vasos neoformados em ambos os grupos, não foi observada uma predominância de neoformação vascular no grupo com Blue®M gel.

Os biomateriais são a opção mais estudada com intuito de reparo ósseo comparados ao osso autógeno. Na osteocondução, a migração de capilares e células do leito receptor se diferenciam dentro da estrutura calcificada (material de enxerto), facilitando a migração dos capilares e funcionando como um arcabouço.⁵

Na forma granulada, o Bonfill® Porous, atua como mecanismo osteocondutor favorecendo o crescimento e regeneração óssea. Devido ao grande volume dos poros de interligação e da composição natural, produzem comumente a formação e o crescimento de osso novo no local do implante.

O presente estudo incorporou Blue® M gel ao xenoenxerto bovino Bionnovation® afim de avaliar a resposta tecidual após implantação em alvéolos dentários de ratos. Para avaliação do reparo ósseo, o corte do bloco ósseo ideal é a do terço médio, certo de que, diminuirá o viés do terço cervical e apical devido à contaminação externa e do apical devido à convergência das paredes que facilita a osteocondução.

Existe uma escassez na literatura acerca do Blue® M gel. Logo, novos estudos devem ser realizados para apresentação de novos dados que corroborem a efetividade do produto.

6-CONCLUSÕES

Com base nesses resultados, podemos concluir que o biomaterial analisado foi considerado compatível e osteocondutor, e a associação com gel ativo à base de oxigênio não interferiu ou melhorou a reparação óssea durante os períodos experimentais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-Barreto MA, Duarte LR. Evidências científicas em estética e osseointegração.In :Duarte LR, Leahy FM, Miranda DA, Consolaro A , Francischone CE. Substitutos ósseos de origem animal :análise microscópica para mensurar as reações biológicas teciduais frente aos enxertos particulados. São Paulo: Odessa Editora Napoleão,2013.p.170-209.

2-Bionnovation.BulaINQ003rev14/04-11-2015.Disponível em:http://www.bionnovation.com.br/downloads/IU/INQ003/pt-BR/IU_INQ003_14_PT-BR.pdf. Acesso em 03/08/2018.

3-Blue M care.Disponível em: <https://www.bluemcare.com/pt-br/#>. Acesso em 29/07/2018.

4-Bosh C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membrane. Cleft Palate Craniofac J. 1995;32(4):128-33.

5-Braga CM, Souza JO. Aumento Horizontal de Rebordo Maxilar Anterior com Enxerto de Osso de Origem Bovina. Full Dent. Science 2013;17(4):36-44.

6-Calasans Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. Acta Cir Bras 2009; 24:325–328.

7-Costa OR, Veinstein FJ. Injertos osseos em regeneración periodontal. Rev Asoc Odont Argent 1994; 82(2):117-25.

8-Consolaro A. Inflamação e Reparo: Um silabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas, 2009.

9-Consolaro A, Leahy FM. Tecido de granulação e granuloma: dois termos com significados muitos diferentes. *Dental Press Implantology* 2011;37(4):33-128.

10-Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterioriliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dental Relat Res* 2003; 5:161-167.

11-Darby I, Chen ST, Buser D . Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24:71-260.

12-Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(5):696-710.

13-Iasella JM, Greenwell H, Miller RL. et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol Chicago* 2003;74(7):990-999

14-Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*.10.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

15-Leahy FM. Análise microscópica da organização celular e tecidual na superfície e ao redor das partículas de três tipos comerciais de osso xenógeno enxertados em defeitos induzidos em calvárias murinas: “uma proposta de critérios e parâmetros de análise das reações teciduais frente a materiais particulados”. *Dissertação Mestrado em Implantologia* 2011. Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas , São Paulo, p.16-19, 34-39.

16- Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, et al. Short term sodium alendronate administration improves

the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. *J Appl Oral Sci* 2017;25(1):42-52.

17-Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL. 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 de enxerto xenógeno. *Rev. Bras. Ortoped* 2003;38(9):551-560.

18-Proff P, Baerlein T, Fanghanel J. et al. The application of bone graft substitutes for alveolar ridge preservation after orthodontic extractions and for augmentation of residual cleft defects. *Folia Morphol (Warsz)* 2006;65(1):3-81.

19-Ratner B. New ideas in biomaterials science—A path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1993;27(7): 50-837

20-Sartori S, Silvestrini M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesesi P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (BioOss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14(3):72-369.

21-Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. Literature review. *Minerva Stomatol.* 2004;53(5)191-206.

22-Tadjoedin ES, De Lange GL, Bronkers ALJJ. et al. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003;30(3):70-261.

23-Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):93-879.

24-Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. Uma comparação interespecífica de propriedades de fratura óssea. Biomed Mater Eng.1998; 8(1); 1-9.



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

! Certificamos que o projeto protocolo nº 949, intitulado “Avaliação in vivo de xenoenxerto de origem bovina associado ao Blue M gel” sob a orientação da Profª. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia, da Faculdade de Odontologia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 19 de junho de 2017. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de trinta (30) ratos, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 19 de junho de 2017.

Presidente da CEUA

