

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**RENATA VIANNA UNRUH**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM  
CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO OSSO BOVINO INORGÂNICO E  
MEMBRANA DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA, ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO**

**CURITIBA  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RENATA VIANNA UNRUH**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM  
CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO OSSO BOVINO INORGÂNICO E  
MEMBRANA DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA, ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à Obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Augusto Tramontina

**CURITIBA**

**2009**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

**RENATA VIANNA UNRUH**

### AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS UTILIZANDO OSSO BOVINO INORGÂNICO E MEMBRANA DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA, ISOLADOS OU EM ASSOCIAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador(a):

Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FOP-UNICAMP

Prof. Dr. Sung Hyun Kim  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 10 de março de 2009.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sérgio Vieira** pelo empenho, dedicação e incentivo à pesquisa.

Ao Coordenador da Área de Concentração em Periodontia, **Prof. Dr. Sung Hyun Kim**, por me aceitar no curso, agradeço pela oportunidade e confiança.

Ao **Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina** um exemplo de profissional competente e dedicado, gentil e paciente ao esclarecer minhas dúvidas e grande incentivador da pesquisa. Obrigada por sua compreensão e empenho, especialmente por não me deixar desistir. Meus sinceros reconhecimento e admiração. Foi um privilégio tê-lo como orientador.

À **Profª Dra. Vula Papalexiou** pela disposição, atenção e amizade, sua contribuição foi indispensável para a realização desse trabalho.

À **Profª Sônia Mara Luczyszyn** pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao **Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima** pelo conhecimento compartilhado, sua contribuição foi muito importante na avaliação histológica desse trabalho.

Ao **Prof. Sérgio Aparecido Ignácio** pela paciência e empenho dedicados à análise estatística e interpretação dos dados desse trabalho.

Aos todos os **professores** do programa de Pós-Graduação que contribuíram para minha formação, por sua paciência, dedicação e competência.

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Operatória da PUC-PR, **Mizael e Álvaro**, pela disponibilidade e colaboração prestada durante a etapa experimental do estudo.

À funcionária do Laboratório de Biologia Celular da PUC-PR, **Sra. Elizabeth Clarice Cordeiro**, pela dedicação, sua amizade e seu otimismo que foram fundamentais para a concretização desse projeto.

À funcionária do laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR, **Ana Paula Camargo Martins** por sua colaboração.

À secretária do programa de Pós-Graduação da PUC-PR, **Sra. Neide Reis Borges**, pela dedicação e carinho com os quais executa seu trabalho.

A todos os funcionários da Clínica de Odontologia da PUC-PR, em especial à **Silvana** sempre atenciosa e dedicada.

Aos colegas de mestrado, **Fábio Bonamin dos Santos, Camila Prevedello Pereira, Maria Bibiana Grassi, Maria de Fátima Scarpim, Rosângela Paese e Italo Nogiri Filho** pelo companheirismo, a amizade e o convívio agradável durante esses dois anos. Sentirei saudades. Agradeço especialmente ao colega **Fábio Bonamin dos Santos**, profissional responsável e competente, sempre disposto a dividir seu conhecimento. Obrigada por sua solidariedade e amizade.

Ao aluno da graduação **Pedro Bonassoli**, pela colaboração durante as cirurgias.

À minha **família**, pela cumplicidade, pelo apoio e incentivo. Amo vocês.

## RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo a avaliação histológica e histométrica da reparação de defeitos ósseos agudos padronizados na calvária de ratos Wistar albinos com enxerto de osso bovino inorgânico, membrana de cortical óssea bovina, a associação de ambos e enxerto de osso autógeno. Foi produzido um defeito não contido de 6mm de diâmetro na calvária de cada um dos 102 animais provenientes do biotério da PUCPR que foram aleatoriamente tratados conforme os cinco grupos descritos e subdivididos em períodos de eutanásia de 2 e 8 semanas para coleta, processamento e avaliação das amostras. A avaliação das lâminas foi realizada com o programa analisador de imagens ImageJ, e na sequência os dados foram submetidos à análise estatística. A avaliação histomorfométrica revelou que os melhores resultados pertencem ao grupo submetido à associação membrana de cortical óssea bovina associada ao osso bovino inorgânico. O resultado histológico demonstrou presença de material de preenchimento circundado por tecido conjuntivo organizado e infiltrado inflamatório com marcante presença de macrófagos no subgrupo de 2 semanas de tratamento. Foi observada neoformação óssea nas margens do defeito sobre o osso original e a presença de centros de ossificação nos defeitos que receberam osso autógeno. A avaliação histométrica da cicatrização óssea em calvária de ratos indicou melhores resultados na reparação dos defeitos ósseos agudos padronizados que receberam a associação de membrana de cortical óssea bovina associada ao osso bovino inorgânico. E a avaliação histológica apontou melhores resultados para os defeitos que receberam osso autógeno.

Palavras-chave: Osso bovino inorgânico. Membrana de cortical óssea bovina. Osso autógeno.

## ABSTRACT

The objective of this work was the histological and histometric evaluation of the repairing of standardized sharp bone defects in Wistar albino rats calvaria with graft of inorganic bovine bone, membrane of cortical bone bovine, the association of both and graft of autogenous bone. A no contained defect of 6mm of diameter was produced on the calvaria of each one of the 102 animals from the biotery of PUCPR and they were randomly treated acordingly to the five described groups and subdivided in periods of euthanasia of 2 and 8 weeks for harvest, processing and evaluation of the samples. The evaluation of the sheets was accomplished with the analyzing program of images ImageJ, and in the sequence the data were submitted the statistical analysis. The histomorphometric evaluation revealed that the best results belong to the group submitted to the association membrane of cortical bone bovine associated to the inorganic bovine bone. The histological result demonstrated presence of completion material surrounded by fabric organized conjunctive and infiltrated inflammatory with outstanding macrofage presence in the subgroup of 2 weeks of treatment. Bone neoformation was observed in the margins of the defect on the original bone and the presence of ossification centers in the defects that received autogenous bone. The histometric evaluation of the calvaria bone cicatrization of rats indicated better results in the repairing of the sharp bone defects standardized that received the membrane association of cortical bone bovine associated to the inorganic bovine bone. And the histological evaluation pointed better results for the defects that received autogenous bone.

Key-words: Inorganic bovine bone. Membrane of cortical bone bovine. Autogenous Bone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Lâminas.....	17
Figura 2 – Fotomicrografias do grupo coágulo .....	21
Figura 3 – Fotomicrografias do grupo autógeno.....	21
Figura 4 – Fotomicrografias grupo membrana cortical óssea bovina .....	22
Figura 5 – Fotomicrografias grupo osso bovino inorgânico.....	23
Figura 6 - Fotomicrografias grupo membrana cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico.....	23
Figura 7 – Percentagem média do preenchimento dos grupos de tratamento.....	27
Tabela 1 – Estatísticas descritivas da percentagem do preenchimento segundo grupos no período de 2 semanas.....	26
Tabela 2 – Estatísticas descritivas da percentagem do preenchimento segundo grupos no período de 8 semanas.....	26
Tabela 3 – Tabela simplificada de comparações múltiplas .....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
2.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	15
2.2 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS .....	16
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	18
<b>3 RESULTADOS</b> .....	19
3.1 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA.....	19
3.2 DESCRIÇÃO HISTOMÉTRICA .....	24
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>ANEXOS</b> .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada é uma técnica cirúrgica usada para aumentar o osso alveolar e prepará-lo como área aceitável para colocação de implantes, porque a qualidade e a quantidade óssea são requisitos para se obter a osseointegração.<sup>1</sup>

A morfologia do defeito ósseo desempenha importante papel na cicatrização<sup>2</sup>, e ainda que o tecido ósseo possua uma grande capacidade de regeneração espontânea, o tamanho do defeito pode ser uma característica limitante.<sup>3</sup> O potencial regenerativo do tecido ósseo está intrinsecamente correlacionado ao tamanho, a morfologia e a localização do defeito<sup>4</sup>. Tão importante quanto as características do material de enxerto utilizado na técnica de regeneração óssea guiada são a morfologia do defeito, o tabagismo e a severidade da perda óssea que afetam a quantidade e a qualidade do novo osso.<sup>1</sup>

Defeitos como maior profundidade, menor largura, maior número de paredes ósseas (duas e três paredes)<sup>5,6</sup> e ângulos mais agudos em sua base<sup>2</sup> têm maior potencial regenerativo. A técnica regenerativa é indicada para defeitos infra-ósseos de 2 e 3 paredes, e envolvimento de furca grau II porque o ligamento periodontal e o osso são fontes para a formação do tecido de granulação.<sup>6</sup>

A base dos procedimentos de enxertia óssea da periodontia atual se deve a Nabers & O'Leary, que relataram aumento na altura óssea através do enxerto de osso cortical removido com cinzéis manuais.<sup>7</sup>

O uso de substitutos ósseos para o tratamento de defeitos infra-ósseos elimina a necessidade de área doadora intra ou extrabucal.<sup>8</sup> Substitutos ósseos incluem xenoenxertos e materiais sintéticos que atuam como arcabouço para a proliferação de osteoblastos e fornecem espaço para a formação de novo osso. Contudo, as propriedades dos substitutos ósseos podem afetar o processo de consolidação óssea<sup>9</sup>.

O material de enxerto ideal deve ser osteoindutor, osteocondutor, reabsorvível, fácil de manusear, e melhorar a adesão, a proliferação e a diferenciação celular.<sup>10</sup>

Os enxertos ósseos são envolvidos pelo coágulo que é substituído por tecido de granulação altamente vascularizado, e a trama óssea brota nos espaços entre os

substitutos ósseos, mas para que os substitutos ósseos guiem o novo osso em formação é fundamental que inicialmente aconteça a estabilização do coágulo.<sup>9</sup>

Os enxertos ósseos podem ser transferidos de uma posição para outra no mesmo indivíduo (autoenxerto), obtidos de pessoa diferente e processados em banco de osso (aloenxertos), processados de estruturas ósseas de outras espécies (xenoenxertos) ou sinteticamente desenvolvidos (aloplásticos).<sup>11</sup>

Estudos demonstraram que o osso autógeno oferece a melhor resposta aos procedimentos de enxerto, porque as células contidas nesse enxerto sobrevivem ao processo de transplante<sup>10</sup>, entretanto, o enxerto autógeno aumenta a morbidade e sua disponibilidade é limitada.<sup>12</sup> O enxerto ósseo autógeno contém células osteoprogenitoras da medula óssea, matriz extracelular colágena e não colágena e fatores de crescimento e de diferenciação; e como promove a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução, é considerado padrão ouro<sup>12,13</sup> para a regeneração óssea.

O autoenxerto é amplamente utilizado para aumento de rebordo e reconstrução de defeitos ósseos<sup>13</sup>, o que limita seu uso são inconveniências, associadas a disponibilidade<sup>1,14</sup>, a morbidade da área doadora<sup>15</sup>, ao aumento do custo e do tempo de tratamento e a imprevisibilidade do resultado final<sup>3</sup>.

Entre as áreas doadoras de enxerto autógeno intra-bucal estão locais de cicatrização pós-extração, rebordos edêntulos, tórus e tuberosidades, mas, como as fontes intra-bucais são limitadas é freqüente a necessidade de uma fonte secundária<sup>11</sup> como o osso ilíaco. O osso trabecular e a medula óssea do ilíaco oferecem o maior potencial indutor de novo osso no periodonto, no entanto, a reabsorção radicular foi reportada como uma complicação após o enxerto de osso ilíaco fresco e esse problema foi aparentemente eliminado com o congelamento do material.<sup>7</sup>

A bioatividade do aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado parece depender da idade, o potencial osteogênico é aumentado em indivíduos jovens quando comparado a indivíduos mais velhos.<sup>16</sup> A indicação do aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado envolve preocupações com a consistência de resultados, fontes doadoras e a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas<sup>18</sup>, embora evidências como a inativação do vírus da imunodeficiência humana<sup>4</sup> mostrem o contrário<sup>16</sup>.

O processo de desmineralização expõe as proteínas osteoindutoras (proteínas morfogenéticas ósseas), localizadas na matriz óssea e essas proteínas induzem as células mesenquimais do hospedeiro a se diferenciarem em osteoblastos<sup>7</sup>. Diferentemente, o aloenxerto ósseo seco congelado não-desmineralizado, tem função osteocondutora e fornece um arcabouço para a formação de novo osso.<sup>7</sup>

O aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado é usado há décadas com relativo sucesso para a regeneração de novo osso no tratamento de defeitos periodontais, para regenerar osso ao redor de implantes e para aumento de rebordo.<sup>15</sup> Apenas o autoenxerto e o aloenxerto ósseo seco congelado desmineralizado combinado a osteogenina ou não, promovem regeneração periodontal em tecidos acometidos pela doença periodontal conforme publicação de 1996<sup>8</sup>.

O enxerto osteocondutor fornece uma superfície onde o novo osso se deposita, atuando como arcabouço, sua estrutura e composição química facilitam a formação óssea.<sup>9</sup> É o objetivo dos procedimentos de regeneração óssea facilitar o crescimento de novo osso e os materiais usados devem suportar a proliferação de células osteoblasticas, e os xenoenxertos são materiais seguros e seu suprimento é ilimitado.<sup>16</sup> Muitos desses materiais são projetados para serem porosos e permitir que o osso se forme através do material bem como entre os grânulos ou partículas<sup>17</sup> e mais tarde essa trama óssea é substituída por osso lamelar maduro que se adapta às cargas funcionais.

O osso bovino é um substituto ósseo que se integra bem aos tecidos ósseos e tem comportamento osteocondutor, é obtido através de diferentes métodos de produção que resultam em hidroxiapatita com total remoção de proteínas para evitar reações imunológicas<sup>10</sup> ou contendo algum colágeno residual<sup>12</sup>, contudo sua arquitetura física é mantida intacta<sup>18</sup>.

O Gen Ox Inorg<sup>®</sup> Esponjoso (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP) é um enxerto ósseo mineral de origem bovina, é desproteínizado e possui matriz inorgânica de osso bovino medular. Atua como material de preenchimento osteocondutor é de fácil manuseio, apresenta boa adaptação ao leito receptor e possui características estruturais que o permitem atuar como material de preenchimento e manutenção do espaço.

Entre as proteínas residuais quase indetectáveis, podem estar alguns fatores de diferenciação e proteínas morfogenéticas, e quando o osso bovino inorgânico trabecular é enxertado na presença de osteoclastos, esses são capazes de promover reabsorção na superfície do material e liberar essas proteínas que incrementam o desempenho do material, contudo, as partículas de osso bovino inorgânico são incapazes de induzir a formação óssea heterotópica<sup>15</sup>.

O Gen Ox Inorg<sup>®</sup> é um material que apresenta grânulos porosos compostos de apatita cristalina, a sua natureza cristalina o torna menos a degradação.<sup>19</sup> O osso bovino mineral é uma apatita biológica especialmente confiável quando associada à membrana em defeitos, mas tem algumas de suas qualidades questionadas como a taxa de reabsorção e a expressão osteocondutora.<sup>20</sup>

É bem tolerado e não existem relatos de reações alérgicas<sup>21</sup>. Há controvérsias quanto ao risco da transmissão de doenças através dos xenoenxertos<sup>1</sup>, assim, devem ser submetidos a um processamento bem controlado para garantir a segurança biológica, porque os príons, os agentes causadores da encefalopatia espongiforme bovina que no homem provoca a nova variante da Doença de Creutzfeldt Jakob, apresentam resistência química e física a tratamentos que inativam outros microrganismos através da destruição do ácido nucléico.<sup>22</sup>

A GenDerm<sup>®</sup> (Baumer S.A., Mogi Mirim, SP) é uma membrana biológica de origem bovina aplicada como barreira para impedir a invasão de células não osteogênicas para o local do implante, o que favorece a regeneração guiada, embora permita a vascularização e a troca de nutrientes.

Na regeneração óssea guiada os materiais de enxerto servem para estabilizar o coágulo e prevenir a contração da ferida, e a membrana é aplicada para promover o selamento da área.<sup>11</sup> Sem os materiais de preenchimento o resultado do tratamento pode ser menos favorável porque ocorre o colapamento do espaço que a barreira sozinha é incapaz de manter.<sup>23</sup>

A exposição da membrana durante a fase de cicatrização é uma questão crítica<sup>24</sup>, na linha de sutura não devem ser observadas deiscências que possibilitem a colonização da membrana por bactérias, mas o completo fechamento para que ocorra a cicatrização por primeira intenção que parece ser condição importante para o sucesso de procedimentos de regeneração guiada.<sup>25</sup>

Os materiais aloplásticos apenas preenchem espaço, a cicatrização acontece quase que exclusivamente com encapsulamento do material por tecido conjuntivo e

não há regeneração verdadeira.<sup>17</sup> São biologicamente inertes<sup>7</sup> (hidroxiapatita sintética, fosfatos de cálcio e vidros bioativos)<sup>26</sup>, e a maior expectativa relacionada a esses materiais é que alcancem propriedades biomecânicas e biológicas e obtenham integração óssea comparável a autoenxertos e aloenxertos.<sup>20</sup>

Defeitos críticos podem ser definidos como os menores defeitos em tecido ósseo incapazes de regenerar espontaneamente durante a vida do animal.<sup>4,10</sup> É importante que ao testar substitutos ósseos o defeito seja suficientemente extenso para não cicatrizar espontaneamente e defeitos de 6mm de diâmetro satisfazem esse requisito.<sup>27</sup> A avaliação da cicatrização óssea de defeitos criados em calvária de ratos está bem documentada, a manipulação é fácil, é desnecessário estabilizar a ferida, não há camadas musculares e há facilidade em manter os animais.<sup>10</sup> A vantagem do modelo da calvária de ratos é a presença de osso cortical e medular que se assemelha a região maxilofacial.<sup>27</sup>

A escolha de biomateriais nacionais na execução desse trabalho justifica-se pela oportunidade de apreciar o desempenho de materiais de uso rotineiro em consultório e que oferecem facilidade de obtenção, qualidade e bom custo-benefício. O objetivo do trabalho é a avaliação histológica e histométrica da reparação de defeitos ósseos agudos padronizados na calvária de ratos Wistar albinos com enxerto de osso bovino inorgânico, membrana de cortical óssea bovina e enxerto de osso autógeno.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o N° 0016/06 CEUA/PUC-PR. Foram utilizados 102 ratos machos adultos Wistar albinos pesando 250 a 300g, submetidos a um protocolo cirúrgico que incluiu tricotomia na região frontoparietal, anti-sepsia com iodo povidine, anestesia através de injeção intramuscular de cloridrato de Ketamina (5mg/Kg), incisão sagital obtendo-se um retalho de espessura total, expondo o osso da calvária. A seguir foi realizada a perfuração da calvária com broca trefina (Nobel Biocare, Zürich, Switzerland) de 6mm adaptada em contra-ângulo com redução de 16:1 sob refrigeração abundante com soro fisiológico.

Após cuidadosa remoção da porção incisada da calvária, o grupo 1, composto de 20 animais, recebeu osso inorgânico bovino GenOx Inorg<sup>®</sup> aglutinado com soro para hidratação na área do defeito. O grupo 2, composto de 20 animais, recebeu a membrana de colágeno obtida a partir de cortical óssea bovina Gen-Derm<sup>®</sup> com o objetivo de recobrir completamente a cavidade padronizada na calvária e ultrapassar as bordas da lesão em torno de 2mm.

O grupo 3, composto de 20 animais, teve a área do defeito preenchida com enxerto ósseo bovino inorgânico esponjoso, GenOx Inorg<sup>®</sup>, aglutinado com soro para hidratação e foi aplicada a membrana colágena reabsorvível de osso bovino, GenDerm<sup>®</sup>. No grupo 4, composto de 22 animais, a porção da calvária removida com broca trefina foi fragmentada com auxílio de cinzéis de Oschenbein #1 e serviu como enxerto de osso autógeno. E no grupo 5, composto de 20 animais, não houve aplicação de material para que o preenchimento da ferida ocorresse pela formação de coágulo. Todas as suturas foram realizadas com fio de seda agulhado.

Os grupos foram subdivididos em dois tempos de cicatrização, 2 e 8 semanas, e cumprido cada período os subgrupos sofreram eutanásia com sobredose de anestésico e submetidos às cirurgias para coleta de porção do osso

da calvária que excedesse em pelo menos 3mm os limites do defeito previamente criado e essas peças foram mantidas em formol 10% (formalina).

## 2.2 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Ao final do período de 2 meses de desmineralização com EDTA a 4,13%, as peças foram cortadas no centro do defeito para futura referência e as metades de cada peça acondicionadas em cassetes. Foi realizado o processamento histológico de rotina e durante a etapa de inclusão as metades de cada peça foram posicionadas com o lado do defeito voltado para o fundo do cassete. A fim de efetuar cortes transversais que permitissem avaliar a cicatrização tendo como referência as bordas do defeito e as lâminas confeccionadas foram coradas com hematoxilina-eosina.

Cada lâmina foi fotografada com aparelho Sony CCD Iris Color Video Camera (Model DXC-107 A) adaptado a microscópio Olympus BX-50 em aumento de 4X, e as imagens obtidas pelo programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. As imagens obtidas de cada lâmina foram unidas através do programa Corel Photo-Paint X3<sup>®</sup> (Corel Corporation, Ottawa, Ontario), recortadas, convertidas em escala de cinza e analisadas com o programa analisador de imagens ImageJ, de domínio público que processa imagens (Digital Image Processing and Analysis in Java) (figura 1).

No qual, a área do defeito foi selecionada em cada imagem e as densidades da área do defeito e da área de referência (as bordas do defeito) foram avaliadas com relação à porcentagem de preenchimento. Os valores relativos à densidade da área do defeito e da área de referência foram transcritos em tabela do programa Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> (Microsoft Co.) e as densidades comparadas obtendo-se um percentual de preenchimento (figura 1). Os dados foram transferidos para o pacote SPSS<sup>®</sup> 15.0, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

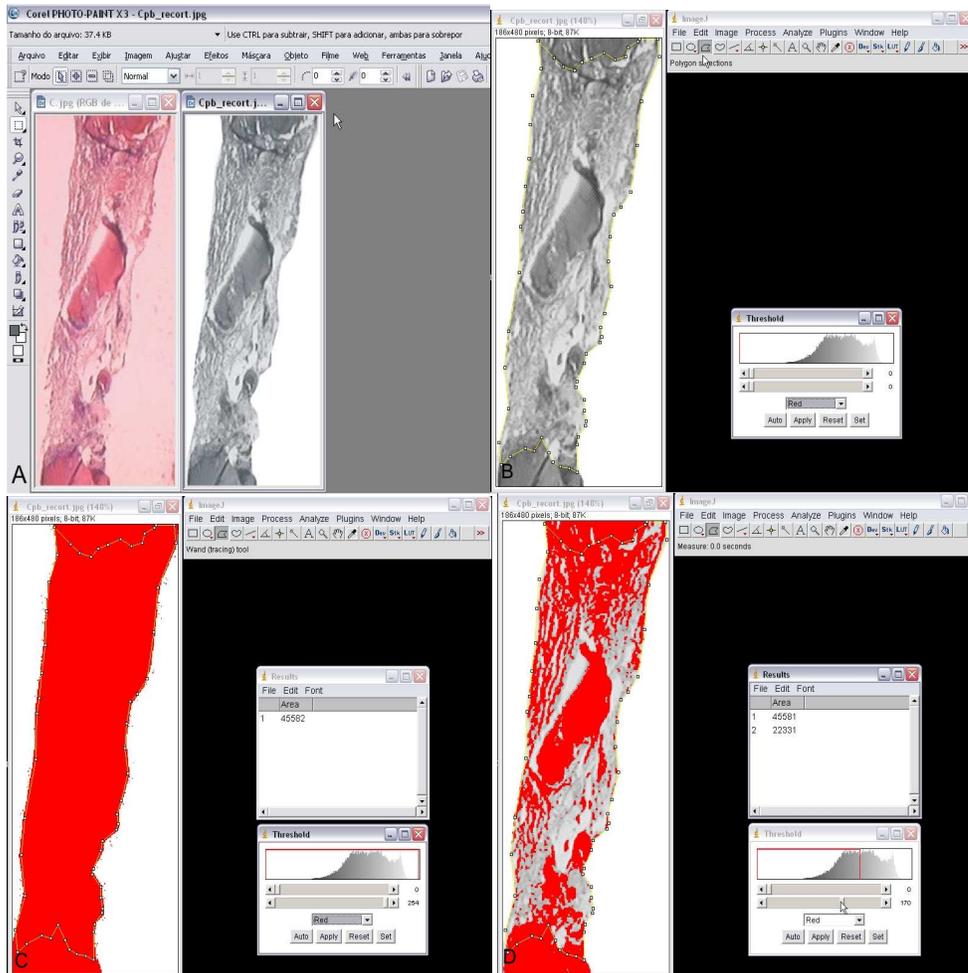


Figura 1 – Lâminas  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- Arquivo de imagem obtido do programa Image pro Plus e sua conversão em escala de cinza no programa Corel Photo Paint X3®.
- A imagem da lâmina fotografada é recortada e transformada em escala de cinza no programa Corel Photo-Paint X3® e transferida para o programa ImageJ que permite a seleção da área de avaliação.
- É acrescentada cor vermelha através da janela *threshold* (limiar) do programa ImageJ para definir a medida da área de densidade normal (referência) como 100%.
- A área selecionada mostra a diferença de densidades. Na área colorida (vermelho) houve preenchimento e nas áreas não coloridas (preto) não houve preenchimento.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de comparar a existência de diferença na percentagem média de preenchimento segundo grupos testou-se a normalidade de distribuição dos dados para cada grupo através do teste de Kolmogorov-Smirnov (figura 11) a homogeneidade entre os grupos através do teste de Levene (figura 12).

Visando comparar a existência de diferença estatisticamente significativa na percentagem média de preenchimento segundo grupos testou-se inicialmente a normalidade dos dados de cada grupo e a homogeneidade de variância entre grupos. Como todos os grupos apresentaram normalidade, foi usado Anova a um critério de classificação visando identificar quais grupos diferiam entre si. Uma vez que Anova indicou existir diferença entre os valores médios segundo grupos, a comparação entre eles foi feita utilizando o teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell para variâncias heterogêneas. E como o teste de Levene indicou existir variância heterogênea entre os grupos, toda a análise estatística foi realizada utilizando um nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA

No grupo controle, período 2 semanas (figura 2A), foram observadas células mesenquimais do tipo fibroblastos em fase proliferativa e fibras colágenas, compatíveis com um tecido jovem, macrófagos, áreas com presença de hemácias início de hemorragia no local e hemossiderina, que é um pigmento de coloração acastanhada, resultante da degradação de hemácias. Nas extremidades da peça havia presença de osso original com osteócitos e nas bordas do defeito ósseo foi possível verificar áreas de osso neoformado, com presença de grupos de celulares em algumas lacunas de reabsorção, lacunas de Howship, indicativo de processo de remodelação óssea.

No grupo coágulo, período 8 semanas (figura 2B), o tecido conjuntivo apresentou mais fibras colágenas o que representa um nível de organização maior que o verificado em duas semanas. De modo geral a quantidade de células inflamatória mostrou-se reduzida, assim como a quantidade de fibroblastos. As células apresentavam-se mais esparsamente dispostas e mononucleares, características de um infiltrado inflamatório predominantemente crônico.

No grupo que recebeu osso autógeno, período 2 semanas (figura 3A), além das bordas da ferida, foi verificada neoformação óssea onde havia presença de células compatíveis com células ósseas viáveis nas partículas enxertadas, mas também foi identificado o encapsulamento de algumas partículas de osso autógeno enxertado no qual não foram identificadas células viáveis, o que pode indicar reação ao osso necrótico. Há presença de atividade vascular importante e de infiltrado inflamatório predominantemente crônico com linfócitos e macrófagos.

No grupo osso autógeno, período 8 semanas (figura 3B), foram verificados centros de ossificação na proximidade do osso autógeno enxertado que parecia conter células viáveis, e foi possível verificar encapsulamento do osso triturado onde

não se identificou células viáveis. Uma nítida demarcação fazia fronteira entre o osso predecessor e o osso neoformado nas áreas próximas às bordas da ferida.

O grupo membrana (GenDerm<sup>®</sup>), período 2 semanas (figura 4A), apresentou áreas de neoformação óssea a partir das bordas da ferida, sobre a área da ferida foi observada a presença da membrana, e sobre ela o tecido conjuntivo. Predomínio de infiltrado inflamatório crônico com presença de macrófagos e linfócitos.

No grupo membrana (GenDerm<sup>®</sup>), período 8 semanas (figura 4B), foi possível identificar resíduos membrana ou um rastro de macrófagos era o indício da sua localização anterior. O infiltrado inflamatório era mais discreto que no grupo membrana 2 semanas.

Dois semanas após a cirurgia no grupo que recebeu o osso bovino (GenOx Inorg<sup>®</sup>) (figura 5A), foi possível observar as partículas de formato irregular e sem padronização, características do biomaterial, com presença de lacunas sem osteócitos encapsuladas por fibras colágenas. A proliferação vascular é uma característica de áreas inflamatórias e foi verificada a presença de infiltrado inflamatório misto com a presença de células gigantes e reação de corpo estranho com leucócitos polimorfonucleares na proximidade das partículas de osso bovino. Com presença marcante de macrófagos e linfócitos, fibroblastos em proliferação e feixes de fibras colágenas ao redor dos grânulos. Próximo as margens do defeito foi verificada a neoformação óssea, mas não foram observados centros de ossificação próximos às partículas do biomaterial.

Após oito semanas, o infiltrado inflamatório mostrou-se predominantemente crônico no grupo osso bovino (GenOx Inorg<sup>®</sup>) (figura 5B), com presença marcante de plasmócitos. As partículas estavam envolvidas por feixes de fibras colágenas, e não foi observada invasão do espaço do biomaterial por tecido conjuntivo.

No grupo osso bovino e membrana (GenOx<sup>®</sup> e GenDerm<sup>®</sup>), período 2 semanas (figura 6A), o tecido conjuntivo apresentou-se bastante celularizado, indicando tratar-se de tecido jovem, em atividade. Foi verificada a presença de infiltrado inflamatório predominantemente crônico com marcante presença de macrófagos. O osso novo formado estava restrito às bordas do defeito e as partículas de osso bovino apresentavam-se encapsuladas.

Resíduos ou indícios da localização da membrana, GenDerm<sup>®</sup>, no grupo osso bovino e membrana (GenOx<sup>®</sup> e GenDerm<sup>®</sup>) no período 8 semanas (figura 6B), foram identificados. Foi observada neoformação óssea próxima as bordas da ferida, mas

não próximo a superfície das partículas de GenOx Inorg<sup>®</sup>. Em algumas amostras foi observado infiltrado inflamatório em torno das partículas de osso bovino inorgânico.

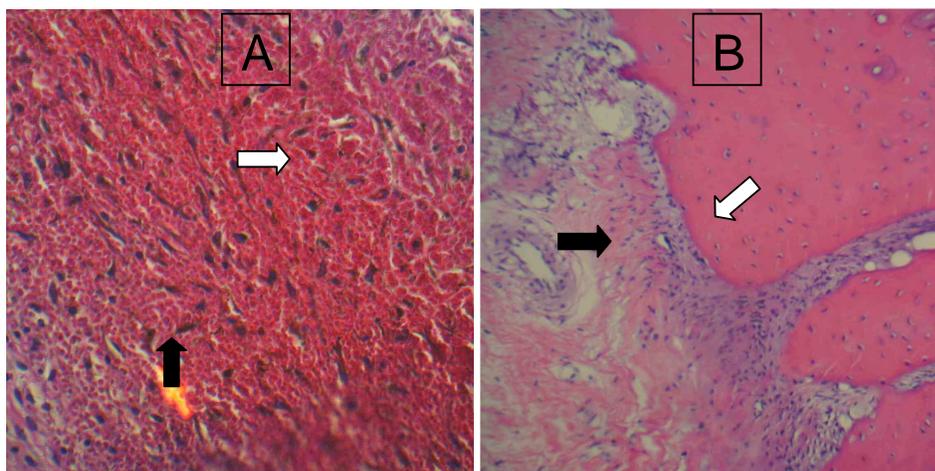


Figura 2 – Fotomicrografias do grupo coágulo  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- A) Fotomicrografia representativa do grupo coágulo de 2 semanas mostrando macrófago (seta preta) e linfócito (seta branca) células características de um infiltrado inflamatório predominantemente crônico (HE 10X).
- B) Fotomicrografia representativa do grupo coágulo de 8 semanas mostrando tecido ósseo original (seta branca) e elementos celulares mais escassos indicando maior organização tecidual (seta preta) (HE 10X).

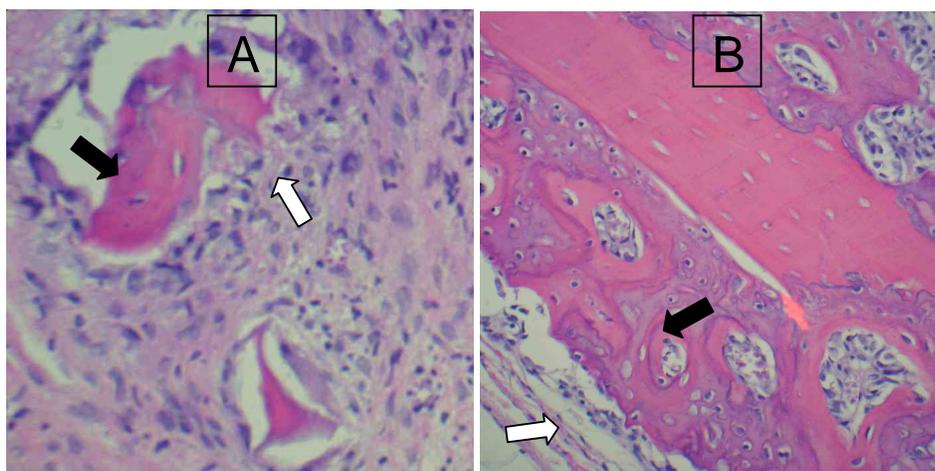


Figura 3 – Fotomicrografias do grupo autógeno  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- A) Fotomicrografia representativa do grupo autógeno de 2 semanas na qual foi verificado maior quantidade de células inflamatórias (seta branca) na proximidade das partículas enxertadas (seta preta) (HE 10X).
- B) Fotomicrografia representativa do grupo autógeno de 8 semanas no qual foi verificada a presença de centros de ossificação (seta preta) na proximidade das partículas enxertadas e a presença de fibras colágenas (seta branca) (HE 10X).

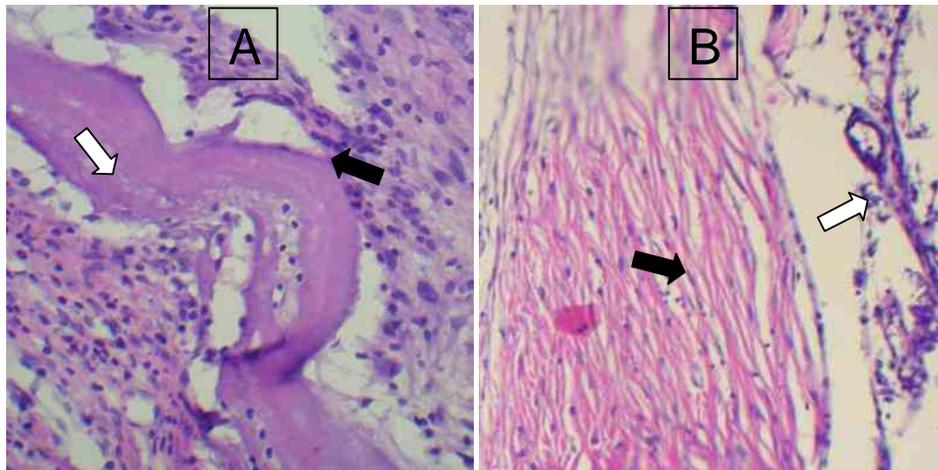


Figura 4 – Fotomicrografias grupo membrana cortical óssea bovina  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- A) Fotomicrografia representativa do grupo membrana cortical óssea bovina período de 2 semanas onde se observa a presença da membrana (seta branca) e células de infiltrado inflamatório predominantemente crônico (seta preta) (HE 10X).
- B) Fotomicrografia representativa do grupo membrana cortical óssea bovina período de 8 semanas onde se observa resíduos da membrana (seta branca) e infiltrado inflamatório mais discreto com presença de fibras colágenas (seta preta) (HE 10X).

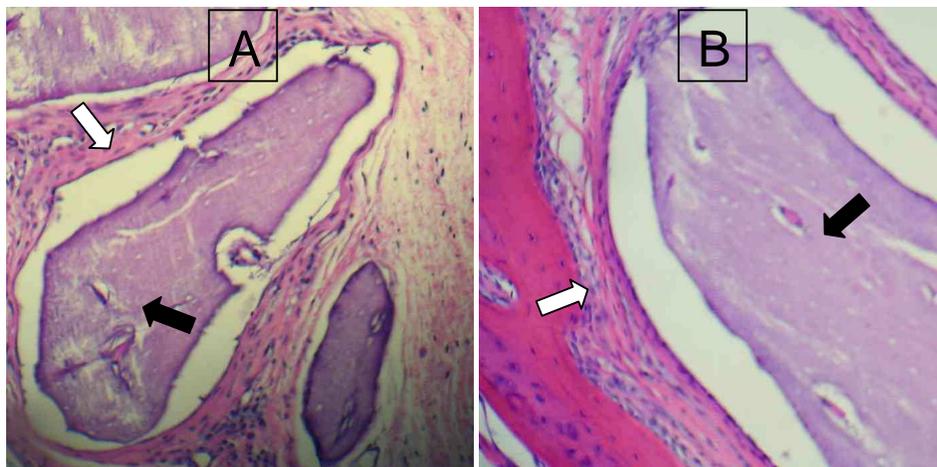


Figura 5 – Fotomicrografias grupo osso bovino inorgânico  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- A) Fotomicrografia representativa do grupo osso bovino inorgânico período de 2 semanas onde foi possível observar a partícula irregular (seta preta) envolvida por tecido conjuntivo (seta branca) (HE 10X).
- B) Fotomicrografia representativa do grupo osso bovino inorgânico período de 8 semanas onde possível observar a partícula (seta preta) envolvida por tecido conjuntivo mais organizado (seta branca) (HE 10X).

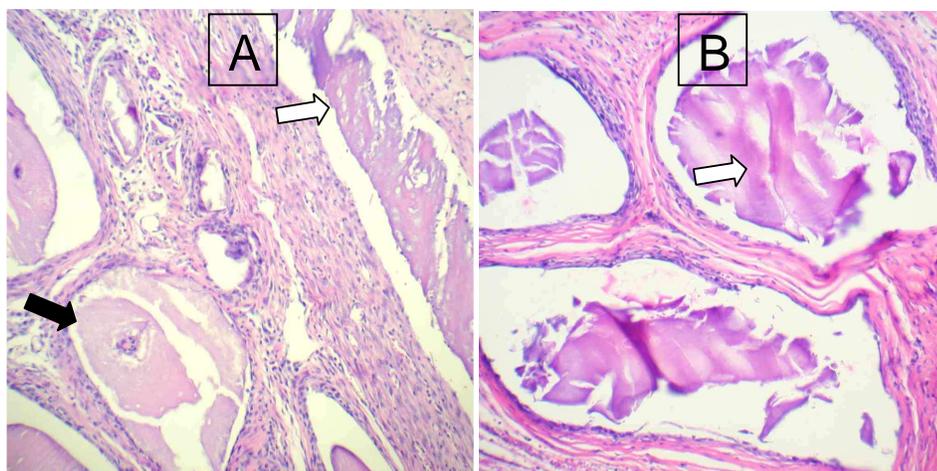


Figura 6 – Fotomicrografias grupo membrana cortical óssea bovina  
+ osso bovino inorgânico  
Fonte: Renata Vianna Unruh (2009).

- A) Fotomicrografia representativa do grupo membrana cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico período de 2 semanas onde foi possível identificar a membrana (seta branca) e as partículas envolvidas por tecido conjuntivo com abundante presença de células (seta preta) (HE 10X).
- B) Fotomicrografia representativa do grupo membrana cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico período de 8 semanas, as partículas (seta branca) estão envolvidas por fibras colágenas e o tecido apresenta menor quantidade de células (HE 10X).

### 3.2 DESCRIÇÃO HISTOMÉTRICA

Os dados analisados estatisticamente forneceram os seguintes resultados: o grupo tratado com a associação de membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico apresenta as maiores médias de percentagem de preenchimento 47,10% e 41,78%, respectivamente, para os períodos de 8 e 2 semanas (tabelas 1 e 2).

Há diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento entre o grupo que recebeu a associação membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico avaliado em 8 semanas e os grupos tratados com osso autógeno, osso bovino inorgânico, membrana de cortical óssea bovina avaliados em 2 semanas e ambos os períodos de avaliação do grupo coágulo (2 e 8 semanas). Também há diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento entre o grupo que recebeu a associação de membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico avaliado em 2 semanas e os grupos tratados com osso autógeno e osso bovino inorgânico avaliados em 2 semanas e ambos os períodos do grupo coágulo (2 e 8 semanas) (tabela 3).

Na sequência, com médias de percentagem de preenchimento semelhantes estão os grupos tratados com osso bovino inorgânico, 39,52% e 30,72% com 8 e 2 semanas respectivamente e membrana de cortical óssea bovina, 38,55% e 30,81% com 8 e 2 semanas respectivamente. Diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento é observada entre o grupo

tratado com osso bovino inorgânico avaliado em 8 semanas e ambos os períodos de avaliação do grupo coágulo (tabela 3). O grupo tratado com osso bovino inorgânico avaliado em 2 semanas apresenta diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento de ambos os períodos de avaliação do grupo coágulo e ambos os períodos de avaliação do grupo tratado com a associação de membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico.

O grupo tratado com membrana de cortical óssea bovina avaliado em 8 semanas apresenta diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento de ambos os períodos do grupo coágulo, e o grupo tratado com membrana de cortical óssea avaliado no período de 2 semanas apresenta diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento do grupo tratado com a associação de membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico de 8 semanas.

O grupo que recebeu osso autógeno apresentou como média de percentagem de preenchimento 34,43% e 28,29%, respectivamente para os subgrupos 8 e 2 semanas. O grupo que recebeu osso autógeno avaliado no período de 8 semanas apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento de ambos os períodos do grupo coágulo. E o grupo que recebeu osso autógeno avaliado no período de 2 semanas apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à média de percentagem de preenchimento de ambos os períodos do grupo coágulo e do grupo tratado com a associação membrana de cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico (tabela 3).

Os menores valores relativos à média de percentagem de preenchimento do grupo coágulo são 21,67% e 20,38%, respectivamente para 8 e 2 semanas (figura 10). A média de percentagem de preenchimento do grupo coágulo avaliado no período de 8 semanas só não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo coágulo avaliado em 2 semanas e o grupo tratado com membrana avaliado em 2 semanas, também não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos coágulo e membrana avaliados em 2 semanas.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas da percentagem do preenchimento segundo grupos no período de 2 semanas

Grupos	n	Média	Desvio Padrão
Autógeno (2 semanas)	12	28,29	5,09
Osso Bovino (2 semanas)	9	30,72	5,53
Membrana (2 semanas)	7	30,81	7,95
Osso Bovino + Membrana (2 semanas)	5	41,78	3,81
Coágulo (2 semanas)	6	20,38	1,95

Fonte: Dados de Pesquisa.

Tabela 2 – Estatísticas descritivas da percentagem do preenchimento segundo grupos no período de 8 semanas

Grupos	n	Média	Desvio Padrão
Autógeno (8 semanas)	10	34,43	5,95
Osso Bovino (8 semanas)	7	39,52	7,03
Membrana (8 semanas)	7	38,55	7,42
Osso Bovino + Membrana (8 semanas)	9	47,10	8,99
Coágulo (8 semanas)	7	21,67	2,27

Fonte: Dados de Pesquisa.

Tabela 3 – Tabela simplificada de comparações múltiplas

	Aut 2s	Aut 8s	Os.B 2s	Os.B 8s	Mb 2s	Mb 8s	Os.B+Mb 2s	Os.B+Mb 8s	Cg 2s	Cg 8s
Aut 2s	28,29						28,29	28,29	28,29	28,29
Autg 8s		34,43							34,43	34,43
Os.B 2s			30,72				30,72	30,72	30,72	30,72
Os.B 8s				39,52					39,52	39,52
Mb 2s					30,81			30,81		
Mb 8s						38,55			38,55	38,55
Os.B+Mb	41,78		41,78				41,78		41,78	41,78
Os.B+Mb	47,10		47,10		47,10			47,10	47,10	47,10
Cg 2s	20,38	20,38	20,38	20,38		20,38	20,38	20,38	20,38	
Cg 8s	21,67	21,67	21,67	21,67		21,67	21,67	21,67		21,67

Fonte: Dados de Pesquisa.

São apresentadas as médias de percentagem de preenchimento observadas em ambos os períodos de avaliação de cada grupo (em amarelo). São destacados em azul os períodos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao período observado (em cada coluna). As médias de preenchimento superiores e que apresentaram diferença estatisticamente significativa ao período observado estão em verde e as médias inferiores em vermelho.

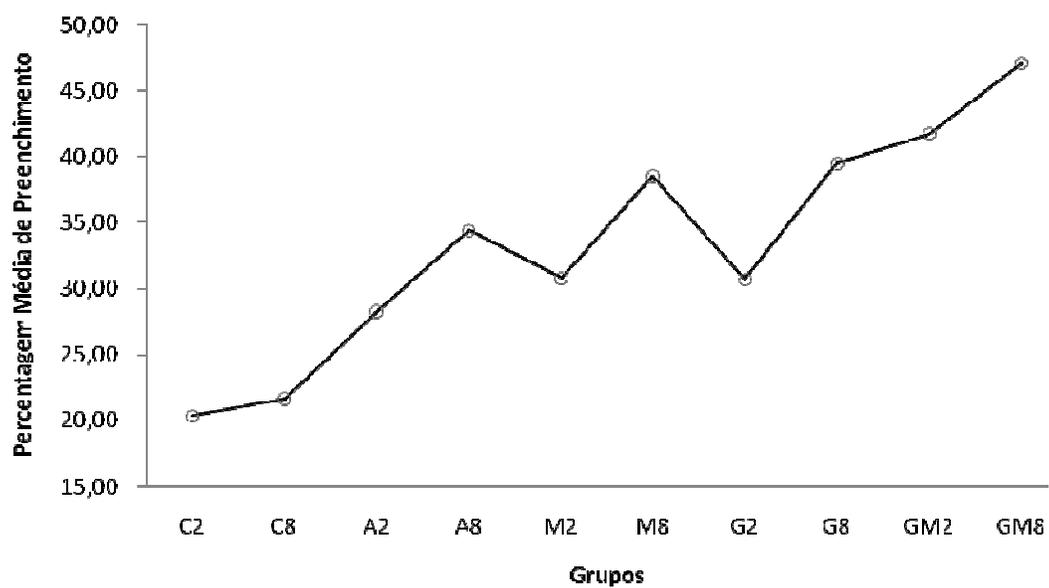


Figura 7 – Percentagem média do preenchimento dos grupos de tratamento.  
Fonte: Dados de pesquisa.

## 4 DISCUSSÃO

Diferentes resultados do ponto de vista histológico são possíveis após intervenção cirúrgica em defeitos periodontais: (1) o crescimento de tecido conjuntivo e epitelial ao longo da superfície radicular, (2) adesão do tecido conjuntivo à superfície radicular a partir do defeito, (3) formação de nova inserção, (4) contato direto entre o osso alveolar e a superfície radicular, chamada anquilose, e (5) a combinação desses eventos.<sup>28</sup> Os materiais empregados nesse estudo demonstraram potencial osteocondutor e exerceram função de preenchimento do espaço cirurgicamente criado. A média de quantidade de preenchimento ósseo alcança aproximadamente 60% em humanos.<sup>7</sup>

Nesse trabalho, foi observado o encapsulamento das partículas de osso bovino inorgânico por tecido conjuntivo e não foram verificados sinais de reabsorção nesse período de avaliação.

O grupo tratado com a associação membrana de cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico independentemente do período de avaliação apresentou as maiores médias de percentagem de preenchimento, embora a neoformação óssea estivesse restrita às bordas do defeito. Como o programa analisador de imagem quantifica o preenchimento através de atribuição de cor à área selecionada, o valor obtido não necessariamente reflete o comportamento do tecido ósseo, mas talvez a densidade da membrana somada à densidade das partículas irregulares do xenoenxerto. O que favoreceu o resultado da associação.

Considerando que a membrana de cortical óssea bovina, usada na técnica de regeneração tecidual guiada como as partículas de xenoenxerto necessitam de tempo para a reabsorção, períodos de observação mais longos são sugeridos para novas avaliações. Porque apesar dos resultados histometricamente favoráveis para os grupos que receberam osso bovino inorgânico e a associação membrana de cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico, não foram observadas osteoindução ou neoformação óssea significativa.

A reabsorção do enxerto de osso bovino mineral é lenta, cinco anos após a cirurgia o material pode ser radiograficamente detectável, e provavelmente o

preenchimento do defeito consiste de uma combinação de partículas de osso bovino e osso humano em regeneração.<sup>23</sup>

A maioria dos substitutos ósseos atua por osteocondução e histologicamente produz limitada regeneração.<sup>8</sup> Planejar o tratamento requer a habilidade de distinguir regeneração verdadeira de preenchimento de espaço com material inerte.<sup>29</sup>

O osso autógeno é referido como material de enxerto padrão ouro<sup>9,11,12,14</sup>, no entanto nesse trabalho o resultado independentemente do período avaliado, ficou aquém da expectativa. Nos defeitos tratados com osso autógeno foram observados centros de ossificação e também partículas encapsuladas. A fragmentação do osso da calvária com cinzel de Oschenbein #1 também produziu partículas irregulares em tamanho e forma impedindo a distribuição uniforme do material no defeito ósseo e o maior contato entre as partículas e as células presentes na região.

A área do defeito avaliada sob microscopia óptica mostra que a neoformação óssea esteve restrita as bordas do defeito independentemente do grupo observado, no entanto, no grupo que recebeu osso autógeno, foi possível observar alguns núcleos de ossificação na proximidade das partículas ósseas após 8 semanas.

Evidência radiográfica de aumento da densidade óssea em geral não é visível até 6 meses após a cirurgia de enxerto, e a avaliação histológica é considerada o método ideal para verificar o real potencial de qualquer enxerto em regenerar o periodonto<sup>7</sup>.

As abordagens regenerativas como o enxerto ósseo e a regeneração tecidual guiada são capazes de influenciar a porção mais apical ou no máximo o componente intra-ósseo do defeito e não oferecem evidências conclusivas sobre seus reais benefícios,<sup>29</sup> mas não há abordagem terapêutica previsível para o componente supra-ósseo. Novos estudos devem ser realizados com períodos mais longos para avaliação, sugere-se a obtenção de partículas de osso autógeno de menor tamanho e a aplicação de sistemas de avaliação mais sensíveis como a imunohistoquímica que permitam a identificação precisa dos elementos celulares.

Embora o grupo que recebeu a associação de membrana de cortical óssea bovina e osso bovino inorgânico tenha apresentado as maiores médias de percentagem de preenchimento 41,78% e 47,10%, a análise da imagem digital não mostra os estágios da reparação, mas sim a densidade do material. Portanto, os números não confirmam a cicatrização dos defeitos ósseos. A avaliação pelo

programa analisador de imagens indica o preenchimento de material inorgânico presente, mas não confirma a reparação óssea.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A avaliação histométrica da cicatrização óssea em calvária de ratos indicou melhores resultados na reparação dos defeitos ósseos agudos padronizados que receberam a associação de membrana de cortical óssea bovina associada ao osso bovino inorgânico, no entanto, a avaliação de imagem digital indica apenas o preenchimento de material e não o reparo ósseo. A avaliação histológica apontou melhores resultados para os defeitos que receberam osso autógeno, nos quais foi possível observar centros de ossificação próximos às partículas.

## REFERÊNCIAS

1. ERSANLI S, OLGAC V, LEBLEBICIOGLU B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol* 2004; **75**:750-55.
2. LIÑARES A, CORTELLINI P, LANG NP, SUVAN J, TONETTI M. Guided tissue regeneration/deproteinized bovine bone mineral or papilla preservation flaps alone for treatment of intrabony defects. II: radiographic predictors and outcomes. *J Clin Periodontol* 2006; **33**:351-358.
3. MARINS LV, CESTARI TM, SOTTOVIA AD, GRANJEIRO JM, TAGA R. Radiographic and Histological Study of Perennial Bone Defect Repair in Rat Calvaria After treatment With Blocks of Porous Bovine Organic Graft Material. *J Appl Oral Sci* 2004; **12**:62-69.
4. CARDOSO A K, BARBOSA JR. AA, MIGUEL FB, MARCANTONIO JR. E, FARINA M, SOARES G D A, ROSA FP. Histomorfometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs* 2006; **184**:128-137.
5. HARTMAN GA, ARNOLD RM, MILLS MP, COCHRAN DL, MELONIG JT. Clinical and Histological Evaluation of Anorganic Bovine Bone Collagen with or without a Collagen Barrier. *Int J Periodontics and Restorative Dent* 2004; **24**:27-35.
6. PAOLANTONIO M, SCARANO A, DI PLACIDO G, TUMINI V, D'ARCHIVIO D, PIATTELLI A. Periodontal healing in humans using anorganic bovine bone peritoneum-derived collagen membrane: a clinical and histologic case report. *Int J Periodontics and Restorative Dent* 2001; **21**:505-515.
7. BRUNSVOLD M, MELLONIG J. Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontology 2000* 1993; **1**:80-91.
8. NEVINS ML, CAMELO M, LYNCH SE, SCHENK RK, NEVINS M. Evaluation of Periodontal Regeneration Following Grafting Intrabony Defects with Bio-Oss Collagen: A Human Histologic Report. *Int J Periodontics and Restorative Dent* 2003; **23**:09-17.
9. BUSENLECHNER D, TANGL S, MIAR B, FUGGER G, GRUBER R, REDL H , WATZEK G. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials* 2008; **29**:3195-3200.
10. MOKBEL N, BOU SERHAL C, MATNI G, NAAMAN N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg* 2008; **12**:73-78.

11. ROSE LR, MEALEY BL, GENCO RJ, COHEN DW. Periodontia – Medicina, Cirurgia e Implantes. In:\_\_\_\_\_. Regeneração Periodontal e Cirurgia Reconstructiva. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2007; 585-592.
12. HERTEN M, ROTHAMEL D, SCHWARZ F, FRIESEN K, KOEGLER G, BECKER J. Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investigations* 2008.
13. CRUZ ACC, POCHAPSKI MT, DAHER JB, SILVA JCZ, PILATTI GL, SANTOS FA. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hidroxyapatites. *Journal of Oral Science* 2006; **48**:219-226.
14. SCULEAN A, BERAKDAR M, CHIANTELLA GC, DONOS N, ARWEILER NB, BRECX M. Healing of intrabony defects following treatment with bovine derived xenograft and collagen membrane. *J Clin Periodontol* 2003; **30**:73-80.
15. SCHWARTZ Z, WEESNER T, VAN DIJK S, COCHRAN DL, MELLONIG JT, LOHMANN CH, CARNES DL, GOLDSTEIN M, DEAN DD, BOYAN BD. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol*, August 2000; **71**:1258-1269.
16. STEPHAN EB, JIANG D, LYNCH S, BUSH P. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol* 1999; **70**:364-368.
17. ZUCHELLI G, AMORE C, MONTEBUGNOLI L, DE SANCTIS M. Enamel Matrix Protines Bovine Porous Bone Mineral in the Treatment of Intrabony Defects: A Comparative Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology* 2003; **74**:1725-1735.
18. ARTZI Z, GIVOL N, ROHRER MD, NEMCOVSKY CE, PRASAD HS, TAL H. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 1: description of a dog model and histological observations. *J Periodontol* 2003; **74**:1143-1152.
19. ACCORSI-MENDONÇA T, CONZ MB, BARROS TC, SENA LA, SOARES GA, GRANJERO JM. Physicochemical characterization of two deproteinized xenografts. *Braz Oral Res* 2008; **22**:5-10.
20. SCABBIA A, TROMBELLI L. Surgical guided: A comparative study on the use of HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intra-osseous defects. *J Clin Periodontol* 2004; **31**:348-55.
21. SCULEAN A, CHIANTELLA GC, WINDISCH P, ARWEILER NB, BRECX M, GERA I. Healing of intrabony defects following treatment with composite bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination with a collagen membrane (Bio-Guide PERIO). *J Clin Periodontol* (2005), **32**:720-724.

22. WENZ B, OESCH B, MARTIN H. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; **22**:1599-1606.
23. SLOTTE C, ASKLÖW B, LUNDGREN D. Surgical guided tissue regeneration treatment of advanced periodontal defects: a 5-year follow-up study. *J Clin Periodontol* 2007; **34**:977-984.
24. STAVROPOULOS F, DAHLIN C, RUSKIN JD, JOHANSSON C. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects - An experimental study in a canine model. *Clin Oral Impl Res* 2004; **15**:435-442.
25. NYGAARD-ØSTBY P, BAKKE V, NESDAL O, NILSSEN HK, SUSIN C, WIKESJÖ UME. Periodontal healing following reconstructive surgery: effect of guided tissue regeneration using a bioresorbable barrier device when combined with autogenous bone grafting. A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008; **35**:37-43.
26. CAMELO M, NEVINS ML, LYNCH SE, SCHENK RK, SIMION M, NEVINS M. Periodontal Regeneration with an Autogenous Bone-Bio-Oss Composite Graft and Bio-Guide Membrane. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2001; **21**:109-19.
27. POEHLING S, PIPPIG SD, HELLERBRAND K, SIEDLER M, SCHÜTZ A, DONY C. Superior effect of MD05, beta-tricalcium phosphate coated with recombinant humangrowth/differentiation factor-5, compared to conventional bone substitutes in the rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2006; **77**:1582-1590.
28. LUNDGREN D, SLOTTE C. Reconstruction of anatomically complicated periodontal defects using a bioresorbable GTR barrier supported by bone mineral. A 6-month follow-up study of 6 cases. *J Clin Periodontol* 1999; **26**:56-62.
29. TONETTI MS, CORTELLINI P, LANG NP, SUVAN JE, ADRIAENS P, DUBRAVEC D, FONZAR A, FOURMOSIS I, RASPERINI G, ROSSI R, SILVESTRI M, TOPOLL H, WALLKAMM B, ZYBUTZ M. Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. *J Clin Periodontol* 2004; **31**:770-76.

**ANEXOS**

## ANEXO A – RESULTADOS

### Teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade de distribuição dos dados para cada grupo

Grupos		Kolmogorov-Smirnov Statistic	df	Valor p
Percentagem do Preenchimento	Autógeno (2 semanas)	0,190854849	12	0,2000
	Autógeno (8 semanas)	0,179072243	10	0,2000
	Osso Bovino (2 semanas)	0,186272374	9	0,2000
	Osso Bovino (8 semanas)	0,183092196	7	0,2000
	Membrana (2 semanas)	0,192658551	7	0,2000
	Membrana (8 semanas)	0,23172673	7	0,2000
	Osso Bovino + Membrana (2 semanas)	0,212367901	5	0,2000
	Osso Bovino + Membrana (8 semanas)	0,166883648	9	0,2000
	Coágulo (2 semanas)	0,129730034	6	0,2000
	Coágulo (8 semanas)	0,176455687	7	0,2000

Fonte: Dados de pesquisa.

### Teste de Lavene para testar a homogeneidade entre os grupos

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Percentagem do Preenchimento	Based on Mean	2,19005299	9	69,00000	<b>0,033057766</b>

Fonte: Dados da Pesquisa.

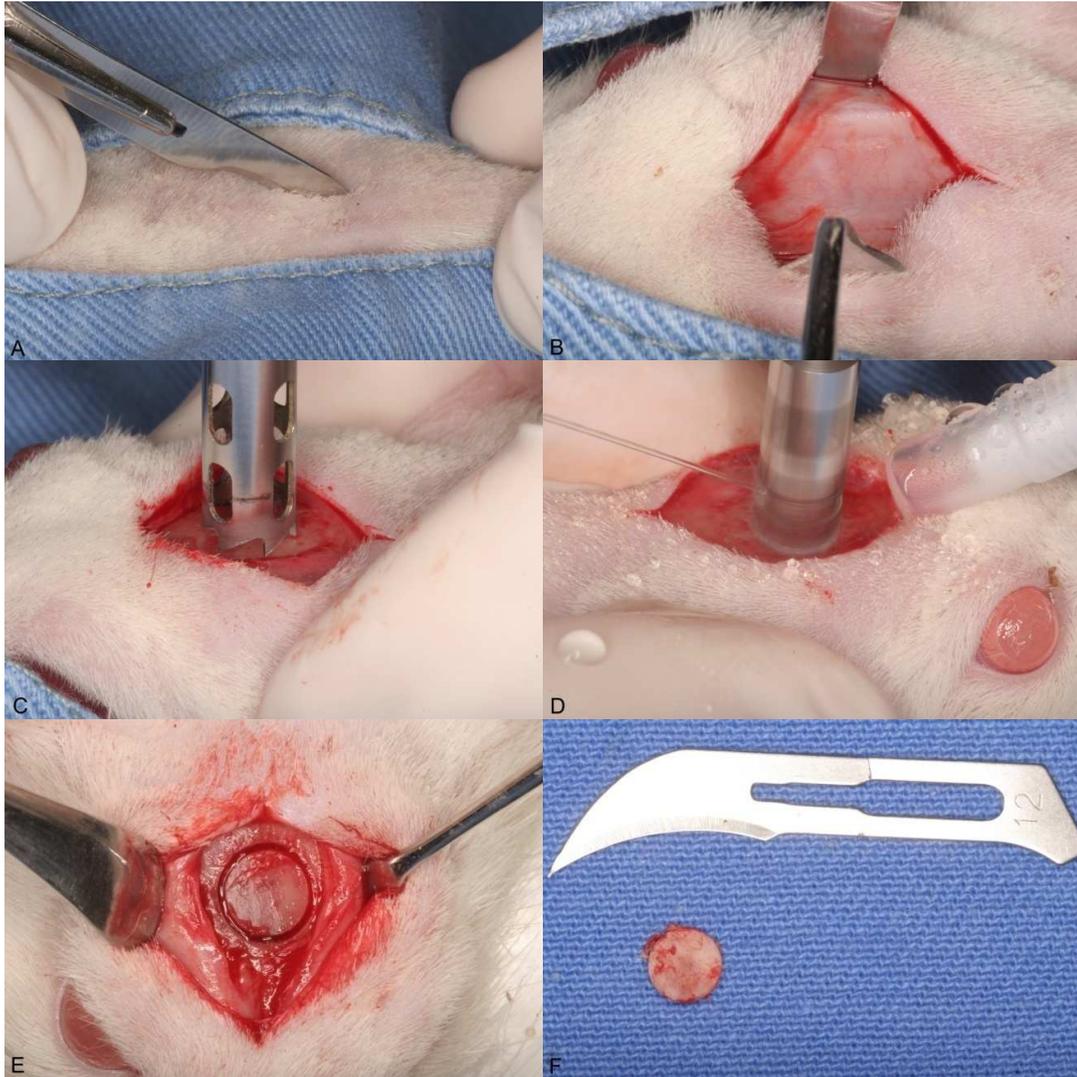
### Teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell para variâncias heterogêneas

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
OA2	OA8	-6,139666667	2,385967163	0,29676	-14,70108543	2,4217521
	OB2	-2,430555556	2,355974883	0,98536	-10,97053094	6,10941983
	OB8	-11,231666667	3,035003685	0,07442	-23,31928001	0,85594667
	M2	-2,520238095	3,346070457	0,99775	-16,12434449	11,0838683
	M8	-10,26595238	3,164599429	0,14436	-22,98474554	2,45284077
	OB+M2	-13,495666667	2,247971474	<b>0,00290</b>	-22,36849324	-4,62284009
	OB+M8	-18,815	3,338448121	<b>0,00296</b>	-31,58848408	-6,04151592
	C2	7,913333333	1,671427957	<b>0,00669</b>	1,798479102	14,0281876
	C8	6,616904762	1,701739132	<b>0,03079</b>	0,436802132	12,7970074
OA8	OA2	6,139666667	2,385967163	0,29676	-2,421752095	14,7010854

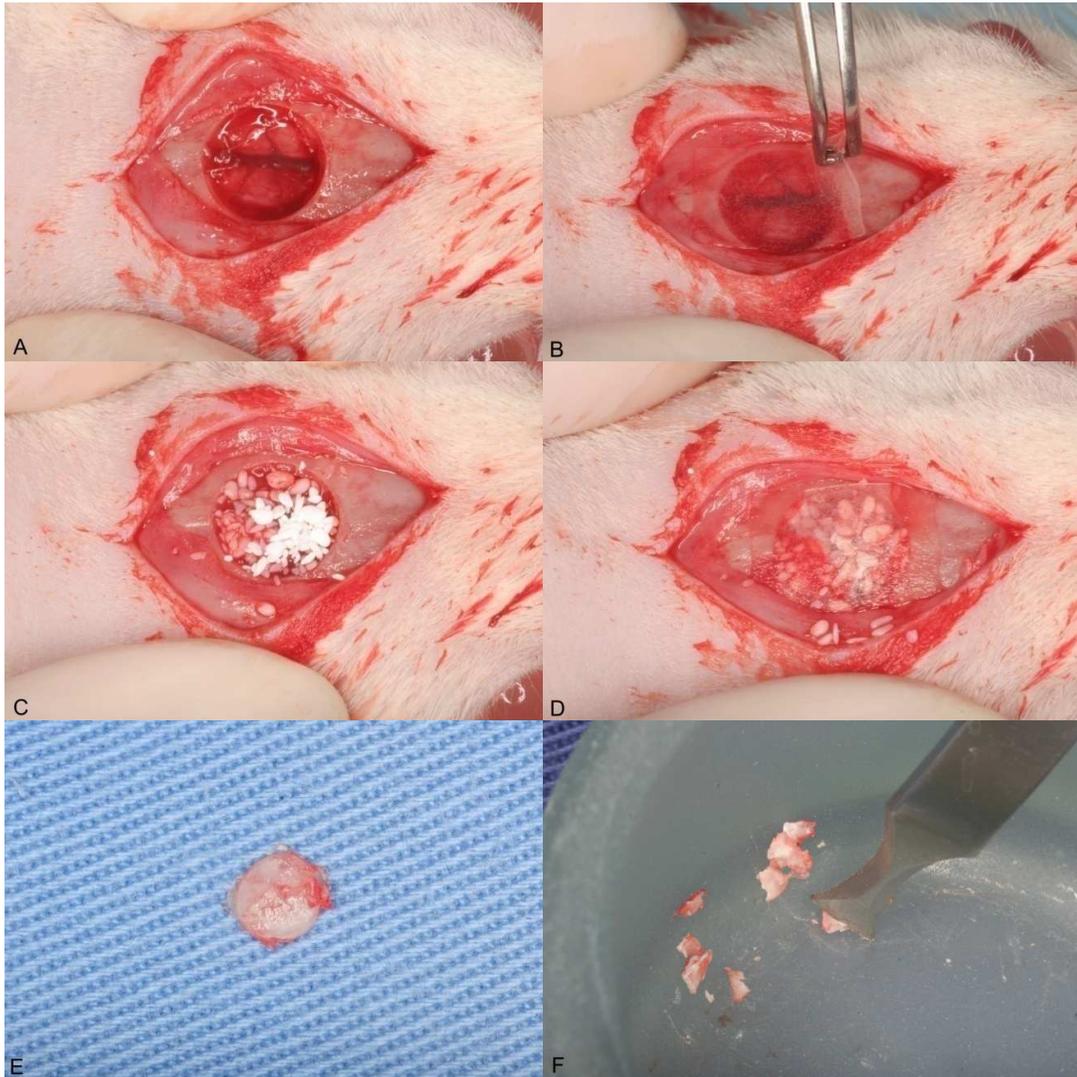
	OB2	3,709111111	2,632272299	0,90822	-5,79963501	13,2178572
	OB8	-5,092	3,254149224	0,84115	-17,5885097	7,4045097
	M2	3,619428571	3,546043896	0,98366	-10,25995062	17,4988078
	M8	-4,126285714	3,375341368	0,95296	-17,19347161	8,94090019
	OB+M2	-7,356	2,536063003	0,20579	-17,05006964	2,33806964
	OB+M8	-12,675333333	3,538852309	0,06438	-25,87437287	0,5237062
	C2	14,053	2,042525697	0,00049	6,242218539	21,8637815
	C8	12,75657143	2,067403174	0,00115	4,9111257	20,6020172
OB2	OA2	2,430555556	2,355974883	0,98536	-6,109419826	10,9705309
	OA8	-3,709111111	2,632272299	0,90822	-13,21785723	5,79963501
	OB8	-8,801111111	3,232223	0,26843	-21,2918046	3,68958238
	M2	-0,08968254	3,525933303	1,00000	-13,9676029	13,7882378
	M8	-7,835396825	3,354207462	0,43679	-20,89863928	5,22784563
	OB+M2	-11,06511111	2,507866404	0,02158	-20,76145456	-1,36876766
	OB+M8	-16,38444444	3,518700614	0,01054	-29,56757718	-3,20131171
	C2	10,34388889	2,00740867	0,00792	2,509113571	18,1786642
	C8	9,047460317	2,032715973	0,02043	1,18410002	16,9108206
OB8	OA2	11,23166667	3,035003685	0,07442	-0,855946672	23,31928
	OA8	5,092	3,254149224	0,84115	-7,404509696	17,5885097
	OB2	8,801111111	3,232223	0,26843	-3,689582381	21,2918046
	M2	8,711428571	4,011587638	0,51852	-6,634270405	24,0571275
	M8	0,965714286	3,861520091	1,00000	-13,77222888	15,7036575
	OB+M2	-2,264	3,154365803	0,99849	-14,88908305	10,361083
	OB+M8	-7,583333333	4,005232044	0,67363	-22,46285366	7,29618699
	C2	19,145	2,773142493	0,00395	7,10370646	31,1862935
	C8	17,84857143	2,791516424	0,00574	5,822203173	29,8749397
M2	OA2	2,520238095	3,346070457	0,99775	-11,0838683	16,1243445
	OA8	-3,619428571	3,546043896	0,98366	-17,49880776	10,2599506
	OB2	0,08968254	3,525933303	1,00000	-13,78823782	13,9676029
	OB8	-8,711428571	4,011587638	0,51852	-24,05712755	6,6342704
	M8	-7,745714286	4,110508186	0,67895	-23,43973251	7,94830393
	OB+M2	-10,97542857	3,454701688	0,16105	-24,96864215	3,017785
	OB+M8	-16,2947619	4,245800733	0,04133	-32,12123328	-0,46829053
	C2	10,43357143	3,110507904	0,15698	-3,215563879	24,0827067
	C8	9,137142857	3,126900075	0,25106	-4,494478713	22,7687644
M8	OA2	10,26595238	3,164599429	0,14436	-2,452840775	22,9847455
	OA8	4,126285714	3,375341368	0,95296	-8,940900186	17,1934716
	OB2	7,835396825	3,354207462	0,43679	-5,227845626	20,8986393
	OB8	-0,965714286	3,861520091	1,00000	-15,70365746	13,7722289
	M2	7,745714286	4,110508186	0,67895	-7,948303934	23,4397325
	OB+M2	-3,229714286	3,279247748	0,98621	-16,41812637	9,9586978
	OB+M8	-8,549047619	4,104305777	0,56402	-23,80962311	6,71152787
	C2	18,17928571	2,914405851	0,00754	5,463772326	30,8947991
	C8	16,88285714	2,93189463	0,01113	4,183580174	29,5821341
OB+M2	OA2	13,49566667	2,247971474	0,00290	4,622840089	22,3684932
	OA8	7,356	2,536063003	0,20579	-2,338069636	17,0500696
	OB2	11,06511111	2,507866404	0,02158	1,368767664	20,7614546
	OB8	2,264	3,154365803	0,99849	-10,36108305	14,889083
	M2	10,97542857	3,454701688	0,16105	-3,017785002	24,9686421
	M8	3,229714286	3,279247748	0,98621	-9,958697799	16,4181264
	OB+M8	-5,319333333	3,447319555	0,85054	-18,55784335	7,91917669
	C2	21,409	1,879480691	0,00058	12,627168	30,190832
	C8	20,11257143	1,906486907	0,00067	11,380087	28,8450559
OB+M8	OA2	18,815	3,338448121	0,00296	6,041515921	31,5884841

	OA8	12,67533333	3,538852309	0,06438	-0,5237062	25,8743729
	OB2	16,38444444	3,518700614	0,01054	3,201311707	29,5675772
	OB8	7,583333333	4,005232044	0,67363	-7,296186993	22,4628537
	M2	16,2947619	4,245800733	0,04133	0,468290529	32,1212333
	M8	8,549047619	4,104305777	0,56402	-6,711527873	23,8096231
	OB+M2	5,319333333	3,447319555	0,85054	-7,919176685	18,5578434
	C2	26,72833333	3,102306848	0,00027	14,17435501	39,2823117
	C8	25,43190476	3,118742124	0,00037	12,87279136	37,9910182
C2	OA2	-7,913333333	1,671427957	0,00669	-14,02818756	-1,7984791
	OA8	-14,053	2,042525697	0,00049	-21,86378146	-6,24221854
	OB2	-10,34388889	2,00740867	0,00792	-18,17866421	-2,50911357
	OB8	-19,145	2,773142493	0,00395	-31,18629354	-7,10370646
	M2	-10,43357143	3,110507904	0,15698	-24,08270674	3,21556388
	M8	-18,17928571	2,914405851	0,00754	-30,8947991	-5,46377233
	OB+M2	-21,409	1,879480691	0,00058	-30,190832	-12,627168
	OB+M8	-26,72833333	3,102306848	0,00027	-39,28231165	-14,174355
	C8	-1,296428571	1,17259882	0,97368	-5,845686959	3,25282982
C8	OA2	-6,616904762	1,701739132	0,03079	-12,79700739	-0,43680213
	OA8	-12,75657143	2,067403174	0,00115	-20,60201716	-4,9111257
	OB2	-9,047460317	2,032715973	0,02043	-16,91082061	-1,18410002
	OB8	-17,84857143	2,791516424	0,00574	-29,87493968	-5,82220317
	M2	-9,137142857	3,126900075	0,25106	-22,76876443	4,49447871
	M8	-16,88285714	2,93189463	0,01113	-29,58213411	-4,18358017
	OB+M2	-20,11257143	1,906486907	0,00067	-28,84505586	-11,380087
	OB+M8	-25,43190476	3,118742124	0,00037	-37,99101816	-12,8727914
	C2	1,296428571	1,17259882	0,97368	-3,252829817	5,84568696

Fonte: Dados de Pesquisa.

**ANEXO B – MATERIAL E MÉTODOS**

A) A imagem mostra o posicionamento da lâmina para executar a incisão; B) A imagem mostra a divulsão dos tecidos; C) Posicionamento da broca trefina para iniciar a perfuração; D) A broca trefina acionada e sob refrigeração; E) Padronização do defeito criado; F) O detalhe mostra a peça óssea removida da calvária.



A) A imagem mostra o defeito criado em calvária de rato no qual haverá formação de coágulo; B) A imagem mostra a colocação de membrana de cortical óssea bovina ultrapassando as bordas do defeito; C) A imagem mostra o preenchimento do defeito com osso bovino inorgânico; D) A imagem mostra o preenchimento do defeito com a associação membrana de cortical óssea bovina + osso bovino inorgânico; E) A imagem mostra a porção da calvária removida que servirá como enxerto autólogo; F) A imagem mostra o osso autólogo sendo triturado pelo cinzel de Oschenbein #1.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)