



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Departamento de CTBMF e Periodontia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)

**Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos
ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos.
Estudo histomorfométrico e microtomográfico.**

Ytalo Freitas Fernandes

PG.PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto

2022

YTALO FREITAS FERNANDES

**Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos
ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos.
Estudo histomorfométrico e microtomográfico.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Odontologia (Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza.

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto.

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Fernandes, Ytalo Freitas.

Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico.

Ribeirão Preto, 2022

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: SÉRGIO LUÍS SCOMBATTI DE SOUZA.

1. Regeneração Óssea 2. Biomaterial 3. Estudo em animal

FERNANDES Y.F. **Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico.** Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha companheira de vida Liana Couto, que sempre esteve ao meu lado durante toda essa trajetória. Aos meus pais por todo amor e incentivo e a minha mãe do coração Maria das Graças por ser uma inspiração de vida para mim.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar chegar até aqui, me dando forças para continuar nos momentos mais adversos dessa caminhada.

Aos meus pais, pelo amor incondicional de sempre.

A minha esposa Liana Couto pelo incentivo, amor e cumplicidade em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Sérgio Scombatti, um dos meus principais incentivadores e um exemplo de profissional a ser seguido, pelo apoio e orientação. Graças a ele eu não desisti de realizar esse sonho.

Ao meu grande companheiro de pesquisa, Rafael Mantovani, por ter sido meu ponto de apoio e meu braço direito durante todo o trabalho.

Aos meus colegas de mestrado: Rafael Chaves, Diana Ramos, Rafaella Scannavino, Larissa Miranda, Mariana Moraes, Gisele e Lucia pelo companheirismo e por fazerem parte dessa jornada.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP- USP, em especial a Luiz Gustavo de Souza, Mila Sprone e Adriana Almeida, fundamentais para o sucesso dessa pesquisa.

Aos meus amigos inseparáveis Henrique Brito, Raquel Jales, Paulo Estênio, Rafael, Erick Barbosa, Junio Cardoso, Julian, Amanda Maciel, Ana Gimenes e Viviane Gravata.

Ao meu amado grupo de Bauru: Alyssa Obeid, Carla Grizel, Grazielle Schimidt, Mariana Paskakulis e Leonardo por sempre me apoiarem.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À CAPES pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

Resumo

Resumo

FERNANDES, Y. F. **Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico.** 2022. X p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022

Diversos estudos têm observado haver grande semelhança entre a estrutura genética do genoma de suínos e da espécie humana. O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados obtidos pelo uso de um enxerto ósseo suíno no reparo ósseo em defeitos críticos criados cirurgicamente em calvária de ratos, por meio de análise microtomográfica (micro-CT) e análise histomorfométrica. Foram utilizados 24 ratos divididos igualmente e aleatoriamente em quatro grupos experimentais, contendo 6 ratos em cada, subdivididos em: Grupo 1 (GC): Grupo controle negativo com coágulo sanguíneo; Grupo 2 (GS): Grupo Suíno, defeito preenchido com substituto ósseo suíno; Grupo 3 (GB): Grupo Bio-Oss, defeito preenchido com substituto ósseo bovino tratado química e termicamente (Geistlich Bio-Oss®). Grupo 4 (GBF): Grupo Bonefill, defeito preenchido por substituto ósseo bovino tratado apenas quimicamente (Bionnovation, Bonefill®). Após a eutanásia, 30 dias depois da cirurgia para colocação do enxerto, realizou-se a remoção em bloco da área do defeito cirúrgico original e dos tecidos circunjacentes, para análise tridimensional por micro-CT e análise histomorfométrica. Para a comparação entre os grupos foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors, sendo considerados os dados normais. O teste paramétrico de Análise de variância (ANOVA), com subteste de Tukey, foi utilizado para a comparação entre grupos após 30 dias, com nível de significância de 5%. Na avaliação por Micro-CT, o grupo com biomaterial de origem suína apresentou resultados estatisticamente significantes, em relação aos grupos Controle, Bio-Oss e Bonefill, para os parâmetros: percentual de volume ósseo (BV/TV: GS=10,99±3,61; GC=1,11±0,40; GB=5,38±3,02; GBF=6,14±3,75); densidade óssea de superfície (BS/TV: GS=12,69±5,57; GC=2,27±1,85; GB=5,08±2,66; GBF=6,87±3,38); número de trabéculas (Tb.N: GS=2,91 ±1,19; GC=0,35±0,29; GB=1,31±0,75; GBF=1,56±0,84) e Conectividade (GS=8087,29±5020,51; GC=2327,29±3397,65; GB=3204,00±2265,24; GBF=2534,00±2499,15). Na análise Histomorfométrica, em relação à extensão de osso neoformado (EON), o grupo de origem suína apresentou resultados semelhantes ao GB e superiores aos GC e GBF (EON: GC=0,40±0,10; GS=0,77±0,30; GB=

0,67±0,35; GBF=0,43±0,07); para área de osso neoformado (AON), o GS foi semelhante a GB e GBF e superior a GC (AON: GC=2,98 ±2,76; GS= 7,86±3,99; GB=6,30±3,62; GBF= 8,94±7,40). O substituto ósseo de origem suína testado em defeitos críticos de calvária de rato apresentou reparo ósseo superior em comparação a dois substitutos ósseos de origem bovina.

Palavras-chave: Regeneração Óssea, Biomaterial, Estudo em Animal

Abstract

Abstract

Several studies have observed that there is great similarity between the genetic structure of the porcine and human genomes species. The aim of this study was to evaluate the results obtained by the use of a porcine bone graft in surgically critical size defects in rat calvaria, through microtomographic (micro-CT) and histomorphometric analysis. Twenty-four rats were divided equally and randomly into four experimental groups, containing 6 rats each, subdivided into: Control Group (CG) - blood clot; Porcine Bone Group (PG) - porcine-derived bone substitute; (BG): Bio-Oss Group (BG) – chemically and heat-treated bovine graft; Bonefill Group (BFG) - chemically treated bovine bone substitute. 30 days after the graft placement surgery the euthanasia of the animals was performed, the area of the original surgical defect and the surrounding tissues were removed in block for three-dimensional micro-CT and histomorphometric analysis. For the comparison between the groups, the Lilliefors normality test was performed, considering the normal data. O teste de normalidade de Lilliefors apontou a normalidade dos dados. ANOVA analysis of variance parametric test with Tukey's subtest were used to compare groups after 30 days. The significance level adopted was 5%. In the Micro-CT evaluation, porcine derived biomaterial group presented statistically significant results, in comparison to the Control, Bio-Oss and Bonefill groups, for the parameters: percentage of bone volume (BV/TV: PG=10, 99±3.61; CG=1.11±0.40; BG=5.38±3.02; BFG=6.14±3.75); surface bone density (BS/TV: PG=12.69±5.57; CG=2,27±1,85; BG=5.08±2.66; BFG=6.87±3.38); number of trabeculae (Tb.N: PG=2.91 ±1.19; CG=0.35±0.29; BG=1.31±0.75; BFG=1.56±0.84) and Connectivity (PG=8087.29±5020.51; CG=2327.29±3397.65; BG=3204.00±2265.24; BFG=2534.00±2499.15). In the Histomorphometric results, the porcine group presented similar results to the Bio-Oss group regarding newly formed bone extension (NBE PG=0.77±0.30; BG= 0.67±0.35) and to the Bio-Oss and Bonefill groups regarding newly formed bone area (NFB PG=7.86±3.99; BG=6.30±3.62; BFG=8.94±7.40). Based on these results, we can conclude that the bone porcine derived substitute offers superior characteristics in comparison to the bovine derived bone substitutes tested in the present work regarding bone density and volume, trabecular thickness, connectivity, and total bone area.

Keywords: Bone Regeneration, Biomaterial, Animal Study

Listas

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	EDS de amostras de enxerto do Grupo Suíno (GS) e Grupo Bonefill (GBF).....	37
Figura 2.	Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de alta resolução de GBF (a/b/c/d) e GS (e/f/g/h), mostrando as características ultraestruturais da superfície dos biomateriais, com ampliação de 70x (a/e), 200x (b/ f), 500x (c/g) e 1500x (d/h).....	38
Figura 3.	Dorso do crânio após tricotomia e antissepsia.....	40
Figura 4.	Deslocamento total do retalho após incisão, expondo o tecido ósseo.....	40
Figura 5.	Criação do DTC com marcação de amálgama.....	41
Figura 6.	Padronização da quantidade de enxerto ósseo utilizado nos grupos GS, GB e GBF	41
Figura 7.	DTC preenchido com substituto ósseo	41
Figura 8.	Membrana de PTFE posicionada.....	42
Figura 9.	Tecido reposicionado e suturado.....	42
Figura 10.	Análise de Micro-CT - reconstruções tridimensionais dos defeitos: A: Grupo Controle; B: Grupo Suíno; C: Grupo Bio-Oss; D: Grupo Bonefill.....	46
Figura 11.	Média ± desvio-padrão dos valores de Densidade Óssea de Superfície (BS/TV). Letras diferentes: representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, p<0,05)	47
Figura 12.	Média ± desvio-padrão dos valores de Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, p<0,05)	48
Figura 13.	Média ± desvio-padrão dos valores de Espessura Trabecular (Tb.Th). Letras diferentes: representam diferença	

	estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$).	49
Figura 14.	Média \pm desvio-padrão dos valores de Número de Trabéculas (Tb.N). O grupo GS apresentou maior valor numérico em relação aos demais grupos. (Letras diferentes: representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ANOVA, $p < 0,05$)	50
Figura 15.	Média \pm desvio-padrão dos valores de Porosidade Total (Po.Tot), em porcentagem. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$)	51
Figura 16.	Média \pm desvio-padrão dos valores de Conectividade. O grupo GS apresentou maior valor em relação aos grupos GC; GB e GBF. (Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos: ANOVA, $p < 0,05$)	52
Figura 17.	Imagens histológicas panorâmicas de todos os grupos experimentais com aumento de 1.6x, coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E). A: Grupo Controle; B: Grupo Suíno; C: grupo Bio-Oss; D: Grupo Bonefill.	54
Figura 18.	Imagens histológicas de todos os grupos experimentais no aumento de 10x. Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.). Imagens A e B: bordas do defeito do Grupo Controle. Imagens C e D: bordas do defeito Grupo Suíno. Imagens E e F: bordas do defeito do grupo que utilizou Bio-Oss. Imagens G e H. Bordas do defeito em que Bonefill foi utilizado. As setas pretas estão mostrando o contato direto entre as partículas do biomaterial e o osso neoformado. As setas brancas indicam tecido ósseo. As setas na cor laranja indicam a membrana de PTFE. As estrelas indicam as partículas do biomaterial. A estrela das fotos G e H representam neoformação óssea onde estava a partícula, substituindo-a por novo osso. O asterisco está indicando área de tecido fibroso não mineralizado.....	55
Figura 19.	Média \pm desvio-padrão dos valores da Área Total. O grupo GS apresentou maior valor em relação aos grupos GC; GB e GBF. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$)	56
Figura 20.	Média \pm desvio-padrão dos valores de Extensão de osso neoformado. O grupo GS apresentou maiores valores em	

relação aos grupos GC e GBF. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$)	57
Figura 21. Média \pm desvio-padrão dos valores para Área de osso neoformado. Os grupos com biomateriais apresentaram maiores valores em relação ao grupo controle, sem diferenças estatísticas entre eles (Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$)	58
Figura 22. Média \pm desvio-padrão dos valores para Área de Partículas Remanescentes. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$)	59
Figura 23. Média \pm desvio-padrão dos valores da extensão linear, calculada em mm. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$)	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APR: Área de partículas remanescentes

AT: Área total

AON: Área de osso neoformado

BS/TV: Densidade óssea de superfície

BV/TV: Porcentagem de volume ósseo

CCI: Coeficiente de correlação intraclasse

Conn: Conectividade

ELD: Extensão linear do defeito cirúrgico criado

EON: Extensão de osso neoformado

HE: Hematoxilina-Eosina

Micro-CT: Microtomografia computadorizada

Po.Tot: Porcentagem de porosidade total

Tb.Th: Espessura trabecular

Tb.N: Número de trabéculas

TM: Tricrômico de Masson

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Por cento

<: Menor a (símbolo matemático)

=: Igual

±: Desvio padrão

N: Tamanho da amostra

P: Probabilidade de significância

°C: Graus Celsius

kV: Quilowatts

μl: Microlitros

mg/mL: Microgramas por mililitro

mg/Kg: Microgramas por quilograma

mL: Mililitros

ml/g: Mililitros por grama

mm: Milímetros

UI/Kg: Unidades internacionais por quilograma

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO A Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	83
ANEXO B Anexo B – Comprovante de submissão do artigo científico para publicação em periódico internacional – <i>Materials</i>	84

Sumário

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Cálculo do tamanho da amostra.....	34
3.2 Comissão de Ética.....	34
3.3 Caracterização da amostra.....	34
3.4 Preparação do enxerto de origem suína.....	35
3.5 Caracterização de enxertos derivados de suínos e bovinos.....	36
3.6 Procedimento Cirúrgico.....	39
3.7 Eutanásia e coleta de material para análise.....	42
3.8 Análises Realizadas.....	43
3.8.1 Análise por ,Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) ...	43
3.8.2 Análise histomorfométrica.....	43
3.9 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Análise Microtomográfica (Micro-CT)	46
4.2 Análise Histomorfométrica.....	53
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	69
8. ANEXOS.....	83

Introdução

Introdução

O tecido ósseo apresenta grande potencial de reparo. Entretanto, em casos de perdas extensas, isso pode não acontecer de forma adequada (Barreto & Duarte, 2013). Por esse motivo, muito se tem estudado sobre o processo de regeneração óssea e as formas possíveis para viabilizar a realização desse processo. (Carmagnola et al., 2008; Iezzi et al., 2008; Lee et al., 2008; Jensen et al., 2009; Stavropoulos & Karring 2010; Ezirganli et al., 2014). A possibilidade de reconstruir defeitos ósseos significa propiciar uma melhora significativa nos diversos tratamentos reabilitadores. Para alcançar tal objetivo, tem-se lançado mão do uso de diferentes tipos de enxertos ósseos.

Potter & Ellis, (2004) afirmaram que um biomaterial ideal para enxertia óssea deveria possuir as seguintes características: biocompatibilidade, ser quimicamente inerte, não alérgico, não cancerígeno, possuir custo acessível, ser passível de esterilização sem que houvesse alteração de sua composição química, ser de fácil manipulação e de fácil conformação durante a realização do ato cirúrgico, apresentar boa estabilidade quando adaptado, apresentar radiopacidade, bem como ser reabsorvível e substituível por novo tecido ósseo.

Os enxertos ósseos podem ser classificados, quanto à sua origem, em: autógenos, alógenos, aloplásticos e xenógenos (Costa & Veinstein, 1994). É consenso na literatura que os enxertos autógenos, principalmente devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, além da presença de fatores de crescimento e de células-tronco, são o “padrão ouro” nos processos regenerativos (Ezirganli et al., 2015). Porém, algumas variáveis, como por exemplo a extensão da área a ser reabilitada, a taxa de reabsorção não controlada e a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, podem por vezes impossibilitar sua utilização. (Habal et al., 1992; Hallman & Thor 2008; Alam et al., 2009).

Kaptein et al. (1998) afirmaram que o uso de osso autógeno tem a desvantagem de requerer uma segunda cirurgia no local doador, e está associado a risco adicional de morbidade e queixas clínicas. Corroborando essa afirmativa, Castania (2002) ressaltou que a obtenção do enxerto autógeno pode implicar em risco ao paciente, devendo-se levar em conta o aumento da morbidade pós-operatória e o possível

enfraquecimento do sítio doador. Outro fator importante é que a remoção do osso autógeno leva ao aumento do tempo cirúrgico total. As principais áreas doadoras intrabucais para a enxertia autógena incluem a região do mento, túber da maxila e região retromolar. Contudo, sua indicação está limitada, principalmente, à presença de volume ósseo necessário para a aplicação no defeito (Faverani et al., 2014).

Visando solucionar esses problemas, os substitutos ósseos têm evoluído como uma alternativa ao osso autógeno. Os enxertos xenógenos são biomateriais obtidos de doadores de outras espécies, principalmente bovinos. Estes substitutos ósseos possuem, essencialmente, um potencial osteocondutor, oferecendo estabilização ao coágulo nas primeiras fases da cicatrização e fornecendo suporte para nova reparação óssea nas fases posteriores, sendo ainda, química e fisicamente, semelhantes ao osso humano (Tsonis et al., 2002; Tadjodin et al., 2003; Polimeni et al., 2004). Por razões de segurança biológica, materiais xenogênicos de origem bovina precisam ser completamente desproteinizados por meio de processos térmicos ou químicos, para eliminar o risco de transmissão de bactérias, vírus ou partículas de príons (Lei et al., 2015). Existem evidências de que o aquecimento de enxertos bovinos afeta suas características morfológicas e estruturais, e modifica significativamente seu desempenho biológico (osteocondutividade) e cristalinidade. (Pramanik et al., 2013; De Carvalho et al., 2018).

A literatura apresenta diversos trabalhos demonstrando bons resultados obtidos pelo uso desse tipo de enxerto (Berglundh & Lindhe 1997; Artzi et al. 2000; Froum et al., 2002; Carmagnola et al., 2003; Nevins et al., 2006; Carmagnola et al., 2008; Iezzi et al., 2008; Lee et al., 2008; Jensen et al., 2009; Stavropoulos & Karring 2010; Ezirganli et al., 2015). Tadjodin et al. (2003) descrevem que o crescimento ósseo, pelo uso de enxertos xenógenos, dá-se através da orientação de células osteogênicas das superfícies ósseas existentes para as partículas enxertadas, levando à formação de tecido ósseo entre elas, conectando-as em uma massa de tecido mineralizado. A estrutura física do enxerto constitui um arcabouço, permitindo a migração de células e elementos vasculares que facilitarão o reparo ósseo, favorecendo a osteocondução (Berglundh et al., 1997; Yoshikawa et al., 2000).

Um dos biomateriais xenógenos mais pesquisados na Odontologia, que tem mostrado bons resultados tanto para defeitos periodontais quanto para cirurgias de

implante, é o Bio-Oss® (Geistlich AG, Wolhusen, Suíça). Ele é composto por uma matriz mineral de osso bovino cortical ou medular, desproteínizado, e tem como vantagens apresentar similaridade estrutural ao osso humano, biocompatibilidade, propriedades osteocondutivas e comprovada interação com o osso regenerado (Hallman M & Thor 2008; Araújo et al., 2008; Araújo et al., 2011). Diversos estudos encontraram formação óssea satisfatória quando da utilização de osso bovino desproteínizado (Fukota et al., 1992; Klinger et al., 1992; Haas et al., 1998; Hurzeler et al., 1997).

Apesar de enxertos ósseos bovinos terem seu uso amplamente difundido na odontologia, Sogal & Tofe, (2009) avaliaram o risco de transmissão de Encefalopatia Epongiforme Bovina (EEB), e concluíram que existe o risco da doença de Creutzfeldt-Jacob em humanos associada à transmissão pelos substitutos ósseos de origem bovina. Kim et al., (2011) em uma revisão sistemática, também ressaltaram a possibilidade do risco de transmissão de EEB em humanos por meio do uso de substitutos ósseos de origem bovina. Os pesquisadores concluíram que biomateriais derivados de enxerto bovino podem apresentar um risco de transmissão de príons para pacientes, embora o risco não possa ser quantificado pelas informações e pesquisa disponíveis atualmente. Mais recentemente, Kim et al., (2016), em outra pesquisa sobre o risco de transmissão dos príons, relataram que a capacidade de rastrear príons dentro do genoma animal é limitada e que existe um período de latência longo para a manifestação da doença (1 a mais de 50 anos) em pacientes infectados. Esse fato, segundo os pesquisadores, fornece embasamento para discutir os possíveis riscos a longo prazo dos xenoenxertos.

Diante do exposto, a possibilidade de se obter um enxerto ósseo de origem suína, animal já amplamente utilizado na área da saúde, com boa biocompatibilidade e menor risco biológico em relação a outras espécies animais, parece ser uma alternativa promissora para o uso clínico.

A maioria dos tecidos e órgãos suínos são notavelmente semelhante aos humanos, tanto estrutural quanto fisiologicamente. Tal fato inclui coração e sistema circulatório, rim, pâncreas, fígado, pulmões e até a pele, que é quase indistinguível histologicamente (Sachs D.H et al., 1994). Diversos pesquisadores concordam que os suínos seriam uma boa opção de fonte de enxerto xenógeno por razões que

incluem, por exemplo, a sua boa disponibilidade. Esses animais têm grandes tamanhos de ninhada, o que possibilita a seleção de filhotes apropriados para reprodução, além de atingirem maturidade sexual relativamente precoce, com cerca de quatro a cinco meses, e um ciclo reprodutivo a cada três semanas (Sachs D.H et al., 1994; Sykes M & Sachs D.H 2019).

Comparações de sequências entre as regiões do DNA de humanos e de porcos mostrou haver semelhança de nucleotídeos variando de 85-100%. A extensão da preservação da ordem linear de genes, ao longo dos segmentos cromossômicos entre o porco e o homem, como no caso do alinhamento do cromossoma humano 3 e do cromossoma 13 suíno, indica conteúdos genéticos quase idênticos (Sun et al., 1999). Além disso, com o avanço na área da engenharia genética, é possível modificar genes suínos, principalmente através do desenvolvimento de metodologias de edição de genes baseadas em CRISPR-Cas9 (Bendixen et al., 2010; Sykes M & Sachs D.H 2019). Essa modificação genética pode superar mecanismos de rejeição e incompatibilidades fisiológicas, bem como reduzir o risco de transmissão de patógenos (Deng S et al., 2019).

Assim, biomateriais de origem suína têm sido também muito utilizados em Odontologia, apresentando bons resultados (Camelo et al., 2012; Rotundo et al., 2012; Lima et al., 2015). Recentemente, um novo substituto ósseo particulado de origem suína foi desenvolvido por empresa presente no mercado nacional (Bionnovation Biomedical, Bauru, São Paulo). O tecido ósseo utilizado para manufatura provem de ossos longos, sendo aproveitados tanto tecido ósseo medular quanto cortical. Após seleção das peças, as mesmas são processadas fisicamente com jatos de água pressurizados e aquecidos, sendo estes complementados com raspagem mecânica, para remoção de matéria orgânica aderida aos ossos. Depois, as peças são cortadas em tamanhos menores para facilitar a separação das partes medular e cortical, as quais são processadas seguindo a mesma sequência de eventos (descrita a seguir), mas com variações de tempos (o osso cortical, por ser mais denso, vai exigir processamento mais demorado em alguns passos do processo). Em seguida, os fragmentos ósseos, divididos em medular e cortical, recebem processamento físico em um equipamento desenvolvido exclusivamente para utilizar força gravitacional e jato de água pressurizado aquecido em ambiente fechado. Este equipamento acelera a remoção de gordura e demais restos

orgânicos através da rotação e pressão da água aquecida. Depois disso, os restos orgânicos finais são removidos por meio da fase de processamento químico, no qual o produto é lavado com bases fortes e soluções em concentrações variadas de compostos alcoólicos e são removidas proteínas e gorduras porventura remanescentes das fases anteriores. Posteriormente, estas amostras são trituradas em grânulos menores, até o tamanho entre 0,25 e 1mm de diâmetro. Depois disso, recebem o tratamento químico final, com posterior lavagem abundante na qual todos os produtos químicos utilizados são removidos e inativados. Em seguida, as amostras recebem processamento térmico para remoção de derivados de carbono e os grânulos são selecionados, removendo partículas que estejam fora do tamanho de 0,25 a 1mm de diâmetro. Amostras são retiradas para análise de qualidade, e passam por testes padronizados para testar a presença de restos orgânicos. Havendo resultado adequado nesta análise (ou seja, ausência de remanescentes orgânicos), o produto é fracionado nas embalagens finais na proporção de 70% de osso medular e 30% de osso cortical (em peso), e segue para esterilização por radiação gama.

Schmitz & Hollinger (1986) definiram defeito de tamanho crítico (DTC) como sendo um defeito que não possui a capacidade de realizar regeneração óssea de forma natural e espontânea. O DTC criado em calvária de ratos é considerado pela literatura um modelo experimental bem aceito para avaliar o reparo ósseo com o uso de substitutos ósseos (Schmitz & Hollinger 1986; Donos et al., 2004). De acordo com Donos et al., (2004) defeitos ósseos de 5,0 mm de diâmetro não conseguem se regenerar de forma espontânea, sendo, portanto, considerados um DTC.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) tem sido amplamente utilizada para análises morfométricas tridimensionais, sendo relativamente sensível para medir massa óssea e a sua estrutura microscópica (Molon et al, 2013; Bouxsein et al, 2010; Exirganli et al, 2011). As vantagens da micro-CT incluem: alta resolução em uma única varredura tridimensional, fácil escolha da área a ser estudada e não interferência de artefatos (Chackartchi et al, 2011; De Smet et al, 2006). Do mesmo modo, a histomorfometria é um exame padrão utilizado para quantificar estruturas ósseas, permitindo a análise do processo de reabsorção e ganho ósseo através de avaliações quantitativas de estruturas visualizadas em lâminas histológicas

(Murakami et al, 1999; Ahn et al, 2008), apresentando alta precisão para esses parâmetros.

Frente às vantagens mencionadas pelo uso de enxertos xenógenos nos processos regenerativos e diante das similiaridades encontradas entre o genoma humano e suíno, parece interessante investigar um novo biomaterial de origem suína, no intuito de conhecer seu comportamento biológico no reparo ósseo e fornecer embasamento científico para possibilitar sua futura aplicabilidade clínica no campo da Odontologia, avaliando parâmetros microtomográficos e histomorfométricos, em modelo experimental em animais.

Objetivos

Objetivos

O propósito deste estudo foi avaliar os resultados obtidos pelo uso de um substituto ósseo de origem suína no reparo ósseo de defeitos críticos criados cirurgicamente em calvária de ratos, em comparação a substitutos ósseos de origem bovina, por meio de:

- a) Análise microtomográfica, avaliando a Densidade óssea de superfície (BS/TV), Porcentagem de volume ósseo (BV/TV), Espessura trabecular (Tb.Th), Número de trabéculas (Tb.N) e Porcentagem de porosidade total (Po.Tot);
- b) Análise histomorfométrica, avaliando a Área total de osso (AT), Área de osso neoformado (AON), Extensão linear do defeito cirúrgico criado (ELD), Extensão de osso neoformado (EON) e a Área de partículas remanescentes (APR) (esta última apenas nos grupos em que serão utilizados substitutos ósseos).

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

3.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo de tamanho amostral foi realizado utilizando-se aplicativo para internet Dhand, N. K., & Khatkar, M. S. (2014). Statulator: An online statistical calculator. Sample Size Calculator for Comparing Two Independent Means. Accessed 10 March 2022 at <http://statulator.com/SampleSize/ss2M.html>) com o objetivo de comparar o resultado entre duas médias para uma variável selecionada. Estudos anteriores deste grupo forneceram dados para a variável selecionada de área de neoformação óssea, sendo eleita a busca por diferença de 1 unidade entre as médias de dois grupos, sendo um controle e um grupo teste, com desvio padrão de 0,5 unidade. Para poder de 90% com nível de significância de 5%, teste de duas caudas e grupos de mesmo tamanho, o tamanho amostral calculado foi de 6 animais por grupo. Dessa forma, o tamanho amostral calculado foi de 6 animais por grupo. Assim, um total de amostra de 24 animais foi alcançado para obter um resultado significativo.

3.2 Comissão de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal do Campus da USP-Ribeirão Preto. Processo nº 2018.1.579.58.0 (Anexo A). Os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 Caracterização da amostra

Foram utilizados 24 ratos machos (Rato *Sprague Dawley*), com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 250g-300g, provenientes do biotério central da FORP-USP. Os animais ficaram acomodados em gaiolas metabólicas e submetidos a um período de 7 dias de aclimação com o ambiente e com a equipe de execução do projeto. A sala tinha temperatura ambiente controlada entre 23,5 e 24,5°C com ciclo de luz de 12 horas por dia. Durante todo o experimento os animais receberam ração sólida e água filtrada Ad libitum e ficaram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Os animais foram divididos igualmente e aleatoriamente em quatro grupos experimentais, contendo 6 ratos cada.

- Grupo 1 (GC): Grupo controle negativo, no qual o defeito ósseo foi ser preenchido apenas com coágulo sanguíneo.
- Grupo 2 (GS): Grupo de Osso Suíno, onde o defeito ósseo foi preenchido com substituto ósseo de origem suína (Bionnovation, Bauru, São Paulo, Brasil).
- Grupo 3 (GB): Grupo Bio-Oss, no qual o defeito ósseo foi preenchido com substituto ósseo bovino inorgânico tratado quimicamente e termicamente (Geistlich Bio-Oss® Wolhusen, Suíça).
- Grupo 4 (GBF): Grupo BoneFill, no qual o defeito foi preenchido com enxerto ósseo bovino tratado apenas quimicamente, sem tratamento térmico (Bionnovation, Bonefill®, Bauru, São Paulo, Brasil).

3.4 Preparação do enxerto de origem suína

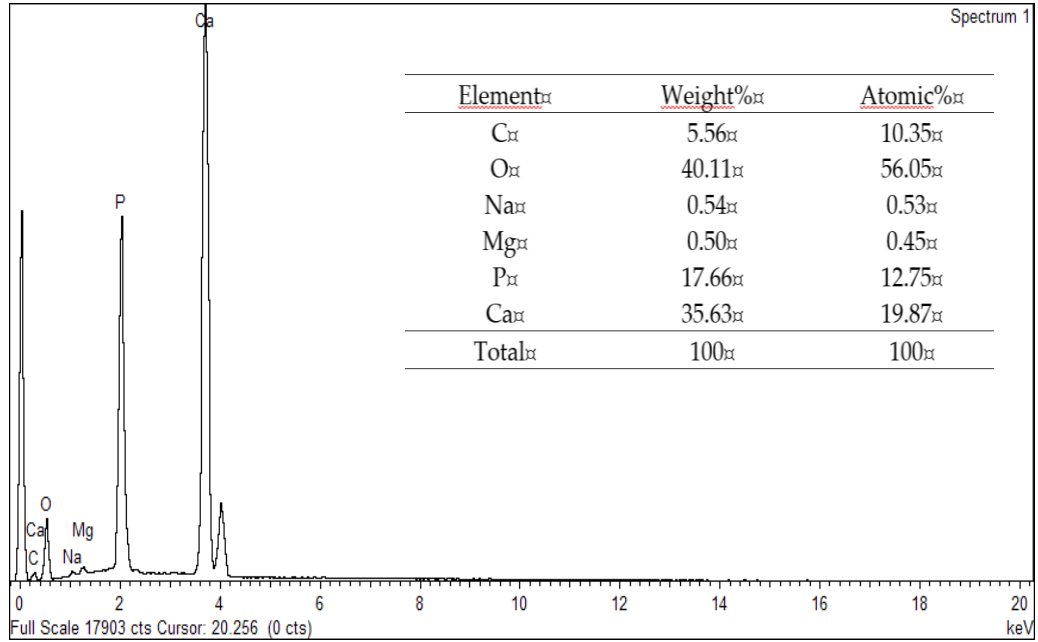
Para o preparo do enxerto, foram utilizadas as porções medular e cortical dos ossos longos suínos. Um processo físico com jatos de água pressurizados e aquecidos foi aplicado inicialmente nas peças ósseas, complementado com raspagem mecânica para remover o material orgânico que estava aderido. Em seguida, os ossos foram cortados em tamanhos menores para facilitar a separação das porções medular e cortical, que foram processadas seguindo a mesma sequência de eventos, mas com variações no tempo (o osso cortical, por ser mais denso, requer maior tempo de processamento em alguns passos). Em seguida, os fragmentos ósseos, divididos em porções medulares e corticais, receberam um processamento físico em equipamento de força gravitacional e jato de água aquecido pressurizado, em ambiente fechado. Este equipamento acelera a remoção de gordura e restos orgânicos através da rotação e pressão da água aquecida. A seguir, os restos orgânicos finais, como proteínas e gorduras, foram removidos por meio de um processo químico, no qual o produto é lavado com bases fortes e soluções em diferentes concentrações de compostos alcoólicos. Posteriormente, as peças foram trituradas em grânulos menores, entre 0,25 e 1 mm de diâmetro. Em seguida, o osso recebeu o tratamento químico final, com posterior lavagem

abundante em água para remover ou inativar todos os produtos químicos utilizados anteriormente. Os fragmentos ósseos foram então submetidos a um processamento térmico (a 600°C) para remoção de compostos orgânicos derivados do carbono. Partículas com tamanhos diferentes da faixa entre 0,25 mm a 1 mm de diâmetro foram então removidas. Em seguida, o enxerto passou por análise de qualidade, por meio de testes padronizados para presença de restos orgânicos. Após aprovação da análise de qualidade, o produto foi disposto nas embalagens finais com proporção (em peso) de 70% de osso medular e 30% de osso cortical, e finalmente esterilizado por radiação gama.

3.5 Caracterização de enxertos derivados de suínos e bovinos

Os enxertos utilizados nos grupos suíno e bonefill foram caracterizados estrutural e quimicamente. Para identificar e caracterizar a composição de elementos químicos presentes nos enxertos, foram realizadas medidas de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) utilizando um sistema INCAX-Sight (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido), com tensão de 15 kV, spot 5.0, distância de trabalho de 10 mm (Figura 1). Um microscópio eletrônico de varredura (SEM) Quanta 400 FEG D8630 (FEI Company, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) foi usado para analisar a morfologia ultra-estrutural dessas superfícies, e as micrografias eletrônicas de varredura representativas são mostradas na Figura 2.

GS



GBF

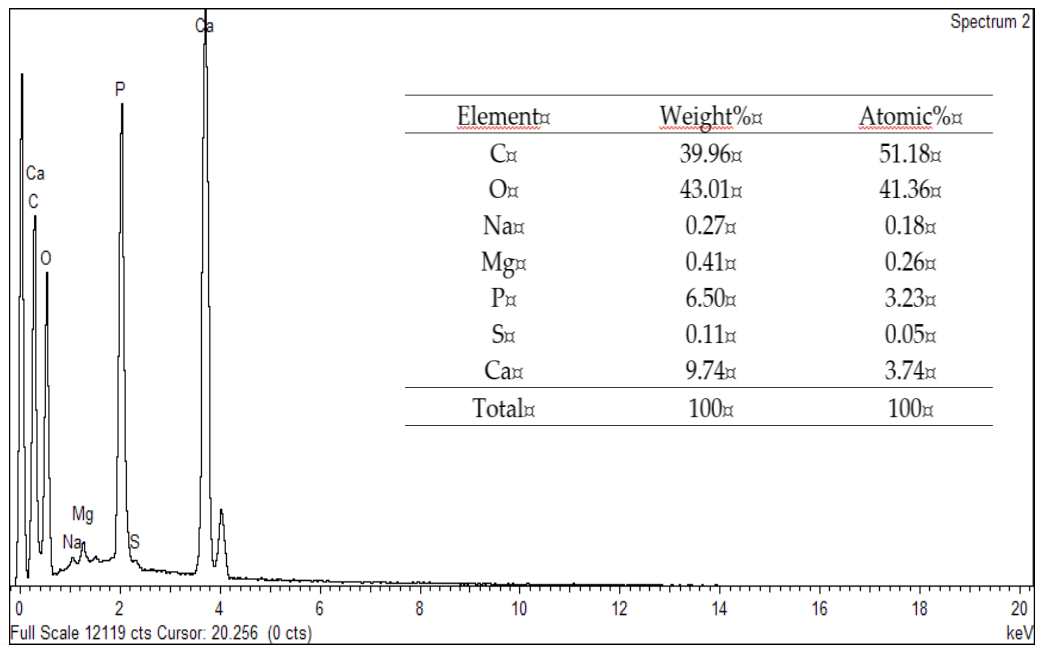


Figura 1. EDS de amostras de enxerto do Grupo Suíno (GS) e Grupo Bonefill (GBF).

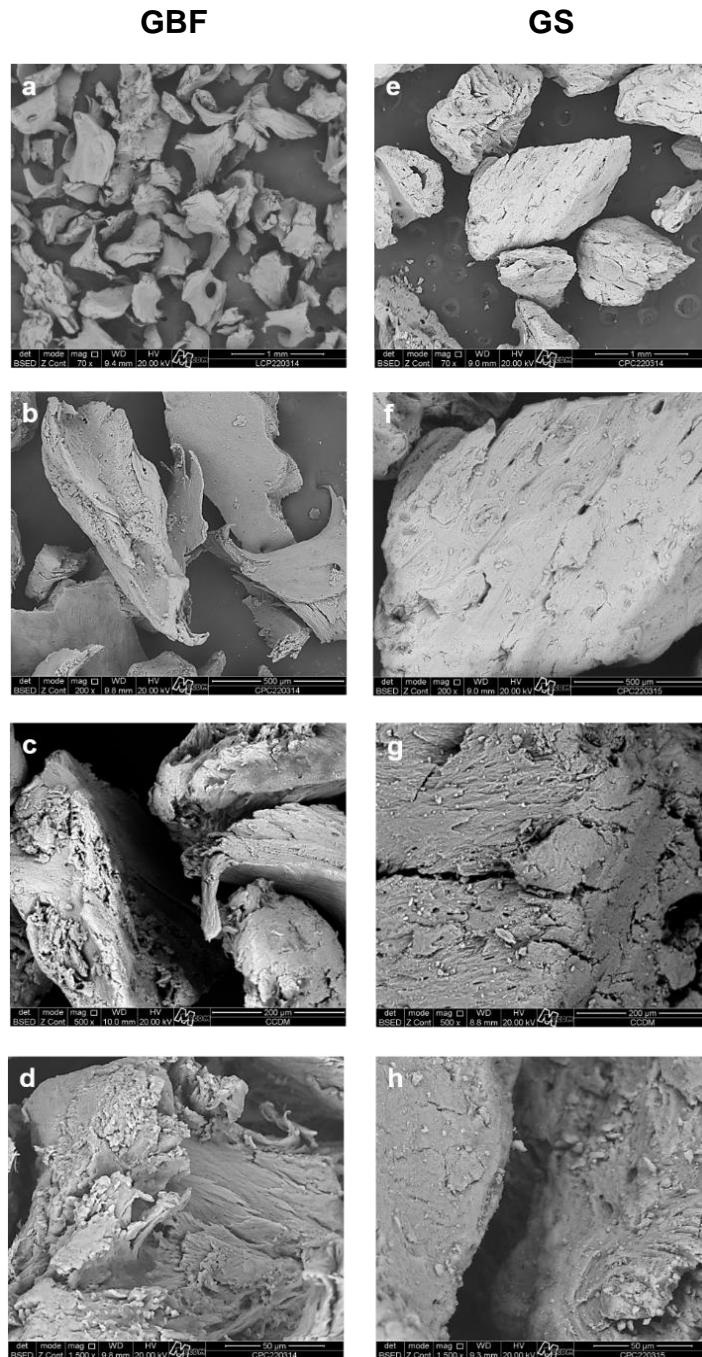


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de alta resolução de GBF (a/b/c/d) e GS (e/f/g/h), mostrando as características ultraestruturais da superfície dos biomateriais, com ampliação de 70x (a/e), 200x (b/ f), 500x (c/g) e 1500x (d/h).

3.6 Procedimento Cirúrgico

Previamente à realização do ato cirúrgico, os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/mL) (Rompum® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/mL) (Dopalen® - Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, SP, Brasil) nas concentrações de 10mg/Kg e 80mg/Kg, respectivamente. Após anestesia, foi realizado a tricotomia e antisepsia da região dorsal do crânio, utilizando Iodopovidine (PVPI) a 1%. Uma incisão semi-lunar foi então realizada para possibilitar o acesso ao tecido ósseo e o deslocamento total do retalho. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro foi realizado com auxílio de uma trefina (Broca Trefina 5 mm, Harte Instrumentos Cirúrgicos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) adaptada em contra-ângulo de baixa rotação sob irrigação abundante com solução salina fisiológica estéril (0,9%), preservando a dura-máter para manter a integridade encefálica do animal.

Para facilitar a identificação da região central do defeito ósseo original nos procedimentos laboratoriais e histomorfométricos, duas marcações de 2mm, uma anterior e outra posterior ao DTC foram confeccionadas e preenchidas com amálgama. Para tal procedimento, utilizamos brocas diamantadas (Ponta diamantada #2200, KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) em alta rotação, sob irrigação constante com solução salina estéril (0,9%).

Nos animais do Grupo 1, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos apenas com coágulo sanguíneo. Nos animais do Grupo 2, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos com osso suíno. No Grupo 3, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos com o substituto ósseo bovino (Geistlich Bio-Oss® small, Wolhusen, Suíça). E, nos animais do Grupo 4, os defeitos foram reenchidos também com enxerto ósseo bovino (Bionnovation, Bonefill®, Bauru, São Paulo, Brasil). Em todos os grupos, o defeito ósseo foi recoberto por uma membrana de teflon (PTFE Surgitime, Bionnovation, Bauru, São Paulo, Brasil) recortada nas dimensões de 10mm de largura por 10mm de altura. Nos grupos que utilizamos enxertos ósseos, a quantidade de material inserido foi mensurada igualmente em 0,02 mL, utilizando uma seringa de 1 mL adaptada.

Com os materiais mencionados em posição foi realizado o fechamento primário dos tecidos por meio de suturas utilizando fios absorvíveis (Vicryl Ethicon 5.0, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). No período trans-cirúrgico, foi aplicada injeção intramuscular de 2 mg/Kg de cloridrato de tramadol (Agner União®, Apucarana, PR, Brasil) para promover analgesia trans e pós-cirúrgica. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção via intramuscular de 24.000 UI/Kg de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Animal Health®, Campinas, SP, Brasil).

No pós-operatório foi administrado injeção via intramuscular de 24.000 UI/kg de Penicilina G-benzatina na dose de 0,01 mL (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e anti-inflamatório via intramuscular Banamine® 0,2mL/100g (Injetável Pet - Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil). Os animais operados ficaram sob observação constante e os mesmos foram colocados em caixas de polipropileno autoclaváveis (3 animais por caixa) para a recuperação anestésica.



Figura 3. Dorso do crânio após tricotomia e antissepsia



Figura 4. Deslocamento total do retalho após incisão, expondo o tecido ósseo.

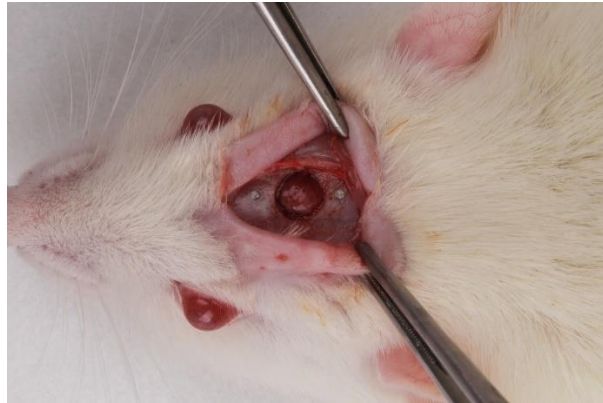


Figura 5. Criação do DTC com marcação de amálgama.

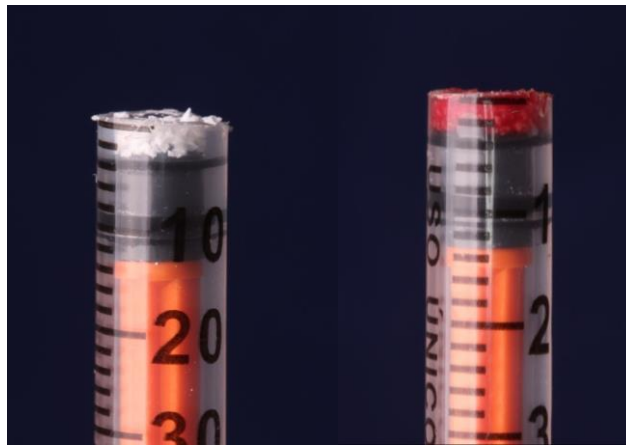


Figura 6. Padronização da quantidade de enxerto ósseo utilizado nos grupos GS, GB e GBF.



Figura 7. DTC preenchido com substituto ósseo



Figura 8. Membrana de PTFE posicionada



Figura 9. Tecido reposicionado e suturado

3.7 Eutanásia e coleta de material para análise

A eutanásia dos 32 animais foi realizada com aprofundamento anestésico de Lidocaína 10mg/mL (0,7mg/Kg) e Tiopentato de sódio 2,5% (150 mg/kg) (Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal no período de 30 após a realização das cirurgias. Em seguida, foi realizada a remoção em bloco da área do defeito cirúrgico original e dos tecidos circunjacentes, para análise tridimensional por micro-CT e análise histomorfométrica.

3.8 Análises Realizadas

3.8.1 Análise por microtomografia computadorizada (Micro-CT)

As peças foram escaneadas por um sistema de microtomografia computadorizada (micro-CT) de feixe cônico (Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios-X foi operado a um potencial de 50 kV detectados por uma câmera de 11 megapixels com resolução de até 1µm. Um examinador calibrado realizou as análises utilizando o software CT-Analyser® v.1.13.5.1+ (Bruker, Kontich, Bélgica). (Calefi et al., 2017)

Os seguintes parâmetros tomográficos foram verificados: Densidade óssea de superfície (BS/TV), Porcentagem de volume ósseo (BV/TV), Espessura trabecular (Tb.Th), Número de trabéculas (Tb.N), Porcentagem de porosidade total (Po.Tot) e Conectividade.

3.8.2 Análise histomorfométrica

Fixação e Desidratação

Após a coleta, os fragmentos foram fixados em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas. A desidratação das peças foi feita pelo uso crescente de solução de etanol (70%, 80%, 90% e 95%). As peças foram então incluídas em parafina, sendo padronizadas pelo auxílio de uma inclusora Histo Embedder (Leica Reichert & Jung Products - Heidelberg, Alemanha).

Secção

A divisão das peças foi feita tomando como referência a marcação de amálgama, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original. Foram confeccionados cortes histológicos longitudinais com 5 µm de espessura iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original e montados em lâminas de vidro. Em seguida, foi realizada a desparafinização dos cortes utilizando xilol, hidratados em série decrescente de etanol, ficando 5 minutos em cada concentração. Foi iniciada com etanol a 100%, repetindo-se por duas vezes, seguido por concentrações 95%, 90%, 80%, 70% e 50%. Para a coloração das lâminas usou-se a técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.).

Histomorfometria

Para capturar os cortes histológicos, foi utilizado um microscópio trinocular para campo claro e fluorescência (modelo DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heidelberg, Alemanha) com objetiva de 1,6 acoplada a uma câmera DFC300FX. Para mensurar a área foi utilizado um software de aquisição e análise de imagens (LAS EZ versão 4.1.0, Leica Microsystems®).

Os parâmetros que foram avaliados incluem: Área total (AT) em mm² do defeito originalmente criado; área de osso neoformado (AON); extensão de osso neoformado (EON); Área de partículas remanescentes (APR) nos grupos em que se utilizou o substituto e extensão linear do defeito cirúrgico criado (ELD).

3.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas por examinador calibrado e sem conhecimento dos grupos experimentais. Para calibração do examinador, um terço da amostra foi avaliada em dois períodos de tempo com um intervalo de 48 horas. O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) foi utilizado para determinar a reprodutibilidade do examinador nas duas avaliações realizadas. Valores de CCI maiores que 90% foram considerados para assegurar a calibração do examinador. Os dados obtidos foram normalizados e analisados através do software estatístico Prism 5 (GraphPad, San Diego, EUA).

O teste de normalidade de Lilliefors apontou a normalidade dos dados. Os testes paramétricos de análise de variância (ANOVA), com subteste de Tukey foram utilizados para comparação entre grupos. Foi utilizado o software Bioestat (Instituto Mamirauá - Tefe Amazonas Brasil), com nível de significância de 5%, para todas as análises realizadas.

Resultados

Resultados

4.1 Análise Microtomográfica (Micro-CT)

Foram analisados os seguintes parâmetros: densidade da superfície óssea (BS/TV), que corresponde à razão entre a área da superfície óssea e o volume total da região de interesse, expressa em 1/mm; porcentagem de volume ósseo (BV/TV), que consiste na razão entre o volume ósseo e o volume total da área de interesse, expressa em %; (Tb.Th) que é a espessura média das trabéculas, expressa em mm; número de trabéculas (Tb.N) que corresponde ao número de trabéculas, expressa em 1/mm; Porosidade Total (Po.tot), porcentagem de poros por área analisada; e Conectividade (Conn), que é definida como uma medida do grau no qual uma estrutura está multiplamente conectada, ou seja, o número máximo de conexões que podem ser rompidas antes que a estrutura seja separada em duas partes.

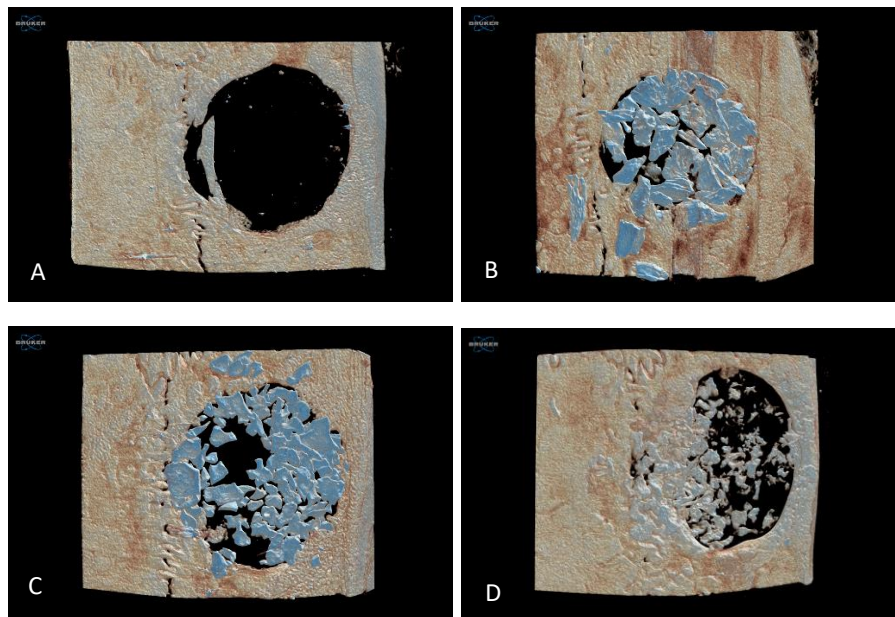


Figura 10. Análise de Micro-CT - reconstruções tridimensionais dos defeitos: A: Grupo Controle; B: Grupo Suíno; C: Grupo Bio-Oss; D: Grupo Bonefill.

Análise Intergrupos

Em relação à densidade óssea de superfície (BS/TV, em 1/mm) houve diferenças estatisticamente significantes entre GS ($12,69 \pm 5,57$) versus GC ($2,27 \pm 1,85$), GB ($5,08 \pm 2,66$) e GBF ($6,87 \pm 3,38$). (Figura 11).

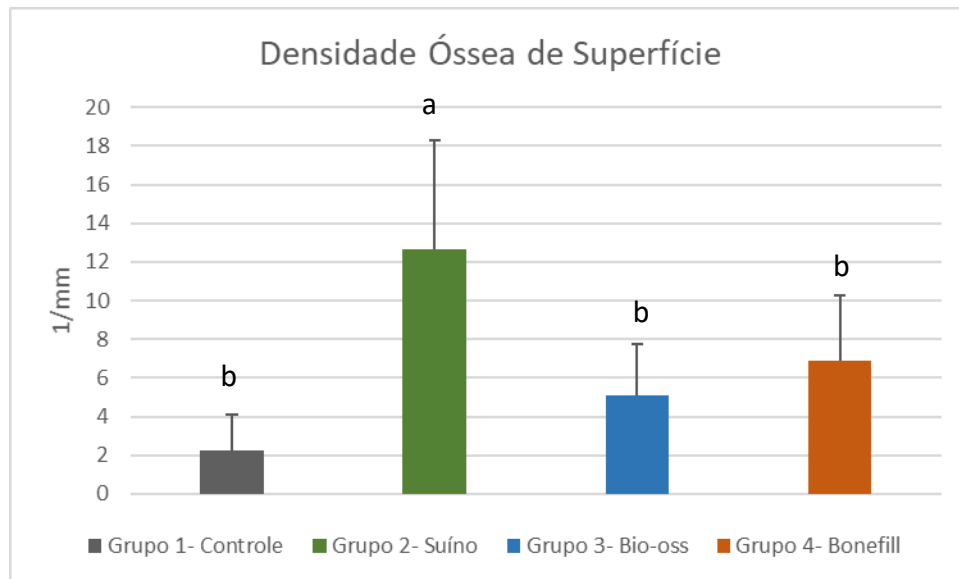


Figura 11. Média \pm desvio-padrão dos valores de Densidade Óssea de Superfície (BS/TV). Letras diferentes: representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

Na análise da Porcentagem de Volume Ósseo em relação ao volume total (BV/TV, em %) foram observadas diferenças estatisticamente significantes do GS ($10,99 \pm 3,61$) *versus* GC ($1,11 \pm 0,41$), GB ($5,38 \pm 3,02$) e GBF ($6,14 \pm 3,75$). Também houve diferenças estatisticamente significantes do GB e GBF *versus* GC, com melhores resultados para GB e GBF (Figura 12).

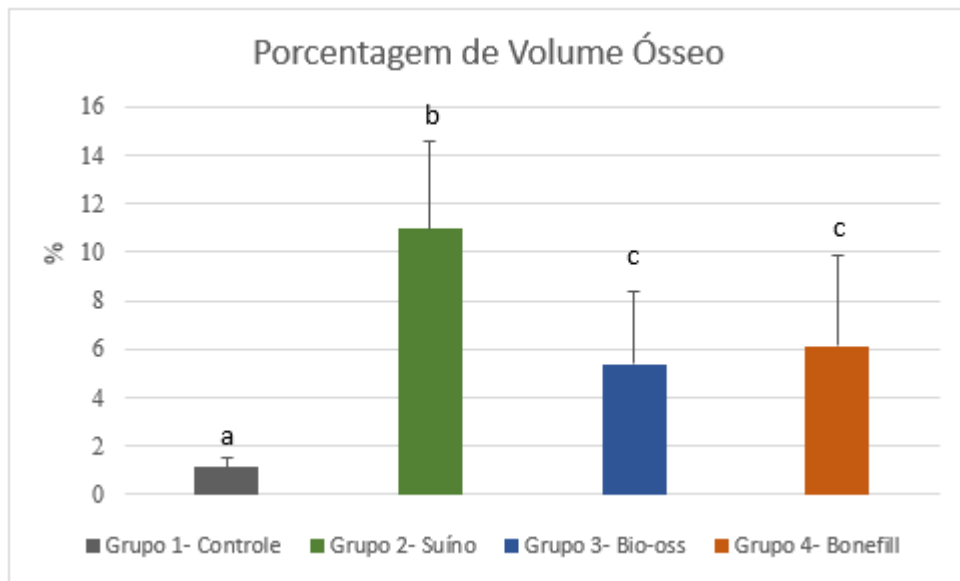


Figura 12. Média \pm desvio-padrão dos valores de Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

No que diz respeito à Espessura Trabecular (Tb.Th), os valores foram: GC ($0,03 \pm 0,01$), GS ($0,04 \pm 0,01$), GB ($0,04 \pm 0,01$), GBF ($0,05 \pm 0,01$). Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre GBF *versus* GC (Figura 13).

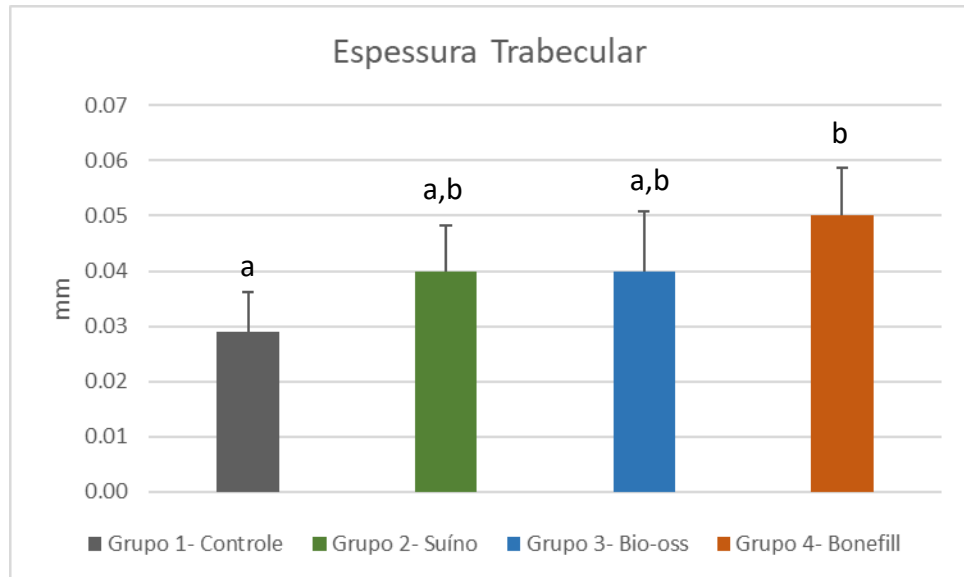


Figura 13. Média \pm desvio-padrão dos valores de Espessura Trabecular (Tb.Th). Letras diferentes: representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

Na análise do Número de Trabéculas (Tb.N), houve diferença estatisticamente significativa entre GS ($2,91 \pm 1,19$) versus GC ($0,35 \pm 0,29$), GB ($1,31 \pm 0,75$) e GBF ($1,56 \pm 0,84$), com maior número médio de trabéculas para o GS. Também se observou diferença estatisticamente significativa entre GBF ($1,56 \pm 0,84$) versus GC ($0,35 \pm 0,29$) (Figura 14).

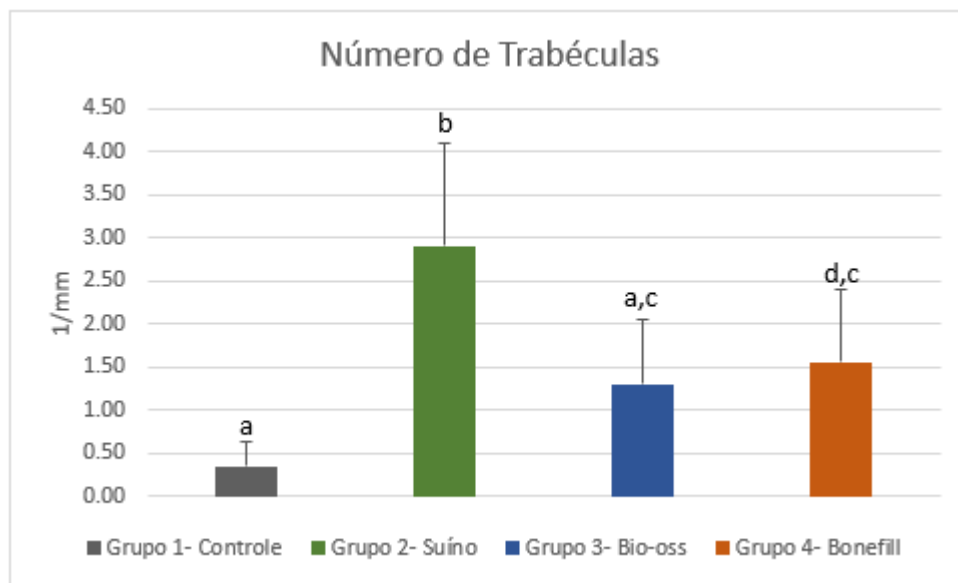


Figura 14. Média \pm desvio-padrão dos valores de Número de Trabéculas (Tb.N). O grupo GS apresentou maior valor numérico em relação aos demais grupos. (Letras diferentes: representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ANOVA, $p < 0,05$).

Quanto à Porcentagem de Porosidade Total (Po.Tot, em %), os valores foram: GC ($97,48 \pm 3,46$); GS ($94,03 \pm 2,88$); GB ($93,56 \pm 3,21$); GBF ($90,32 \pm 5,70$). Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre GC *versus* GBF (Figura 15).

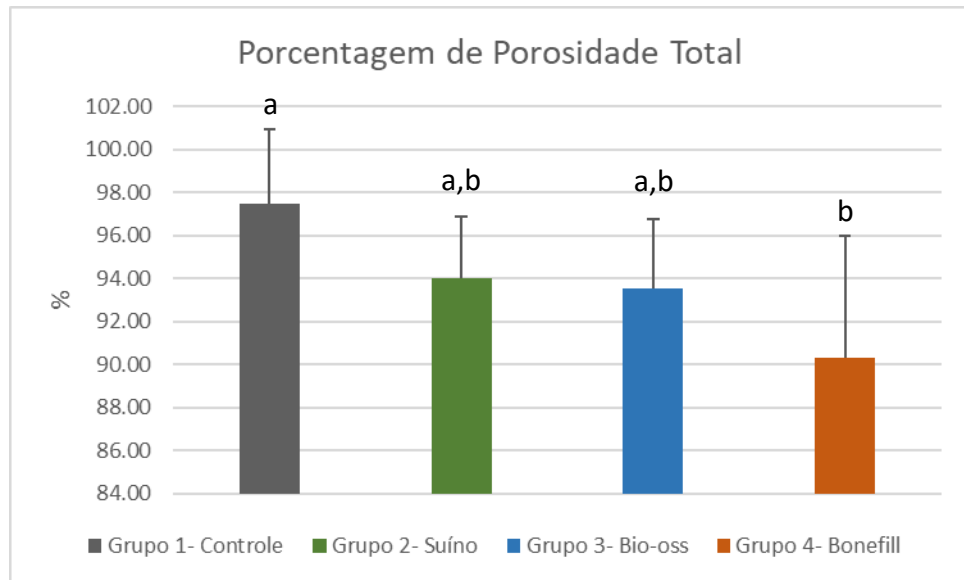


Figura 15. Média \pm desvio-padrão dos valores de Porosidade Total (Po.Tot), em porcentagem. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

Na análise da Conectividade (Figura 16), foi observada diferença estatisticamente significativa entre GS ($8087,29 \pm 5020,51$) versus GC ($2327,29 \pm 3397,65$), GB ($3204,00 \pm 2265,24$) e GBF ($2534,00 \pm 2499,15$).

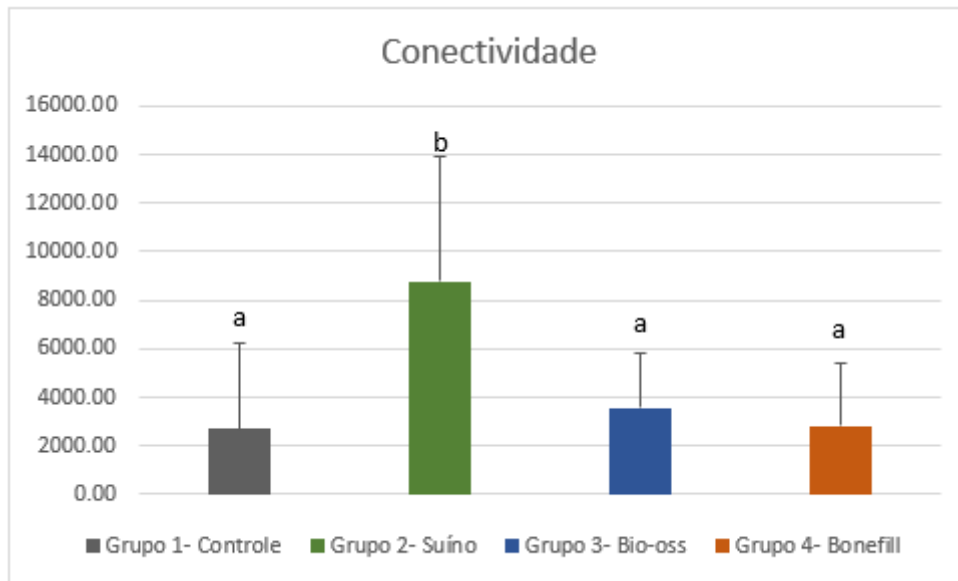


Figura 16. Média \pm desvio-padrão dos valores de Conectividade. O grupo GS apresentou maior valor em relação aos grupos GC; GB e GBF. (Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos: ANOVA, $p < 0,05$).

4.2 Análise Histomorfométrica

Foram avaliados histomorfometricamente os seguintes parâmetros: Área total (AT) do defeito originalmente criado, em mm²; área de osso neoformado (AON) no interior da AT, calculada em porcentagem da AT; área de partículas remanescentes (APR) nos grupos em que se utilizou o substituto ósseo e também mensurada em porcentagem da AT; extensão linear do defeito cirúrgico criado (ELD), tendo como limites as extremidades delimitadas para a medida de AT, expressa em mm; e extensão de osso neoformado (EON), também calculada e expressa em mm.

As imagens panorâmicas de todos os grupos analisados estão representadas na Figura 17.

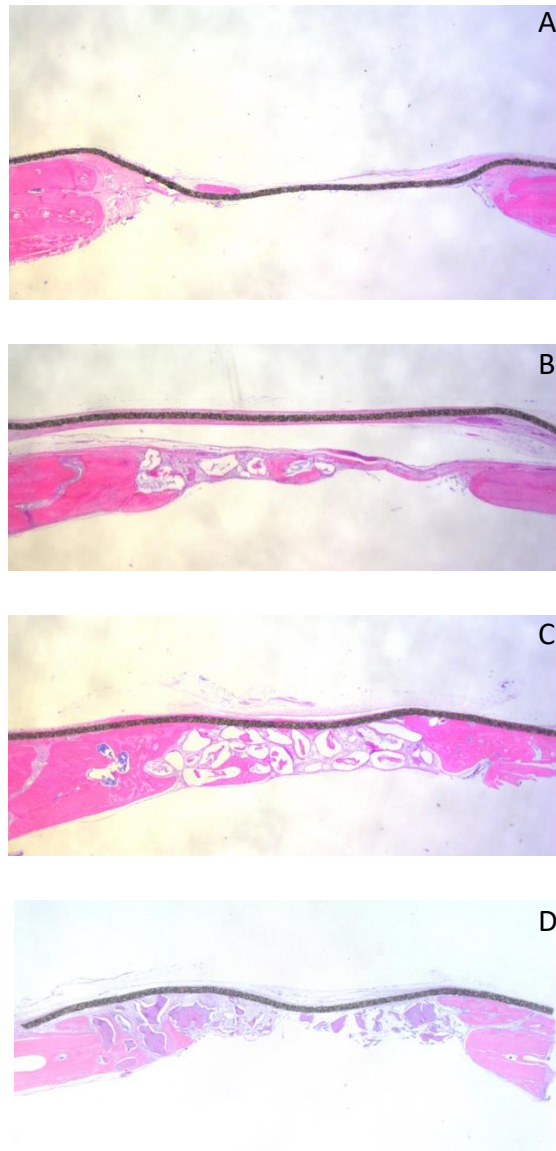


Figura 17. Imagens histológicas panorâmicas de todos os grupos experimentais com aumento de 1.6x, coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E). A: Grupo Controle; B: Grupo Suíno; C: grupo Bio-Oss; D: Grupo Bonefill.

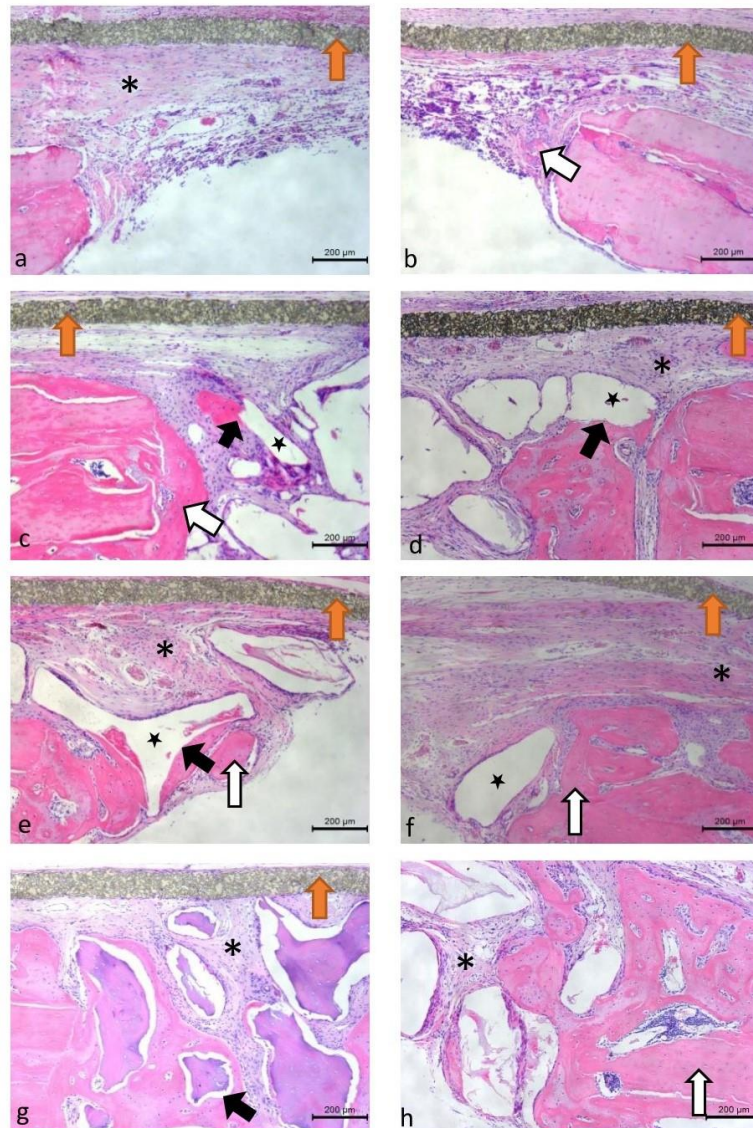


Figura 18. Imagens histológicas dos grupos experimentais com aumento de 10x. Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) Imagens a e b: bordas do defeito no Grupo Controle; c-d. o defeito do Grupo Suíno; e-f. bordas do defeito no Grupo Bio-Oss; g-h. Bordas do defeito no Grupo Bonefill. Setas pretas: Contato direto entre as partículas do biomaterial e o osso recém-formado. Setas brancas: Tecido ósseo. Setas laranja: membrana PTFE. Estrelas pretas: partículas remanescentes do biomaterial. Asteriscos: área de tecido fibroso não mineralizado

Análise Intergrupos

Na análise da área total (AT), houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo GS ($5,14 \pm 0,34$) *versus* GC ($4,59 \pm 0,41$), GB ($4,53 \pm 0,42$) e GBF ($4,47 \pm 0,32$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos GC, GB e GBF (Figura 19).

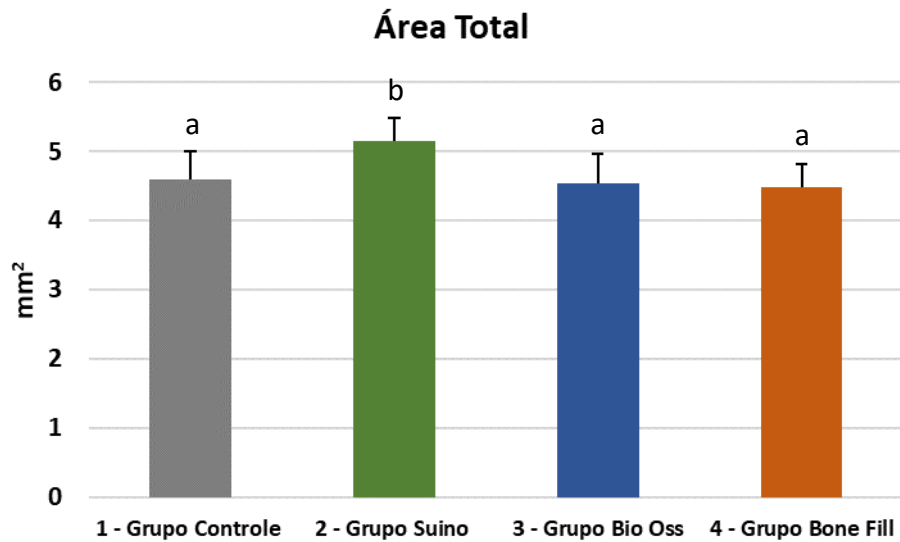


Figura 19. Média \pm desvio-padrão dos valores da Área Total. O grupo GS apresentou maior valor em relação aos grupos GC; GB e GBF. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

Quanto à Extensão de osso neoformado (EON), foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre GS ($0,77\pm 0,30$) *versus* GC ($0,40\pm 0,10$) e GBF ($0,43\pm 0,07$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre GB ($0,67\pm 0,35$) *versus* GS ($0,77\pm 0,30$), GC ($0,40\pm 0,10$) e GBF ($0,43\pm 0,07$) (Figura 20).

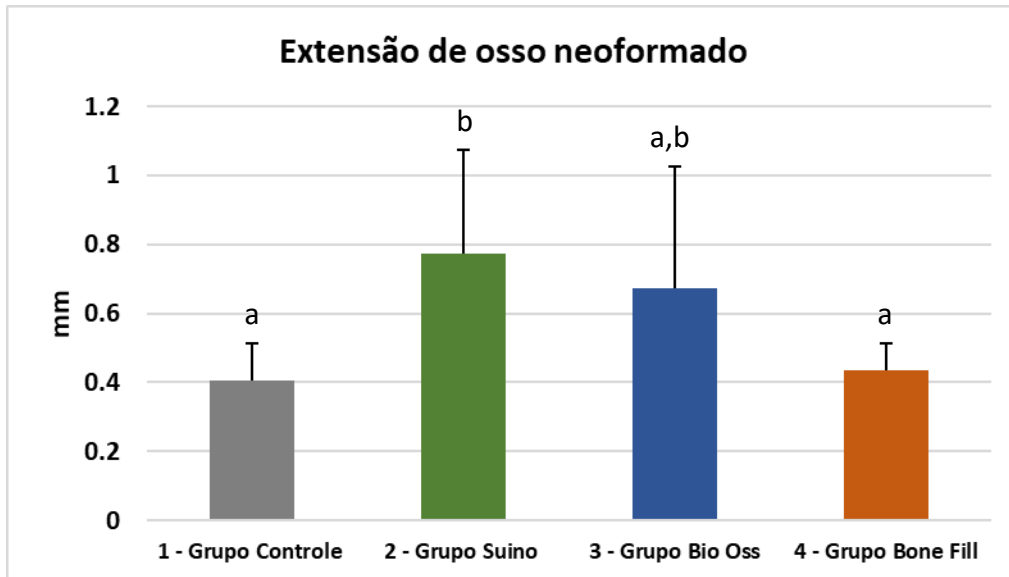


Figura 20. Média \pm desvio-padrão dos valores de Extensão de osso neoformado. O grupo GS apresentou maiores valores em relação aos grupos GC e GBF. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

Para o parâmetro Área de osso neoformado (AON), houve diferença estatisticamente significativa entre GC ($2,98 \pm 2,76$) versus GS ($7,86 \pm 3,99$), GB ($6,30 \pm 3,62$) e GBF ($8,94 \pm 7,40$), com melhores resultados para os grupos em que foram utilizados substitutos ósseos. Entre os grupos GS, GB e GBF não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 21).

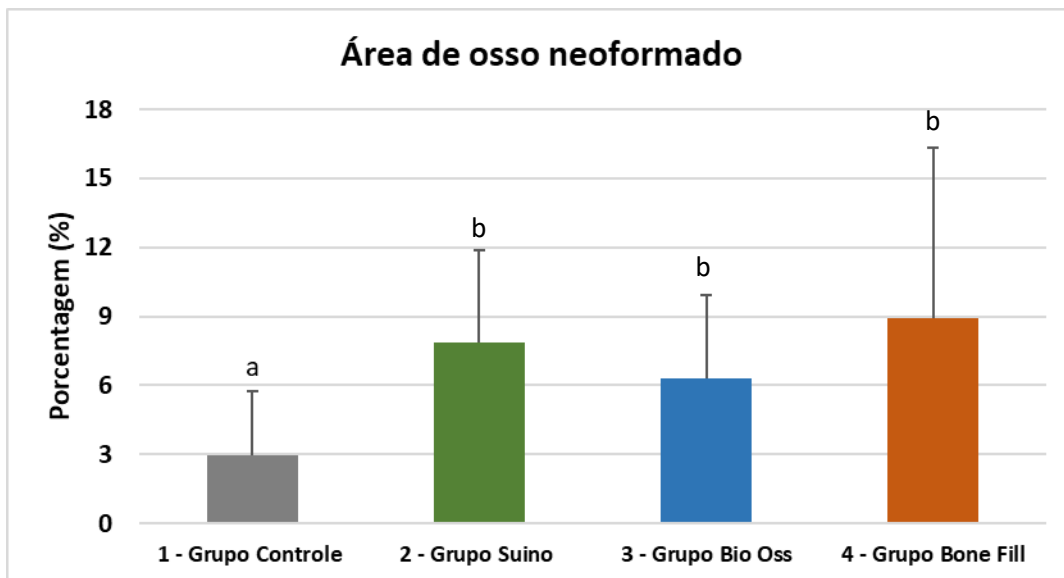


Figura 21. Média \pm desvio-padrão dos valores para Área de osso neoformado. Os grupos com biomateriais apresentaram maiores valores em relação ao grupo controle, sem diferenças estatísticas entre eles (Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$)).

Com relação ao parâmetro Área de partículas remanescentes (APR), que foi calculada como porcentagem da AT nos grupos com biomaterial, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos GS ($12,41 \pm 11,38$), GB ($8,84 \pm 6,36$) e GBF ($9,76 \pm 5,06$) (Figura 22).

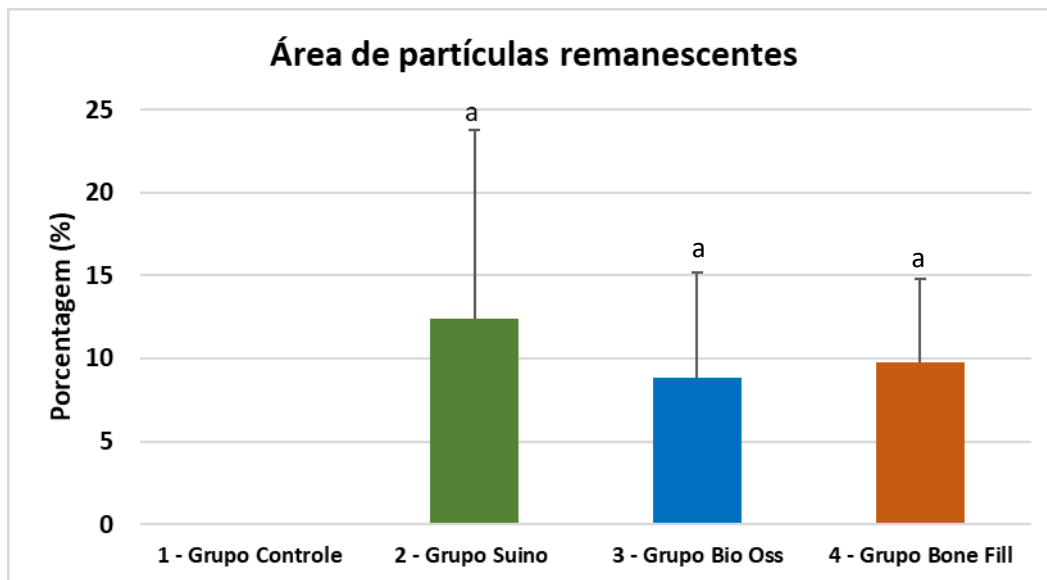


Figura 22. Média \pm desvio-padrão dos valores para Área de Partículas Remanescentes. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

Com relação a análise da Extensão linear do defeito cirúrgico criado (Figura 23), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GC ($5,02\pm 0,01$), GS ($5,03\pm 0,01$), GB ($5,12\pm 0,18$) e GBF ($5,02\pm 0,01$), mostrando que houve uniformidade na metodologia durante a confecção do defeito ósseo experimental.

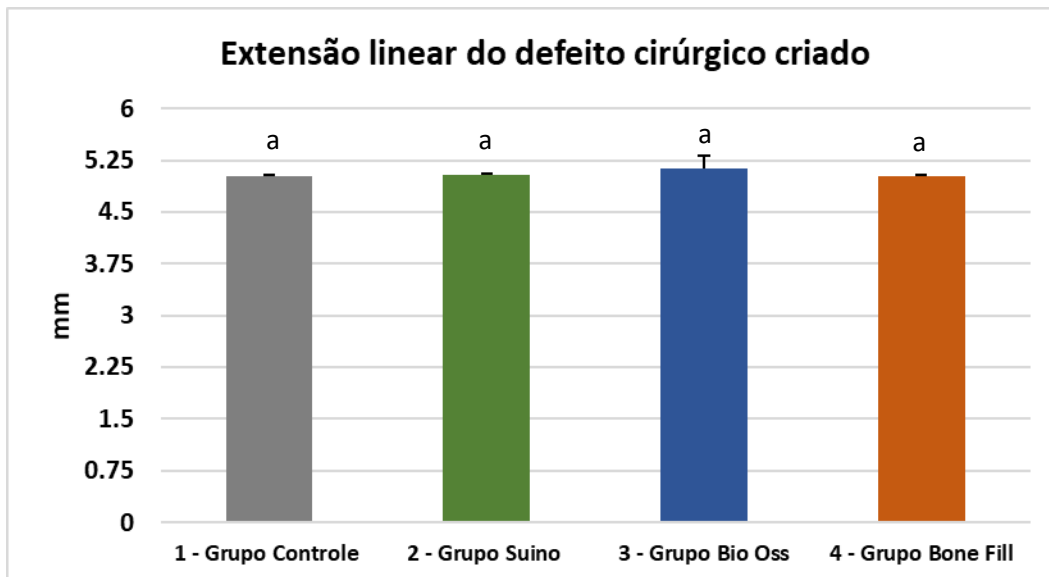


Figura 23. Média \pm desvio-padrão dos valores da extensão linear, calculada em mm. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

Discussão

Discussão

Este estudo avaliou o reparo ósseo após o uso de um enxerto experimental de origem suína, em comparação a outros dois substitutos ósseos de origem bovina (Bonefill e Bio-Oss). Para avaliar o processo regenerativo, utilizou-se um defeito de tamanho crítico (DTC) em calvária de ratos. O DTC é um modelo experimental bem caracterizado na literatura, sendo o modelo pré-clínico mais utilizado para a avaliação do potencial regenerativo dos biomateriais, além de apresentar semelhança fisiológica à remodelação óssea humana. (Hollinger & Schmitz 1986; Huard et al., 2010; Spicer 2012)

Diversos trabalhos publicados corroboram o uso de substitutos ósseos como um método eficaz, com alta taxa de sucesso no processo regenerativo (Ezirganli et al., 2015; Troiano et al. 2018; van den Beucken et al. 2018). Estudos pré-clínicos e ensaios clínicos têm demonstrado a capacidade dos biomateriais de manter o volume ósseo elevado a longo prazo. (Aludden et al., 2017; Chapullis et al., 2018).

No presente estudo, observou-se maior formação de volume ósseo na calvária dos ratos nos grupos GS, GB e GBF, nos quais foram utilizados substitutos ósseos associados à membrana, em comparação ao uso isolado da membrana. Este resultado já era esperado em virtude do excelente desenho dos substitutos ósseos nos processos regenerativos em associação com membranas, o que faz que funcionem como um arcabouço para a regeneração . Há ainda um efeito sinérgico do uso da membrana, que além de barrar as células indesejáveis (epiteliais e do conjuntivo gengival), ajuda na estabilização do enxerto no local da ferida cirúrgica. Utilizou-se membrana em todos os grupos, pois a ausência dela poderia acarretar em aumento da velocidade de reabsorção do biomaterial utilizado (Nooh et al., 2016).

Apesar de haver muitos estudos relevantes sobre o uso de enxerto ósseos bovinos para regeneração óssea guiada, existem poucas publicações avaliando *in vivo* o uso de enxertos suínos, assim como comparações entre enxerto ósseo suíno *versus* enxerto ósseo bovino.

Park, Kang & Hanawa em 2016, avaliaram a atividade osteogênica de quatro tipos diferentes de substitutos ósseos, enxerto ósseo de origem suína (ES), enxerto

ósseo de origem suína com adição de íons de estrôncio (ES/Sr), partículas de fosfato de cálcio bifásico micro/macroporoso sintético (BCP), e enxerto ósseo alógeno liofilizado desmineralizado particulado (EA), em um modelo *in vivo* em calvária de coelhos, com avaliação após 3 e 6 semanas. Nas análises histológicas e histomorfométrica, o ES apresentou AON nas margens do defeito, entretanto com presença de tecido fibroso ao redor dos grânulos remanescentes na área central. O ES/Sr apresentou maior neoformação de osso na área central do defeito entre todos os grupos analisados. No presente estudo, o GS apresentou maior AON ($7,86 \pm 3,99$) em comparação a GC ($2,98 \pm 2,76$) e GB ($6,30 \pm 3,628$), entretanto sem diferenças estatísticas quando comparado ao GBF ($8,94 \pm 7,40$). Na avaliação de 6 semanas, o BV/TV foi de 12,5% para o ES/Sr, resultado que está em concordância com os valores obtidos no presente estudo (GS BV/TV 10,99%). Os valores para os grupos ES/Sr, BCP, e EA foram de 16,7%, 17,2% e 27,3%, respectivamente. Apesar do grupo EA ter apresentado a maior média para BV/TV, também mostrou grandes variações entre os espécimes (12,9%-61,8%), comprometendo sua confiabilidade. Apesar do estudo de (Park; Kang; Hanawa, 2016) ter sido desenvolvido em um modelo animal diferente ao do presente estudo, a interpretação dos resultados aponta desfechos favoráveis para o enxerto de origem suína.

Kim et al., em 2018, compararam *in vivo* a formação óssea em dois tipos de substitutos ósseos: enxerto híbrido de origem suína e Bio-Oss. As análises de micro-CT e histomorfométrica apresentaram resultados similares aos da presente pesquisa. A análise micro-CT de 4 e 8 semanas mostrou formação de osso superior dos grupos com enxerto em comparação ao grupo controle (sem biomaterial, somente coágulo sanguíneo), com valores semelhantes de BS/TV, BV/TV entre o grupo de enxerto de origem suína e o grupo Bio-Oss. Além disso, na análise histomorfométrica de 4 semanas, o grupo de enxerto de origem suína apresentou maior angiogênese e menor área de partículas remanescente (APR) em comparação ao grupo Bio-Oss. No entanto, o início da maturação do osso somente foi observado na análise de 8 semanas. O grupo de enxerto de origem suína apresentou maior e mais rápida neoformação óssea, assim como maior biodegradação do material enxertado. Em relação à área de osso neoformado (BV/TV), ambos os enxertos apresentaram aumento do volume ósseo quando comparados ao grupo controle, com maior diferença estatística para o grupo Bio-

Oss. Este último resultado está em contraste com o obtido no presente estudo, onde GS apresentou melhores resultados, com diferenças estatisticamente significantes, para BS/TV e BV/TV em comparação ao GB. Em relação a APR e AON não houve diferenças significativas entre os grupos em que foram utilizados substitutos ósseos, mas sim para AON em comparação ao grupo controle.

Em um estudo de 2019, Bae et. al., avaliaram a capacidade regeneradora de um enxerto ósseo de origem suína versus enxerto ósseo de origem bovina (Bio-Oss) em calvária de ratos. Na análise de micro-CT para BV/TV após 4 semanas, ambos os enxertos apresentaram resultados positivos para osso neoformado, com uma leve tendência para o enxerto suíno, no entanto sem diferenças estatisticamente significantes - os valores obtidos foram de $17,52 \pm 3,88\%$ para o enxerto suíno e $11,6 \pm 3,88\%$ para o enxerto bovino. (Bae et al., 2019) Apesar de tal estudo não ter encontrado diferenças significantes entre os grupos, tais resultados concordam com os encontrados no presente estudo, no qual a análise de micro-CT apresentou valores mais elevados e com diferença significativa para BV/TV no GS em comparação ao GB, com $10,99 \pm 3,61\%$ e $5,38 \pm 3,02\%$, respectivamente. Ainda sobre a análise histomorfométrica, os valores de AON obtidos no estudo de Bae et al., 2019, após 4 semanas para o grupo suíno ($9,08 \pm 5,47$) e o grupo bovino ($5,83 \pm 2,56$), apresentaram uma tendência estatística para o grupo suíno, resultado que também foi observado na análise após 8 semanas (grupo suíno: $25,22 \pm 13,56$, e grupo bovino $21,68 \pm 11,11$). Esses resultados foram similares aos obtidos no presente estudo, na análise após 4 semanas, com $7,86 \pm 3,99$ para o GS, e $6,30 \pm 3,62$ para o GB, mostrando assim capacidades similares para neoformação de osso para ambos os grupos, com valores maiores para o GS, contudo sem diferença estatística.

No presente estudo, todos os grupos com enxerto ósseo apresentaram melhores resultados de BV/TV em relação ao grupo controle. Entre os grupos com enxerto ósseo, foram observados melhores resultados para o GS ($10,99 \pm 3,61$) versus GB ($5,38 \pm 3,02$) e GBF ($6,14 \pm 3,75\%$). Os resultados obtidos para o GB estão de acordo com os achados de Park et al., 2009, com valores de BV/TV de 6,4% para o Bio-Oss, assim como com os achados de Leventis et al., 2018 embora o modelo animal utilizado neste último estudo (calvária de coelho com 8 semanas de pós-operatório) seja diferente do utilizado no presente estudo. Os achados descritos por

ambos estudos (Park et al., 2009; Leventis et al., 2018) colocam o GB em segundo lugar na porcentagem de volume ósseo em relação aos materiais avaliados.

Atualmente, o Bio-Oss é o substituto ósseo com maior evidência clínica e científica (Araújo et al., 2008; Araújo; Lindhe, 2009; Fan et al., 2021). No entanto, nos resultados do presente estudo, o GB apresentou resultados inferiores, em relação a BS/TV, BV/TV, Tb.N, Conn e AT; e níveis similares de Tb.Th, Po.Tot, AON e EON, quando comparado ao GS. Além disso, mostrou resultados equivalentes ao outro substituto bovino testado (GBF), para todos os parâmetros microtomográficos e histomorfométricos avaliados. Estudos realizados em defeitos críticos mostraram resultados semelhantes na avaliação da neoformação óssea, com valores inferiores obtidos pelo Bio-Oss em comparação a diferentes substitutos ósseos, com origem suína (Bae et al., 2019), derivado da casca de ovo (Park et al., 2009), aloplásticos cerâmicos (Grossi-Oliveira et al., 2020), fosfato beta tricálcico (Leventis et al., 2018), bem como no uso de cápsulas de teflon sem substitutos ósseos (Stavropoulos et al., 2004).

Em relação ao número de trabéculas, o GC apresentou menor número de trabéculas na área do defeito, com a maior separação trabecular entre todos os grupos, mostrando assim que nos grupos com substituto ósseo houve atividade osteocondutora, gerando um osso mais compacto. Simultaneamente, o GS apresentou os melhores resultados para formação de trabéculas (Tb.N $2,91 \pm 1,19$) e conectividade (Conn $8087,29 \pm 5020,51$) em comparação ao GB (Tb.N $2,91 \pm 1,19$; Conn $3204,00 \pm 2265,24$) e GBF (Tb.N $1,56 \pm 0,84$; Conn $2534,00 \pm 24,99,15$). Este resultado sugere que o enxerto de origem suína facilitou o desenvolvimento de maior número de trabéculas ósseas, bem como uma arquitetura de poros interconectados.

Na análise histomorfométrica do presente estudo, o grupo de osso suíno apresentou, em relação a AON ($7,86 \pm 3,99\%$) e EON ($0,77 \pm 0,30$ mm), resultados estatisticamente superiores quando comparado ao GC (AON $2,98 \pm 2,76$ mm²; EON $0,40 \pm 0,10$ mm), e numericamente superiores, embora sem diferenças estatísticas, em relação aos grupos com substitutos ósseos bovinos (GB: AON $6,30 \pm 3,62$ mm², EON $0,67 \pm 0,35$ mm; GBF: AON $8,94 \pm 7,40$ mm², EON $0,43 \pm 0,07$ mm). O resultado obtido para os grupos com substitutos ósseos foi semelhante ao apresentado no estudo de Park et al., 2009, para o Bio-Oss (AON $6,4 \pm 4,3$ mm²) em análise após 6

semanas em defeito crítico em calvária de ratos, mostrando formação óssea similar 2 semanas antes deste período (ou seja, em 4 semanas no presente estudo).

Entre as limitações deste estudo, pode-se citar o período curto de eutanásia dos animais, o que não permitiu analisar o comportamento dos biomateriais em prazo mais longo. Outra limitação observada foi a baixa formação óssea em todos os grupos estudados, este fenômeno pode estar associado ao modelo animal utilizado. Sabe-se que os defeitos críticos em calvária de rato podem apresentar algumas características relacionadas ao metabolismo da região, incluindo vascularização deficiente, instabilidade de fragmentos ou problemas sistêmicos do animal (Mokbel et al., 2008; Gomes; Fernandes, 2011). Entretanto, é importante ressaltar que a ordem de grandeza dos resultados foi semelhante à já relatada na literatura para o mesmo tipo de defeito e de substituto ósseo (Park et al., 2009). Uma outra questão é a exígua literatura abordando uso de substitutos ósseos de origem suína para comparação com os presentes resultados, devido principalmente a sua elaboração relativamente recente. Sugere-se a realização de mais estudos, incluindo períodos de avaliação mais longos, e a comparação com outros tipos de substitutos ósseos, como de origem aloplástica.

Osteogênese, osteocondução, rápida reabsorção e biodegradação são características desejadas dos substitutos ósseos. Os resultados do presente estudo sugerem que todos os substitutos ósseos apresentaram biocompatibilidade e osteocondução, assim como previsibilidade para a formação de osso no defeito criado, quando associados à membrana de PTFE. O substituto ósseo de origem suína testado no presente estudo mostrou superioridade em relação ao grupo controle, preenchido com coágulo sanguíneo, propriedades semelhantes às apresentadas pelos enxertos de origem bovina em relação à área e extensão de osso neoformado, bem como resultados superiores em relação à densidade e ao volume ósseo, número de trabéculas, conectividade e área total de osso, mostrando assim, ser uma opção de biomaterial viável para uso em regeneração óssea guiada.

Conclusão

Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O substituto ósseo de origem suína, apresentou resultados microtomográficos e histomorfométricos superiores em relação a densidade e volume ósseos, espessura trabecular, conectividade, e área total de osso, em comparação a dois substitutos ósseos de origem bovina.
- O substituto ósseo de origem suína apresentou resultados microtomográficos e histomorfométricos semelhantes em relação a área e extensão de osso neoformado, em comparação a dois substitutos ósseos de origem bovina.
- Os dois substitutos ósseos de origem bovina analisados não diferiram entre si em relação a todos os parâmetros avaliados.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que o substituto ósseo de origem suína testado em defeitos críticos de calvária de rato oferece uma resposta celular favorável e capacidade de regeneração óssea não inferior à produzida pelos dois substitutos de origem bovina atualmente disponíveis no mercado.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AHN JJ, SHIN HI. Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: A histomorphometric study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 23, p.1133–1138, 2008.

ALAM, S., UEKI, K., NAKAGAWA, K., MARUKAWA, K., HASHIBA, Y., YAMAMOTO, E., SAKULSAK, N. & ISEKI, S. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology** 107: 22 –2, 2009.

ALUDDEN, H.C.; MORDENFELD, A.; HALLMAN, M.; DAHLIN, C.; JENSEN, T. Lateral ridge augmentation with Bio-Oss alone or Bio-Oss mixed with particulate autogenous bone graft: A systematic review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 46, p. 1030–1038, 2017.

ARAÚJO M.G, LINDER E., WENNSTRÖM J., LINDHE J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. **Int J Periodontics Restorative Dent.** v.28, n. 2, p. 123-35, abr. 2008.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss ® collagen: A 6-month study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 5, p. 433–440, maio 2009.

ARAÚJO MG., LINDER E., LINDHE J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. **Clin Oral Implants Res.** v. 22, n. 1, p. 1-8, jan. 2011.

ARTZI, Z., TAL, H. & DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I: histomorphometric evaluations at 9 months. **Journal of Periodontology**, v. 71, p. 1015–1023, 2000.

BAE E.B, KIM H.J, AHN J.J, BAE H.Y, KIM H.J, AND HUH J.B. Comparison of Bone Regeneration between Porcine-Derived and Bovine-Derived Xenografts in Rat Calvarial Defects: A Non-Inferiority Study. **Materials**, v. 12, n. 20, p. 3412, out. 2019.

BARRETO M.A. & DUARTE L.R. **Evidências científicas em estética e osseointegração**. 1. ed. São Paulo. Editora Napoleão, 2013.

BENDIXEN E., DANIELSEN M., LARSEN K., BENDIXEN C. Advances in porcine genomics and proteomics-a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research, **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, n. 1 May, p. 208–219, 2010.

BERGLUNDH, T. & LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 8, p. 117–124, 1997.

BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, GULDBERG RE, JEPSEN KJ, MÜLLER R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

BRAGA C.M; SOUZA J.O. Horizontal augmentation of anterior maxillary alveolar ridge using bovine bone graft. **Full Dent. Sci**, v. 5, n. 17, p. 36-44, 2013.

CALEFI A.P. Efeitos da Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) associada ou não a um substituto ósseo sintético na cicatrização de defeitos ósseos em

calvária de ratas. (2017) 90f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

CAMELO M, NEVINS M, NEVINS ML, SCHUPBACH P, KIM DM. Treatment of gingival recession defects with xenogeneic collagen matrix: a histologic report. **Int J Periodontics Rest Dent** 2012; 32:167-73.

CARMAGNOLA, D., ABATI, S., CELESTINO, S., CHIAPASCO, M., BOSSHARDT, D. & LANG, N.P. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, p. 1246–1253, 2008.

CARMAGNOLA, D., ADRIAENS, P. & BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, p. 835–840, 2003.

CASTANIA, V. A. Enxerto córtico-esponjoso homogêneo processado quimicamente e esterilizado em óxido de etileno, em cães: análise mecânica e estudo da integração por meio de radiografias. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHACKARTCHI T, IEZZI G, GOLDSTEIN M, KLINGER A, SOSKOLNE A, PIATTELLI A, SHAPIRA L. Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, p.473–480, 2011.

CHAPPUIS, V.; RAHMAN, L.; BUSER, R.; JANNER, S.F.M.; BELSER, U.C.; BUSER, D. Effectiveness of contour augmentation with guided bone regeneration: 10-year results. **J. Dent. Res**, v. 97, p. 266–274, 2018.

COELHO, P. G., COIMBRA, M. E., RIBEIRO, C., FANCIO, E., HIGA, O., SUZUKI, M., & MARINCOLA, M. Physico/chemical characterization and preliminary human histology assessment of a β -TCP particulate material for bone augmentation.

Materials Science and Engineering: C, v. 29, n. 7, p. 2085–2091, ago. 2009.

COOPER DKC. A brief history of cross-species organ transplantation. Proceedings.

Baylor University Medical Center, v. 25, n. 1, p. 49-57, 2012.

COOPER GM, MOONEY MP, GOSAIN AK, CAMPBELL PG, LOSEE JE, HUARD J.

Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plast Reconstr Surg**, v. 125, n. 6), p. 1685–1692, 2010.

COSTA, O.R.; VEINSTEIN, F.J.; Injertos oseos em regeneración periodontal. **Rev**

Asoc Odont Argent, v. 82, n. 2, p. 117-25, 1994.

DANIELETTO-ZANNA, C.F.; BIZELLI, V.F.; RAMIRES, G.A.D.A.; FRANCATI, T.M.;

DE CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A.P.F. Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical Analysis. **International Journal of Biomaterials**, v. 2020, p. 1–9, 2020.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis.

Nature Reviews Microbiology, v. 8, p. 481–490, 2010.

DE CARVALHO B, ROMPEN E, LECLOUX G, SCHUPBACH P, DORY E, ART J-F,

LAMBERT F. Effect of Sintering on In Vivo Biological Performance of Chemically Deproteinized Bovine Hydroxyapatite, **Materials** **2019**, 12, 394-60. doi: 10.3390/ma12233946

DE SMET, E., JAEQUES, S.V., WEVERS, M., JANSEN, J.A., JACOBS, R.,

VANDER SLOTEN, J. & NAERT, I.E. Effect of controlled early implant loading on

bone healing and bone mass in guinea pigs, as assessed by micro-CT and histology.

European Journal of Oral Sciences, v. 114, p. 232–242, 2006.

DHAND, N. K., & KHATKAR, M. S. Statulator: An online statistical calculator. Sample Size Calculator for Comparing Two Paired Proportions. 2014.

DONOS N, LANG NP, KAROUSSIS IK, BOSSHARDT D, TONETTI M, KOSTOPOULOS L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. **Clin Oral Implants Res.** v. 15, n. 1, p. 101-11, Feb 2004.

EZIRGANLI S., KAZANCIOGLU H.O., MIHMANLI A., SHARIFOV R., AYDIN M.S. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. **Clin. Oral Impl. Res.** v. 26, p. 1482–1488, 2015.

EZIRGANLI S., POLAT S., BARIS E., TATAR I., CELIK H.H. Comparative investigation of the effects of different materials used with titanium barrier on new bone formation. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 10, p. 14, 2011.

FAN Q, ZENG H, FAN W, WU T, SUN J, YAN Q, SHI B. Ridge preservation of a novel extraction socket applying Bio-Oss® collagen: An experimental study in dogs. **Journal of Dental Sciences**, v. 16, n. 3, p. 831–839, 2021.

FAVERANI L.P.; FERREIRA G. R; SANTOS P.H; ROCHA E. P; JÚNIOR I.R.G; PASTORI C.M.; ASSUNÇÃO W.G. Surgical techniques for maxillary bone grafting – literature review. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 41, n. 1, p. 061-067, 2014.

FROUM, S., CHO, S.C., ROSENBERG, F., ROHRER, M. & TARNOW, D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass

or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. **Journal of Periodontology**, v. 73, p. 94–102, 2002.

FUKOTA K, HR-SHAI Y, COLLARES M, LICHTEN J, JACKSON I. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in reconstruction of full-thickness skull defect. **J Craniofac Surg**, v. 3, p. 25–29, 1992.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.

GOSAIN AK, SONG L, YU P, MEHRARA BJ, MAEDA CY, GOLD LI, LONGAKER MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, p. 360–372, 2000.

GROSSI-OLIVEIRA G, FAVERANI LP, MENDES BC, BRAGA POLO TO, BATISTA MENDES GC, DE LIMA VN, RIBEIRO JÚNIOR PD, OKAMOTO R, MAGRO-FILHO O. Comparative Evaluation of Bone Repair with Four Different Bone Substitutes in Critical Size Defects. **International Journal of Biomaterials**, v. 2020, p. 1–9, 2020.

HAAS R, DONATH K, FODINGER M, WATZEK G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. **Clin Oral Implants Res**, v. 9, p. 107–116, 1998.

HABAL MB, REDDI AH. Different forms of bone grafts. In: Habal MB, Reddi AH, editors. *Bone Grafts and Bone Substitutes*. Philadelphia: **Saunders**; p. 6-8, 1992.

HAIJSHENGALLIS, G., LIANG, S., PAYNE, M. A., HASHIM, A., JOTWANI, R., ESKAN, M. A., CURTIS, M. A. Low- abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. **Cell Host & Microbe**, v. 10, p. 497–506, 2011.

HALLMAN M & THOR A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. **Periodontol 2000**. v. 47, p. 172-92, 2008.

HURZELER MB, QUINONES CR, SCHUPBACK P, MORRISON EC, CAFFESSE RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: histologic findings. **Int J Oral Maxillofac Implants** v. 12, p. 168–175, 1997.

IEZZI, G., SCARANO, A., MANGANO, C., CIROTTI, B. & PIATTELLI, A. Histologic results from a human implant retrieved due to fracture 5 years after insertion in a sinus augmented with anorganic bovine bone. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 192–198, 2008.

KAPTEIN ML, HOOGSTRATEN J, DE PUTTER C, DE LANGE GL, BLIJDORP PA. Dental implants in the atrophic maxilla: measurements of patients' satisfaction and treatment experience. **Clinical Oral Implants Research**. v. 9, p. 321-326, 1998.

KIM Y, NOWZARI H, RICH SK. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 15, n. 5, p. 645-53, Oct. 2013.

KIM Y, RODRIGUEZ AE, NOWZARI H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. **Clin Implant Dent Relat Res**. v. 18, n. 6, p. 1095-1102, Dec. 2016.

KIM, S. E., LEE, E., JANG, K., SHIM, K. M., & KANG, S. S. Evaluation of Porcine Hybrid Bone Block for Bone Grafting in Dentistry. **In Vivo**, v. 32, n. 6, p. 1419–1426, 22 out. 2018.

KIM, Y.; RODRIGUEZ, A.E.; NOWZARI, H. The risk of prion infection through bovine grafting materials. **Clin. Implant Dent. Relat. Res**, v. 18, p. 1095–1102, 2016.

KLINGE B, ALBERIUS P, ISAKSSON S, JONSSON J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, p. 241– 249, 1992.

KORNMAN, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: A new look. **Journal of Periodontology**, v. 79, p. 1560–1568, 2008.

LEE, J.H., JUNG, U.W., KIM, C.S., CHOI, S.H. & CHO, K.S. Histologic and clinical evaluation for maxillary sinus augmentation using macroporous biphasic calcium phosphate in human. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, p. 767–771, 2008.

LEI, P.; SUN, R.; WANG, L.; ZHOU, J.; WAN, L.; ZHOU, T.; HU, Y. A new method for xenogeneic bone graft deproteinization: Comparative study of radius defects in a rabbit model. **PLoS ONE**, **2015**, 10:1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0146005

LEVENTIS M, FAIRBAIRN P, MANGHAM C, GALANOS A, VASILADIS O, PAPAVALSILEIOU D, HOROWITZ R. Bone Healing in Rabbit Calvaria Defects Using

a Synthetic Bone Substitute: A Histological and Micro-CT Comparative Study. **Materials (Basel)**, v. 11, n. 10, p. 2004, 2018.

LIMA R, PERUZZO D, NAPIMOGA M, SABA-CHUJFI E, SANTOS-PEREIRA S, MARTINEZ E. Evaluation of the Biological Behavior of Mucograft® in Human Gingival Fibroblasts: An In Vitro Study. **Braz Dent J**. v. 26, n. 6, p. 602-6, 2015.

MANJI RA, LEE W, COOPER DKC. Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future. **Int J Surg**. V. 23, p. 280-284, Nov. 2015.

MOKBEL N, BOU SERHAL C, MATNI G, NAAMAN N.. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 12, n. 2, p. 73–78, 2008.

MOLON RS, DE AVILA ED, NOGUEIRA A, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice (published online ahead of print June 27, 2013). **J Periodontol**. v. 85, p. 465–477, 2014.

MORDENFELD, A.; HALLMAN, M.; JOHANSSON, C.B.; ALBREKTSSON, T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clin. Oral Implants Res**. v. 21, p. 961–970, 2010.

MURAKAMI S, TAKAYAMA S, IKEZAWA K, SHIMABUKURO Y, KITAMURA M, NOZAKI T, TERASHIMA A, ASANO T, OKADA H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. **J Periodontal Res**, v. 34, p. 425–430, 1999.

NEVINS, M., CAMELO, M., DE PAOLI, S., FRIEDLAND, B., SCHENK, R.K., PARMA-BENFEATI, S., SIMION, M., TINTI, C. & WAGENBERG, B. A study of the

fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. **The International Journal Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 26, p. 19–29, 2006.

NIU D, WEI HJ, LIN L, GEORGE H et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. **Science**. v. 22, n. 357, p. 1303-1307, Sep. 2017.

NOOH, N., RAMALINGAM, S., AL-KINDI, M., AL-RASHEED, A., AL-HAMDAN, K. S., & AL-HEZAIMI, K. Real-Time assessment of guided bone regeneration in standardized calvarial defects in rats using bio-oss with and without collagen membrane: an in vivo microcomputed tomographic and histologic experiment. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, n. 36 *Suppl*, p. s139–s149, 2016.

PARK JW, JANG JH, BAE SR, AN CH, SUH JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 4, p. 372–378, abr. 2009.

PARK, J.-W.; KANG, D.-G.; HANAWA, T. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. **Oral Diseases**, v. 22, n. 1, p. 53–61, jan. 2016.

POLIMENI G., KOO K.T., QAHASH M., XIROPAIDIS A.V., ALBANDAR J.M., WIKESJO U.M.E. Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of a space-providing biomaterial on guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol**, n. 31, p. 725-729, 2004.

PRAMANIK S, HANIF ASM, PINGGUAN-MURPHY B, OSMAN NAA. Morphological Change of Heat Treated Bovine Bone: A Comparative Study. *Materials* **2013**, 6:65-75. doi: 10.3390/ma6010065

PUSHPARAJAN, S., THIAGARAJAN, R., NAMASI, A., EMMADI, P., & SARAVANAN, H. Efficacy of guided bone regeneration using composite bone graft and resorbable collagen membrane in Seibert's class i ridge defects: Radiological evaluation. *Journal of Oral Implantology*, v. 39, n. 4, p. 455–462, 2013.

ROTUNDO R, PINI-PRATO G. Use of a new collagen matrix (Mucograft) for the treatment of multiple gingival recessions: case reports. *Int J Periodontics Rest Dent*; v. 32, n.4, p. 413-9, 2012.

SANZ, M., BEIGHTON, D., CURTIS, M. A., CURY, J. A., DIGE, I., DOMMISCH, H., ZAURA, E. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 44, p.18:S5–S11, 2017.

SARAVANAN P, RAMAKRISHNAN T, AMBALAVANAN N, EMMADI P, JOHN TL. Efficacy of guided bone regeneration using composite bone graft and resorbable collagen membrane in Seibert's class I ridge defects: Radiological evaluation. *J Oral Implantol*, v. 39, p. 455–462, 2013.

SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. n. 205, p. 299-308. Apr 1986.

SOGAL A, TOFE AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. **J Periodontol**, v. 70, p. 1053–1063, 1999.

SPICER PP, KRETLOW JD, YOUNG S, JANSEN JA, KASPER FK, MIKOS AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nat Protoc**, v. 7, p. 1918–1929, 2012.

STAVROPOULOS, A., KOSTOPOULOS, L., NYENGAARD, J.R. AND KARRING, T. Fate of bone formed by guided tissue regeneration with or without grafting of Bio-Oss® or Biogran®. An experimental study in the rat. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 1, p. 30–39, 2004.

STAVROPOULOS, A. & KARRING, T. Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 200–210, 2010.

SUN HF, ERNST CW, YERLE M, PINTON P, ROTHSCHILD MF, CHARDON P, ROGEL-GAILLARD C, TUGGLE CK. Human chromosome 3 and pig chromosome 13 show complete synteny conservation but extensive gene-order differences. **Cytogenet Cell Genet**. v. 85, n. 3-4, p. 273-8, 1999.

TADJOEDIN ES, DE LANGE GL, BRONCKERS AL, LYARUU DM, BURGER EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 3, p. 261-70, 2003.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico", Protocolo nº 2018.1.579.58.0, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 19/09/2018.

Vigência do Projeto	19/09/2020 a 27/06/2020
Espécie/Linhagem	Rato Heterogênico Sprague Dawley
Nº de animais	64
Peso/Idade	250-300 g / 7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B – Comprovante de submissão do artigo científico para publicação em periódico internacional – *Materials*

Journals Topics Information Author Services Initiatives About
sergio.scombatti@gmail.com My Profile Logout Submit

~ User Menu

- Home
- Manage Accounts
- Change Password
- Edit Profile
- Logout

~ Submissions Menu

- Submit Manuscript
- Display Submitted Manuscripts
- English Editing
- Discount Vouchers
- Invoices
- LaTeX Word Count

~ Reviewers Menu

- Volunteer Preferences

Manuscript Information Overview

Manuscript ID **materials-1829335**

Status **Pending review**

Article type **Article**

Title **Evaluation of a new porcine bone graft on the repair of surgically created critical bone defects in rat calvaria: Histomorphometric and microtomographic study**

Journal **Materials**

Section **Biomaterials**

Abstract **The aim of this study was to evaluate the use of a new porcine bone graft in rat calvaria bone defects. Critical defects were surgically created in 24 rats that were divided into four experimental groups according to defect filling (n=6): Control Group (CG) - blood clot; Porcine Bone Group (PG) - porcine-derived bone substitute; (BG); Bio-Oss Group (BG) –chemically and heat-treated bovine graft; Bonefill Group (BFG) - chemically treated bovine bone substitute. Euthanasia of the animals occurred 30 days after the surgery, the area of the original surgical defect and the surrounding tissues were removed for micro-CT and histomorphometric analysis. In the micro-CT evaluation, PG presented statistically significant differences (p<0.05), in comparison to CG, BG and BFG, for the parameters: percentage of Bone Volume (BV/TV: PG=10, 99±3.61; CG=1, 11±0.40; BG=5, 38±3.02; BFG=6, 14±3.75); Surface Bone Density (BS/TV: PG=12, 69±5.57; CG=±; BG=5, 08±2.66; BFG=6, 87±3.38); Number of Trabeculae (Tb.N: PG=2, 91 ±1.19; CG=0, 35±0.29; BG=1, 31±0.75; BFG=1, 56±0.84) and Bone Connectivity (PG=8087, 29±5020.51; CG=2327, 29±3397.65; BG=3204, 00±2265.24; BFG=2534, 00±2499.15). The Histomorphometric analysis showed that the PG presented similar results to the BG regarding newly formed bone extension and to the BG and BFG regarding newly formed bone area. The porcine-derived graft presented superior microtomographic and histomorphometric results when compared to two bovine bone substitutes.**

Keywords **bone regeneration; bone substitute; histology**


Manuscript File [manuscript.docx](#)

PDF File [manuscript.pdf](#)

Preprints You can put your paper online **immediately and before peer review** at [Preprints.org](#), with the following benefits:

- Anyone can read and download your work immediately, before peer review is complete.
- Receive comments and feedback.
- Make your work citable via assignment of a digital object identifier.
- Immediate indexing by Google Scholar and other online databases.
- Papers are put online within 24 hours.
- A doi will be applied to your announced preprints automatically.

[Upload to Preprints](#)

 **data** Data is of paramount importance to scientific progress, yet most research data drowns in supplementary files or remains private. Enhancing the transparency of the data processes will help to render scientific research results reproducible and thus more accountable. Co-submit your methodical data processing articles or data descriptors for a linked data set in [Data](#) journal to make your data more citable and reliable.

- Deposit your data set in an online repository, obtain the DOI number or link to the deposited data set.
- Download and use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare your data article.
- Upload and send your data article to the [Data](#) journal [here](#).

[Submit To Data](#)

Author Information