

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Luiz Bertoldo da Costa Filho

**EFEITO DOS BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA E ÁCIDO HIALURÔNICO
NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO INTRABUCAL EM RATOS**

Belo Horizonte
2012

Luiz Bertoldo da Costa Filho

**EFEITO DOS BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA E ÁCIDO HIALURÔNICO
NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO INTRABUCAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Gerluza Aparecida Borges Silva

Belo Horizonte
2012

FICHA CATALOGRÁFICA
Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

C837e Costa Filho, Luiz Bertoldo da
Efeito dos biomateriais a base de quitosana e ácido hialurônico no reparo de defeito ósseo intrabucal em ratos / Luiz Bertoldo da Costa Filho. Belo Horizonte, 2012.
104f.: il.

Orientador: Peterson Antônio Dutra de Oliveira
Coorientadora: Gerluza Aparecida Borges Silva
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Regeneração óssea. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Ácido hialurônico. 4. Quitosana. 5. Fraturas mandibulares. I. Oliveira, Peterson Antônio Dutra de. II. Silva, Gerluza Aparecida Borges. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.314-089

Luiz Bertoldo da Costa Filho

**EFEITO DOS BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA E ÁCIDO
HIALURÔNICO NO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO INTRABUCAL EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa – UFMG
- 2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 29 de junho de 2012

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2012

Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia - Mestrado**

*Dedico e ofereço este trabalho à minha filha,
Débora, inspiração e razão para que eu lute sempre.
E de modo especial, à minha esposa, Gerluza, que
durante todo esse período esteve ao meu lado com
amor, carinho, dedicação e sobretudo
profissionalismo, sendo o meu porto seguro na
condução desse projeto. Que Deus continue
abençoando e iluminando a sua vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e dar forças para seguir sempre em frente. No silêncio das minhas orações, sempre enxerguei o Meu Senhor e Nossa Santa Mãe na porta da escola a me esperar.

A todos da minha família (irmãos, tios, sobrinhos e primos) e ao meu pai, Luiz, pela educação, dignidade, base para minha vida. À minha mãe, Minervina, meu exemplo de fé, de disposição incomensurável e de otimismo diante das adversidades.

À família da minha esposa, em especial o Sr. Bené, um exemplo de gratuidade e disposição. Sem saber, ele é um “Mestre” a quem procuro seguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira e Dr^a Alcione, sua esposa, que me estenderam as mãos, me abraçaram sem me conhecer, e viabilizaram minha trajetória no Mestrado.

Aos coordenadores do Mestrado em Implantodontia da PUCMINAS, Profs. Drs. Martinho Campolina Rebello Horta e Elton Gonçalves Zenóbio, grandes profissionais que abraçaram a coordenação do Mestrado em favor de nossa turma.

Aos meus grandes colaboradores, Matheus Henrique (UNIFENAS) e Igor (UFMG), alunos de iniciação científica do curso de Biomedicina. Ambos brilharam como odontólogos dos nossos “pacientes”. Foram fundamentais e imprescindíveis ao bom andamento deste trabalho.

Ao professor D. Alfredo Miranda de Góes, que gentilmente nos cedeu o biomaterial (quitosana) e acreditou no nosso projeto.

Ao meu amigo atleticano, parceiro de “alegrias e tristezas alvinegras”, um grande colaborador desse projeto, a quem carinhosamente chamo de “amado mestre”, Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu, pelos conselhos, pela lealdade e disponibilidade.

Aos professores Dr. Maurício Greco Cosso, José Alfredo Gomes de Mendonça, Marcos Dias Lanza, Paulo Roberto Gomes do Nascimento e Antônio Henrique Correa Rodrigues que transmitiram conhecimento e experiência a todos nós.

À minha madrinha e pilar de minha formação na PUC-Minas, Prof^a Vânia Lúcia Bicalho Cruz que sempre esteve ao meu lado com seu incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, do ICB onde desenvolvi grande parte dos meus experimentos, pelo carinho com que fui recebido.

Aos colegas da turma IV do mestrado 2010/2012, Eduardo Fraiha Henriques meu grande parceiro, às minhas “nobres colegas” Liziany Cardoso e Adriana Bicalho, ao Fernando Zander com seu super “motorhome” e Guilherme Mariano “meu segurança” pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas da turma de Ortodontia 2010/2012, Bernardo, Camila, Manu, Ana Petraconi, Tarsila, Soraya, sempre “juntos e misturados”!

Às funcionárias do bloco e clínicas, Luzia, Leidiane, Alenice, Vera, Cris, Marly, Poly e a todos os funcionários que sempre me receberam com todo carinho.

Às secretárias Silvânia e Angélica, pelo carinho, disponibilidade e paciência. Também pelos “puxões de orelha” nos cobrando a pontualidade.

Ao Dr. Maurício Aquino, do Lab. Hermes Pardini, pela disponibilidade e educação com que nos recebeu; em colaboração à nossa pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta etapa da minha vida profissional se tornasse realidade, o meu MUITO OBRIGADO.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos da enxertia de uma matriz tridimensional de quitosana-gelatina (QG) associada ou não ao gel de ácido hialurônico 1% (Hialuronana/HA) no reparo de defeitos ósseos intrabuciais em ratos. Por se tratar de um defeito ainda não descrito na literatura, a descrição detalhada dos protocolos e recursos técnicos para sua reprodutibilidade configurou-se também como objetivo do estudo. Defeitos ósseos de dimensão padronizada foram criados nos maxilares de ratos, na área do 1º molar superior. Uma mesa cirúrgica desenvolvida e patenteada nesse projeto contribuiu grandemente para a viabilização e padronização dos defeitos. As cavidades foram preenchidas com 1. Solução 1% ácido hialurônico (HA); 2. Esponja tridimensional da matriz quitosana-gelatina (QG); 3. HA associado à matriz de quitosana-gelatina (HA+QG). Defeitos preenchidos naturalmente com coágulo sanguíneo serviram como controles. A mucosa sobre os defeitos foi devidamente suturada. Os animais foram sacrificados após 7 e 21 dias, para análise histológica e quantificação da deposição óssea. A morfometria foi realizada em 6 amostras por grupo, pela leitura de matriz de colágeno recém depositada na área central do defeito, em cortes corados com Tricrômico de Gômori, com auxílio do Software Image-Jey. Fotografias macroscópicas foram utilizadas para avaliação clínica da cicatrização gengival. O tratamento com HA propiciou, aos 7 dias, um avanço na cicatrização gengival. Os demais grupos não revelaram diferença entre si. Entretanto, aos 21 dias, todos os grupos apresentaram nível de cicatrização gengival similares. A análise morfométrica aos 7 dias demonstrou um nível de deposição óssea ainda muito baixo, menos que 1% para todos os grupos, embora estatisticamente superior nos grupos tratados com a associação HA+QG. Aos 21 dias, a maior deposição de colágeno ocorreu nos grupos HA e QG, ambos superiores aos grupos CO e HA+QG $[(HA=QG)>(CO=HA+QG)]$. A avaliação histológica revelou aspectos favoráveis ao grupo QG em relação ao HA, em termos de extensão da área de reparo e contenção da invasão epitelial na área do defeito. A deposição óssea nos grupos CO e HA estava concentrada na área mais profunda do defeito e apresentava trabéculas maduras, bem delineadas e espessas. Nos grupos QG, a área de neoformação ocupava a maior parte do defeito. Além disso, a matriz de colágeno tinha aspecto mais imaturo, sugerindo uma fase intermediária do processo de reparo ósseo. As lâminas de quitosana mantinham íntimo contato com

células e tecido conjuntivo, sem sinais de encapsulamento. As lâminas residuais de quitosana impediram a invasão epitelial para dentro do defeito, o que não foi visualizado nos grupos CO/HA. Nos grupos HA+QG, o processo de degradação da quitosana pareceu mais acelerado do que nos grupos QG, reduzindo a área de scaffold. Em suma, o modelo de defeito ósseo desenvolvido no presente estudo revelou-se um método viável, reproduzível e apropriado às avaliações de biomateriais e enxertia óssea em Odontologia. Nossos dados macro e microscópicos revelaram melhores resultados com a enxertia da matriz pura de quitosana-gelatina, o que nos permite sugerir o emprego deste biomaterial como uma alternativa promissora para o preenchimento de defeitos ósseos críticos em cavidade bucal.

Palavras-chave: Reparo ósseo. Biomateriais. Ácido hialurônico. Quitosana-gelatina. Defeito ósseo intrabucal.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of a tridimensional matrix graft of chitosan-gelatin (CG) associated or not to a gel of hyaluronic acid 1% (Hyaluronan/HA) in the repair of intraoral bone defects in rats. Due to the fact of being an unpublished study, the detailed description of the protocols and technical resources used was also part of our goals. Bone defects of a standard dimension were created in rat maxillas in the area of the first superior molar. A surgical table was developed and patented in this study, which has contributed to enable standardized defects. The cavities were filled with: 1. 1% hyaluronic acid solution (HA); 2. tridimensional sponge of chitosan-gelatin matrix (CG); 3. HA associated to the matrix of chitosan-gelatin (HA+CG). Defects naturally filled with blood clot were used as controls (CO). Animals were sacrificed after 7 and 21 days to histological analysis and bone neoformation quantification. Morphometric analysis was performed in 6 samples per group by the evaluation of the collagen matrix in the central area of the defect, in sections stained with Gomori's trichrome, using ImageJ software. Macroscopic photographs were used for clinical evaluation of gingival healing. Treatment with HA resulted in improvement of gingival healing on day 7. On day 21, all groups presented similar levels of gingival healing. Morphometric analysis on day 7 demonstrated a low level of bone deposition, lower than 1% for all the studied groups, despite statistically superior in groups treated with HA+CG association. On day 21, the largest collagen deposition occurred in HA and CG, both superior than the groups CO and HA+CG $[(HA=CG) > (CO=HA+CG)]$. The histological assessment revealed favorable aspects to CG compared to HA in terms of the healing area extension as well as of reduction epithelial invasion in the defect area. Bone deposition in groups CO and HA was concentrated in the deepest area of the defect and presented well delimited, thick mature trabeculae. In CG, the neoformation area occupied the major part of the defect and, the collagen matrix had an immature aspect suggesting an intermediate phase of the bone repair process. Chitosan sheets maintained a close contact with cells and connective tissue, with no signs of encapsulation. Chitosan residual fragments prevented epithelial invasion inside the defect which was not seen in CO and HA. In HA+CG, chitosan degradation process seemed more accelerated than in isolated CG group, reducing the area of cellular scaffold. In conclusion, the model of bone defect developed in the present study is a

viable, reproducible and an appropriate method to the analysis of biomaterials and bone grafting in Dentistry. Our macroscopic and microscopic data revealed better results with chitosan-gelatin matrix graft which suggest its use as a promising alternative to fill critical bone defects in the oral cavity.

Keywords: Bone repair. Hyaluronic acid. Chitosan-gelatin. Intraoral bone defects.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Padronização das técnicas cirúrgicas	27
3.2.1 Avaliação topográfica e simulação dos procedimentos em crânios dissecados	27
3.2.2 Avaliação radiográfica dos defeitos	29
3.3 Procedimentos cirúrgicos in vivo	30
3.3.1 Desenvolvimento de uma mesa cirúrgica para procedimentos intraorais em animais de pequeno porte.	30
3.3.2 Protocolo de criação do defeito ósseo	30
3.4 Métodos de avaliação macroscópica	34
3.5 Métodos de avaliação histológica e morfométrica	36
3.6 Análise estatística.....	41
4 ARTIGO DA DISSERTAÇÃO	43
5 ARTIGO DE REVISÃO	66
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

A busca pelo adequado suporte ósseo visando as reabilitações orais, tanto por implantes quanto por próteses muco-suportadas representa um desafio para os pesquisadores. A reconstrução óssea, em Odontologia, é de fundamental importância para a reabilitação funcional e estética do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas por traumas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (WILTFANG et al., 2004; CHIAPASCO et al., 2012; KANG et al., 2012). A recuperação da estrutura óssea perdida, mesmo aquelas atróficas, conseqüentes de perdas dentárias, pode demandar a realização de cirurgias de enxerto ósseo ou inserção de biomateriais (AROSARENA; COLLINS, 2005; IZUKA et al., 2005).

O tecido ósseo de origem autógena, com suas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas, é considerado o material “gold standart” (padrão-ouro) de enxertia nas cirurgias ósseas reconstitutivas (BURCHARDT, 1983; SPINETTO et al., 2011; JIMI et al., 2012). Todavia, sua escolha apresenta como desvantagens a viabilidade da área doadora, morbidade e imprevisibilidade no processo de reabsorção do enxerto (JOHANSSON et al., 2001; NKENKE et al., 2001; SPRINGER et al., 2004; WEIBULL et al., 2009). Recentes avanços em biotecnologia têm propiciado à clínica cirúrgico-odontológica o acesso a uma diversidade de biomateriais para enxertia e, em alguns casos, possibilitado a inserção precoce de implantes bucais. Contudo, a busca por um material ideal para enxertia óssea permanece como um grande desafio (WONG; RABIE, 2005; TORRES et al., 2011).

Estudos recentes têm demonstrado o potencial osteoindutor do ácido hialurônico (Hialuronana=HA) e a possibilidade de sua utilização como um coadjuvante terapêutico em odontologia (MENDES et al., 2008; 2010). O tratamento de alvéolos dentários de ratos com HA promoveu a cicatrização da área lesada após exodontias dos primeiros molares superiores especialmente por acelerar a deposição óssea e a expressão de proteínas osteogênicas como a osteopontina (OPN) e a proteína morfogenética do osso tipo-2 (BMP-2) (MENDES et al., 2008; 2010).

Outros biomateriais, têm se destacado por seu potencial osteocondutor. Estes são elaborados como matrizes tridimensionais que servem de suporte estrutural

(*scaffold*) e guias para o direcionamento da proliferação de células osteogênicas visando a reconstrução tecidual óssea (ABARRATEGI et al., 2008; 2010; BHATTACHARYYA et al., 2008; SITHARAMAN et al., 2008). Matrizes tridimensionais à base quitosana têm chamado a atenção dos pesquisadores pela possibilidade de associação com substâncias que favorecem a formação óssea (MEDRADO et al., 2006). Este biopolímero natural apresenta algumas propriedades fundamentais para a engenharia tecidual como biocompatibilidade e a biodegradabilidade (SENEL et al., 2000; MOROZ et al., 2012).

A quitosana tem sido extensivamente estudada como *scaffold* (suporte) para cultura celular, configurando-se como uma matriz tridimensional adequada à adesão celular, visando o posterior transplante do tecido construído *in vitro* (LI et al., 2010; COSTA-PINTO; REIS; NEVES, 2011; IM et al., 2012) para sítios receptores *in vivo* (COSTA-PINTO et al., 2012). Associações da quitosana com outras moléculas como hidroxiapatita, fosfatos inorgânicos, colágeno, ácido hialurônico e outros polímeros têm sido testadas no intuito de melhorar as propriedades biológicas da quitosana e sua performance para a engenharia de tecidos *in vitro* (SHI et al., 2005; STEPHAN et al., 2010, YANG et al., 2010; COIMBRA et al., 2011a, b). Dentre essas associações a mistura de quitosana com gelatina tem revelado resultados bastante satisfatórios (YANG et al., 2004). O colágeno presente na gelatina favorece a adesão e proliferação celular (PITTENGER et al., 1999; HUANG et al., 2005; TAN et al., 2009). Uma mistura (3:1) de quitosana e gelatina (QG), reticulada com glutaraldeído, foi recentemente desenvolvida para bioengenharia tecidual óssea, pelo Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG (MIRANDA, 2010; MIRANDA et al., 2011). Após a caracterização química e morfológica dessa matriz de QG, o biomaterial foi implantado em alvéolos dentários de ratos para análises histológicas *in vivo*. Os resultados revelaram que matrizes de quitosana-gelatina apresentam propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para utilização como material de preenchimento de alvéolos dentários, bem como de carrear células tronco (MIRANDA et al., 2011; 2012).

Modelo de alvéolo dentário após exodontias tem sido um modelo de estudo bastante utilizado em pesquisas para a avaliação de fatores que possam acelerar ou retardar o processo de reparo ósseo (BOECK et al., 1999; PINTO et al., 2001; YUGOSHI et al., 2002; KANYAMA et al., 2003; TEÓFILO et al., 2004). Entretanto, embora representem um modelo viável para análise da reconstituição óssea, essas

cavidades mínimas, geradas pela exodontia dos molares de ratos, apresentam algumas limitações como a variação no tamanho dos alvéolos e a presença dos septos interradiculares que dificulta a inserção de materiais sólidos e inviabiliza a padronização do volume de biomaterial inserido no interior das cavidades alveolares. Além disso, os alvéolos dentários não representam a realidade da demanda odontológica em termos de perda óssea. Alvéolos dentários íntegros são modelos passíveis de variações não apenas quanto à dimensão, mas também quanto à quantidade de resíduos remanescentes do ligamento periodontal, os quais podem interferir na interpretação dos resultados.

Modelos de defeitos ósseos mais amplos e padronizados têm sido tradicionalmente criados em tíbias, fêmures e calota craniana de ratos e coelhos (GIELKENS et al., 2008; LEE et al., 2010; PURICELLI et al., 2010). Tais sítios estão, entretanto, livres de fatores como bactérias, fluxo salivar, alterações de pH e forças mastigatórias, o que inviabiliza a extrapolação direta dos resultados para clínica odontológica. Alguns estudos que simulam os defeitos ósseos, como exemplo, as fraturas de mandíbula, os múltiplos implantes ou os enxertos ósseos em bloco têm utilizado modelos de defeitos ósseos criados nos maxilares de cães ou maxilares de primatas (LYNCH et al., 1991; KIM et al., 2005). Tais animais constituem modelos adequados para cirurgias intraorais, devido ao amplo campo visual, com acesso cirúrgico direto e com a utilização dos recursos técnicos similares aos disponibilizados na clínica odontológica (GIANNOBILE; FINKELMAN; LYNCH, 1994; ELSALANTY et al., 2009; BARONE et al., 2011; ZHOU et al., 2010). Entretanto, não representam uma realidade acessível à maioria dos laboratórios de pesquisa científica, tanto por questões éticas, quanto pelo custo e pelas condições específicas de manejo e espaço para manutenção desses animais em biotério. Poucos estudos intra-bucais têm sido realizados em animais de pequeno porte, (ratos e camundongos), modelos de baixo custo e mais acessíveis aos laboratórios de pesquisa na área da Odontologia (BIGI et al., 2011). Possivelmente, uma das razões para a deficiência de estudos em defeitos ósseos intrabucais nesses modelos experimentais decorre da dificuldade técnica para a realização dos procedimentos intraorais em animais de pequeno porte. De fato, o acesso intraoral aos maxilares de ratos, camundongos, coelhos, especialmente quando o procedimento cirúrgico exige o corte por instrumentos rotatórios elétricos sob irrigação, é limitado por alguns fatores, tais como: limitada abertura dos maxilares, com difícil visualização do campo

cirúrgico intrabucal; necessidade de um sistema de irrigação e de aspiração contínua com soro ou solução salina simultaneamente à utilização dos motores cirúrgicos utilizados na criação de defeitos ósseos; necessidade de afastamento e de proteção dos tecidos moles, para evitar acidentes iatrogênicos como a dilaceração tecidual de tecidos periodontais, língua e mucosa labial e jugal (bochechas); e necessidade de suporte, apoio ou fixação da cabeça do animal a fim de permitir o acesso intraoral de instrumentos cortantes (mecânicos ou elétricos) com segurança.

A necessidade de muitos aparatos e de mãos auxiliares para sustentar os aparelhos e os instrumentais indispensáveis aos procedimentos como fonte de luz, irrigação, sucção, afastadores de tecidos, dificultam a realização de cirurgias intrabucais em pequenos animais.

Subsidiado pelos resultados prévios da literatura em relação aos efeitos dos biomateriais à base de quitosana-gelatina (MIRANDA et al., 2011) e ao ácido hialurônico em alvéolos dentários (MENDES et al., 2008), o presente projeto propõe a avaliação desses biomateriais isolados e em associação em um modelo de defeito ósseo intrabucal desenvolvido nos maxilares de ratos. A implementação desse modelo representará um avanço em relação aos modelos de alvéolos dentários, onde a padronização do volume de biomaterial inserido e controle das áreas preenchidas são dificultados pelos septos interradiculares e discrepâncias na morfologia radicular. O modelo ósseo de dimensões mais amplas e padronizadas permitirá a definição prévia do volume do biomaterial enxertado, garantindo que o mesmo ocupará toda a área do defeito. Outro diferencial do defeito ósseo proposto, em relação ao modelo de alvéolos, refere-se à ausência, neste modelo, da influência do ligamento periodontal. Dados da literatura têm demonstrado a influência de células do ligamento periodontal no processo de reparo ósseo (TOUR et al., 2012). A presença de resíduos do ligamento periodontal pode gerar variação dos resultados pela discrepância natural de tamanho e número de raízes quando se trabalha com alvéolos dentários íntegros. A possível implementação do modelo de estudo proposto abre perspectivas para avaliação do reparo ósseo de biomateriais enxertados *in vivo*, na cavidade oral de animais de pequeno porte, como ratos, camundongos, gatos, marsupiais, coelhos, modelos de baixo custo e fácil disponibilidade.

Enfim, o presente estudo, agregou simultaneamente duas frentes de pesquisa interligadas; a avaliação dos efeitos dos biomateriais (ácido hialurônico/HA e quitosana-gelatina/QG) no reparo ósseo intrabucal e paralelamente, a avaliação de um novo modelo de estudo, ainda não descrito na literatura; um defeito ósseo intrabucal padronizado, criado por acesso intraoral nos maxilares de ratos. Espera-se que os resultados aqui apresentados possam contribuir para as pesquisas no campo da bioengenharia tecidual óssea em Odontologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da Hialuronana (HA/ácido hialurônico) e QG (blenda quitosana-gelatina) isoladamente e em associação (HA+QG), no reparo de defeitos ósseos intrabuciais de dimensões padronizadas, criados em maxilares superiores de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- a) desenvolver protocolos e recursos técnicos (mesa cirúrgica) que garantam a reprodutibilidade e viabilidade do modelo de defeito ósseo intrabucal proposto como sítio de inserção de biomateriais em maxilares de ratos;
- b) inserir nos referidos defeitos ósseos, um volume conhecido e padronizado dos biomateriais HA, QG, HA+QG e avaliar seus efeitos na cicatrização gengival e no processo de neoformação óssea, após 7 e 21 dias dos procedimentos cirúrgicos;
- c) investigar, por microscopia de luz, a biocompatibilidade da matriz de quitosana-gelatina, associada ou não ao ácido hialurônico, considerando sua integração com o tecido, níveis de inflamação, biodegradação ou encapsulamento do biomaterial;
- d) correlacionar o grau de cicatrização gengival (avaliação macroscópica) com as análises histológicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 300 e 350g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG. Os animais foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade. Os ratos tiveram acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório, exceto no período após os procedimentos cirúrgicos de extração dos primeiros molares e criação do defeito ósseo, quando os animais permaneceram por cinco dias em dieta pastosa (ração moída) e leite, além de água. Importante ressaltar que durante o período pós-operatório tanto a ração moída quanto o leite eram renovados a cada 24 horas e os animais eram acondicionados um por gaiola. De acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), os animais receberam analgésicos, anti-inflamatórios profiláticos e antibióticos na fase pós-operatória. O projeto foi previamente aprovado pelo CETEA/UFMG sob número 284/2010 (ANEXO A).

3.2 Padronização das técnicas cirúrgicas

3.2.1 Avaliação topográfica e simulação dos procedimentos em crânios dissecados

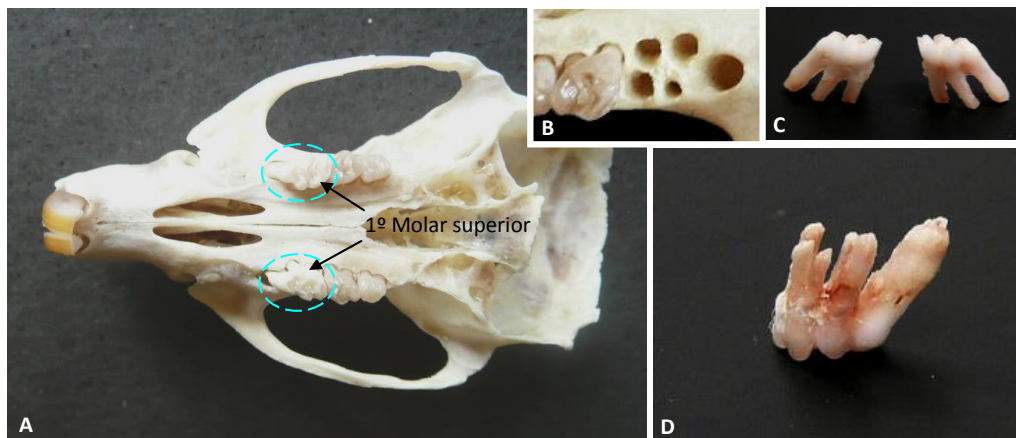
Previamente aos procedimentos cirúrgicos, um minucioso estudo foi realizado em crânios dissecados de ratos, para a definição do local mais adequado para a criação do defeito ósseo pretendido. Tal estudo preliminar visava o conhecimento da anatomia do processo alveolar, seus acidentes anatômicos e topografia (FIG. 1)

Além disso, foi possível testar diferentes instrumentos e acessórios antes da fase *in vivo*. Pelas dimensões pretendidas, concluiu-se, após inúmeras tentativas, que a área dos alvéolos distais (quatro raízes) do 1º molar superior, seria o local mais apropriado, para todos os animais independente do tamanho, para a criação de uma loja óssea de aproximadamente 2,5mm de diâmetro por 2,5mm de profundidade.

Os implantes de quitosana (grupos QG ou HA+QG) eram discos com espessura de 1,5mm e diâmetro padronizado segundo tamanho do defeito ósseo criado (2,5mm). Os discos de QG seriam aplicados no interior das cavidades ósseas sem compressão, com o auxílio de um porta-amálgama (FIG.2).

Diversas simulações em crânios dissecados (FIG.3) foram realizadas com todos os procedimentos cirúrgicos, incluindo a inserção de discos de quitosana, o que permitiu a definição prévia do diâmetro (2,5mm) e espessura (1,5mm) de biomaterial perfeitamente adequados às dimensões do defeito criado.

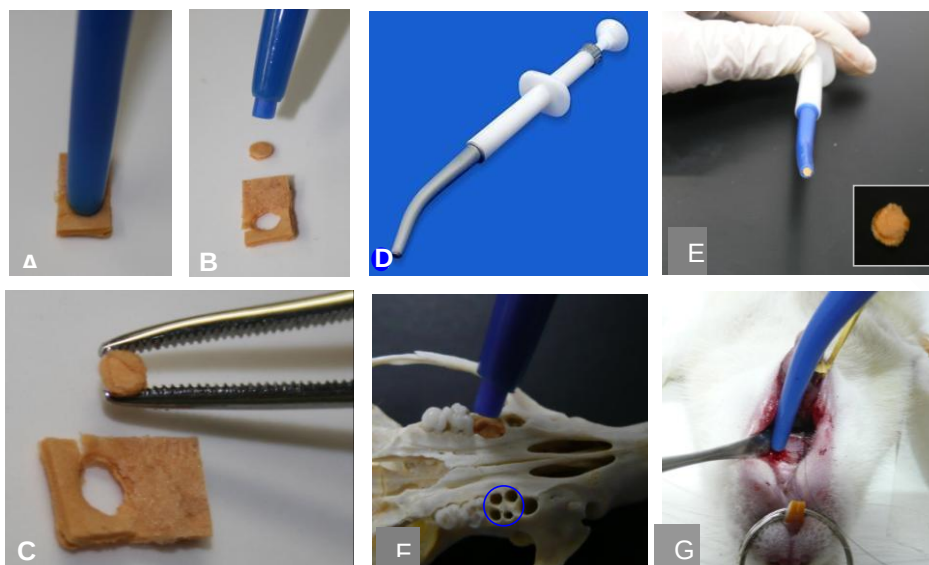
Figura 1. Análise topográfica de crânios, alvéolos e raízes dos 1ºs molares superiores



(A) Avaliação das dimensões e topografia das coroas; (B) alvéolos e (C,D) raízes dos 1ºs molares superiores.

Fonte: Fotos do autor

Figura 2. Simulação do procedimento cirúrgico em crânios dissecados



(A-C) Preparo dos discos de quitosana para inserção nos defeitos ósseos. (D-G) Método de inserção dos discos de quitosana nos defeitos ósseos com a utilização de porta-amálgama.

Fonte: Fotos do autor

Figura 3: Simulação dos defeitos em crânios dissecados

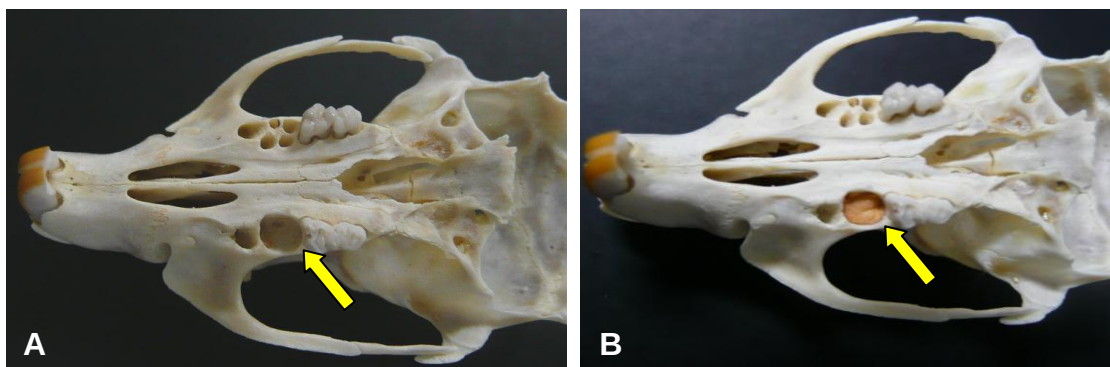


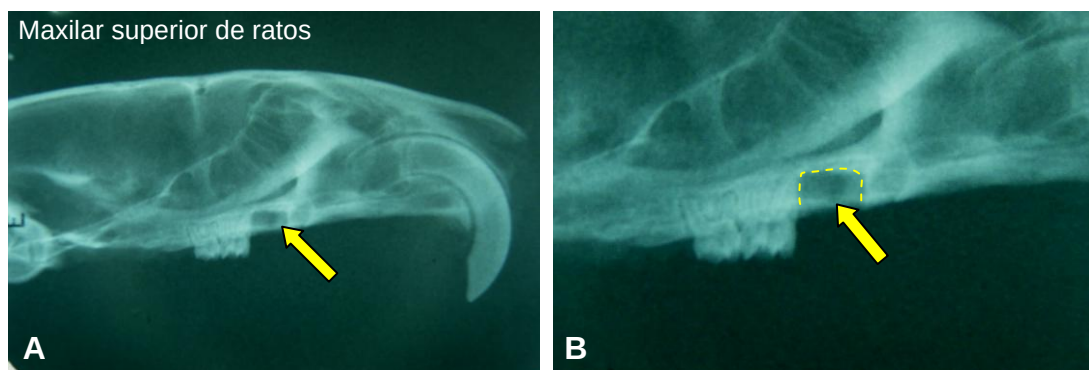
Imagem do defeito antes (A) e depois (B) da inserção do biomaterial a base de quitosana (setas).

Fonte: Fotos do autor

3.2.2 Avaliação radiográfica dos defeitos

A fim de avaliar os limites das paredes ósseas remanescentes do defeito proposto e suas relações com os acidentes anatômicos, uma análise radiográfica foi também realizada (FIG. 4).

Figura 4. Avaliação radiográfica do defeito ósseo



(A) Avaliação radiográfica do defeito ósseo (seta) criado na área dos alvéolos das raízes distais do 1º molar superior de ratos Wistar. (B) Imagem ampliada do defeito contornado em linha tracejada (seta).

Fonte: Fotos do autor

3.3 Procedimentos cirúrgicos in vivo

3.3.1 *Desenvolvimento de uma mesa cirúrgica para procedimentos intraorais em animais de pequeno porte.*

A realização dos procedimentos *in vivo* só foi possível após a elaboração de uma mesa cirúrgica especificamente desenvolvida para essa finalidade. O equipamento foi idealizado a fim de otimizar a visualização do campo cirúrgico, permitir a utilização do micromotor odontológico com segurança para os animais incluindo o sistema de irrigação e aspiração de fluidos, e também para sustentar instrumentos utilizados na proteção dos tecidos moles. Com a utilização da mesa cirúrgica, a demanda de mãos auxiliares, normalmente requeridas nesses procedimentos é reduzida. Tal equipamento, portanto, configura-se também como importante produto desse estudo. Seu caráter inovador diante do estado da técnica, e a possível credibilidade no meio científico, pode ser constatada pela aprovação do depósito de patente dessa invenção junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual. O depósito da invenção nomeada “Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte” foi realizado junto ao INPI em 04/08/2011 (ANEXO B). Encontra-se na fase de sigilo de 18 meses, o que justifica, no momento, a indisponibilidade de acesso pela Internet. O projeto contou com o apoio técnico de profissionais da Engenharia Mecânica, os quais têm demonstrado um crescente interesse pela divulgação do produto. O protótipo foi selecionado para apresentação, na área de Bioengenharia, no Congresso Nacional de Engenharia Mecânica que ocorrerá em Julho/2012 em São Luis do Maranhão. O artigo completo sobre o equipamento com as possíveis aplicações em Odontologia, incluindo a criação do defeito ósseo, objetivo do presente estudo, foi selecionado pela Associação Brasileira de Engenharia e Ciências Mecânicas, para publicação na Revista do VII Congresso de Engenharia Mecânica/ 2012 (ANEXO C - ISSN 2178-180X).

3.3.2 *Protocolo de criação do defeito ósseo*

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma combinação de sedativo e relaxante muscular, cloridrato de xilazina 2% (0,1ml/100g peso corporal) e a base anestésica, cloridrato de Ketamina 10% (0,1ml/100g).

Previamente à cirurgia, os animais receberam uma dose de antiinflamatório de uso veterinário, Flunixinina/meglumina (Banamine® injetável pet), 1,1 mg/kg. Após posicionamento dos animais na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, foram extraídos por via alveolar, os primeiros molares superiores direitos e esquerdos, utilizando-se um instrumento de *Hollemback* para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e remoção dos dentes. Após confirmação da integridade dos dentes removidos, o defeito ósseo padronizado foi criado com auxílio de uma broca diamantada cilíndrica 2094, acoplada a um contra-ângulo (Kavo)/micromotor odontológico (Beltec) de bancada, sob irrigação com solução salina estéril. Foram removidos os septos interradiculares das raízes distais. O septo da raiz mesial foi sempre preservado. Os defeitos ósseos obtidos tinham dimensão de aproximadamente 2,5mm de diâmetro x 2,5 mm de profundidade. As cavidades ósseas foram preenchidas de acordo com os seguintes grupos experimentais (n=6 por grupo):

- a) Grupo Controle – preenchimento natural com coágulo sanguíneo;
- b) Grupo HA isolado – injeção local de 30µl de gel de HA 1%;
- c) Grupo QG isolada;
- d) Grupo HA+QG.

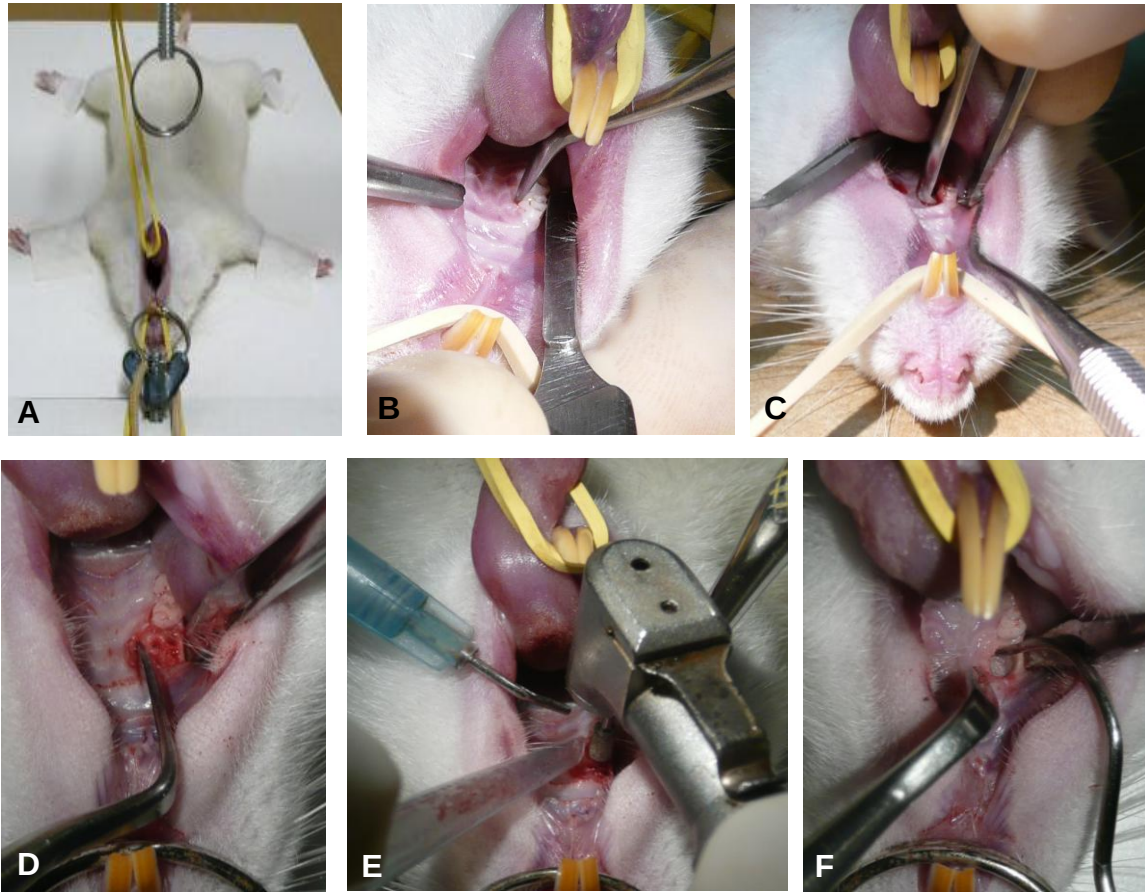
O preenchimento dos defeitos com os biomateriais foi realizado de forma aleatória, sem critérios prévios de seleção de animais por grupo.

As bordas da mucosa sobre o sítio operado foram suturadas com fio de nylon, biosut 6,0, por meio da técnica de cochoeiro modificada. Os animais receberam 3 doses subcutâneas do antibiótico oxitetraciclina (Terramicina® Solução Injetável), 10mg/kg, uma a cada 24 horas. Os animais foram sacrificados após 7 e 21 dias.

Animais pertencentes ao grupo de 21 dias foram anestesiados após 7 e 14 dias, para o controle macroscópico da evolução clínica da cicatrização. Nesse caso, as suturas foram removidas no 14º dia após o procedimento cirúrgico.

As figuras 5 e 6 ilustram as principais etapas do protocolo cirúrgico.

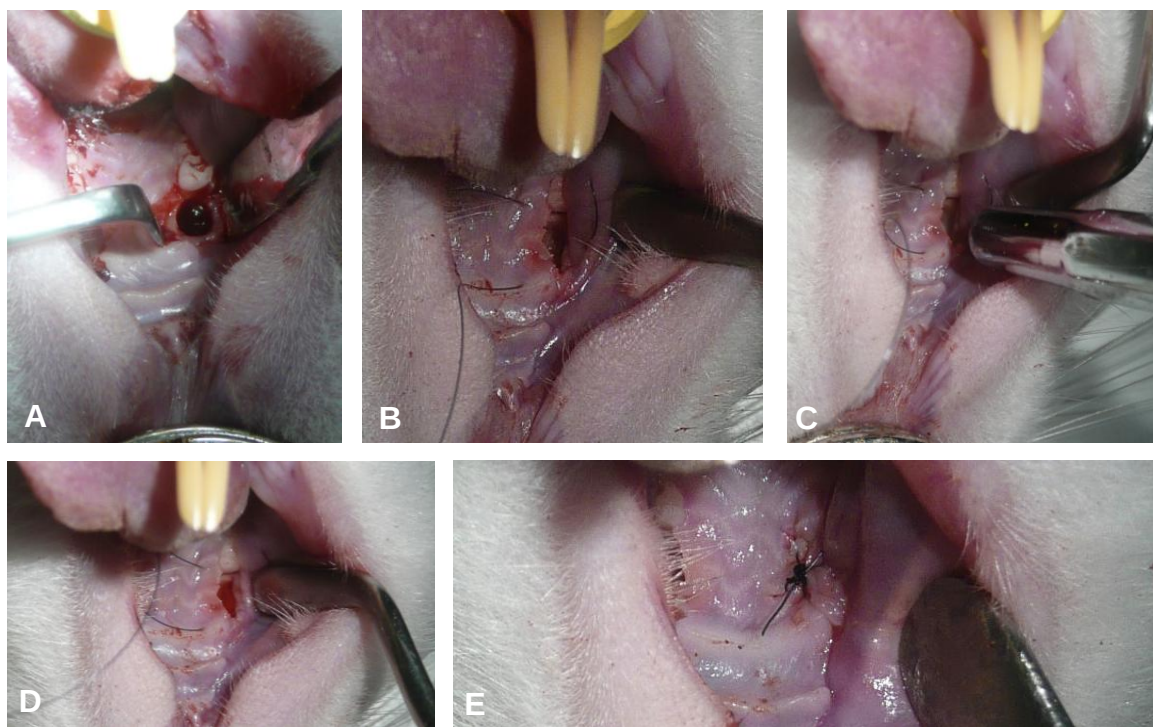
Figura 5. Procedimentos cirúrgicos in vivo



(A) Animal posicionado na mesa cirúrgica em decúbito dorsal. (B) Afastamento do tecido gengival por sindesmotomia. (C) Luxação do 1º molar com pinça dente de rato. (D) Visualização dos alvéolos das raízes distais. (E) Criação do defeito com ponta diamantada cilíndrica em baixa rotação sob irrigação e aspiração. (F) Conferência de ausência de perfuração; planificação da parede de fundo e remoção completa das cavidades alveolares.

Fonte: Fotos do autor

Figura 6. Procedimentos cirúrgicos in vivo.



(A) Visualização do defeito preenchido por coágulo. (B) Posicionamento dos fios de sutura antes da inserção do biomaterial. (C) aplicação do disco de quitosana com porta-amálgama. (D) reposicionamento das bordas da mucosa gengival. (E) Aspecto do sítio cirúrgico após a sutura.

Fonte: Fotos do autor

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram monitorados até o final do efeito anestésico, garantindo o bem-estar dos mesmos no pós-operatório imediato. Após as cirurgias, a fim de minimizar os possíveis traumas sobre as áreas operadas, os animais foram isolados, ficando um em cada gaiola. Receberam dieta pastosa (ração triturada e umidecida específica para roedores, marca Labina) e leite integral vitaminado, por 5 dias. A água era renovada e as gaiolas limpas, com detergente, álcool e hipoclorito de sódio também diariamente, a fim de garantir um ambiente limpo e seco durante toda a fase de cicatrização, até a data do sacrifício dos animais. No período pós-operatório não foram utilizadas maravalhas, para evitar sua introdução na cavidade oral dos animais.

3.4 Métodos de avaliação macroscópica

O efeito dos biomateriais no fechamento das feridas foi avaliado por fotos macroscópicas do sítio cirúrgico a cada 7 dias, onde a cicatrização gengival foi avaliada por 3 avaliadores segundo escores previamente definidos (FIG. 7). Um examinador padrão (*gold standard*) conduziu todo o processo de treinamento dos examinadores.

Para obtenção das fotos, os animais foram anestesiados com a metade da dose de anestésico, suficiente para a imobilização dos animais e abertura de boca, com o auxílio de um afastador intra-bucal. Utilizamos a lente macro (Leika) da câmera fotográfica marca Panasonic DMC-TZ3, LUMIX, sem a utilização de flashes, a uma distância padrão de 5 cm do objeto de estudo.

Como foi definido o período de 14 dias para remoção dos pontos cirúrgicos, os animais que tiveram os pontos rompidos aos 7 dias, observados durante a análise macroscópica, foram excluídos e as amostras foram substituídas para compor a planilha das análises estatísticas.

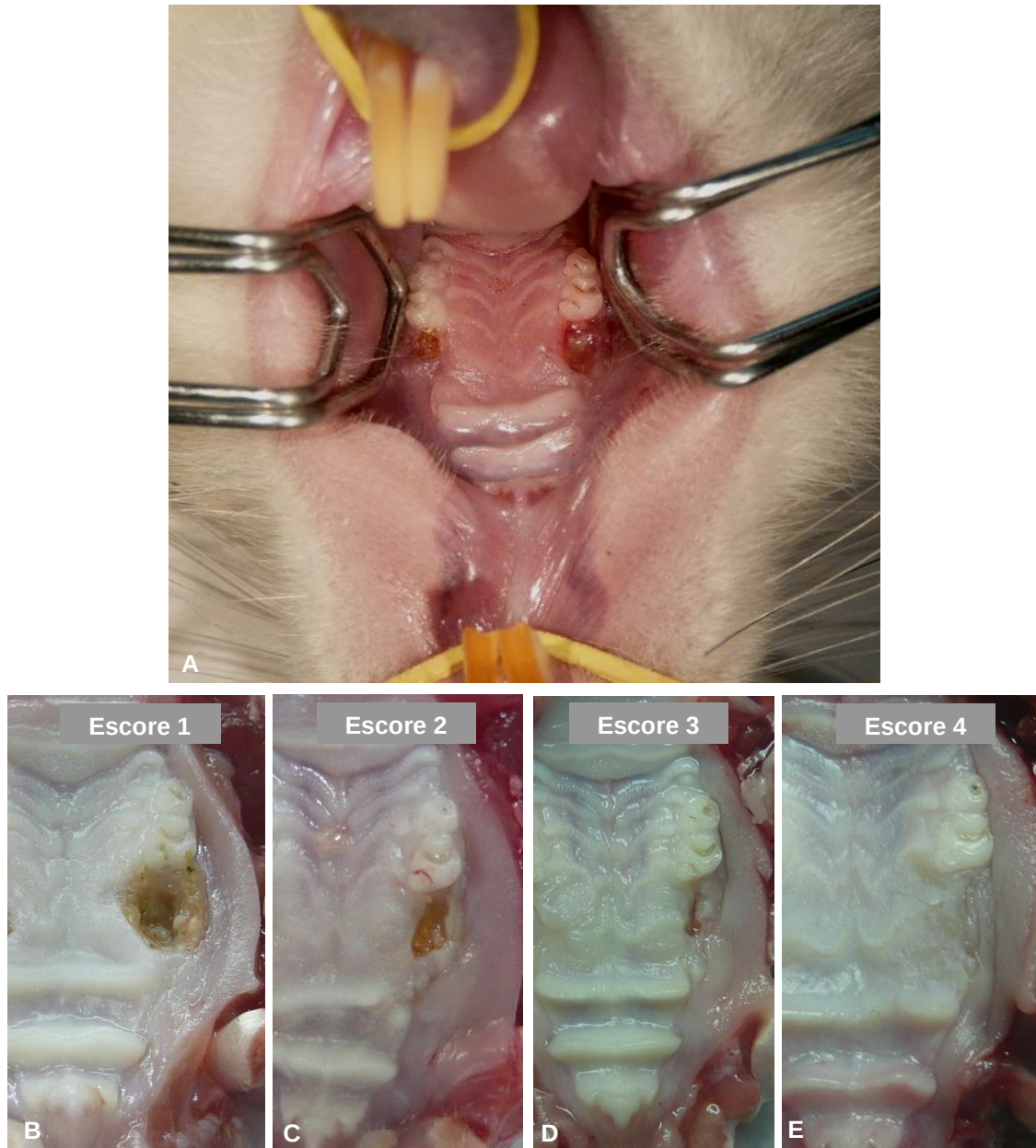
O nível de cicatrização epitelial foi definido segundo scores apresentados na Tabela 1/Figura 7.

Tabela 1. Escores do grau de epitelação do tecido gengival para análise macroscópica.

Escore	Grau de epitelação do tecido gengival
1	Máximo de 1/3 de área cicatrizada. Maior parte da ferida ocupada por tecido de granulação
2	Epitelização gengival em no máximo 2/3 da área operada.
3	Epitelização acima de 2/3
4	Epitelização concluída

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7. Fotos ilustrativas dos escores de cicatrização gengival.



(A) Abertura da cavidade bucal com os afastadores bucais, para as tomadas radiográficas. (B) Escore 1 – Máximo de 1/3 de área cicatrizada. Maior parte da ferida ocupada por tecido de granulação. (C) Escore 2- Epitelização gengival em no máximo 2/3 da área operada. (D) Escore 3 – Epitelização acima de 2/3. (E) Escore 4 – Epitelização concluída.

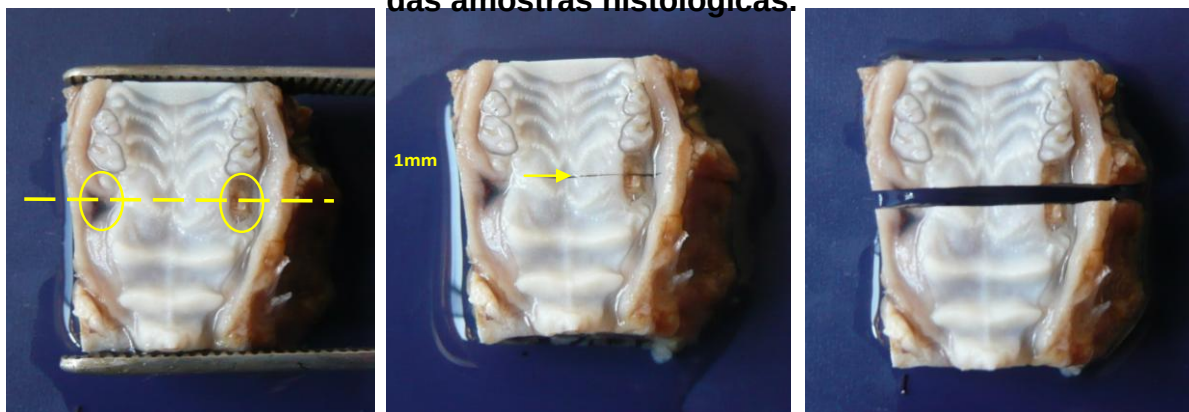
Fonte: Fotos do autor

3.5 Métodos de avaliação histológica e morfométrica

Os animais foram sacrificados por decapitação após 7 e 21 dias dos procedimentos, períodos estes baseados na experiência com a regeneração óssea em alvéolos dentários. O período de 7 dias foi selecionado por representar o período inicial de regeneração óssea alveolar, quando a reação inflamatória aguda, inerente ao processo cirúrgico, dá lugar ao início da deposição óssea. Aos 21 dias, estudos revelam que o processo de reparo ósseo está quase completo (BRANDÃO et al., 2002; ZIED et al., 2005), apresentando rede de trabéculas ósseas espessas e espaços medulares reduzidos (MENDES et al., 2008). Após o sacrifício, os animais tiveram as cabeças dissecadas, removendo-se a pele e o tecido muscular. As maxilas foram imediatamente fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10%, à temperatura ambiente, por 72 horas.

Após a fixação as maxilas foram desmineralizadas em solução desmineralizadora Planck Richol's, produzida pela mistura de cloreto de alumínio, ácido fórmico e ácido clorídrico. Após 48 horas de desmineralização, as peças foram aparadas e seccionadas em plano frontal, para permitir a visualização dos alvéolos direito e esquerdo ao mesmo tempo. Um corte preliminar na área central dos defeitos permitiu a padronização da área de microtomia e consequentemente, a uniformidade da região a ser avaliada em todos os grupos. O corte foi realizado a 1mm da face mesial da coroa do 2º molar (FIG. 8).

Figura 8. Padronização da secção frontal para inclusão das amostras histológicas.



O corte foi realizado na região do defeito ósseo, a 1mm da face mesial da coroa do 2º molar. As áreas circuladas correspondem aos sítios dos defeitos ósseos. Peça ilustrativa (21 dias após os enxertos).

Fonte: Fotos do autor

Após a desmineralização as peças foram imersas em água corrente por uma noite para retirada do excesso de Planck. Feito isso as peças foram processadas para histologia, conforme protocolo a seguir:

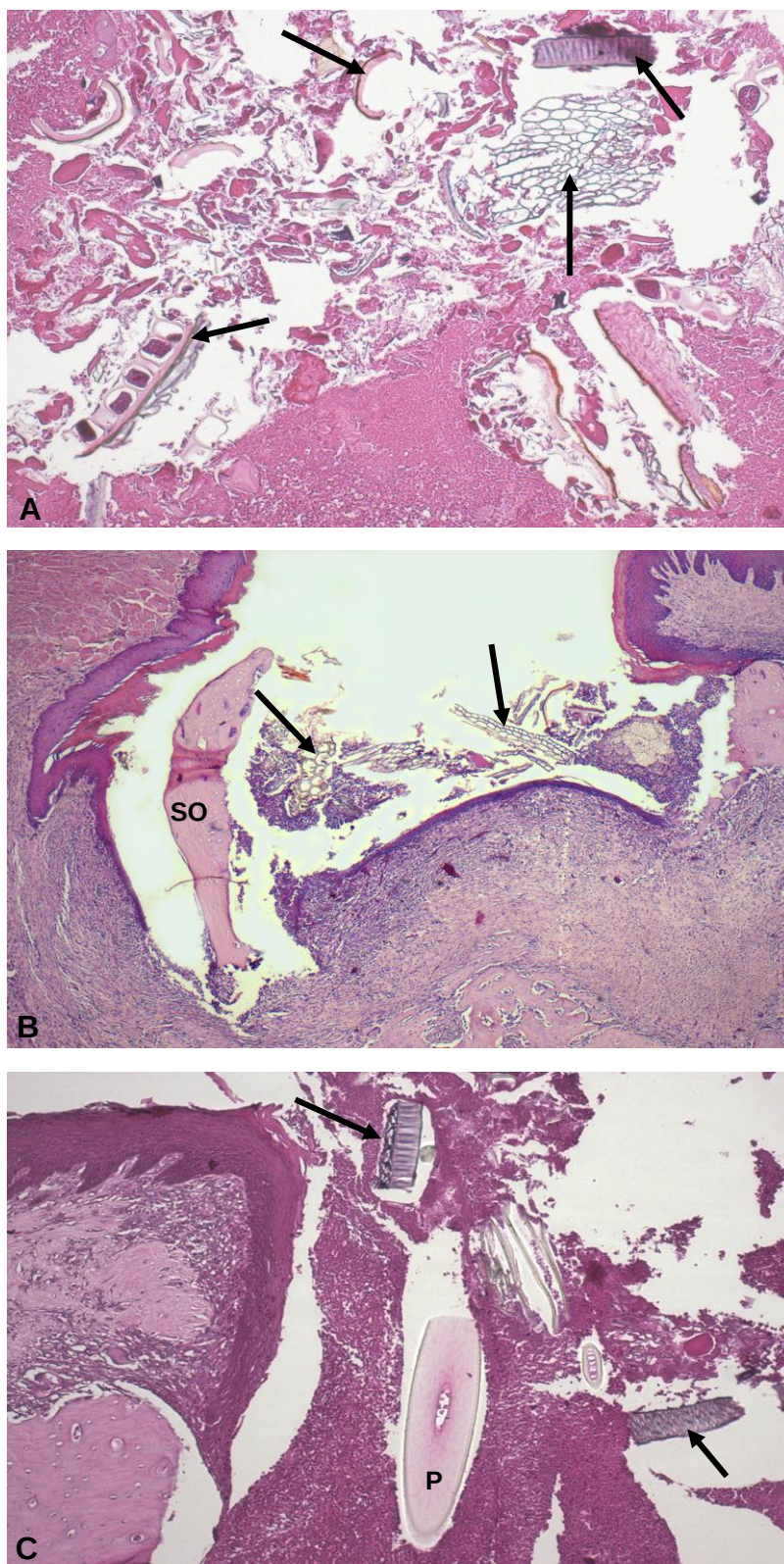
- a) desidratação em uma série crescente de álcoois (70%, 80% I, 80% II, 90%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III, absoluto IV), por 30 minutos em cada banho;
- b) diafanização em três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;
- c) infiltração em três banhos de parafina a 58°C, durante 40 minutos cada;
- d) inclusão em parafina histológica, em moldes pré-definidos para microtomia em plano frontal.

Cerca de 110 cortes seriados de 6µm de espessura, de cada amostra foram montados em lâminas histológicas previamente tratadas com silano 2%. As lâminas foram coradas em Tricrômico de Gômori para análises morfométricas e com Hematoxilina eosina, em cortes alternados, para avaliação histológica. Os parâmetros histológicos avaliados comparativamente entre os grupos foram:

- a) presença de Infiltrado inflamatório
- b) interação do biomaterial com o tecido adjacente e com o tecido ósseo neoformado
- c) nível de cicatrização epitelial
- d) presença de áreas de encapsulamento do biomaterial
- e) biodegradação da matriz de quitosana – tipos de células reabsortivas presentes
- f) interferência/ efeitos dos implantes (HA, QG, HA+QG) no reparo ósseo.

Durante a análise histológica, foram consideradas como critérios de exclusão das amostras, a presença de pelos, maravalha, fragmentos ou corpos estranhos no interior dos defeitos. A Figura 9 ilustra alguns desses resíduos, introduzidos no interior do defeito ósseo em decorrência da perda precoce dos pontos na fase pós-cirúrgica. Todas as amostras que apresentavam pontos rompidos antes de 7 dias foram excluídas do estudo.

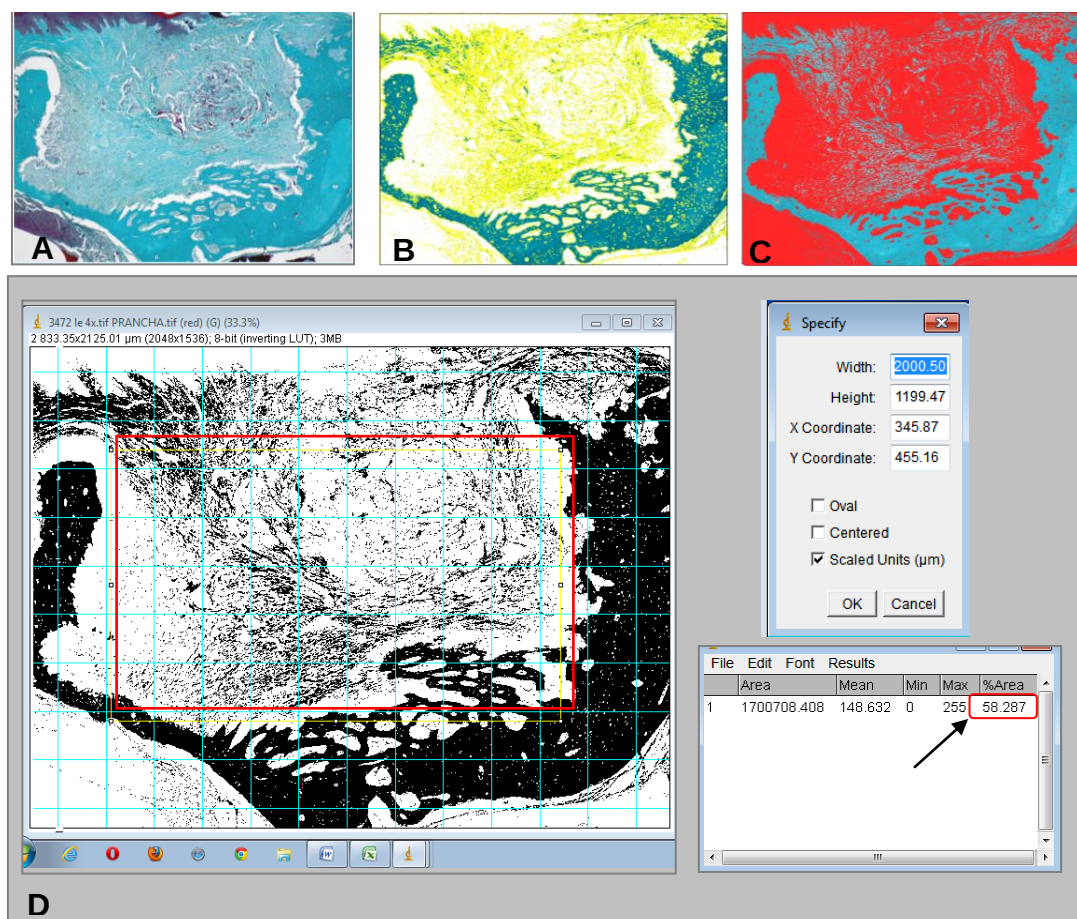
Figura 9. Critérios de exclusão das amostras para análise histológica.



(A) Imagem histológica de fragmentos de corpos estranhos no interior da cavidade, como restos de algodão e fragmentos de maravalha (setas). (B) Imagem de seqüestro ósseo (SO), fragmentos de corpos estranhos no interior da cavidade (setas) e invasão epitelial. (C) Imagem de pelo (P) e fragmento de maravalha no interior do defeito (Setas).

Para análise morfométrica foram selecionados quatro cortes, a cada 20 secções, corados com Tricrômico de Gômori e que apresentavam o defeito ósseo bem delineado, para quantificação de deposição óssea por morfometria. Imagens capturadas com objetiva de 4x, pela câmera Q-color 3 acoplada ao microscópio de luz Olympus BX-41, foram avaliadas com o Software de análise morfométrica Image Jey. Este software permite a leitura precisa das áreas coradas em verde pelo Tricrômico de Gomori (colágeno I) correspondentes à neoformação óssea e fornece o percentual de deposição relativo à maior área do defeito (FIG. 10).

Figura 10. Análise morfométrica do percentual de neoformação óssea pelo software de morfometria Image Jey.



(A) Imagem original corada com Tricromico de Gomori; (B) e (C) Seleção de áreas a serem excluídas da leitura (em amarelo e vermelho); (D) Definição da área de leitura após a separação dos canais de cores e seleção do canal de maior contraste das estruturas ósseas e deposição de matriz de colágeno. As janelas laterais fornecem o tamanho da área total (grade) em micrômetros e, abaixo a leitura do percentual de colágeno (seta), em relação à área. A leitura dos percentuais de colágeno foi mensurada em 4 cortes por animal, no total de seis animais por grupo.

3.6 Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade da variância usando Teste de Liliefors and Bartlett, respectivamente. Análise por “One-Way ANOVA” foi realizada para comparações entre os grupos. Teste pós hoc com correção de Bonferroni foi empregado para testar significâncias das múltiplas comparações. Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico STATA (Data Analysis and Statistical Software – versão 10.1). Diferenças entre os grupos foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5%.

4 ARTIGO DA DISSERTAÇÃO

Formatado para a revista Clinical Oral Implants Research / Qualis A2-Capes.

Print ISSN: 0905-7161
Online ISSN: 1600-0501
Frequency: Monthly
Impact Factor: 2.812

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Effect of biomaterial chitosan-based and hyaluronic acid in repair of intrabuccal bone defects in rats

Luiz Bertoldo Costa Filho
Gerluza Aparecida Borges Silva
Fernando Antonio Mauad Abreu
Matheus Henrique Santos Assis
Igor Daniel Garcia Reis
Alfredo Miranda Goes
Peterson Antônio Dutra de Oliveira

Authors' affiliations:

Luiz Bertoldo da Costa Filho, Peterson Antônio Dutra de Oliveira,
School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
Gerluza Aparecida Borges Silva, Fernando Antônio Mauad Abreu, Alfredo Miranda Goes, Igor Daniel Garcia Reis
Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
Matheus Henrique Santos Assis
Universidade José do Rosário Vellano, Unifenas, Belo Horizonte, MG, Brazil

Running title: Chitosan and hialuronan in intrabuccal bone repair in rats

Corresponding author:

Gerluza Aparecida Borges Silva, PhD
Laboratório de Biologia de Oral e do Desenvolvimento, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil
Tel: +55 031 3409 30 33
Fax: +55 031 3409 2771
E-mail: gerluza@terra.com.br

Key-words: bone repair, biomaterials, hyaluronan, chitosan-gelatin, intrabuccal bone defect

Abstract

Aim: To evaluate the effects of three-dimensional matrix of chitosan-gelatin (CG), associated or not, to 1% hyaluronic acid (Hyaluronan / HA) on gingival healing and during the repair of intrabuccal bone defects in rats.

Material and methods: Standardized bone defects were created in the region of the upper 1st molars of rats. The cavities (n = 6/group) were filled with: blood clot (control / CO); 1% Hyaluronan (HA), chitosan-gelatin matrix (CG) or (HA+CG). After 7 and 21 days, animals were sacrificed for histological and histomorphometric

analysis. The bone formation was quantified from the percentage of newly synthesized collagen, visualized by Gomori's trichromic. Clinical /macroscopic evaluation was made from predetermined scores of gingival healing.

Results: Treatment with hyaluronic acid improved the gingival healing at 7 days, but at 21 days, there was no statistical difference between groups. Chitosan does not impair the close wounds. The morphometric analysis showed better results after the treatment of bone defects with HA or CG at 21 days. However, the histological analysis showed that the three-dimensional structure of CG prevented the invasion of epithelial tissue into the defect, preserving its original volume. Sheets of chitosan were closely associated with cells and loose connective tissue without signs of encapsulation. Furthermore, the area of new bone formation in CG-treated defects was more extensive. Although the aspect immature, the new collagen deposit occupied most of the defect, suggesting continuity of the repair process.

Conclusion: Chitosan-gelatin is a highly biocompatible biomaterial and promising strategy for filling critical intrabuccal bone defects.

A major challenge for dentistry is the replacement of bone tissue, essential for the restoration of masticatory function of patients, either by prostheses or dental implants. The bone tissue of autogenous origin, with osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties, is considered "gold standard" graft for reconstructive bone surgery (Burchard 1983; Spin-Neto et al. 2011). However, its use has disadvantages such as the viability of the donor area, morbidity and unpredictability in the process of resorption of the graft (Johansson et al. 2001; Nkenke et al. 2001; Springer et al. 2004; Weibull et al. 2009). Recent advances in bone tissue bioengineering have led to clinical-surgical dental access to a variety of biomaterials for grafting, and in some cases, have allowed early placement of dental implants. Some biomaterials, produced as three-dimensional matrix have been highlighted for potential osteoconductive (Sun et al. 2012). These materials serve as structural support (scaffold) and guides for migration and proliferation of osteogenic cells toward the bone healing area (Bhattacharyya et al. 2008; Sitharaman et al. 2008; Abarrategi et al. 2008, 2010). Three-dimensional matrix of chitosan-based biomaterials have drawn the attention of researchers by being inert, antibacterial and low-cost (Chen et al. 2012), as well as having the possibility of an association with substances that promote bone formation (Medrado et al. 2006). Chitosan (CS) is a partially deacetylated derivative of chitin. It has a high molecular weight and is the second most abundant natural biopolymer commonly found in shells of marine crustaceans and cell walls of fungi (Singla & Chawla 2001). In addition, CS is easy to mould a three-dimensional scaffold, can support tissue ingrowth, aid in the formation of tissue structure, and promote growth and mineral rich matrix deposition by osteoblast in culture for bone tissue engineering (Seol 2004).

Biodegradability and biocompatibility of natural biopolymers are very important properties that make them suitable for bone regeneration (Jayasuriya & Kibbe 2010). Chitosan has been used extensively in research as a scaffold *in vitro* (support) for cell culture, configuring as a three-dimensional matrix suitable for cell adhesion (Seol 2004). Some *in vivo* studies have demonstrated the proliferation and adhesion of osteogenic cell to porous chitosan matrices associated with gelatin (chitosan-gelatin), during the repair of dental sockets of rats (Miranda et al. 2011, 2012).

In parallel studies, biomaterials with osteoinductive potential have also been evaluated during the bone repair of dental sockets. Recently, Mendes et al. (2008, 2010) showed osteoinductive potential of 1% hyaluronic acid (HA) in regenerative process of dental alveoli in rats and suggested their use as a therapeutic adjuvant in dentistry. Sodium hyaluronate, hyaluronic acid or hyaluronan (HA) is a high molecular weight glycosaminoglycan composed of repeated non-sulfated disaccharide units of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid (Prince 2004). It is one of the components of extracellular matrix and plays important role in morphogenesis and tissue healing. It is thought to stimulate migration, adhesion, proliferation, and cell differentiation leading to bone formation. Treatment of rat dental sockets with HA accelerated bone deposition, confirmed by increased expression of osteogenic proteins such as osteopontin (OPN) and bone morphogenetic protein type 2 (BMP-2) (Mendes et al. 2008, 2010).

Although the model of tooth socket in rats has been recognized as a viable model for analysis of bone reconstruction (Boeck et al., 1999; Mendes et al., 2008; Miranda et al., 2011), these cavities are very small. Technical issues must be considered. The variation in the size of the roots and the presence of interradicular septum can hinder the insertion of solid materials, making impossible to standardize the amount of biomaterial inserted within the bone cavities. Intact alveoli are subject to variations of the amount of waste remaining periodontal ligament. This may interfere in the evolution of the inflammatory process due to availability of osteogenic cells and thus mask the interpretation of results. Furthermore, the dental alveoli do not represent the actual demand in terms of bone loss. More larger and standardized bone defects have been traditionally created outside the oral cavity, in the tibia, femur and calvaria of mice and rabbits (Gielkens et al. 2008, Lee et al. 2010; Puricelli et al. 2010, Stephan et al, 2010). These sites, however, are free of factors such as bacteria, salivary flow and changes in pH and chewing forces, which prevent the direct extrapolation of results to clinical dentistry. Bone defects more directly related to the dental clinic have been developed in dogs or primates (Lynch et al. 1991; Kim et al. 2005, Sugawara et al. 2010; De

Santis et al. 2011). These experimental models are adequate by facility of intraoral surgical access, due to the large visual field, with direct surgical access and the use of technical resources similar to those available in the dental clinic (Giannobile et al. 1994; Elsalanty et.al. 2009; Barone et al., 2011). However, the use of these animals raises questions of ethics, costs and the necessity of specific vivarium.

The present study is aimed to evaluate the effects of a tridimensional matrix graft of chitosan-gelatin (CG) associated or not to a gel of hyaluronic acid 1% (Hyaluronan/HA) in the repair of model of intra-buccal bone defect in rats, which has not been described in the literature.

Materials and Methods

Experimental model

Twenty-four 10-week-old male rats, *Rattus norvegicus albinus*; Wistar (n=24), weighing between 300 and 350 g, were used. The animals were housed in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. The animals were cared for according to the guidelines of the local Ethical Committee for Animal Research at the Minas Gerais Federal University, which approved the project before the beginning of the experiments.

Surgical procedure

Rats were anaesthetized intramuscularly with a mixture of 10% ketamine (Dopalen®; Vetbrands, São Paulo, Brazil) and 2% xylazine (Ronpum®; Bayer, São Paulo, Brazil), 1:1, 0.1 mL/100g body weight, i.m. Prior to surgery, the animals received a dose of a veterinary anti-inflammatory, flunixin-meglumine (Banamine® injectable PET, Intervet do Brazil Veterinária, Cruzeiro, Brazil), 1.1 mg / kg. The rats were then, were subjected to upper first molars (right and left) extraction. A full thickness 2.5mm circular defect was made in the area of distal alveoli of the 1st maxillary molar, using a sterile cylindrical # 2094 diamond point (KG Sorensen ISO; Ind. Com Ltda. SP, Brazil). The cavities were created at low rpm, under copious irrigation with sterile saline. Control of bleeding and secretions were performed only by vacuum aspiration. In all surgical phases, the use of cotton or gauze was avoided, as they can leave residues in the surgical site. The coaptation of the edges of the mucosa after grafting is a step of fundamental importance. The best technique is the mattress suture with silk 6.0 (Ethicon, São Paulo, Brazil). The loss of points before day 7 was considered an exclusion

criterion of samples. Bone defects (n=6 for group) were treated according to prescribed conditions for each of the four groups: Group HA: 30µl of 1% HA [Hyaluronic acid ($C_{14}H_{20}NNaO_{11}$)n.Na. pH 6,2/NIKKOL, Galena, Campinas, Brazil]; Group CG: insertion of CG /chitosan-gelatin disks (1.5mm thickness x 2.5mm diameter); Group HA+CG: association of 1% HA+CG and Group CO (defect filled with blood clot). The animals were sacrificed at 7 or 21 days after surgical procedures. Three-dimensional chitosan-gelatin scaffolds were obtained via a freeze-drying technique and glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, USA) cross-linking. The CG scaffolds were synthesized according to Miranda et al (2011) in the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences of Federal University of Minas, under responsibility of Dr. Alfredo Miranda de Goes (goes@icb.ufmg.br; alfredomgoes@gmail.com) and were produced according to Miranda et al. (2011), from two natural polymers, chitosan (Sigma, St. Louis, USA) with a degree of deacetylation of 85% and type A porcine skin gelatin (Vetec,RJ, Brazil). In summary, chitosan 0.7% (w/v) solution and gelatin 0.7% (w/v) solution were dissolved in 0.1 M acetic acid (Vetec, RJ, Brazil) separately. These two distinct solutions rested for 24 h at room temperature, and they were then mixed at a 3:1 (chitosan/gelatin) ratio. Subsequently, the chitosan-gelatin blend was cross-linked with 25% glutaraldehyde solution at a 0.1% concentration. An amalgam carrier (Golgran® Dentistry Surgical Instruments, São Paulo, Brazil) was used to place the chitosan disks into the bone cavities.

In the postoperative period, the animals were kept isolated in plastic cages with access to water *ad libitum* and pasty food for 5 days. Lining the cages with wood shavings was avoided. In addition, the rats received three subcutaneous doses of the antibiotic oxytetracycline (Terramicina® Injectable Solution – Pfizer, Guarulhos, São Paulo, Brazil), 10mg/kg, one every 24 hours. The sequence of clinical procedures is shown in figure 1.

[Figure 1]

Tissue processing

After 7 and 21 days of clinical procedures, the animals (n=24) were sacrificed by decapitation under anesthesia with 10% ketamine and 2% xylazine (1:1, 0.1 mL/100 g body weight, i.m.). The upper maxillaries were dissected and fixed in neutral 10% buffered formalin for 72 h at room temperature. After fixation, the upper maxillaries were demineralized in Planck Richol's solution, dehydrated through graded ethanol solutions, embedded in paraffin and serially sectioned at 6 μ m in the frontal plane. The sections were stained with Haematoxylin Eosin (H&E) for histological analysis and Gomori's Trichrome for morphometric analysis. For morphometric analysis four sections from 6 animals were selected, representing the central area of bone defect, for the quantification of bone deposition by morphometry. Images were captured with 4x objective using the Q-color 3 camera, coupled to a light microscope Olympus BX-41. They were then transferred to computer for morphometric analysis of bone deposition by morphometric software Image Jey. This software allowed an accurate reading of areas stained in green by Gomori's trichrome, recording the percentage of Type I collagen- new bone deposited in the largest area of the defect.

Clinical evaluation

The effect of biomaterials in the healing of the wounds was assessed by analysis of macroscopic photos of the surgical site. The gingival healing was evaluated by 3 calibrated examiners, according to previously defined scores: 1. Maximum of 1/3 of healing wound: most of the operated area is occupied by granulation tissue; 2. Gingival epithelialization in a maximum 2/3 of the operated area; 3. Epithelialization over 2/3; 4. Epithelialization complete (Fig.2). An examiner standard (*gold standard*) carried out the training of examiners. To obtain the image, the animals were anesthetized with half the dose of anesthetic, sufficient to immobilize animals and to allow the mouth to open, with the aid of intraoral retractors. Photographs were taken with a macro lens (Leika) of a Panasonic DMC-TZ3, Lumix camera, without the use of flashes, at a standard distance of 5 cm from the object of study.

[Figure 2]

Statistical analysis

Given the normality and homoscedasticity assumptions (Liliefors and Bartlett tests, respectively), the data were subjected to one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test. Data were submitted to STATA software (Data Analysis and Statistical Software, version 10.1). Differences between groups were considered significant for a probability of less than 5% significance ($P < 0.05$).

Results

Clinical - Macroscopic evaluation

The macroscopic aspect of healing wounds was assessed at 7 and 21 days. The hyaluronic acid (HA) was effective as an adjuvant in the initial phase of healing (7 days) when compared to control/CO (blood clot) and chitosan-gelatin groups (CG and HA+CG). On the other hand, the presence of chitosan inserted into bone defects did not affect gingival healing, being similar to the closing of the control group at day 7 (Fig. 3). On day 21, there were no statistical differences between groups. Here, all treatment had scores between 3 and 4, similar to the control group (Fig. 3).

[Figure 3]

Histomorphometric evaluation

At 7 days the bone deposition was minimal in all groups, regardless of treatment. Although the HA+CG group showed a statistically greater collagen deposition in this period, it did not exceed the limit of 1% of new bone formation (Fig. 4). On day 7, as observed in all groups, the defects were filled with fibrin network. The epithelial tissue was still interrupted (open) and the cavitary walls showed signs of bone resorption (Figs. 5a, 5b). In groups CG and HA+CG the chitosan-gelatin matrix had their pores filled with cell debris, fibrin and blood clot (Fig. 5b). At 21 days, better results were observed in bone defects treated with HA or CG (Fig. 4). However, histological evaluation revealed differences in the level of maturation and distribution of collagen in these groups. Bone deposition in HA, such as the control group (CO), was concentrated in the deepest part of the defect and showed mature trabeculae, thick and well delineated, suggesting the conclusion of the repair process (Fig. 5c, 5e). In group

CG, the area of new bone formation was more extensive. Although immature, areas of new collagen deposition filled most of the defect, closely associated with the blades of chitosan, suggesting the continuity of the repair process (Figs. 5d, 5f, 5g). At 21 days, the amount of chitosan observed in the HA+CG group was sharply smaller, suggesting a faster degradation of the biomaterial when combined with hyaluronic acid (Fig. 6b). A common feature in groups CG and (HA+CG), was the fusion of layers of chitosan, which apparently precedes the degradation process of the biomaterial (Fig. 6c). The epithelial tissue was in the final stages of healing in most samples (score 3-4).

[Figures 4, 5, 6]

An interesting finding was that the three-dimensional structure of chitosan-scaffold, present in the CG group, appeared to contain the epithelial migration toward the interior of the bone defect (Fig. 7). In some cases, this effect could be clinically observed in the volume of mucosa covering the surgical site (Fig. 7c).

Histological features indicative of the biocompatibility of chitosan were observed in sections stained with H&E (Fig.8). The rest of biomaterial was observed in loose connective tissue, however there were no signs of inflammation or fibrous tissue encapsulation of implant. Pores of the scaffold were invaded by native cells of connective tissue, suggesting a chemotaxis action induced by biomaterial. These cells presented light nuclear chromatin, suggestive of a high activity of RNA synthesis. Areas of neovascularization were seen in close contact with the blades of residual chitosan (Fig. 8a.). At 21 days, some resorptive multinucleated cells were observed close to chitosan laminae (Fig. 8b e c).

[Figures 7,8]

Discussion

In this study we demonstrated the effects of chitosan-gelatin (CG) and hyaluronic acid (HA) in the healing of a large intrabuccal bone defect created in rat maxillas. We worked an unprecedented bone defect model, yet unpublished in the literature. The model can be considered feasible, reproducible and appropriate for studies in bone grafting in dentistry.

However, all the pre- and post-operative care mentioned in methodology must be strictly followed for the success of the technique.

In this study, we evaluated the effects of biomaterials in bone repair considering the periods of 7 days and 21 days. These periods were selected taking as parameters the healing of dental sockets of rats, when at 7 days is possible to observe the onset of bone deposition and at 21, the alveoli are almost totally filled by newly formed bone (Mendes et al., 2008). Our results indicated that the period of 7 days is very early for evaluation of bone deposition. Morphometric data showed a minimal collagen deposition, below 1% in this period, even in control animals. Therefore, although statistical analysis has revealed a significantly higher percentage of collagen in the treatment HA+CG, it is wise to say that the period of 7 days is insufficient for evaluation this parameter. This period should be useful for evaluation of other parameters indicative of bone repair, not evaluated in this study, such as the expression of markers of osteogenic differentiation, phenotypic characterization of initial phases of the inflammatory process or evaluation of the resorptive process that precedes the bone deposition. On the other hand, the 7 day period is well suited for clinical evaluation-gingival healing analysis as shown by our macroscopic evaluation. The treatment of the defects with hyaluronic acid has promoted a breakthrough in gingival healing observed in the first postoperative week. These data are consistent with previous data from the literature (Flavia et al. 2008), mentioning the beneficial effects of hyaluronic acid as anti-inflammatory and assist in the healing of soft tissues (Bansal et al. 2010). In dentistry, the initial closing of the lesions is highly desirable for reducing the risk of contamination in the area operated from waste and bacteria from the oral cavity. Although the chitosan-scaffold revealed no healing effect to the gum tissue, presence of this biomaterial was not able to prevent the healing process evolution. At 21 days, the healing was almost complete and the clinical aspects in all groups, CO, HA and CGs, were quite similar; the level of healing gingival was between 3-4 for all groups.

Our study showed better results with the grafting of isolated HA and CG biomaterials. The low immunogenicity and biocompatibility of chitosan-gelatin blend, commonly cited in the literature (Huang et al. 2005, Khor et al. 2003), were confirmed by histological analyses of bone defects. By 7 days after implantation, the ingrowth of cells could be seen even in the most central area of the scaffold, as well as the characteristic acute inflammatory phase. Neither necrosis of the area surrounding tissues or scaffold encapsulation was observed up to 21 days, suggesting that CG was nontoxic and biocompatible matrix. These results are in agreement with Miranda et al. (2011) that used the same formulation of chitosan-gelatin in the evaluation of dental alveolar bone repair in rats. The authors used a natural and low-cost

chitosan-gelatin blend scaffold, cross-linked by glutaraldehyde. Gelatin was employed as a strategy for improvement of cell adhesion to scaffold surface, as described before (Yang 2001; Lawrence & Madhally 2008). Gelatin from animal sources presents type I collagen, which is important to the formation of new bone from progenitor cells (Yang et al. 2004). Gelatin is reported to improve the biological activity of chitosan, since the collagen amino acid sequences of arginine-glycine-aspartate (RGD sequence) promote cell adhesion and migration (Chang 2003; Huang et al. 2005).

In our assessment, the rest of CG-biomaterial remained until 21 days into connective tissue without formation of fibrous tissue capsule, a negative aspect described in literature for other biomaterials (Ashammakhi 2005; Zhu et al. 2006). The chitosan layers were seen in close association with the osteogenic cells. The adhesion and proliferation of osteoblasts on chitosan corroborate previous *in vitro* studies that have as a great advantage of biomaterial in therapies for bone tissue regeneration (Fakhry et al. 2004).

The resorption process of chitosan-gelatin seems to be consequence of a typical foreign body reaction, which evolves into a favorable implant-tissue interaction. The chitosan-gelatin was progressively resorpted, with a slow degradation rate, and there was simultaneously a time compatible replacement by bone tissue, as preconized for an ideal scaffold by Donzelli et al. 2007. Our histological analysis showed the presence of resorptive cells into scaffold pores in both groups CG and HA+CG. These multinucleated giant cells were more numerous and organized at 21 days. Interestingly, images suggestive of more accelerated degradation of chitosan were observed in group HA+CG. The reduction of chitosan layers observed at 21 days, culminating in the reduction of the scaffold for osteogenic cells, can explain the lower deposition of collagen found in the morphometric analysis of HA+CG samples. Further studies should be conducted to evaluate the hypothesis if the presence of hyaluronic acid should accelerate the degradation of chitosan. The use of hyaluronic acid improved bone neoformation compared to the control group, as shown by morphometric evaluation on day 21. These results are in agreement with data of Mendes et al. (2008), which observed the acceleration of bone deposition on the dental alveoli treated with HA. However, for the model developed here, treatment with HA was not superior to treatment with CG in relation to the percentage of collagen deposited in the same period. Both materials showed better results than the control group. However, histological assessment revealed advantages of CG compared to the HA in terms of healing area extension and contention of epithelial invasion. Bone deposition in group HA was concentrated in the deepest area of the defect and presented outlined, thick mature trabeculae. In the CG group, the neoformation area occupied the major

part of the defect. In addition, the collagen matrix had an immature aspect suggesting an intermediate phase of the bone repair process. This finding suggests the continuity of the process for later formation of trabeculae across the defect. Added to this, the great advantage of the CG relative to HA was due to the difference in mechanical properties of these biomaterials. The micro-architecture of the gelatin-chitosan matrix is capable of supporting the oral mucosa and prevents the precocious migration of epithelial tissue into the defect, preserving the bone volume. Hence, this biomaterial also attends to Guided Bone Regeneration (GBR) treatment (Retzepi & Donos 2010). The GBR biological rationale advocated the mechanical exclusion of undesirable soft tissues from growing into the osseous defect, thereby allowing only osteogenic cell populations derived from the parent bone to repopulate the osseous wound space.

In conclusion, the novel model of intrabuccal bone defect opens important perspectives for the testing of biomaterials in mouth of rats, animal models are of low cost and readily available in research laboratories. Our results showed that chitosan-gelatin blend is a biocompatible biomaterial, with slow degradation, which allows cell adhesion and proliferation, desirable to fill bone injury. These aspects, added to its economic viability, make chitosan-gelatin a suitable biomaterial for tissue bioengineering and a promising strategy for bone restoration of more large defects in dentistry and regenerative medicine.

Acknowledgments: This study was supported by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). All the authors declare to have no conflict of interest with the materials used in the present study.

References

- Abarrategi, A., Moreno-Vicente, C., Ramos, V., Aranaz, I., Sanz Casado, J.V., & López-Lacomba, J.L. (2008) Improvement of porous beta-TCP scaffolds with rhBMP-2 chitosan carrier film for bone tissue application. *Tissue Engineering Part A* **14**: 1305-1319.
- Abarrategi, A., López-Morales, Y., Ramos, V., Civantos, A., López-Durán, L., Marco, F., & López-Lacomba, J.L. (2010) Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research* **95**: 1132-1141.
- Bansal, J., Kedige, S.D., Anand, S. (2010) Hyaluronic acid: a promising mediator for periodontal regeneration. *Indian Journal of Dental Research* **21**: 575-578.
- Barone, A., Ricci, M., Calvo-Guirado J.L. & Covani, U. (2011) Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in Beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 1131-7.

- Bhattacharyya, S., Guillot, S., Dabboue, H., Tranchant, J.F., & Salvétat JP. (2008) Carbon nanotubes as structural nanofibers for hyaluronic acid hydrogel scaffolds. *Biomacromolecules* **9**: 505-509.
- Boeck, E. M., Pansani, C.A, Okamoto, T., Góissis, G., Boeck Neto, R.J. & Marcantonio Jr., E. (1999) Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo* **28**: 83-96.
- Burchard, H. (1983) The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **174**: 28-42.
- Chen, R., Chen, Q., Huo, D., Ding, Y., Hu, Y., & Jiang, X. (2012) In situ formation of chitosan-gold hybrid hydrogel and its application for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **97C**: 132-137.
- Chang C.H., Liu, H.C., Lin C.C., Chou C.H. & Lin F.H. (2003) Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **24**: 4853-4858.
- De Santis E., Lang N.P., Scala A., Viganò P., Salata L.A. & Botticelli D. (2012) Healing outcomes at implants installed in grafted sites: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 340-50. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02326.x. Epub 2011 Oct 3.
- Donzelli, E., Salvadè, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M. & Tredici, G. (2007) Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology* **52**: 64-73.
- Elsalanty, M.E., Zakhary, I., Akeel, S., Benson, B., Mulone, T., Triplett, G.R. & Opperman, L.A. (2009) Reconstruction of canine mandibular bone defects using a bone transport reconstruction plate. *Annals of Plastic Surgery* **63**: 441-448.
- Fakhry, A., Schneider, G.B., Zaharias, R. & Senel, S. (2004) Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials* **25**: 2075-2079.
- Flavia, G., Mariggio, M.A., Maiorano, F., Cassano, A., Capodiferro, S. & Ribatti, D. (2008) Accelerated wound healing of oral soft tissues and angiogenic effect induced by a pool of aminoacids combined to sodium hyaluronat (AMINO GAM). *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents* **22**: 109-116.
- Giannobile, W.V., Finkelman, R.D. & Lynch, S.E. (1994) Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *Journal of Periodontology* **65**: 1158-1168.
- Gielkens, P.F., Schortinghuis, J., de Jong, J.R., Raghoobar, G.M., Stegenga, B., & Bos, R.R. (2008) Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 516-521.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. & Madihally, S.V. (2005) In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **26**: 7616-7627.
- Jayasuriya, A.C. & Kibbe, S. (2010) Rapid biomineralization of chitosan microparticles to apply in bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **21**: 393-398.
- Johansson, B., Grepe, A., Wannfors, K., Aberg, P., & Hirsch J.M. (2001) Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. *Dentomaxillofacial Radiology* **30**: 153-156.
- Khor, E. & Lim, L.Y. (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. **24**: 2339-2349.

- Kim, C.S., Choi, S.H., Cho, K.S., Chai, J.K., Wikesjo, U.M.E. & Kim, C.K., (2005) Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral derived biomaterial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 583-589.
- Lawrence, B.J. & Madhally, S.V. (2008) Cell colonization in degradable 3D porous matrices. *Cell Adhesion & Migration* **2**: 9-16.
- Lee, J.A., Ku, Y., Rhyu, I.C., Chung, C.P., & Park, Y.J. (2010) Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. *Journal of Periodontal & Implant Science* **40**: 211-219.
- Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H., & Williams, R.C. (1991) Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *Journal of Periodontology* **62**: 710-716.
- Medrado, G.C.B., Machado, C.B., Valerio, P., Sanches, M.D. & Goes, A.M. (2006) The effect of a chitosan-gelatin matrix and dexamethasone on the behavior of rabbit mesenchymal stem cells. *Biomedical materials* **1**: 155-156.
- Mendes, R.M., Silva, G.A., Lima, M.F., Calliari, M.V., Almeida, A.P., Alves, J.B., & Ferreira, A.J. (2008) Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology* **53**: 1155-1162.
- Mendes, R.M., Silva, G.A., Calliari, M.V., Silva, E.E., Ladeira, L.O., & Ferreira, A.J. (2010) Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences* **87**: 215-222.
- Miranda, S.C., Silva, G.A., Hell, R.C., Martins, M.D., Alves, J.B. & Goes A.M. (2011) Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Archives of Oral Biology* **56**: 1-15.
- Miranda S.C., Silva G.A., Mendes R.M., Abreu F.A., Caliari M.V., Alves J.B. & Goes AM. (2012) Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. *Journal of Biomedical Material Research. Part A*. May **24**. doi: 10.1002/jbm.a.34214. [Epub ahead of print]
- Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Tröger, M., Kloss, F., & Neukam, F.W. (2001) Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 495-502.
- Prince, C.W., (2004) Roles of hyaluronan in bone resorption. *BCM Musculoskeletal Disorders* **5**: 12. Review.
- Puricelli, E., Corsetti, A., Ponzoni, D., Martins, G.L., Leite, M.G., & Santos, L.A. (2010) Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. *Head & Face Medicine* **28**: 6-10.
- Retzepi M & Donos N. (2010) Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 567-576.
- Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M., Young-Ku, Rhyu, I.C., Lee, S.J., Han, S.B. & Chung, C.P. (2004) Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters* **26**: 1037-1041.
- Singla A.K. & Chawla M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**: 1047-1067.
- Sitharaman, B., Shi, X., Walboomers, X.F., Liao, H., Cuijpers, V., Wilson, L.J., Mikos, A.G., & Jansen, J.A. (2008) In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* **43**: 362-370.

- Spin-Neto, R., Marcantonio, E. J., Gotfredsen, E., & Wenzel, A. (2011) Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. *Journal of Digital Imaging* **24**: 959-966.
- Springer, I.N., Springer, I.N., Terheyden, H., Geiss, S., Härle, F., Hedderich, J., & Açil, Y. (2004) Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 205-212.
- Stephan S.J, Tholpady S.S, Gross B., Petrie-Aronin C.E., Botchway E.A., Nair L.S., Ogle R.C. & Park S.S. (2010) Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope* **120**: 895-901.
- Sugawara A., Fujikawa K., Hirayama S., Takagi S. & Chow L.C. (2010). In Vivo Characteristics of Premixed Calcium Phosphate Cements When Implanted in Subcutaneous Tissues and Periodontal Bone Defects. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. **115**: 277-290.
- Sun, Y., Finne-Wistrand, A., Albertsson, A.C., Xing, Z., Mustafa, K., Hendrikson, W.J., Grijpma, D.W. & Moroni, L. (2012) Degradable amorphous scaffolds with enhanced mechanical properties and homogeneous cell distribution produced by a three-dimensional fiber deposition method. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. doi: 10.1002/jbm.a.34210. [Epub ahead of print]
- Weibull, L., Widmark, G., Ivanoff, C.J., Borg, E. & Rasmusson, L. (2009) Morbidity after chin bone harvesting--a retrospective long-term follow-up study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **11**: 149-157.
- Yang, Y.Y., Chung, T.S. & Ng, N.P. (2001) Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* **22**: 231-41.
- Yang, C., Yang, S., Du, J, Xiao, B. & YE S. (2004) Biocompatibility studies on bone marrow stromal cells with chitosan-gelatin blends. *Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition*. **19**: 30-33.
- Zhu L., Liu W., Cui L. & Cao Y. (2006) Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells. *Tissue Engineering*. **12**: 423-433.

Legends

Fig.1. Surgical procedures *in vivo*. (a) detachment of the gum tissue by sindesmotomy; (b) luxation of upper 1st molar; (c) visualization of alveoli from distal roots; (d) creation of defect with cylindrical diamond bur with irrigation and aspiration; (e) cavitory inspection to evaluate absence of perforation and complete removal of the alveolar walls; (f) preparation of CG disks; (g) insertion of biomaterial; (h) coaptation of the edges of mucosa; (i) suture.

Fig.2. Scores for macroscopical evaluation. (a) Oral cavity with the standoffs for photographic shots; (b) score 1 - Maximum 1/3 of the healing gingival. Most of the wound occupied by granulation tissue; (c) score 2 - Epitelization gingival until 2/3 of the operated area; (d) score 3 - more than 2/3 of healing; score 4 - complete healing.

Fig.3. Comparison among means of scores of gingival healing. (a) Wound healing on 7 days. Treatment with HA improve the gingival epithelization [HA>CO=CG=(HA+CG)]; (b) Wound healing at 21 days after surgical procedure, without statistical differences. [HA=CO=CG=(HA+CG)]. Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * Statistical difference. One-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Fig.4. Effects of different treatments on collagen deposition at 7 and 21 days after surgical procedures. Quantification of new bone formation evaluated by type I collagen percentage at (a) 7 days and (b) at 21 days. The percentage of collagen I was higher in defect treated with HA+CG at 7 days [(HA+CG) > (CO=CG) > HA]. 21 days, the collagen deposition was higher in CG and HA groups [(HA=CG) > CO=HA+CG]. Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * # Statistical difference. One-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test.

Fig.5. Representative histological images of bone repair at 7 or 21 days after surgical procedures. (a) representative images of CO and HA groups at day 7. In both, the defects were filled by blood clot without bone deposition; (b) representative image of CG or HA+CG groups at day 7. Layers of biomaterial shown in red with fibrine clot inside pores of chitosan. (*) areas of bone resorption. (c) Representative images of bone repair in control group at 21 days. Bone deposition concentrated in the deepest area of the defect. (d) Histological aspect of bone repair in CG group at 21 days. The biomaterial occupies the largest area of the defect (in red) intercalated with newly deposited collagen matrix. (e) Histological aspect of new bone from both CO and HA groups (21d). Note thicker trabeculae and smaller marrow spaces when compared with CG/ HA+CG groups shown in (e). (f) Detail of collagen deposition (arrows) between residual sheets of chitosan (Group CG). Gomori's Trichrome. (a-d) Original magnification x4. (e-g) Original magnification x10.

Fig.6. Histological aspect of chitosan degradation at 21 days. (a) CG-group. Sheets of biomaterial (red) scattered throughout repair area (b) HA+CG group. Fragments of chitosan seen in small islands surrounded by connective tissue. Original magnification x10. (c) Fusion of layers of chitosan appears anticipate degradation process of biomaterial. Gomori's Trichrome. Original magnification x 20.

Fig.7. (a) Representative histological image of epithelial healing in HA/CO-group at 21 days. Note the epithelial folding (arrow) toward into defect. (b) The three-dimensional structure of chitosan-scaffold (*) in CG or HA +CG groups appears to contain epithelial invasion toward the interior of the bone defect; Gomori's Trichrome. Original magnification x4. (c) Macroscopic aspect of gingival healing in HA (left) and CG group (right) after 21 days of procedure.

Fig.8. Histological evaluation of chitosan-gelatin biomaterial. Day 21. (a) Integration of chitosan with cells and vessels (V) of connective tissue. (b-c) Adhesion and proliferation of cells on the blades and pores of biomaterial. These cells exhibit light nuclear chromatin suggestive of high synthetic activity (arrows). Note the vascular neoformation (V) between layers of chitosan. H&E. Original magnification x40. (d-e) Resorption of residual chitosan-gelatin scaffold by multinucleated giant cells. (d) H&E. Original magnification x20. (e) H&E. Original magnification x40.

Figure 1.

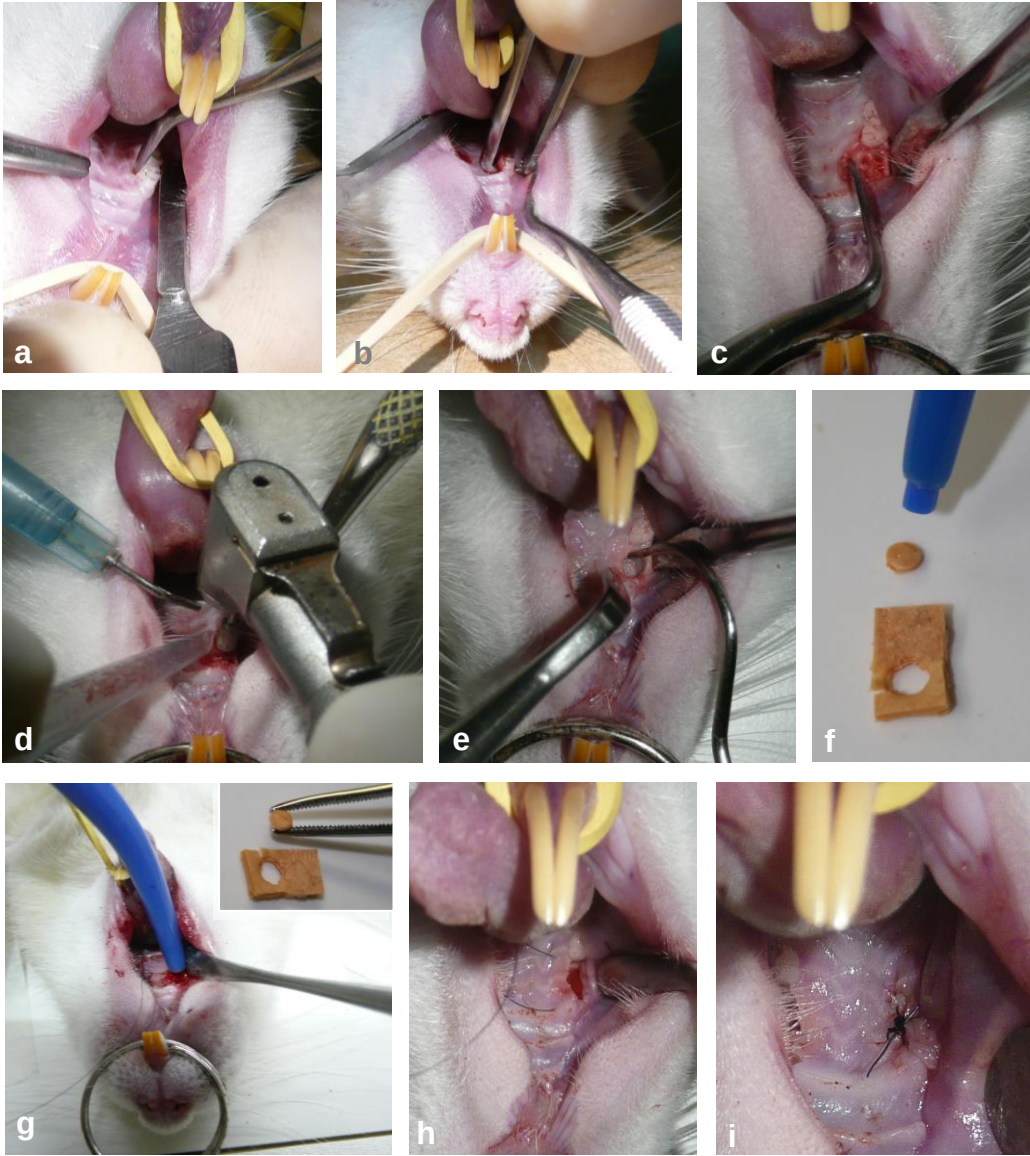


Figure 2.

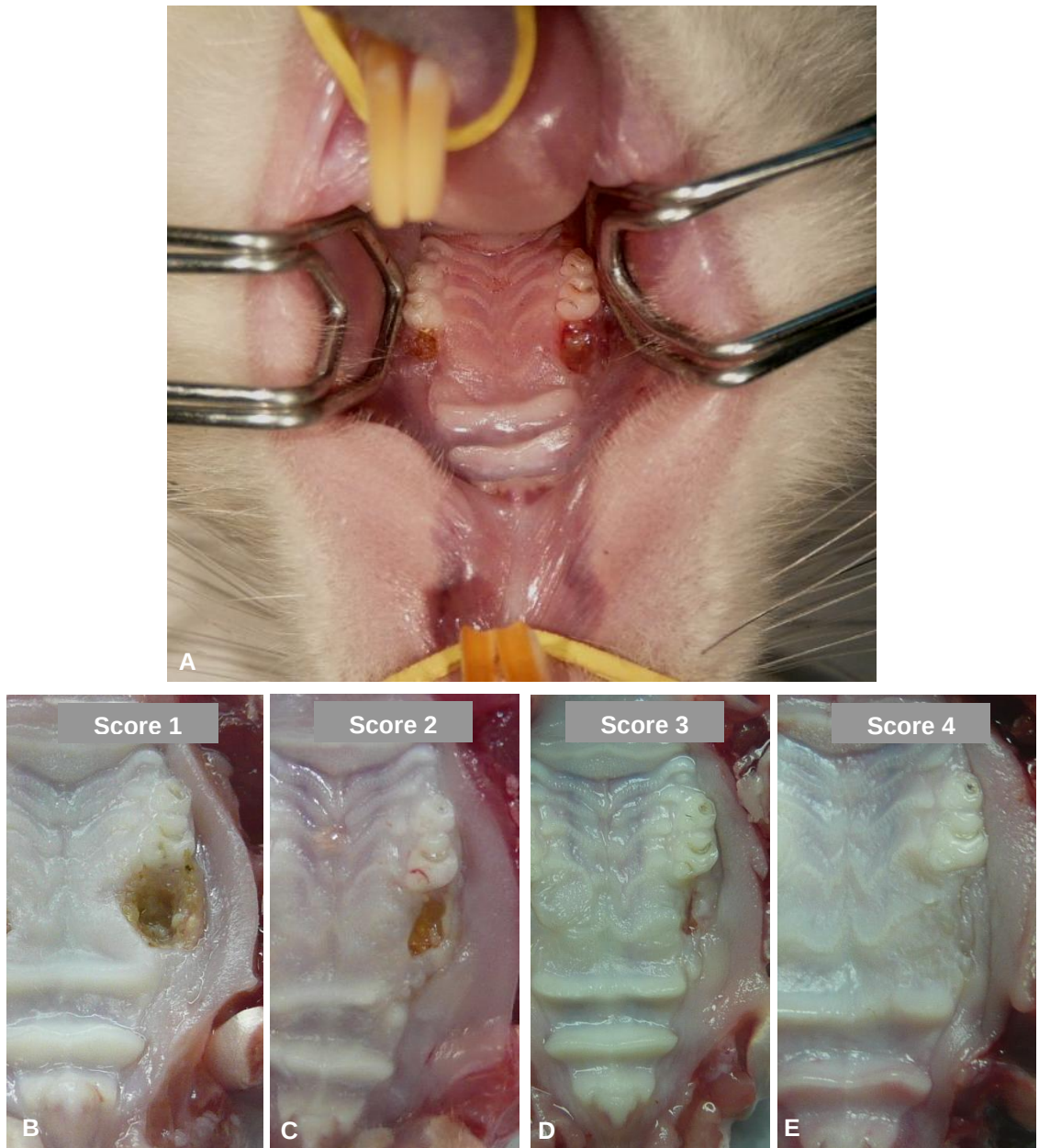


Figure 3.

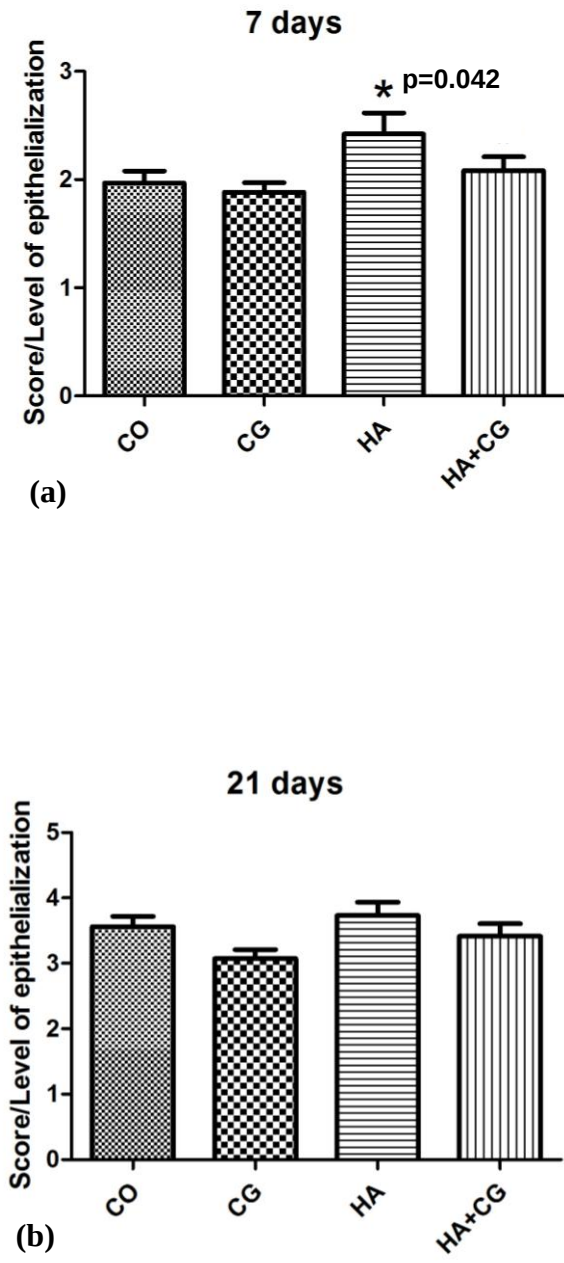


Figure 4.

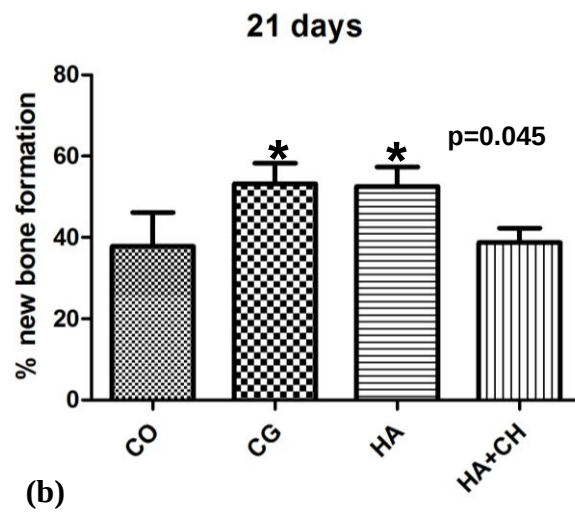
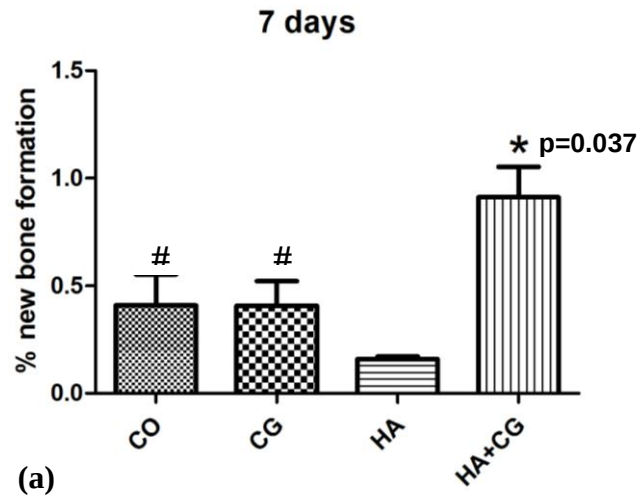


Figure 5.

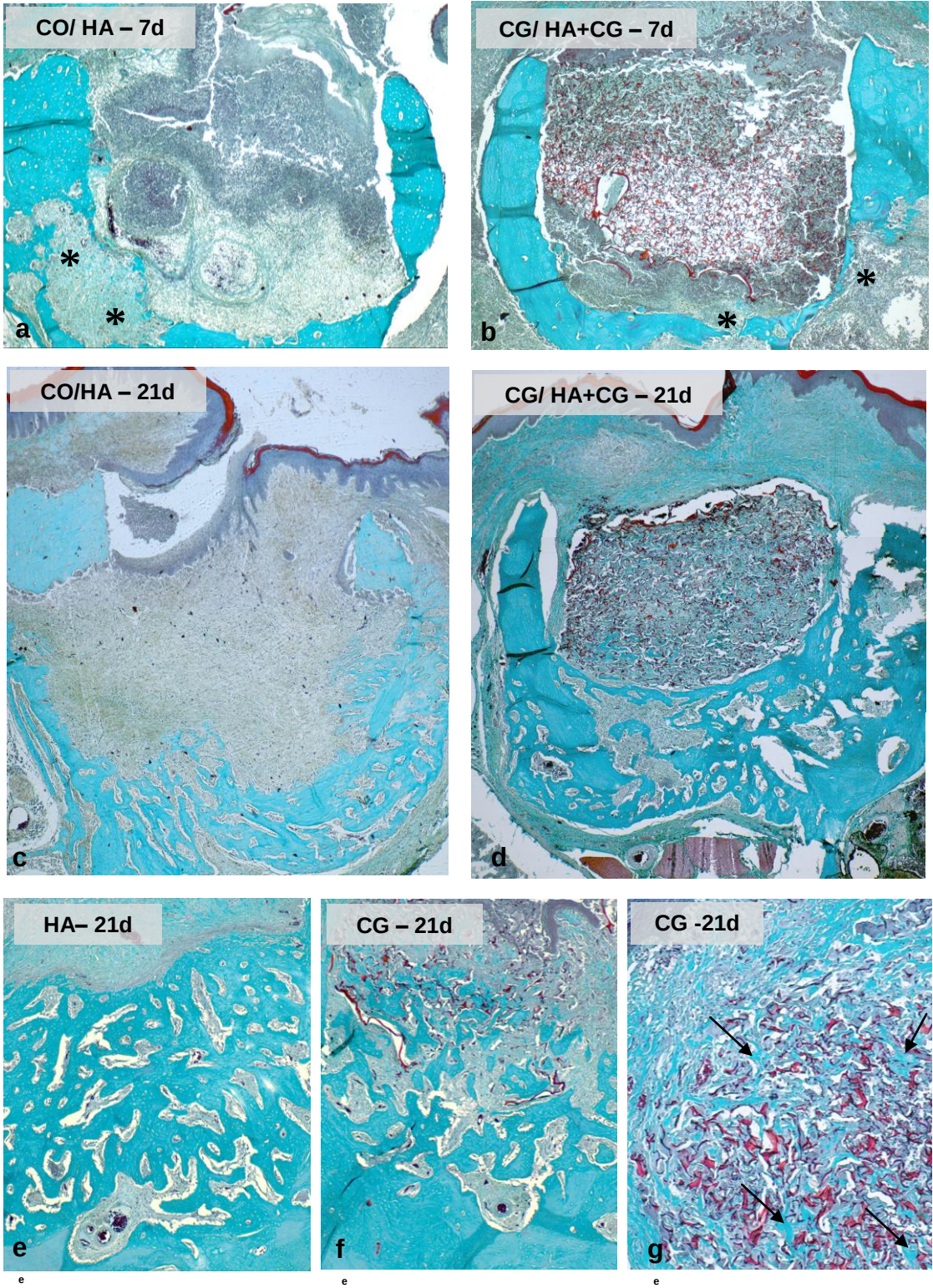


Figure 6.

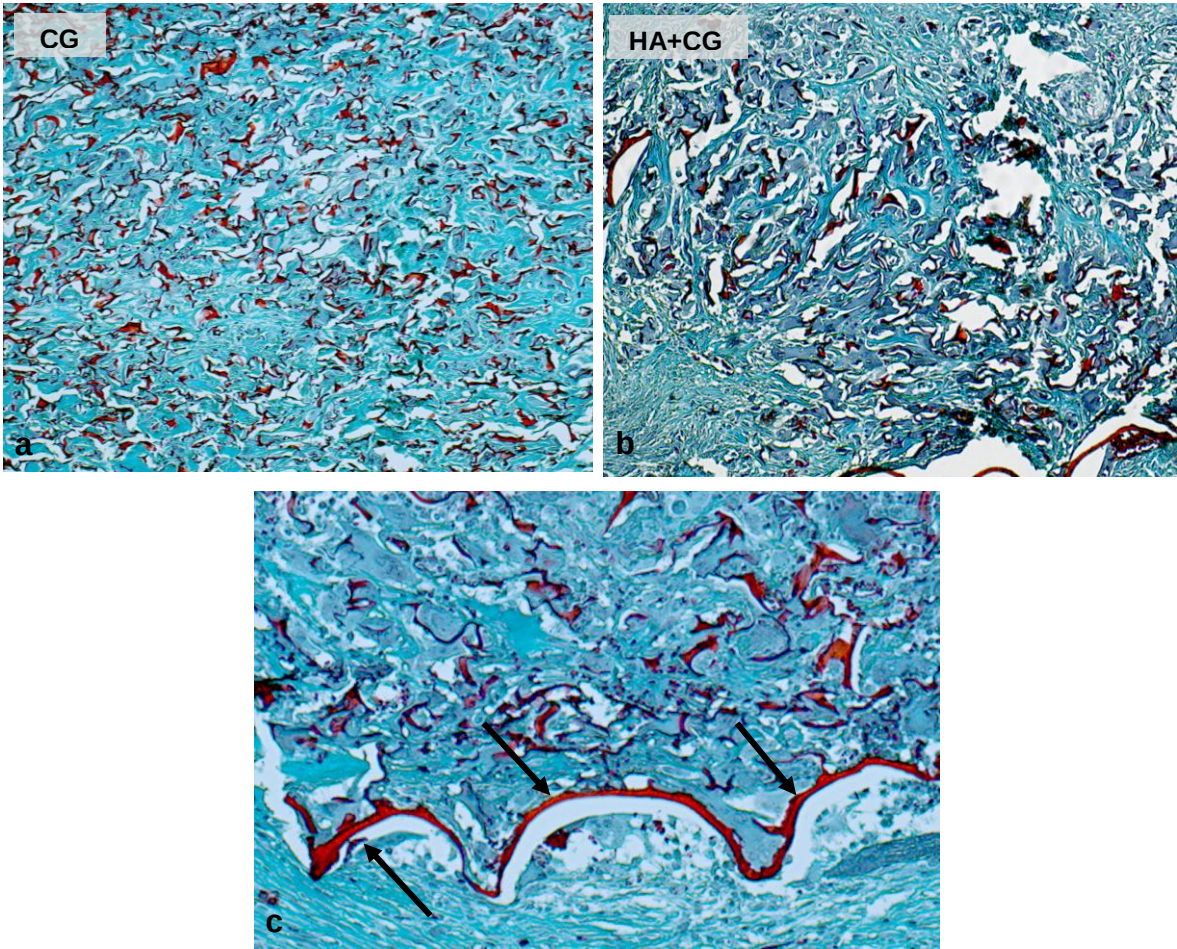


Figure 7

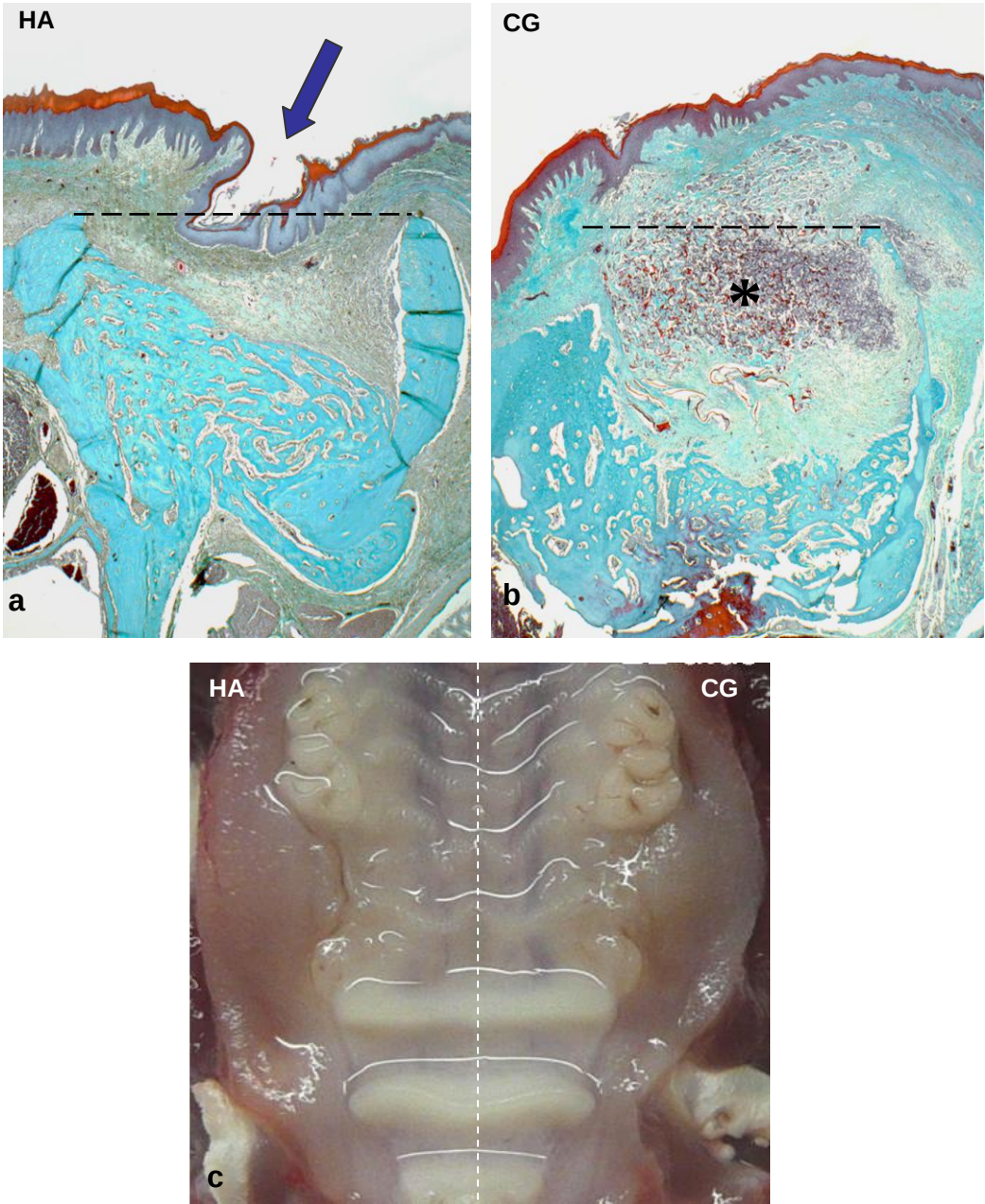
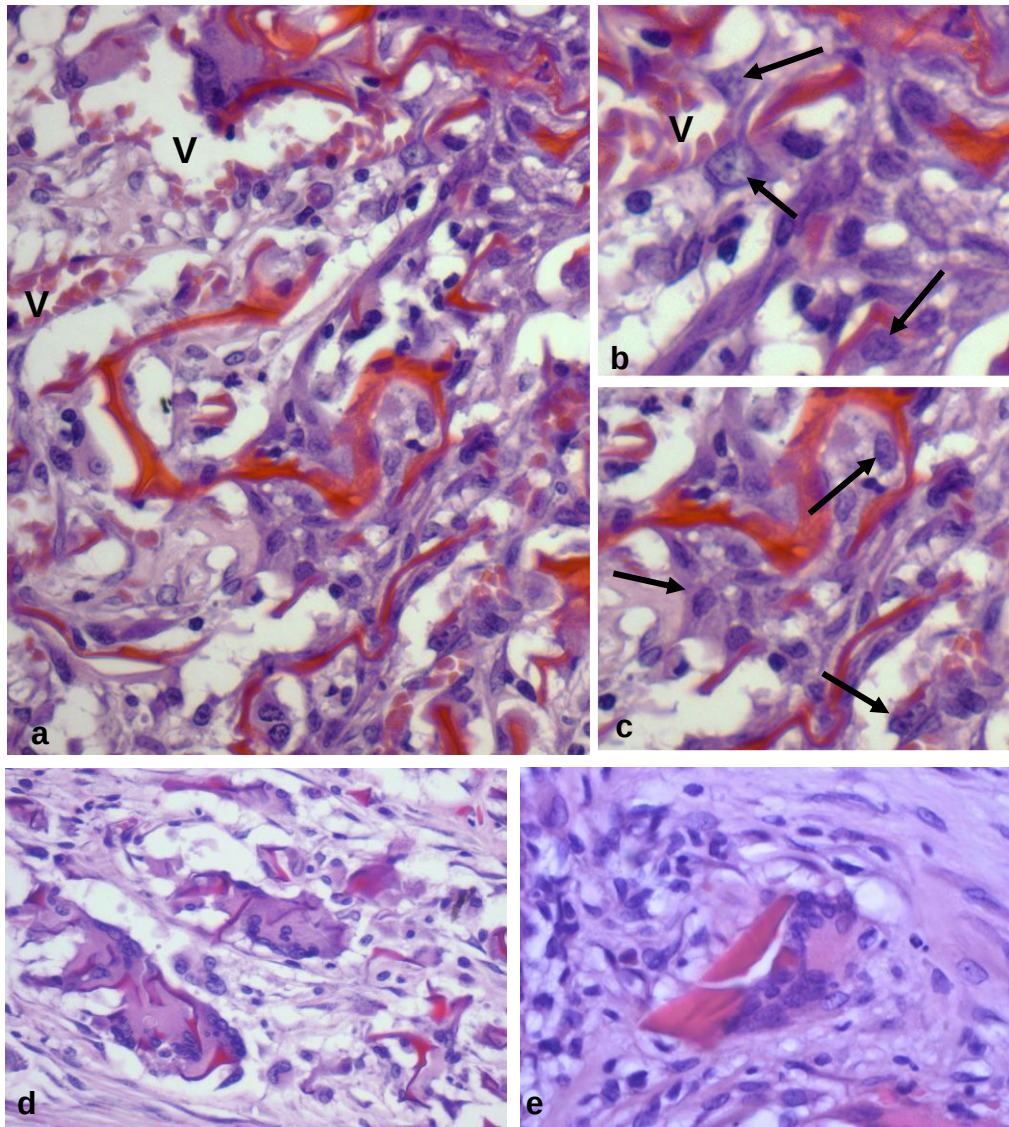


Figure 8



5 ARTIGO DE REVISÃO

Formatado para a REVISTA PERIODONTIA - Brazilian Journal of Periodontology

SOBRAPE – Sociedade Brasileira de Periodontologia

ISSN: 0103-9393

EFEITO DOS BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA E

ÁCIDO HIALURÔNICO NO REPARO ÓSSEO – REVISÃO DE LITERATURA

Effect of chitosan and hyaluronic acid biomaterials on bone repair – Literature review

Luiz Bertoldo da Costa Filho¹, Gerluza Aparecida Borges Silva², Peterson Antônio Dutra de Oliveira³

¹ *Mestrando em Implantodontia do Departamento de Odontologia da PUCMINAS, Belo Horizonte, MG, Brasil*

² *Profa. Dra. Adjunto IV do Departamento de Morfologia da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil*

³ *Prof. Dr. Adjunto III do Departamento de Odontologia da PUCMINAS, Belo Horizonte, MG, Brasil*

RESUMO

A reconstrução de defeitos ósseos em Odontologia é um pré-requisito à reabilitação funcional do sistema estomatognático. A inserção de biomateriais visa otimizar o reparo ósseo abreviando o período de cicatrização e melhorando os aspectos qualitativo/quantitativo dos tecidos neoformados. Biopolímeros naturais como a quitosana (Q) e o ácido hialurônico (HA) têm sido propostos, respectivamente, como suporte para cultura de células osteogênicas/ meio carreador de fármacos nos procedimentos de bioengenharia tecidual e como molécula aceleradora do reparo ósseo. O presente estudo tem como objetivo rever a literatura dos efeitos destes biomateriais no tecido ósseo.

UNITERMOS: Biomateriais, Ácido hialurônico, Quitosana, Cicatrização óssea.

ABSTRACT

The reconstruction of bone defects in Dentistry is a prerequisite for functional rehabilitation of the stomatognathic system. The insertion of biomaterials aims to optimize bone repair shorten the healing time and improve aspects of quality / quantity of newly formed tissue. Natural biopolymers such as chitosan (Q) and hyaluronic acid (HA) have been proposed, respectively, as support for osteogenic cell culture, a medium/ carrier of drugs in bioengineered tissue procedures and as an accelerator molecule of bone repair. The present study aims at reviewing the knowledge of the effects of biomaterials in bone tissue.

UNITERMS: Biomaterials, Hyaluronic acid, Chitosan, Bone healing.

INTRODUÇÃO

Em odontologia, a reconstrução óssea é muitas vezes o pré-requisito essencial à reabilitação funcional e estética do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas por traumas ou mudanças atróficas do processo alveolar dos maxilares (Wiltfang *et al.*, 2004). A recuperação da estrutura óssea perdida, mesmo aquelas atróficas, consequentes de perdas dentárias, pode demandar a realização de cirurgias de enxerto ósseo ou inserção de biomateriais (Arosarena & Collins, 2005; Izuka *et al.*, 2005).

Há tempos, o tecido ósseo de origem autógena vem sendo considerado o material “gold standard” (padrão-ouro) de enxertia nas cirurgias ósseas reconstrutivas (Burchardt, 1983). Todavia, sua escolha apresenta como desvantagens a viabilidade da área doadora, morbidade e imprevisibilidade no processo de reabsorção do enxerto (Johansson *et al.*, 2001; Nkenke *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2004). Recentes avanços em biotecnologia têm propiciado à clínica cirúrgico-odontológica o acesso a uma diversidade de biomateriais para enxertia e, em alguns casos, possibilitado a inserção precoce de implantes bucais. Contudo, a busca por um material ideal para enxertia óssea permanece como um grande desafio (Wong & Rabie, 2005).

Pesquisas com proteínas e carreadores para fatores de crescimento em sítios cirúrgicos têm revelado perspectivas positivas para a aceleração da deposição óssea. Entretanto, o alto custo de produção e os resultados ainda imprevisíveis constituem alguns dos obstáculos para sua implementação clínica (Esposito *et al.*, 2006; Hallman & Thor, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado o potencial osteoindutor do ácido hialurônico (Hialuronana = HA) e a possibilidade de sua utilização como um coadjuvante terapêutico em odontologia. O tratamento de alvéolos dentários de ratos com HA promoveu a cicatrização da área lesada após exodontias especialmente por acelerar a deposição óssea e a expressão de proteínas osteogênicas como a osteopontina (OPN) e a proteína morfogenética do osso tipo-2 (BMP-2) (Mendes *et al.*, 2008; 2010).

Por outro lado, alguns biomateriais, têm se destacado por seu potencial osteocondutor. Estes são elaborados como matrizes tridimensionais que servem de suporte estrutural (*scaffold*) e guias para o direcionamento da proliferação de células

osteogênicas visando a reconstrução tecidual óssea (Abarrategi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sitharaman *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Tutak *et al.*, 2009). Matrizes tridimensionais à base quitosana têm chamado a atenção dos pesquisadores pela possibilidade de associação com substâncias que favorecem a formação óssea (Medrado *et al.*, 2006). Este biopolímero natural apresenta algumas propriedades fundamentais para a engenharia tecidual como biocompatibilidade e a biodegradabilidade (Senel *et al.*, 2000).

A quitosana tem sido extensivamente estudada como suporte para cultura celular, configurando-se como uma matriz tridimensional adequada à adesão celular (Seol, 2004), visando o posterior transplante do tecido construído *in vitro* (Li *et al.*, 2010; Costa-Pinto; Reis; Neves, 2011; Im *et al.*, 2012) para sítios receptores *in vivo* (Costa-Pinto *et al.*, 2012). Associações da quitosana com outras moléculas como hidroxiapatita, colágeno, ácido hialurônico e outros polímeros têm sido testadas visando a melhorar as propriedades biológicas da quitosana e sua performance para a engenharia de tecidos *in vitro* (Shi *et al.*, 2005; Stephan *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2011a, b).

O presente estudo tem como objetivo rever a literatura sobre os efeitos do ácido hialurônico e da quitosana no tecido ósseo.

REVISÃO DE LITERATURA

PERDA ÓSSEA – METABOLISMO ÓSSEO

A população brasileira com faixa etária entre 35 e 44 anos apresenta em média, 13,2 dentes perdidos, enquanto nas faixas mais altas, 65 a 74 anos aproximadamente 25,8 dentes já foram perdidos (Ministério da Saúde, 2005). A perda precoce dos dentes tem como causas principais traumas (Andreasen & Andreasen, 1991), a doença cárie dentária e a doença periodontal (DP) (Frazão *et al.*, 2003). Medidas preventivas como a fluoretação da água, o melhor acesso da população às informações em relação à cárie dentária e a ampliação dos serviços de atenção à saúde bucal têm propiciado a redução da prevalência desta doença em nossa população (Ministério da Saúde, 2005). Entretanto, em virtude do declínio da ocorrência de cáries, aumenta a perspectiva da manutenção de um maior número de dentes na cavidade bucal e, conseqüentemente, pode-se esperar um incremento na

prevalência da DP (Meneghim et al., 2002). A doença periodontal é uma condição inflamatória de origem bacteriana caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos periodontais: gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. A evolução do processo inflamatório afeta os tecidos de suporte do dente, levando à perda óssea, com formação de bolsa periodontal e possibilidade de perda do elemento dentário (Lindhe, 1999). Nestes casos, a utilização de implantes tem se tornado uma alternativa de sucesso para reabilitar as áreas edêntulas. Entretanto, DP e ausência de dentes por um período prolongado acarretam um processo de reabsorção óssea dos maxilares extremamente prejudicial à reconstituição da função dentária por meio dos implantes (Bodic et al., 2005).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, caracterizado pela mineralização da sua matriz orgânica (Lindhe, 1999). A matriz orgânica do tecido ósseo é composta de fibras colágenas, proteínas não-colagenosas e proteoglicanas além de uma matriz extracelular mineralizada constituída por cristais de hidroxiapatita (Yamoto et al., 2002).

A formação óssea é um processo de remodelamento dinâmico e contínuo que é normalmente mantido numa conjunção balanceada entre reabsorção de osso danificado ou velho e a formação de osso novo. Esta se dá através de dois principais processos: a osteopoiese que é a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea em osteoblastos (incluindo os estágios de pré-osteoblastos e osteócitos), e a osteogênese reconhecida como a deposição de novo osso (Long, 2001).

A cicatrização normal do osso, após injúrias, é caracterizada por ações integradas de diferentes células e pode ser dividida em fases sequenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira Jr. & Dantas, 2000), síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (Lalani et al., 2005). O reparo tecidual inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos (Siqueira Jr. & Dantas, 2000).

No alvéolo dentário observa-se ossificação do tipo intramembranosa (Kanyama et al., 2003; Shyng et al., 1999). Após a extração de um dente, a formação de um coágulo sanguíneo no alvéolo dentário é um passo fundamental para as fases subseqüentes do reparo (Yugoshi et al., 2002). A formação da rede de fibrina auxilia inicialmente o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos,

característicos da resposta inflamatória aguda (Siqueira Jr. & Dantas, 2000), bem como possibilita a invasão de fibroblastos e células endoteliais, presentes no ligamento periodontal remanescente (Yugoshi *et al.*, 2002). O ligamento periodontal contém uma mistura de populações celulares incluindo progenitores para osteoblastos (Devlin & Sloan, 2002), cementoblastos e fibroblastos, essenciais para remodelação e formação óssea inicial em processos de cicatrização alveolar (Lekic *et al.*, 1997).

O coágulo é progressivamente reabsorvido quando é invadido por fibroblastos derivados do ligamento periodontal, que proliferam ativamente e migram em direção a ele, formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos responsáveis por produzir novo tecido ósseo durante a cicatrização alveolar (Teófilo *et al.*, 2001). As fibras colágenas inicialmente depositadas formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado (Shyng *et al.*, 1999).

Osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos inter-radiculares remanescentes, presentes após a extração de dentes multiradiculares. Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (Devlin & Sloan, 2002).

Grande parte da dinâmica do reparo do osso alveolar após as exodontias vêm de estudos realizados em animais. O osso alveolar de ratos tem sido freqüentemente utilizado como modelo porque tem um balanço entre a reabsorção óssea e a formação além de uma alta taxa de *turnover* ósseo (Vignery & Baron, 1980). Outras investigações simulam os defeitos ósseos intrabuciais mais amplos, como exemplo, as fraturas mandíbula, os múltiplos implantes ou os enxertos ósseos em maxilares de cães ou maxilares de primatas (Lynch *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2005).

BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA E ÁCIDO HIALURÔNICO

Os biomateriais usados como alternativas aos enxertos ósseos devem apresentar, além de biocompatibilidade e biodegradação, algumas características, como osteocondução e osteoindução. Um biomaterial ou matriz ideal deve permitir que as células se infiltrem e produzam novo osso por meio de uma cicatrização osteocondutora. Adicionalmente, podem estimular, por moléculas bioativas, a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, promovendo a reparação óssea por osteoindução (Chesmel *et al.*, 1998). Outras propriedades são também

desejáveis como porosidade, com interconexão entre os poros e integração com o tecido do hospedeiro.

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, material existente principalmente nas carapaças de crustáceos, e que, representa o segundo polímero mais abundante na natureza (Spin-Neto *et al.*, 2008). Esta tem sido indicada como um biomaterial com diversas aplicações na agricultura, na indústria de alimentos e, recentemente, na área médica (Singla *et al.*, 2001). Testes clínicos, realizados com materiais à base de quitosana, não reportaram nenhuma reação alérgica ou inflamatória após sua implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão pelo corpo humano (Chatelet *et al.*, 2001).

A quitosana, a 2-amino-2-deoxi-D-glicose é um biopolímero natural em evidência para a construção de matrizes. Apresenta biocompatibilidade, excelente propriedade umectante, capacidade de estimular a proliferação celular e promoção da cicatrização de lesões. Características como baixo custo, disponibilidade e biodegradabilidade são também algumas de suas propriedades fundamentais (Senel *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005).

Na área odontológica sua utilização inicial foi na forma de gel para o preenchimento de defeitos ósseos periodontais (Spin-Neto *et al.*, 2008) e/ou como agentes carreadores de compostos biologicamente ativos, incluindo moléculas ou substâncias que favorecem a formação óssea (Medrado *et al.*, 2006), principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada. A associação da quitosana com alguns compostos biologicamente ativos tem sido proposta. Dentre essas associações, a gelatina, material natural, elástico e macio, constituído basicamente de colágeno desnaturado, tem sido sugerida para esse tipo de blenda, visando melhorar as propriedades químicas e físicas das membranas de quitosana. A integração entre gelatina e quitosana reduz a rigidez da membrana e pode também melhorar suas propriedades biológicas (Zhu *et al.*, 2006). A gelatina, obtida a partir de fontes animais, apresenta colágeno do tipo I, que é importante para a formação de osso novo a partir de células progenitoras. Dessa forma, o colágeno, considerado uma proteína de adesão, provê a ancoragem de células, a tração para a migração e os sinais de polaridade e diferenciação (Yang *et al.*, 2004). De fato, estudos como de Machado e colaboradores (2007) utilizando matrizes porosas de quitosana, gelatina e condroitina evidenciaram a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células de linhagem osteogênica *in vitro*. Estudos *in vivo* têm comprovado as

vantagens da mistura quitosana-gelatina para adesão das células osteogênicas e como um material adequado ao preenchimento de cavidades ósseas. Miranda *et al.* (2011, 2012) cultivaram células tronco mesenquimais, obtidas de medula óssea de ratos, em scaffolds tridimensionais de quitosana-gelatina. Nos experimentos *in vitro*, os autores verificaram a adesão, proliferação e diferenciação das células tronco, cultivadas na matriz de quitosana-gelatina, em células osteogênicas (Miranda *et al.*, 2011). Posteriormente, os autores transplantaram o tecido construído *in vitro* (“construto”) para alvéolos dentários de ratos e observaram a migração e perfeita integração das células transplantadas com as células do sítio receptor (Miranda *et al.*, 2012).

Respectivamente, os parâmetros clínicos e histológicos de diminuição de profundidade de sondagem e preenchimento de lesões ósseas decorrentes do avanço da doença periodontal também têm sido relatados quando da aplicação da quitosana nos princípios da regeneração tecidual guiada (Akncbay *et al.*, 2007; Muzzarelli *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003). Outros promissores estudos de materiais à base de quitosana refere-se à sua atuação como carreador de materiais biologicamente ativos, como as proteínas morfogenéticas óssea (BMP) ou fatores de crescimento vascular, contribuindo para o reparo dos tecidos periodontais (Madhally *et al.*, 1997; Zangh *et al.*, 2006).

Um outro biomaterial tem, do mesmo modo, despertado interesse dos pesquisadores da área de bioengenharia dos tecidos. Trata-se da hialuronana (HA), também chamada de hialuronato de sódio ou ácido hialurônico (Aslan *et al.*, 2006), uma glicosaminoglicana de alto peso molecular (104-107Da), consistindo de repetidas unidades dissacarídicas não-sulfatadas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico (Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004). Esta molécula é amplamente distribuída em tecidos como pele (Juhlin, 1997), fluidos das junções sinoviais, revestimentos dos tendões (Engström-Laurent, 1997; Fraser *et al.*, 1997), olhos e na maioria dos líquidos corpóreos (Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004), além de estar presente em todas as matrizes extracelulares. A viscosidade da solução de hialuronana 1% com peso molecular de $3-4 \times 10^6$ Da é cerca de 500.000 vezes maior que a água (Fraser *et al.*, 1997), sugerindo que possa ser um lubrificante biológico ideal (Moseley *et al.*, 2002). É uma molécula que atua na morfogênese tecidual, migração, adesão e diferenciação celular (Aslan *et al.*, 2006; Dechert *et al.*, 2006). Exerce influência no comportamento celular pela interação direta com

receptores de superfície celular (Turley *et al.*, 1991; Dechert *et al.*, 2006), especialmente CD44 (Lesley *et al.*, 2000; Sugahara *et al.*, 2003; Lesley *et al.*, 2004) e receptores para mobilidade mediada por Hialuronana (Rhamm) (Toole, 1997; Savani *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2002; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005). Durante os processos de reparo ósseo, o HA pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local, em virtude de suas propriedades físico-químicas (Sasaki & Watanabe, 1995), além de mediar adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004), e acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005) e formação óssea *in vitro* (Pilloni & Bernard, 1998) e *in vivo* (Sasaki & Watanabe, 1995).

Sua habilidade de ocupar grandes volumes da MEC faz com que o ácido hialurônico atue como preenchedor de espaços (Pilloni & Bernard, 1998). Em um modelo de formação óssea intramembranosa *in vitro*, utilizando culturas com células mesenquimais de calvária de ratos, a hialuronana preveniu inicialmente a agregação celular, e sob estas condições, ocorreu intensa migração e divisão celular (Pilloni & Bernard, 1998). Após 48 horas, os primeiros fibroblastos formados e as células mesenquimais indiferenciadas ainda presentes, secretaram hialuronidase, responsável pela remoção natural da hialuronana. Os elementos celulares apresentaram, neste momento, a quantidade necessária de hialuronana para a formação de pontes de ligação entre a hialuronana e seus receptores celulares, um mecanismo importante na agregação celular (Pilloni & Bernard, 1998).

Géis à base de HA têm sido utilizados em modelos de defeitos ósseos, isoladamente, ou como carreadores para BMP-2 (Itoh *et al.*, 2001; Arosarena & Collins, 2005), matriz óssea desmineralizada (Colnot *et al.*, 2005), compósitos de hidroxiapatita (Bakos *et al.*, 1999) e enxertos ósseos (Giavaresi *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006), além do tratamento de osteoartrites (Barbucci *et al.*, 2002). Quando introduzidos no defeito ósseo, aumentam consideravelmente a eficácia de terapias celulares por facilitarem a migração e diferenciação celular (Grigolo *et al.*, 2001; Lisignoli *et al.*, 2002; Arosarena & Collins, 2005). A hialuronana exibe grande potencial osteocondutor (Liu *et al.*, 1999), entretanto, não é considerada por alguns autores como osteoindutora, já que o implante ectópico deste polímero não resulta em neoformação óssea (Arosarena & Collins, 2005). Sua utilização apresenta boa biocompatibilidade (Bakos *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999), não sendo verificada qualquer evidência de reação tecidual ou inflamação (Barbucci *et al.*, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento da idade média das populações, o diagnóstico, o tratamento e o monitoramento de doenças esqueléticas tornar-se-ão uma questão cada vez mais relevante na área de saúde (Christenson, 1997). Com o envelhecimento da população e aumento das perdas dentárias relacionadas a doença cárie e, em especial, às doenças periodontais, tem crescido entre os pesquisadores e profissionais da odontologia a busca pelo adequado suporte ósseo visando as reabilitações bucais, tanto por implantes quanto por próteses muco-suportadas, bem como o restabelecimento das funções mastigatórias, estética e fonética. A falta de tecido ósseo é uma condição complicadora também para pacientes portadores de grandes mutilações, como perdas dentárias ou trauma mecânico, ou de alterações do desenvolvimento embrionário, como fissuras lábio-palatais. Em ambos os casos, a busca por terapias alternativas para a otimização do reparo ósseo ou substituição do tecido ósseo representa um desafio para os pesquisadores. Nesse contexto, os biomateriais utilizados na bioengenharia tecidual têm chamado a atenção dos pesquisadores como alternativas para a reconstituição de áreas com perdas ósseas alveolares.

Por diversas razões como biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade e composição química adequada à adsorção, proliferação e diferenciação celular, os polímeros de quitosana vêm sendo testados como biomateriais visando a bioengenharia tecidual óssea. Além disso, a quitosana é um produto economicamente viável e de grande disponibilidade (Skajak-Braek *et al.*, 1989), uma vez que é derivada da quitina, obtida do exoesqueleto de crustáceos (Madihally & Matthew, 1999), um resíduo comumente descartado pela indústria alimentícia. A quitina é um biopolímero natural biodegradável, biocompatível, atóxico e pode ser formulado de várias formas, incluindo pós, géis e filmes de acordo com a aplicação desejada (Fakhry *et al.*, 2004). A quitosana e alguns dos seus compostos foram propostos para uma série de aplicações biomédicas, como sistema de liberação de drogas e implantes de preenchimento (Madihally & Matthew, 1999). Já foi comprovada a adesão e proliferação de osteoblastos à quitosana, indicando uma grande vantagem deste biomaterial nas terapias de regeneração do tecido ósseo (Fakhry *et al.*, 2004). Apesar disso, pouco foi estudado no intuito de se explorar a

quitosana no paradigma da engenharia tecidual em Odontologia (Madihally & Matthew, 1999).

O ácido hialurônico (HA) é uma molécula altamente biocompatível, testada e utilizada em outras especialidades médicas em humanos, tais como em cirurgias ortopédicas (Aydogan *et al.*, 2008) e de estética (Fedok, 2008). Existe uma tendência de se usar os componentes nativos da matriz extracelular do osso na produção de matrizes.

A possibilidade de sucesso do tratamento de defeitos ósseos, e outras aplicações clínicas, com a associação entre o ácido hialurônico e quitosana-gelatina pode representar um grande avanço para as terapias de reconstrução, pois estes sinalizam com a capacidade de reduzirem o tempo de cicatrização após procedimentos cirúrgicos e/ou possibilitar maior preservação da estrutura óssea dos maxilares após as exodontias. Finalmente, deve-se salientar que os biomateriais apresentam custos relativamente baixos, o que vai de encontro aos objetivos das políticas de saúde pública, como uma opção terapêutica de grande alcance social.

REFERÊNCIAS

- 1- Wiltfang J et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. Clin Oral Impl Res 2004 15:187-193.
- 2- Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. Otolaryngol: Head Neck Surg 2005 132: 592-597.
- 3- Izuka T et al. Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. Clin Oral Impl Res 2005 16:69-79.
- 4- Burchardt H The biology of bone graft repair. Clin Orthop Relat R 1983 174:28-42.
- 5- Johansson B et al. Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. Dentomaxillofac Rad 2001 30:153–156.
- 6- Nkenke E et al. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. Clin Oral Impl Res 2001 12:495-502.
- 7- Springer IN et al. Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. Clin Oral Impl Res 2004 15:205-212.
- 8- Wong RWK, Rabie ABM. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. Br J Oral Maxillofac Surg 2005 43:46-50.
- 9- Esposito M et al. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. Int J Oral Maxillofac Implants 2006 21:696–710.
- 10- Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. Periodontol 2000 2008 47:172-192.
- 11- Mendes RM et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. Arch Oral Bio 2008 53:1155-1162.
- 12- Mendes RM et al. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. Life Scie 2010 87:215-222.
- 13- Abarrategi A et al. Multiwall carbon nanotube *scaffolds* for tissue engineering purposes. Biomaterials 2008 29:94-102.

- 14- Bhattacharyya S et al. Carbon Nanotubes as Structural Nanofibers for Hyaluronic Acid Hydrogel *Scaffolds*. *Biomacromolecules* 2008 9:505-509.
- 15- Sitharaman B et al. *In vivo* biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* 2008 43:362-370.
- 16- Silva EE et al. Nanostructured 3-d collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration *scaffolds*. *Nano Res* 2009 2:242-73.
- 17- Tutak W et al. Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks. *Nanotechnology* 2009 20:255101.
- 18- Medrado GCB et al. The effect of a chitosan-gelatin matrix and dexamethasone on the behavior of rabbit mesenchymal stem cells. *Biomed mater* 2006 1:155-156.
- 19- Senel S et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm* 2000 193:197-203.
- 20- Seol YJ. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Letters* 2004 26:1037-1041
- 21- Li, H et al. Preparation and Characterization of Homogeneous Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffolds via In-Situ Hydration. *J Biomat Nanobiotech* 2010 1:42-49.
- 22- Costa-Pinto, A.R.; Reis, R.L.; Neves, N.M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tis Engin Part B: Rev* 2011 17(5):.331-347.
- 23- Im O et al. Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. *Int J Nanomed* 2012; 7:2087-99. Epub 2012 Apr 24.
- 24- Costa-Pinto A.R. et al. Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. *J Tis Eng Reg Med* 2012 6(1): 21-28.
- 25- Shi D et al. Development and potential of a biomimetic chitosan/type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering. *Chi Med J (English Edition)* 2005 118(17):1436-43.
- 26- Stephan SJ et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope* 2010 120(5): 895-901.
- 27- Yang Z et al. Effects of chitosan/collagen substrates on the behavior of rat neural stem cells. *Sci Chin Life Sci* 2010 53(2):215-22.

- 28- Coimbra P et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int J Bio Macromolec* 2011 1;48(1):112-118.
- 29- Coimbra P et al. Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization. *Int J Bio Macromolec* 2011 1;49(4):573-9. Epub 2011 Jun 17.
- 30- Ministério da Saúde. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde. 2005.
- 31- Andreasen JO, Andreasen FM. Traumatismo dentário: soluções clínicas. Trad. Frieda Werebe. São Paulo: Panamericana, 1991 168p.
- 32- Frazão P, Antunes JLF, Narvai PC. Perda dentária precoce em adultos de 35 a 44 anos de idade - Estado de São Paulo, Brasil, 1998. *Rev Bras Epidemiol* 2003 6:49-57.
- 33- Meneghim MC, Pereira AC, Silva FRB. Prevalência de cárie radicular e condição periodontal em uma população idosa institucionalizada de Piracicaba - SP. *Pesqui Odontol Bras* 20 16:50-56.
- 34- Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.: 1999. 720 p.
- 35- Bodic F et al. Bone loss and teeth. *Join Bone Spine* 2005 72:215-221.
- 36- Yamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model *in vitro* bone formation. *Biol Pharmaceut Bull* 2002 25:509-515.
- 37- Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cell Mol Dis* 2001 27:677-690.
- 38- Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone* 1995;16:9-15.
- 39- Siqueira Jr, Dantas CJS. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238 p.
- 40- Lalani Z et al. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005 63:1500-1508.
- 41- Kanyama M et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Bio* 2003 48:723-730.
- 42- Shyng YC et al. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Arch Oral Bio* 1999 44:751-757.

- 43- Yugoshi LI et al. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J* 2002 13:92-96.
- 44- Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2002 31:641-645. .
- 45- Lekic P et al. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec* 1997 247:329-340.
- 46- Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec* 1980 196:191-200.
- 47- Lynch SE. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991 62:710-716.
- 48- Kim CS et al. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral derived biomaterial. *J Clin Periodontol* 2005 32:583-589.
- 49- Chesmel K et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1998 56:857-863.
- 50- Spin-neto R et al. Chitosan based biomaterials with medical and dental application: literature review. *Rev Odontol UNESP*. 2008 37(2):155-161.
- 51- Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol* 2001 53:1047-1067.
- 52- Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 2001 22:.261-8.
- 53- Huang Y et al. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin *scaffolds* for tissue engineering. *Biomaterials* 2005 26:7616-7627.
- 54- Zhu X et al. Enhancement of the Mechanical and Biological Properties of a Biomembrane for Tissue Engineering the Ocular Surface *Ann Acad Med Singapore* 2006 35:210-214.
- 55- Yang XB et al. Biomimetic collagen *scaffolds* for human bone cell growth and differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 2004 10:1148-1159.
- 56- Machado CB et al. 3D chitosan gelatin chondroitin porous *scaffold* improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Materials* 2007 2:124-131.
- 57- Miranda SCCC et al. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. *Arch Oral Biol* 2011 56:1-15.

- 58- Miranda SCCC et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. J Biomed Material Res. Part A. 24. 2012. doi: 10.1002/jbm.a.34214. [Epub ahead of print]
- 59- Akncbay H, Senel S, Ay ZY. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007 80:290-296.
- 60- Muzzarelli RA, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. Biomaterials 1994 15:1075-1081.
- 61- Park Js et al. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs. J Clin Periodontol 2003 30:443-453.
- 62- Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 1999 20:1133-1142.
- 63- Zhang Y et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun 2006 344:362-369.
- 64- Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. J Biomater Appl 2006 20: 209-219.
- 65- Moseley R et al. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF[®]-11p75, AQUACEL[®] and hyaluronan towards reactive oxygen species *in vitro*. Biomaterials 2002 23:2255-2264.
- 66- Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. BCM Musculoskelet Disord 2004 5:12.
- 67- Juhlin L. Hyaluronan in skin. J Intern Med 1997 242:61-66.
- 68- Engström-laurent, A. Hyaluronan in joint disease. J Intern Med 1997 242:57-60.
- 69- Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med 1997 242:27-33.
- 70- Dechert TA et al. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. Wound Repair Regen 2006 14:252-258.
- 71- Turley EA et al. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of Ras-transformed cells. J Cell Biol 1991.112:1041-1047.
- 72- Lesley J et al. Hyaluronan binding by cell surface CD44. J Biol Chem 2000. 275(35):26967-26975.

- 73- Sugahara KN et al. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. J Biol Chem 2003 278:32259-32265.
- 74- Lesley J et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. J Biol Chem 2004 279:25745-25754.
- 75- Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. J Intern Med 1997 242: 35-40.
- 76- Savani RC et al. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. J Biol Chem 2001 276:36770-36778.
- 77- Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors – minireview. J Biol Chem 2002 277:4589-4592.
- 78- Nedvetzki S et al. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. Proc Nat Acad of Sci U S A 2004 101:18081-18086,
- 79- Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. J Biol Chem 2005 280:8875-8883.
- 80- Giavaresl G et al. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. Biomaterials 2005 26: 3001-3008.
- 81- Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. Cell Tissue Res 1998 294:323-333.
- 82- Itoh S et al. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. J Mater Sci Med 2001 12:575-581.
- 83- Colnot C et al. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. Clin Orthop Relat Res 2005 435: 69-78. .
- 84- Bakos D, Soldán M, Hernández-fuentes I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. Biomaterials 1999 20:191-195.
- 85- Barbucci R et. al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. Biomaterials 2002 4503-4513.
- 86- Grigolo B. et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbits. Biomaterials 2001 22:2417-2424.
- 87- Lisignoli G et al. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on

non-woven hyaluronic acid-based polymer *scaffold*. *Biomaterials* 2002 23:1043-1051.

- 88- Liu L et al. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999 20:1097-1108.
- 89- Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997 30:573-93
- 90- Skajak-braek G, Anthonsen T, Sandford P. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. London: Elsevier Applied Science 1989.
- 91- Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan *scaffolds* for tissue engineering. *Biomaterials* 1999 20:1133-1142.
- 92- Fakhry A et al. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials* 2004 25:2075-2079.
- 93- Fedok FG. Advances in minimally invasive facial rejuvenation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008 16:359-368.

REFERÊNCIAS

- ABARRATEGI, A. et al. Multiwall carbon nanotube *scaffolds* for tissue engineering purposes. **Biomaterials**, Madrid, v.29, p. 94-102, Jan. 2008.
- ABARRATEGI, A. et al. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Madrid, v.15;95,n.4, p. 1132-1134, Dec. 2010.
- AROSARENA, O.A., COLLINS, W.L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. **Otolaryngology: Head and Neck Surgery**, Lexington, v. 132, p. 592-597, Apr. 2005.
- BARONE, A. et al.. Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in Beagle dogs. **Clinical Oral Implants Research**, Lido di Camaiore, v.22, p. 1131-1137, Oct. 2011.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Carbon Nanotubes as Structural Nanofibers for Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. **Biomacromolecules**, Orléans, v.9, p. 505-509, Feb. 2008.
- BIGI, M.M. et al. Experimental model of distraction osteogenesis in edentulous rats. **Brazilian Oral Research**, Buenos Aires, v.25,n.3, p. 217-224, May-Jun.2011.
- BOECK, E.M. et al. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.28, p. 83-96, 1999.
- BRANDÃO, A C. et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13,n.3, p. 147-154, 2002.
- BURCHARDT H. The biology of bone graft repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.174, p. 28-42, Apr. 1983.
- CHIAPASCO, M, et al. The role of pericranium grafts in the reduction of postoperative dehiscences and bone resorption after reconstruction of severely deficient edentulous ridges with autogenous onlay bone grafts. **Clinical Oral Implants Research**. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02485.x. [Epub ahead of print] Malden, May. 2012.
- COIMBRA, P et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Coimbra, v.1;48,n.1, p. 112-118. Jan. 2011.
- COIMBRA P, et al. Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization. **International Journal**

of Biological Macromolecules, Coimbra v. 1;49,n.4,p. 573-579. Nov. 2011 Epub 2011 Jun 17.

COSTA-PINTO, A.R.; REIS, R.L.; NEVES, N.M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, Guimarães, v.17,n.5, p. 331-347. Oct. 2011.

COSTA-PINTO, A.R. et al. Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Guimarães, v.6,n.1, p. 21-28. Jan. 2012.

ELSALANTY, M.E. et al. Reconstruction of canine mandibular bone defects using a bone transport reconstruction plate. **Annals of Plastic Surgery**, v.63, p. 441-48, Oct. 2009.

GIANNOBILE, W.V.; FINKELMAN R.D.; LYNCH, S.E. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. **Journal of Periodontology**, v.65, p. 1158-1168, Dec. 1994.

GIELKENS, P.F. et al. Vivosorbs, Bio-Gides, and Gore-Texs as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. **Clinical Oral Implants Research**, Groningen, v.19, p. 516–521, May. 2008.

HUANG, Y. et al. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin *scaffolds* for tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, p. 7616-7627, Dec. 2005.

IM, O. et al. Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**. 2012;7:2087-99. Epub 2012 Apr 24.

IZUKA T. et al. Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. **Clinical Oral Implants Research**, v.16, p. 69-79, Feb. 2005.

JIMI, E et.al. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. **International Journal of Dentistry**, Fukuota, 2012:148261 Mar. 2012. doi: 10.1155/2012/148261

JOHANSSON, B. et al. Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. **Dentomaxillofacial Radiology**, v.30, p. 153–156, May. 2001.

KANG, T. et al. A modified ridge Expansion technique in the maxilla. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, Davie, v.33,n.4, p. 250-252, 254, 256; quiz 258, 260, Apr. 2012.

KANYAMA, M. et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Archives of Oral Biology**, Elsevier Ltd, Exeter, v.48, p. 723-730, 2003.

KIM, C. S. et al. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral derived biomaterial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.32, p. 583-589, Jun. 2005.

LEE, J. A. et al. Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. **Journal of Periodontal & Implant Science**, Seoul. v.40, p. 211-219, Oct. 2010.

LI, H. et al. Preparation and Characterization of Homogeneous Hydroxyapatite/Chitosan Composite Scaffolds via In-Situ Hydration. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.1, p. 42-49, Oct. 2010.

LYNCH, S.E. et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. **Journal of Periodontology**, v.62, p. 710-716, Nov. 1991.

MEDRADO, G.C.B. et al. The effect of a chitosan-gelatin matrix and dexamethasone on the behavior of rabbit mesenchymal stem cells. **Biomedical materials**, v.1, p. 155-156, Aug. 2006.

MENDES, R.M. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. **Archives of Oral Biology**, Elsevier Ltd, Exeter, v.53, p. 1155-1162, Dec. 2008.

MENDES, R.M. et al. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. **Life Sciences**, v.87, p. 215-222. Aug. 2010.

MIRANDA, S.C.C.C. **Engenharia de tecido ósseo a partir da cultura de células-tronco mesenquimais em matriz de quitosana-gelatina: avaliação *in vitro* e *in vivo*, em alvéolos dentários de ratos**. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MIRANDA, S.C.C.C. et al. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction. **Archives of Oral Biology**, Elsevier Ltd, Exeter, v.56; p. 1-15. Jan. 2011.

MIRANDA S.C.C.C. et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. **Journal of Biomedical Material Research. Part A**. May 24. 2012. doi: 10.1002/jbm.a.34214. [Epub ahead of print]

MOROZ, A. et al. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improved approach in cartilage tissue engineering. **Platelets**, Botucatu, May. 2012. doi:10.3109/09537104.2012.686255. [Epub ahead of print]

NKENKE E. et al. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. **Clinical Oral Implants Research**, Erlangen, v.12, p. 495-502, Oct. 2001.

PINTO, J.R. et al. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats – a histological study. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.12, p. 3-9, 2001.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Baltimore, v. 2;284,n.5411, p. 143-47, Apr. 1999.

PURICELLI, E. et al. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft et al. **Head & Face Medicine**, Porto Alegre, v.6, p. 1-8, Jun. 2010.

SENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Ankara, v.193, p. 197-203, Jan. 2000.

SHI, D. et al. Development and potential of a biomimetic chitosan/type II collagen scaffold for cartilage tissue engineering. **Chinese Medical Journal (English Edition)**. v.118,n.17, p. 1436-1443, Sep 2005.

SITHARAMAN, B. et al. *In vivo* biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. **Bone**, Houston, v.43, p. 362-370, Aug. 2008.

SPIN-NETO, R. et al. Exploring CBCT-based DICOM files. A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. **Journal of Digital Imaging**, Araraquara, v 24, n.6, p. 959-966, Dec. 2011.

SPRINGER I.N. et al. Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. **Clinical Oral Implants Research**, Kiel, v.15, p. 205-212, Apr. 2004. May; 120,n.5, p. 895-901.

STEPHAN, S.J. et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. **Laryngoscope**, Charlottesville, v.120,n.5, p. 895-901, May. 2010.

TAN, H. et al. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, Pittsburgh, v.30,n.13, p. 2499-2506, May. 2009.

TEÓFILO, J.M.; BRENTAGANI, L.G.; LAMANO CARVALHO, T.L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Archives of Oral Biology**, Elsevier Ltd, Exeter, v. 49, p. 755-762, 2004.

TORRES, J. et al. Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria. **Journal of Clinical Periodontology**, Alcorcón, v. 38,n.12, p. 1147-1153, Dec. 2011.

TOUR, G. et al. Bone Repair Using Periodontal Ligament Progenitor Cell-seeded Constructs. **Journal of Dental Research**, Huddinge v.91,n.8, p. 789-794. Epub 2012 Jun 26.

WEIBULL, L et al. Morbidity after chin bone harvesting--a retrospective long-term follow-up study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Göteborg, v.11,n.2, p. 149-157, Jun. 2009.

WILTFANG, J. et al. A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, Erlangen, v.15, p. 187-193, Apr. 2004.

WONG, R.W.K.; RABIE, A.B.M. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Hong Kong, v.43, p. 46-50, Feb. 2005.

YANG, C. et al. Biocompatibility studies on bone marrow stromal cells with chitosan-gelatin blends. **Journal of Wuhan University of Technology – Materials Science Edition**. v.19, p. 30-33. Dec. 2004.

YANG, Z. et al. Effects of chitosan/collagen substrates on the behavior of rat neural stem cells. **Science China Life Sciences**, v.53,n.2, p. 215-222. Feb 2010 Epub 2010 Mar 7.

YUGOSHI, L.I. et al. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 92-96, 2002.

ZIED, I.C. et al. . Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 26,n.1, p. 9-13, 2005.

ZHOU, M. et al. Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ. **Biomaterials**, v.31, p.4935-4943, Jun. 2010.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEAUNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 284/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação do biomaterial a base de quitosana associado ao hialuronato de sódio como estratégia terapêutica para reconstrução de defeitos ósseos em ratos normais e diabéticos**", que tem como responsável(is) **Gerluza Aparecida Borges Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **30/ 03/2011**.

Este certificado expira-se em **30/ 03/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 284/2010**, related to the project entitled "**Evaluation of chitosan-based biomaterial associated to Sodium Hyaluronate as therapeutic strategy for reconstruction of bone defects in normal and diabetic rats**", under the supervisors of **Gerluza Aparecida Borges Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 30, 2011**.

This certificate expires in **March 30, 2016**.

Belo Horizonte, 4 de Abril de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos 6627 -- Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@ppg.ufmg.br

ANEXO B – DEPÓSITO DE PATENTE DA MESA CIRÚRGICA

	< Uso exclusivo do INPI > Espaço para etiqueta
---	--

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte - MG BR
- 1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

☒ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: Gerluza Aparecida Borges Silva
- 6.2 Qualificação: Professora 6.3 CPF: 665499226-15
- 6.4 Endereço completo: Rua Castelo de Belmonte, 347, Bairro Castelo - Belo Horizonte - MG
- 6.5 CEP: 31330-080 6.6 Telefone: (31) 3409-4774 6.7 Fax: (31) 3409-6430
- 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	20 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	3 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	14 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo dos Inventores, Anexo de depositantes, Portaria nº 042 Declarações				7 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 46 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 01/08/2011

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Prof. Renato de Lima Santos
Pró-Reitor de Pesquisa / UFMG
Delegação de Competência
Portaria nº 042 / 2010



ANEXO DE DEPOSITANTES**Título: MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE**

Página 1

Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG
Qualificação: Fundação
CNPJ / CPF / Número INPI: 213949888000183
Endereço Completo: Rua Raul Pompéia, 101, 11º andar, Bairro São Pedro - Belo Horizonte - MG
CEP: 30330-080
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

ANEXO DE INVENTORES**Título: MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE**

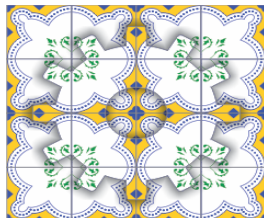
Página 1

Nome: Fernando Antônio Mauad de Abreu
Qualificação: Pesquisador
CPF: 02687629618
Endereço Completo: Rua São Julião, 440, Apto 602, Bairro Nova Floresta, Belo Horizonte - MG
CEP: 31140-230
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: Luiz Bertoldo da Costa Filho
Qualificação: Pesquisador
CPF: 300587326-91
Endereço Completo: Rua Castelo Belmonte, 370, Apto 101, Bairro Castelo - Belo Horizonte - MG
CEP: 31330-080
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: José Bento Alves
Qualificação: Professor
CPF: 076858406-00
Endereço Completo: Rua Custódio de Melo, 39, Bairro Liberdade - Belo Horizonte - MG
CEP: 31270-790
Telefone: (31) 3409-4774
FAX: (31) 3409-6430
E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

ANEXO C – ARTIGO COMPLETO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NOS ANAIS DO VII CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA



CONEM 2012 «Engenharia em destaque»
VII Congresso Nacional de Engenharia Mecânica
São Luís - Maranhão - Brasil
31 de julho a 03 de agosto
www.abcm.org.br/conem2012

DESENVOLVIMENTO DE UMA MESA CIRÚRGICA PARA CIRURGIAS GERAIS E ODONTOLÓGICAS EM ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

Luiz Bertoldo Costa Filho, luizbcfilho@ibest.com.br¹
Gerluza Aparecida Borges Silva, gerluza@terra.com.br²
Fernando Antonio Mauad Abreu, fmauadabreu@yahoo.com.br²
Matheus Henrique Santos Assis, matheushenriquesantos@hotmail.com³
Igor Daniel Garcia Reis, igorbiomedicina@hotmail.com²
Antônio Eustáquio de Melo Pertence, pertence@demec.ufmg.br⁴
Peterson Antônio Dutra, peterpsonperio@gmail.com¹

¹Programa de Mestrado em Implantodontia, PUCMG. Av. Dom José Gaspar, 500, 30535-610. BH, MG, Brasil

²Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento; Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil

³Universidade José do Rosário Vellano, Unifenas, Rua Boaventura, 50, 31270-020, BH, MG, Brasil

⁴Laboratório de Projetos Mecânicos, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brasil

Resumo: Pesquisas visando a aceleração do reparo ósseo em Odontologia têm sido extremamente valorizadas. O tecido ósseo é de fundamental para o restabelecimento da função mastigatória dos pacientes, como apoio para próteses ou implantes. A maioria dos estudos utilizam modelos de defeitos ósseos intra-bucais desenvolvidos em cães ou primatas, adequados pela facilidade de acesso cirúrgico intraoral. Mas, a utilização desses animais é dificultada por questões éticas, pelo custo e necessidade de biotérios específicos. Cirurgias intrabucais em pequenos animais como camundongos, ratos e coelhos são limitadas pela pequena abertura dos maxilares; difícil visualização do campo cirúrgico e espaço limitado para o sistema de irrigação e de aspiração, fundamentais quando da utilização de motores odontológicos. Além disso, a necessidade de proteção dos tecidos moles- língua, lábios, bochechas, demanda mãos auxiliares, tornando o campo visual ainda mais restrito. O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma mesa cirúrgica com recursos específicos para procedimentos intra-orais em animais de pequeno porte, aperfeiçoando sua realização de forma segura, padronizada e em menor tempo, dispensando-se a necessidade de operadores auxiliares. O modelo conta com uma plataforma (leito cirúrgico) removível e esterilizável, com possibilidade de aquecimento e controle da temperatura; regulação de altura e diferentes inclinações por meio de pés rosqueáveis; mecanismo de sustentação e fixação atraumática dos animais; suporte inteligente para instrumentais cirúrgicos e/ou afastadores intraorais permitindo inúmeros giros, posições de altura e diferentes angulações dos mesmos. Pesquisadores odontólogos e profissionais da engenharia mecânica contribuíram para o desenvolvimento do projeto, com apoio financeiro da Fapemig. O depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial foi realizado por meio do CTIT/UFMG, sob nº 014110002397. A matéria tratada representa um avanço metodológico e abre perspectivas promissoras para inúmeros estudos em cavidade oral ou fora dela, em animais de pequeno porte, modelos de baixo custo e fácil disponibilidade.

Palavras-chave: Bioengenharia; Mesa cirúrgica; Pequenos animais; Defeitos ósseos; Odontologia.

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a Odontologia é a reposição do tecido ósseo, essencial para o restabelecimento da função mastigatória dos pacientes, seja por próteses ou por implantes dentários. Nesse sentido, as pesquisas que tratam de alternativas para a aceleração da cicatrização óssea ou da reposição do tecido ósseo, como a avaliação de diferentes tipos de enxertos, biomateriais, células tronco e osteogênicas para bioengenharia tecidual óssea, têm sido extremamente valorizadas (Healy e Guldberg, 2007; Matsuno et al, 2010, Szpalski et al., 2010). A validação científica do uso de biomateriais como substitutos ósseos requer a avaliação do seu comportamento biológico em modelos animais. Alguns defeitos ósseos têm sido experimentalmente desenvolvidos in vivo para fins de pesquisa sobre a regeneração óssea. Entretanto, é importante considerar nos estudos de reparo/enxertos ósseos, os sítios cirúrgicos envolvidos; ou seja, as áreas doadoras e receptoras criadas nos modelos animais. Preferencialmente, os sítios receptores devem ter a mesma origem embrionária das áreas doadoras. Em se tratando dos defeitos ósseos crânio-faciais e maxilares, considera-se como condição ideal trabalhar com modelos ósseos de mesma origem embrionária; ou seja, de origem intramembranosa. Esta condição justifica-se pelo tipo de neoformação de osso alveolar, tecido ósseo que suporta os dentes nos maxilares, o que ocorre por ossificação intramembranosa. Por meio desse processo de ossificação, ocorre um padrão direto de deposição óssea a partir do mesênquima (Brugnami et al., 2010). Os modelos de defeitos ósseos mais usualmente empregados em pesquisas, incluindo os estudos sobre a aplicabilidade dos biomateriais ou dos enxertos em odontologia, são criados em tíbias, em fêmures e em calota craniana de ratos e de coelhos. Desses, somente a calvária possui a desejável origem intramembranosa (Berglundh et al., 2003). O processo de cicatrização óssea nos ossos fêmur e tíbia progride por ossificação endocondral, diferente do que ocorre nos maxilares.

Além da importância da origem embrionária dos sítios de reparo ósseo, outros fatores diretamente relacionados ao sítio cirúrgico, como as características do meio bucal podem influenciar na evolução do processo cicatricial e interferir na interpretação dos resultados. Defeitos ósseos criados em tíbias, fêmures e calvárias constituem sítios cirúrgicos extra-orais, portanto, livre de fatores como bactérias, fluxo salivar, alterações de pH e de forças mastigatórias, o que inviabiliza a extrapolação direta dos resultados para clínica odontológica.

Alguns estudos que simulam os defeitos ósseos, como exemplo, as fraturas de mandíbula, os múltiplos implantes ou os enxertos ósseos em bloco têm utilizado modelos de defeitos ósseos criados nos maxilares de cães ou maxilares de primatas (Lynch et.al, 1991; Kim et al., 2005). Tais animais constituem modelos adequados para cirurgias intraorais, devido ao amplo campo visual, com acesso cirúrgico direto e com a utilização dos recursos técnicos similares aos disponibilizados na clínica odontológica (Elsalanty et.al, 2009; Barone et al., 2011; Giannobile et al., 1994; Zhou et al., 2010). Entretanto, não representam uma realidade acessível à maioria dos laboratórios de pesquisa científica, tanto por questões éticas, quanto pelo custo e pelas condições específicas de manejo e espaço para manutenção desses animais em biotério. Poucos estudos intra-orais têm sido realizados em animais de pequeno porte, ratos e camundongos, modelos de baixo custo e mais acessíveis aos laboratórios de pesquisa na área da Odontologia. Possivelmente, uma das razões para a deficiência de estudos em defeitos ósseos intraorais nesses modelos experimentais decorre da dificuldade técnica para a realização dos procedimentos intraorais em animais de pequeno porte. De fato, o acesso intraoral aos maxilares de ratos, camundongos, coelhos, especialmente quando o procedimento cirúrgico exige o corte por instrumentos rotatórios elétricos sob irrigação, é limitado por alguns fatores, tais como:

- Limitada abertura dos maxilares, com difícil visualização do campo cirúrgico intraoral;
- Necessidade de um sistema de irrigação e de aspiração contínua com soro ou solução salina simultaneamente à utilização dos motores cirúrgicos utilizados na criação de defeitos ósseos;
- Necessidade de afastamento e de proteção dos tecidos moles, para evitar acidentes iatrogênicos como a dilaceração tecidual de tecidos periodontais, língua e mucosa labial e jugal (bochechas); e,
- Necessidade de suporte, apoio ou fixação da cabeça do animal a fim de permitir o acesso intraoral de instrumentos cortantes (mecânicos ou elétricos) com segurança.

A necessidade de muitos aparatos e de mãos auxiliares para sustentar os aparelhos e os instrumentais indispensáveis aos procedimentos como fonte de luz, irrigação, sucção, afastadores de tecidos, dificultam a realização de cirurgias intraorais em pequenos animais. Cirurgias que demandam a utilização de equipamentos odontológicos elétricos, micromotores giratórios como contra-ângulos e canetas de alta rotação, são ainda mais críticas. O campo visual para o acesso às estruturas ósseas intraorais fica extremamente limitado, prejudicando o trabalho padronizado e seguro para os animais. Atualmente, com a regulamentação dos Comitês de Ética em Pesquisa Experimental, os pesquisadores precisam estar atentos não somente aos procedimentos cirúrgicos, mas também ao conforto e segurança dos animais, evitando a manipulação excessiva dos mesmos. Tem sido recomendado que as técnicas cirúrgicas em qualquer modelo animal experimental, incluindo roedores, sejam

realizadas com o máximo de agilidade, segurança para os animais e em condições assépticas (Committee on Infectious Diseases of Laboratory Rats and Mice, I.L.A.R., 1992). Obviamente, experimentos sem perspectiva de resposta, mal planejados ou que determinem o sofrimento, a mutilação e a morte desnecessária de animais, devem ser condenados (Marques et al., 2005). Ao contrário, a utilização de instrumentos, equipamentos, recursos técnicos que viabilizem procedimentos cirúrgicos de modo eficiente e seguro para os animais tem sido estimulada. Nesse sentido, alguns modelos de mesas ou de plataformas cirúrgicas vêm sendo propostos e disponibilizados comercialmente, conferindo uma série de benefícios e recursos facilitadores que visam minimizar o tempo cirúrgico, propiciando conforto e segurança para ambos, operador e animal experimental. O presente estudo, valendo-se dos princípios básicos da engenharia mecânica, apresenta um modelo de mesa cirúrgica inédito pela somatória de recursos e aplicações voltadas para cirurgias gerais e odontológicas em animais de pequeno porte. O modelo é indicado para qualquer tipo de intervenção intra ou extra-oral, para procedimentos dos mais simples como tomadas fotográficas, dissecações anatômicas ou simples coletas de sangue aos procedimentos cirúrgicos mais complexos onde a precisão e a reprodutibilidade são fundamentais para a pesquisa.

O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma mesa cirúrgica com recursos específicos para a realização de procedimentos anatômicos, clínicos ou cirúrgicos em animais de pequeno porte. Especificamente, o dispositivo compreende uma mesa cirúrgica para procedimentos intraorais em animais de pequeno porte, aperfeiçoando sua realização de forma padronizada, em menor tempo, dispensando-se a necessidade de operadores auxiliares.

2. APLICAÇÃO DA MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

Diversos estudos e pesquisas envolvendo cirurgias em cavidade oral de animais de pequeno porte têm sido realizados pelos pesquisadores/inventores utilizando a mesa cirúrgica. Dados publicados demonstram algumas das indicações e aplicabilidade da mesa cirúrgica. Exodontias de molares de ratos seguida da inserção de biomateriais nos alvéolos dentários, para avaliação do processo cicatricial e subsequente reparo ósseo é um exemplo de sua aplicabilidade (Mendes et al., 2008). No estudo indicado, imediatamente após anestesia e posicionamento de ratos na mesa cirúrgica, os animais foram submetidos à extração dos primeiros molares superiores. Em seguida, os alvéolos dentários direitos foram tratados com gel de hialuronato de sódio a 1%, enquanto os alvéolos esquerdos foram usados como controles. Os animais foram sacrificados após 2, 7 e 21 dias, quando as amostras dos maxilares foram processadas para análise histológica e imunohistoquímica.

Na mesma linha de pesquisa, Mendes et al., 2010 avaliaram o efeito da inserção de nanotubos de carbono isolados ou funcionalizados com hialuronato de sódio na cicatrização óssea em alvéolos dentários de ratos. O objetivo do estudo foi avaliar se a funcionalização dos nanotubos de carbono (NTC) com hialuronato de sódio (HY) produziria um gel mais reforçado, com a manutenção das propriedades do hialuronato de sódio isolado (previamente avaliado), o qual apresenta fraca estabilidade. Como no estudo anterior (Mendes et al., 2008), os animais foram anestesiados e posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica para a exodontia dos primeiros molares. Em seguida, os alvéolos foram tratados com nanotubos de carbono, com gel de hialuronato de sódio 1% ou com nanotubos funcionalizados com hialuronato de sódio. A Figura (1) ilustra o exposto acima.

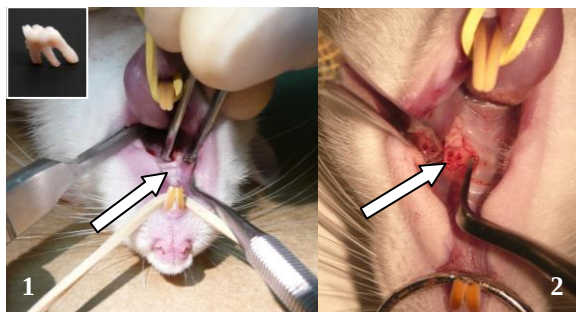


Figura 1. Procedimentos intra-bucais em ratos viabilizados pela mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.

1 - Extração do 1º molar superior (seta) mostrado no canto superior esquerdo, após exodontia, 2 - Acesso aos alvéolos dentários -cavidades ósseas após a remoção dos dentes.

Ainda na linha de pesquisa de avaliação de biomateriais no modelo intrabucal de alvéolos dentários, Miranda et al. (2011) avaliaram o reparo ósseo, seguido do implante de esponjas de quitosana nas cavidades

alveolares após a exodontia dos primeiros molares superiores de ratos. Após a avaliação *in vitro* do comportamento de células tronco mesenquimais (de medula óssea de ratos) cultivadas sobre o biomaterial de quitosana associada à gelatina, os pesquisadores inseriram o biomaterial em alvéolos dentários a fim de avaliar sua biocompatibilidade e biodegradação *in vivo*. Os animais foram sacrificados após 5, 21 e 35 dias.

Os recursos da mesa cirúrgica para procedimentos intra-bucais têm sido também utilizados em pesquisas sobre o tracionamento ortodôntico. O tracionamento ortodôntico é geralmente um procedimento moroso e de alto custo. Pesquisadores têm buscado estratégias para aceleração do processo de movimentação dentária, a partir da ativação dos mecanismos de reabsorção e formação óssea. Uma das estratégias em estudo consiste na administração local de fatores de crescimento relacionados ao metabolismo ósseo. Buscando esclarecer o possível papel regulador do EGF (fator de crescimento epidermal) na remodelação óssea, Saddi et al. (2008) e Alves et. al. (2009) avaliaram o efeito desse dessa molécula no tracionamento ortodôntico induzido em ratos. Os autores utilizaram lipossomas como veículos para a administração do EGF. Lipossomas são pequenas vesículas esféricas produzidas a partir de colesterol, esfingolípides, glicolípides e proteínas de membrana, utilizadas como veículos no transporte de produtos biologicamente ativos. Essas vesículas têm sido utilizadas como carreadores para uma grande variedade de moléculas, como drogas, proteínas, nucleotídeos, uma vez que permitem a liberação lenta e gradual dos produtos que transportam. O uso de lipossomas associados ao EGF no tracionamento ortodôntico visava a permanência da molécula bioativa por um período mais longo, sem a necessidade de administrações diárias ou periódicas do EGF. Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica para a viabilização dos procedimentos intrabucais de adaptação das molas e elásticos ortodônticos entre os dentes 1os molares e incisivos superiores. A abertura da boca e a visualização do campo cirúrgico intrabucal são etapas importantes para ambos, a colocação dos aparelhos de tração e para a administração das drogas, realizadas com uma microseringa, paralela à mucosa, adjacente aos dentes tracionados. A Figura (2) ilustra o exposto acima.

Os animais foram sacrificados após 5, 10, 14 e 21 dias da colocação dos aparelhos ortodônticos, quando foram realizadas medidas de deslocamento (movimentação dentária) e análises histológicas e imunohistoquímicas. No primeiro estudo (Saddi et al., 2008) o objetivo foi avaliar a eficácia dos lipossomas como veículo para a entrega de EGF. No segundo estudo, em continuidade às avaliações de Saddi et al. (2008), Alves et al., 2009 avaliaram o papel da administração desse fator de crescimento no tracionamento ortodôntico. Os resultados revelaram que a administração do EGF exógeno associado à vesículas de lipossomas promove um efeito adicional no nível de osteoclastos recrutados, em comparação à administração do EGF solúvel, produzindo uma reabsorção óssea e consequente movimentação dentária mais rápidas.

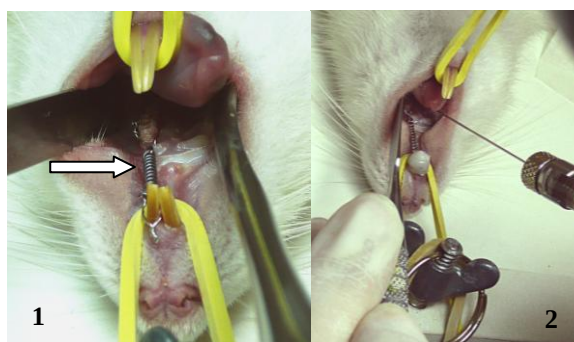


Figura 2. Procedimentos intra-bucais em ratos viabilizados pela mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.

1 - Colocação de aparelho ortodôntico entre os incisivos e molares de ratos (seta), 2 - Administração de drogas via intraoral.

A manutenção do tecido ósseo dos maxilares é de fundamental importância em Odontologia, pois o sucesso das próteses e implantes dentários utilizados no restabelecimento da função mastigatória de pacientes desdentados, depende do volume de tecido ósseo remanescente. Nesse sentido, inúmeras pesquisas têm sido realizadas no intuito de compensar perdas ósseas e otimizar o processo de reparo ósseo após cirurgias intra-bucais. Entretanto, a maioria dos estudos em bioengenharia tecidual óssea tem avaliado biomateriais osteocondutores e/ou osteoindutores em modelos de defeitos ósseos extra-bucais, possivelmente pelas dificuldades técnicas encontradas no trabalho em boca de animais. A maioria dos estudos sobre reparo ósseo utiliza defeitos ósseos criados em tíbias, fêmures e calota craniana de ratos e coelhos. Tais modelos estão livres de fatores bucais que invariavelmente podem comprometer a interpretação dos resultados. A fim de contribuir também nessa linha de pesquisa, um estudo piloto tem sido desenvolvido com o auxílio da mesa cirúrgica aqui apresentada (Costa-filho et al., 2011).

Nesse estudo, um defeito ósseo padronizado foi obtido cirurgicamente no maxilar superior de ratos, por via intraoral, com a preservação da mucosa periodontal e dos tecidos moles adjacentes. O defeito foi criado na área das raízes distais e mediais dos 1os molares superiores. Após a exodontia desses dentes, o defeito é criado com broca diamantada, adaptada a um micromotor odontológico como indica a Fig. (3), sob irrigação com soro fisiológico estéril. O procedimento é realizado com sucção à vácuo das soluções irrigadoras e com o auxílio de afastadores intrabucais de aço inox, para proteção dos tecidos moles. A cavidade padrão obtida de 2,5 mm de profundidade e 2,5 mm de diâmetro permite que biomateriais de dimensões padronizadas, sejam inseridos na loja óssea e contidos por meio de suturas como mostra a Fig. (4).

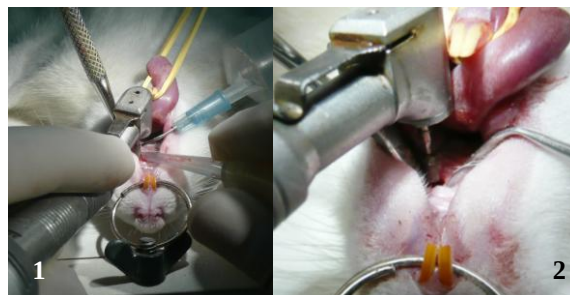
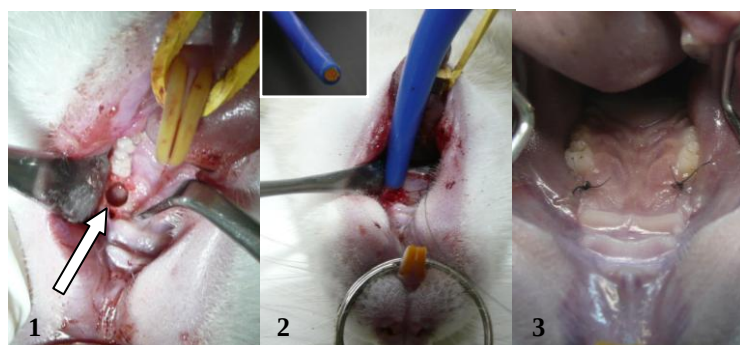


Figura 3. Utilização da mesa cirúrgica para criação de defeito ósseo intra-bucal em ratos. 1 e 2 - Criação do defeito ósseo intra-bucal com motor odontológico.



Figuras 4. Utilização da mesa cirúrgica para criação de defeito ósseo intra-bucal em ratos.

**1 - Imagem panorâmica do defeito ósseo criado (seta), 2 - Aplicação de um biomaterial de preenchimento
3 - Biomaterial contido por meio de sutura.**

Além dos procedimentos cirúrgicos, a avaliação clínica do processo de cicatrização, ou seja, o nível de fechamento das feridas observadas durante a fase pós-operatória é um aspecto muito importante nas pesquisas odontológicas. Nesse sentido, a mesa cirúrgica permite também a padronização de tomadas fotográficas para o controle clínico da área intra-bucal operada ao longo do período de avaliação pós-operatória pretendido.

O modelo de defeito ósseo proposto possui um aspecto inovador, tanto pela via de acesso e localização, quanto pela padronização de suas dimensões. Sua implementação abre perspectivas promissoras para avaliação do reparo ósseo de biomateriais enxertados *in vivo*, em animais de baixo custo e pronta disponibilidade.

3. DESENVOLVIMENTO DA MESA CIRÚRGICA PARA ANIMAIS DE PEQUENO PORTE

A mesa cirúrgica para pequenos animais foi desenvolvida por pesquisadores odontólogos e profissionais da Engenharia Mecânica contribuíram para o projeto, com apoio financeiro da Fapemig. O depósito de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Industrial foi realizado por meio da Coordenadoria de Transferência de Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG, sob nº. 014110002397.

As Figuras (5) e (6) ilustram o projeto conceitual da mesa cirúrgica inicialmente desenvolvida onde é possível indicar as várias partes e suas funções.

A mesa cirúrgica compreende uma base (2), apoiada em quatro pés reguláveis (1) conectados na parte inferior da mesma. Na base há dois rasgos laterais (3), sendo um rasgo para cada lado da base, e uma depressão (7) na parte superior próxima e paralela à face frontal (50). A base (2) serve de suporte para uma plataforma removível esterilizável (24) que serve de local de apoio para os animais.

Duas hastes (16) podem correr dentro de tubos (4) em um movimento de deslizamento para cima e para baixo, sendo que o tubo (4) possui um suporte de fixação (26) para uma trava lateral (25), além um orifício (34) para conectar a trava (25), já as hastes (16) possuem orifícios (15), por onde passam a trava (25). O conjunto compreendido pelo tubo (4) e haste (16) e a barra superior (20) formam um aparato similar a uma trave articulada retrátil. O deslizamento das hastes (16) nos tubos (4) permite o ajuste de altura da barra horizontal (20) utilizando as travas laterais (25) que bloqueiam o movimento ao penetrar nos orifícios (34) e (15).

O tubo (4) também pode se deslocar ao longo dos rasgos (3) e sobre o eixo (5) do conector (6) formando um ângulo variando de 0 a 180 graus com a superfície de apoio. A posição final (altura) da barra horizontal (20) é definida pelas travas laterais (25). O travamento é mecânico, propiciado pelo movimento deslocamento/giro limitado a 90 graus, da trava (25) dentro do suporte de fixação (26), guiando o encaixe da extremidade superior da trava (25) no orifício (34) do tubo (4) em correspondência com orifício/guia (15) criado na haste (16) das hastes laterais.

O objetivo do aparato compreendido pelos tubos (4), hastes (16) e barra superior (20), anexo à mesa, é permitir a conexão da haste instrumental (11) a ser utilizada como afastador intraoral e/ou outras funções de apoio à cirurgia. A haste instrumental (11) é presa por um pivô (22) giratório, conectado a uma peça cilíndrica (18) que permite o movimento lateral do pivô (22), deslizando de um lado para outro (direito-esquerda) na barra horizontal (20). A posição desejada do pivô (22) ao longo da barra horizontal (20) é conectada preferencialmente pelo travamento de uma borboleta (19) anexa ao cilindro (18). O conjunto de tubos (4) e hastes (16) e da barra superior (20) podem ser deslocados em sentidos ântero-posteriores sobre a mesa, pelo deslizamento desse sistema em rasgos laterais (3). A posição desejada por esse deslocamento das traves pode ser estabelecida, valendo-se das guias (56) ou marcações equidistantes nos rasgos laterais (3) para reprodução ou padronização em outras cirurgias/procedimentos de cunho similar. Dessa maneira, a possibilidade de alteração de altura e de posição do pivô (22), assim como da haste instrumental (11), permite a utilização de instrumentos mais longos, mais curtos ou angulados. O pivô (22) compreende também uma borboleta lateral (33) para prender os instrumentais, permitindo definir a melhor altura (movimento de subida / descida) desses instrumentos ali adaptados. A borboleta frontal (21) conecta a melhor posição do pivô (22), em relação ao movimento em torno desse conector (giro para direita x esquerda). A haste (11) pode, opcionalmente, comportar um dispositivo (9) contendo um orifício (10) para adaptação de um instrumental paralelo a critério do operador, como por exemplo, para cirurgias intraorais, uma ponta sugadora de fluidos.

O suporte (17) pode ser removível e é conectado por rosca podendo a uma das extremidades de uma peça em “U” (38) que corre pelo rasgo (30), na outra extremidade da peça em “U” (38) recebe um conector (29) para travamento do suporte (17) na posição desejada. Esse suporte (17) é utilizado para melhor fixação e estabilização da cabeça do animal, no caso de cirurgias em que movimentos mínimos da cabeça do animal podem prejudicar o procedimento, tais como no caso das exodontias ou acessos intracranianos.

As hastes (13) são compreendidas por, pelo menos, um anel (12) circunscrito à haste que serve de bloqueio para o posicionamento dos elásticos em diferentes alturas. Cada haste (13) conecta os dispositivos elásticos que passam pelos incisivos do maxilar inferior (mandíbula) mantendo aberta a boca do animal, esse posicionado em decúbito dorsal. A haste (13) pode ser rosqueada em pelo menos um orifício da mesa (8), permitindo diferentes níveis de tração dos maxilares, de acordo com a posição dos elásticos nos anéis de bloqueio (12) das hastes (13) e de acordo com a extensão (força de tração) do dispositivo elástico utilizado. O anel (12) da haste (13) permite o posicionamento do mesmo em diferentes alturas. O posicionamento ou a altura dos elásticos nesses anéis (12) deve ser definido de acordo com o tamanho e altura dos maxilares dos animais.

Os pés reguláveis (1) podem deslocar a base (2) permitindo a inclinação da mesa, que pode trabalhar em posição plano-horizontal (0 graus); bem como com a inclinação original de 3,7 graus (pés totalmente rosqueados), ou até inclinação de 10 graus, quando os pés anteriores, próximos à face frontal da mesa (50) estão rosqueados e os posteriores, próximos à face traseira da mesa (51) levantam ao máximo a base em relação à superfície de apoio.

A posição ideal de trabalho será ajustada pelo operador de acordo com a finalidade cirúrgica, sendo que a inclinação padrão da base com os pés totalmente rosqueados, favorece a coleta de resíduos, que compreendem dejetos sólidos e/ou líquidos orgânicos, soluções salinas e fixadoras, tampões ou outros, gerados durante o ato cirúrgico; os quais são depositados na depressão (7) da plataforma (24), que funciona como uma calha coletora de resíduos.

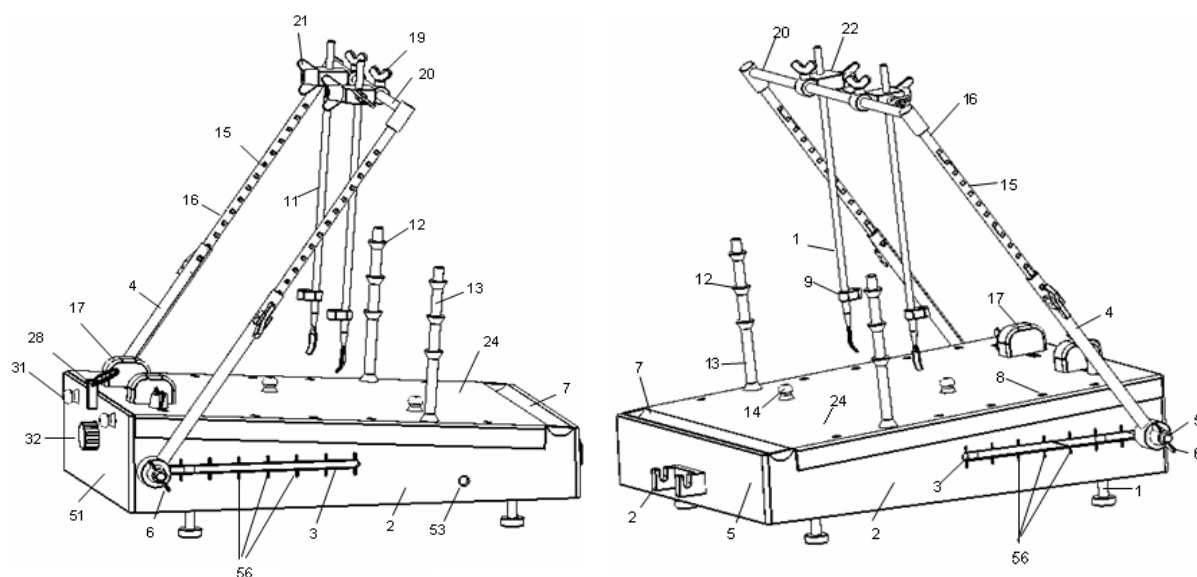
A argola (27) deve segurar o maxilar superior do animal, travando-o pelos dentes incisivos superiores. Alternativamente à utilização da argola (27), o maxilar superior dos animais pode ser apreendido para abertura da boca por meio de um dispositivo elástico conectado a um pino (31) conectado na parte posterior (51) da mesa.

Os dispositivos fixadores móveis (14) possuem um sulco horizontal, uma fissura para adaptação de dispositivo elástico e também podem ser posicionados em qualquer posição na plataforma removível esterilizável (24). Esses fixadores (14) funcionam como auxiliares para a fixação dos membros superiores e inferiores do animal durante a cirurgia. Alternativamente, os dispositivos fixadores móveis (14) podem atuar

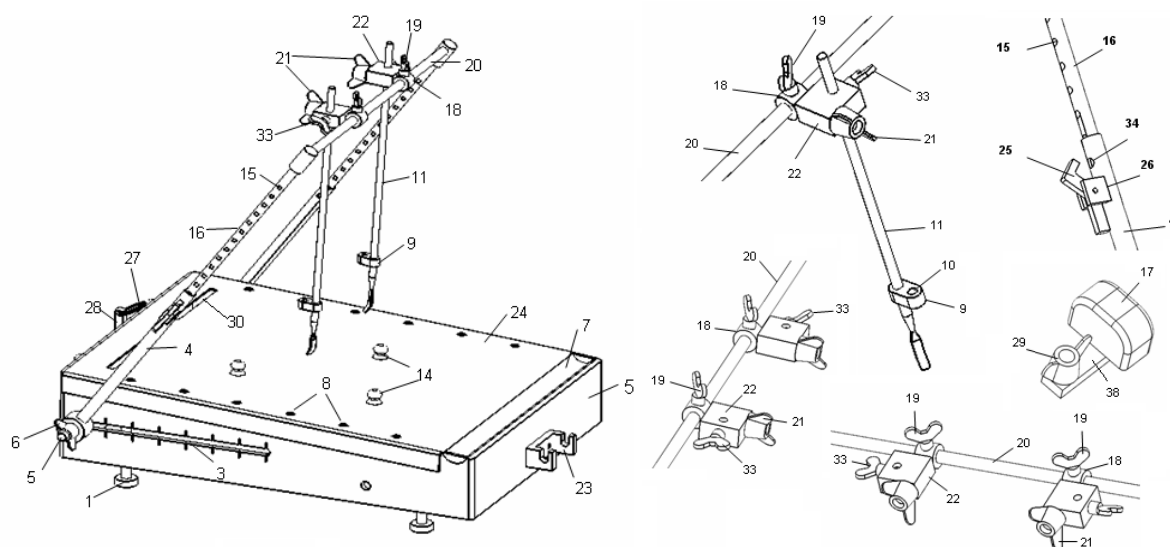
como afastadores de tecidos ou auxiliar no posicionamento do animal em posições diferentes do decúbito dorsal, para outras cirurgias que não intraorais.

O sistema de aquecimento é ligado a um controlador de temperatura (32), podendo para variar a temperatura entre 35 a 40 graus e pode ser ligado em uma tomada convencional nas tensões 127/220 V. Isso garante a manutenção da temperatura basal do animal, condição indispensável para cirurgias de mais longa duração.

Opcionalmente, a mesa pode ser utilizada apenas como plataforma, inclinada ou não, para apoio dos animais, livre das hastes. Nesse caso, as traves devem ser estendidas e giradas totalmente para a posição frontal, onde terminam em zero grau, no momento em que a barra superior (20) encaixa no apoio frontal (23), localizado na parte frontal da mesa (50) caracterizando a “posição fechada” ou “compacta” da mesa, posição adequada para o transporte da mesma.



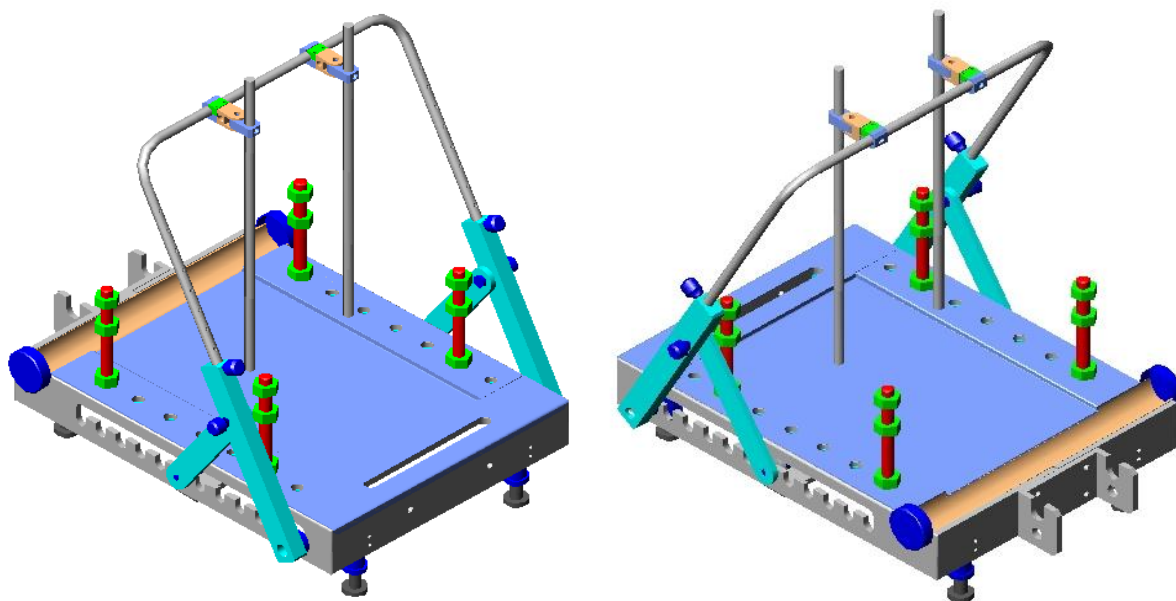
**Figuras 5. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.
Visão lateral em perspectiva**



**Figuras 6. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.
Visão lateral em perspectiva e partes.**

A base (2) e a plataforma removível esterilizável (24) devem ser fabricadas feitas em materiais passíveis de desinfecção ou esterilização em autoclave, em casos de procedimentos cirúrgicos críticos, tais como, o aço inoxidável e o alumínio. As outras partes podem ser submetidas à desinfecção química, podendo ser empregados materiais poliméricos, tais como o polipropileno (PP), polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), polimetacrilato de metila (PMMA), policarbonato (PC), copolímero acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), resinas fenólicas, epóxi, poliéster; poliuretano; silicones rígidos; elastômeros termoplásticos.

Visando aprimorar o projeto conceitual inicialmente desenvolvido, encontra-se atualmente numa fase do projeto, onde as várias partes da mesa cirúrgica vem sendo redesenhadas em sua forma final. Para tanto, estão sendo escolhidos os materiais mais adequados para cada parte, considerando os elementos padronizados encontrados no comércio e a definição dos processos de fabricação convencionais mais adequados e de baixo custo. A Figura (7) ilustra o exposto acima.



**Figuras 7. Mesa cirúrgica para animais de pequeno porte.
Desenvolvimento do projeto final.**

4. COMPARAÇÃO DA MESA CIRÚRGICA DESENVOLVIDA COM OUTROS EQUIPAMENTOS

Comparando a mesa cirúrgica desenvolvida com outros equipamentos, percebe-se que as mesas encontradas no mercado variam em sua complexidade, variando de modelos simples, contando apenas com uma plataforma de apoio para os animais com a possibilidade de inclinação, até modelos mais complexos e inteligentes, especialmente relacionados ao controle da temperatura durante os procedimentos cirúrgicos.

O equipamento desenvolvido apresenta alguns pontos comuns com os produtos do mercado, como: possibilidade de aquecimento da plataforma; regulagem de altura por meio de pés rosqueáveis, permitindo diferentes inclinações da mesa; mecanismo de sustentação atraumática dos animais, com a utilização de peças imantadas para suporte de elásticos ou cintas afastadoras em substituição às fitas adesivas, garras ou cintos de plástico. Entretanto, a mesa cirúrgica aqui desenvolvida reúne características importantes, algumas das quais, foram encontradas em diferentes produtos conhecidos no Estado da Técnica, mas não simultaneamente.

Ao contrário da maioria das mesas que são oferecidas em tamanhos diferenciados para camundongos, ratos, coelhos, porquinhos da índia, a mesa cirúrgica desenvolvida apresenta regulagem de altura das hastes laterais (suporte de instrumentais cirúrgicos) o que viabiliza a utilização da mesma plataforma para todos os animais de pequeno porte, dispensando a aquisição de versões específicas de mesa para cada modelo animal.

Além disso, um diferencial específico em relação às demais mesas cirúrgicas do mercado é a sua aplicabilidade, não exclusiva, mas precisamente indicada, para os procedimentos intraorais em pequenos animais. Para tanto, o sistema conta com hastes laterais articuladas e deslizáveis sobre a plataforma, presas entre si por uma barra horizontal superior. Essa barra horizontal visa servir de apoio para instrumentais e para afastadores intraorais. Tal mecanismo de suporte de instrumentos foi delineado com base na experiência de pesquisadores odontólogos. O sistema permite inúmeras posições de altura e de angulação dos instrumentos adaptados na barra horizontal, permitindo o livre acesso dos operadores à plataforma. Para procedimentos intrabucais, os componentes e os acessórios da mesa foram planejados para que os operadores se coloquem em posição ergonômica de meio dia (12 horas); ou seja, em posição voltada para face posterior da mesa, atrás da cabeça do animal, à semelhança do que ocorre na maioria dos procedimentos clínicos intrabucais em humanos.

A mesa cirúrgica possui tamanho adequado para operações em animais de pequeno porte, tais como os roedores, coelhos, gatos, gambás de laboratório medindo de 10 cm a 30 cm de comprimento, em média, excluindo-se o comprimento da cauda; a largura dos animais, supracitados, varia de 5 cm a 20 cm no sentido látero-lateral.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação do Desenvolvimento da Pesquisa (FUNDEP) pelo apoio recebido para o desenvolvimento deste projeto.

6. REFERÊNCIAS

Alves, J.B., Ferreira, C.L., Martins, A.F., Silva, G.A., Alves, G.D., Paulino, T.P., Ciancaglini, P., Thedei, G.Jr., Napimoga, M.H., 2009, "Local delivery of EGF-liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression", *Life Sciences*, vol.85, pp.693-99.

Barone, A., Ricci, M., Calvo-Guirado J.L., Covani, U., 2011, "Bone remodelling after regenerative procedures around implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in Beagle dogs", *Clinical Oral Implants Research*.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P., Lindhe, J., 2003, "De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants", *Clinical Oral Implants Research*, vol.14, pp.251-62.

Brugnami, F., Caiazzo, A., Leone, C., 2010, "Review of Intraoral Harvesting for Bone Augmentation: Selection Criteria, Alternative Sites, and Case Report", *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, vol.31, Issue 7.

Committee on Infectious Diseases of Laboratory Rats and Mice, I.L.A.R., 1992, Washington, D.C., Government Printing Office.

Costa Filho, L.B., Silva, G.A.B., Abreu, F.A.M., Assis, M.H.S., Miranda, S.C.C.C., Santos, I.G.D., Goes, A.M., Oliveira, P.A.D., 2011, "Defeito ósseo intra-bucal em ratos: etapas cirúrgicas e recursos técnicos para viabilização do modelo de estudo em pesquisas osontológicas", *Brazilian Oral Research*, vol. 25 (Suppl.1), pp. 255, *Proceedings of the 28th SBPqO Annual Meeting*.

Elsalanty, M.E., Zakhary, I., Akeel, S., Benson, B., Mulone, T., Triplett, G.R., Opperman, L.A., 2009, "Reconstruction of canine mandibular bone defects using a bone transport reconstruction plate", *Annals of Plastic Surgery*, vol.63, pp.441-48.

Giannobile, W.V., Finkelman R.D., Lynch, S.E., 1994, "Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I", *Journal of Periodontology*, vol.65, pp.1158-68.

Healy, K.E., Guldberg, R.E. 2007, "Bone tissue engineering", *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, vol.7, pp.328-30.

Kim, C.S., Choi, S.H., Cho, K.S., Chai, J.K., Wikesjo, U.M.E., Kim, C.K., 2005, "Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral derived biomaterial", *Journal of Clinical Periodontology*, vol.32, pp.583-89.

Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H., Williams, R.C., 1991, "Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs", *Journal of Periodontology*, vol.62, pp.710-16.

Marques, R.G., Miranda, M.L., Caetano, C.E.R., Biondo-Simões, M.L.P., 2005, "Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil", *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol.20, pp.262-67.

Matsuno, T., Omata, K., Hashimoto, Y., Tabata, Y., Satoh, T. 2010, "Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery", *Japanese Dental Science Review*, vol.46, pp.188-92.

Mendes, R.M., Silva, G.A., Calliari, M.V., Silva, E.E., Ladeira, L.O., Ferreira, A.J., 2010, “Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair”, *Life Sciences*, vol.87, pp.215-22.

Mendes, R.M., Silva, G.A., Lima, M.F., Calliari, M.V., Almeida, A.P., Alves, J.B., Ferreira, A.J., 2008, “Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats”. *Archives of Oral Biology*, vol.53, pp.1155-62.

Miranda, S.C., Silva, G.A., Hell, R.C., Martins, M.D., Alves, J.B., Goes A.M., 2011, “Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction”, *Archives of Oral Biology*, vol.56, pp.1-15.

Saddi, K.R., Alves, G.D., Paulino, T.P., Ciancaglini, P., Alves, J.B., 2008, “Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats”, *Angle Orthodontics*, vol.78, pp.604-09.

Szpalski, C., Barr, B.A.J., Wetterau, M., Saadeh, P.B., Warren, S.M., 2010, “Cranial bone defects: current and future strategies”, *Neurosurgical Focus*, vol.29, n.6:E8.

Zhou, M., Peng, X., Mao, C., Xu, F., Hu, M., Yu, G.Y., 2010, “Primate mandibular reconstruction with prefabricated, vascularized tissue-engineered bone flaps and recombinant human bone morphogenetic protein-2 implanted in situ”, *Biomaterials*, vol.31, pp.4935-43.

7. DIREITOS AUTORAIS

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo do material impresso incluído no seu trabalho.

DEVELOPMENT OF A SURGICAL TABLE FOR GENERAL AND ODONTOLOGICAL SURGERIES IN SMALL ANIMALS

Luiz Bertoldo Costa Filho, luizbcfilho@ibest.com.br¹

Gerluza Aparecida Borges Silva, gerluza@terra.com.br²

Fernando Antonio Mauad Abreu, fmauadabreu@yahoo.com.br²

Matheus Henrique Santos Assis, matheushenriquesantos@hotmail.com³

Igor Daniel Garcia Reis, igorbiomedicina@hotmail.com²

Antônio Eustáquio de Melo Pertence, pertence@demec.ufmg.br⁴

Peterson Antônio Dutra, peteresonperio@gmail.com¹

¹Program of Master Degree in Implantology, PUCMG. Av. Dom José Gaspar, 500, 30535-610. BH, MG, Brazil

²Laboratory of Oral and Development Biology, Department of Morphology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil

³José do Rosário Vellano University, Unifenas, Rua Boaventura, 50, 31270-020, BH, MG, Brazil

⁴Laboratory of Machine Design, Department of Mechanical Engineering, University of Minas Gerais, Belo Horizonte Av. Antônio Carlos, 6627, 31 270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract: Research to looking for bone repair accelerate in Odontology have been considerably valorized. The bone tissue is fundamental to re-establishing of masticatory function of the patients, with prosthesis backing or implants. The vast majority of studies utilize intrabuccal bone defects developed in dogs or primates, which are adequate by facility of intraoral surgical access. But, the use of these animals is difficult by ethics questions, costs and necessity of specific vivarium. Intrabuccal surgeries in small animals as mice, rats and rabbits, are limited by little opening of maxillary; difficult on visualization of surgical field and limited space for irrigate and aspirate systems, fundamental items to utilization of dentistry motors. Moreover, the necessity of protection of tongue, lips, cheeks, require auxiliary hands, to making the visual field even more limited. This study shows the development of the surgical table with specific resources for intraoral proceeding in small animals, improving its realization on safe form, standardized and in minor time, eliminating the need for assistant operator. The model presents a platform removable and sterilized, with possibility of heating; height regulation and different inclinations by means of screw adjustable feet, mechanism atraumatic to fixation of the animals; intelligent support for surgical instruments, dental tool and/or intraoral retractors, allowing several rotation, height positions and different angulations. Odontology researches and mechanics engineering professionals contributed for the development of the project, with the financial support of Fapemig. The deposition of the patent request on National Institute of Industrial propriety was accomplished by Technological Transfer and Innovation, CTIT/UFMG, under nº 014110002397. The equipment represents a methodological advance and opens perspectives for numerous studies in the oral cavity or outside, in animal models of low cost and easy availability

Keywords: Bioengineering; Surgical Table; Small Animals; Bone Defect; Odontology