

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMPLANTODONTIA

IVAN CONTRERAS MOLINA

**Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com
diferentes tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos
Dissertação de Mestrado**

Florianópolis, SC
2011

IVAN CONTRERAS MOLINA

**Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com diferentes
tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos
Florianópolis, dezembro de 2011.**

Prof. Dr. Cesar Augusto Margalhães Benfatti
Orientador

IVAN CONTRERAS MOLINA

Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com diferentes tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 13 de dezembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini – Coordenador do Curso

Prof. Dr. Cesar Augusto Margalhães Benfatti – Orientador

Prof. Dr. Ricardo Hochheim Neto

IVAN CONTRERAS MOLINA

Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com diferentes tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Margalhães Benfatti

Florianópolis, SC
Dezembro de 2011

DEDICATÓRIA

DEUS PAI, obrigado pela infinita bondade para com seu filho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS**. Somente com **Fé** chegamos aos nossos objetivos. Sem **Ele**, minha vida não faz sentido.

À **Alma**, minha mãe, sempre disposta a me ajudar e escutar nas horas mais difíceis. Muito obrigado por todo o amor que você me deu.

Ao meu irmão, amigo, colega e, por muitas vezes, pai, **Gildardo**.

Ao meu pai, **Gildardo**, por me colocar no caminho certo, sendo um exemplo de vida.

À **Miryam**, minha irmã: você esteve presente em todos os momentos, sempre incentivando e demonstrando todo o seu carinho.

Aos meus avós **Manuel** e **Lolita**, exemplos de longevidade e felicidade, muito obrigado por tudo.

Ao **Jorge**, meu cunhado, um verdadeiro parceiro. Muito obrigado por todas as conversas e por tudo o que passamos juntos.

Aos meus **amigos e familiares** do **México**, pelo aprendizado constante, simplesmente por me deixarem estar perto das suas vidas. *Gracias TOTALES.*

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, por ter-nos proporcionado a oportunidade de aprendizado, oferecendo estrutura física e corpo docente qualificado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia, Prótese, Dentística, meu agradecimento pela experiência acadêmica e científica.

Ao **CNPQ** e à **CAPES**, pelo apoio para a realização dos cursos de Pós-Graduação no Brasil e, em especial, pelo auxílio ao nosso Programa.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, pela confiança depositada em meu trabalho e pela oportunidade que me deu de realizar esta Pós-Graduação.

Ao **Prof. César Benfatti**. Dou graças a Deus por colocá-lo – a pessoa certa! – no meu caminho. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grato a você pelo desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Águedo Aragonês**, pelo apoio incondicional neste trabalho e no Mestrado.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, por formar o meu senso crítico e pelos ensinamentos em Prótese e Oclusão. Obrigado só por ouvir-me durante a caminhada desta Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, por todos os ensinamentos em Periodontia/Implantodontia e pelos conselhos dados nestes anos.

À **Profª Drª Cláudia Volpato**, por todos os conselhos, sempre pertinentes. Sua vontade, entusiasmo, dedicação e caráter são exemplares. Obrigado por compartilhar a paixão pela Odontologia.

Ao **Prof. Dr. Luiz Narciso Baratieri**, pela clareza e sabedoria que foram responsáveis pelas profundas mudanças na minha vida profissional.

Aos professores **Diego, Wilson, Gláucia e Ariadne**, pela confiança, amizade e ensinamentos, pelas orientações e oportunidades.

Aos meus amigos do mestrado: **Rafa, Clessius, Isis, Maria, Guenther, Zé e Melo**, pela amizade, dedicação, colaboração e pelos bons momentos compartilhados, que ficarão guardados para sempre no meu coração.

Aos amigos do doutorado: **Ernesto, João, Pamela, Newton e Armando**, pela amizade cultivada, por toda colaboração, pelos conselhos bem dados.

Aos estagiários **Haline, João, Fernanda e Roberta**, pelo auxílio, dedicação e amizade prestados ao longo do tempo.

Em especial, aos amigos **Caro Panama e Karla Nunes**, que me auxiliaram de maneira fundamental, com dedicação, paciência e carinho, durante todo o mestrado. Sem eles, teria sido impossível realizar esta etapa fundamental da minha formação.

Aos amigos **Carlo, Shizuma, Gustavo, Rafael e Diogo**, colegas de profissão: sinceridade e amizade são eternos.

Às funcionárias do CEPID: **Gisela e Mirian**, responsáveis pelo perfeito funcionamento dessa instituição, pela competência e atendimento a tantos pedidos de ajuda.

À funcionária do Centro Cirúrgico Odontológico, a inesquecível **Nilséia Arruda**, pela dedicação e amizade.

Aos **pacientes**, que contribuíram para a minha formação, pela confiança em mim depositada, pela paciência e pelo carinho durante a realização dos trabalhos.

**É UMA MENTIRA DIZER QUE ESTE MUNDO NÃO SE MOVE COM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA, MAS TAMBÉM É MENTIRA PENSAR QUE,
COM ELAS, ENCONTRAREMOS FELICIDADE.**

MOLINA, I. C. "Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com diferentes tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos". 2011. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste estudo foi testar a influência de diferentes arcabouços: dois substitutos ósseos bovinos, Orthogen (Baumer) e Bio-Oss® Gentlish, dois polímeros compósitos, PLGA (Boehringer Ingelheim) e PLGA + HA (HA Genius-Baumer), osso autógeno e coágulo, relacionando-os à presença de neoformação óssea.

Materiais e métodos: foram criados 6 defeitos considerados semicríticos, de 5 mm de diâmetro, em 21 coelhos da raça Nova Zelândia. Cada animal recebeu 6 enxertos, sendo implantados 3 no fêmur direito e 3 no fêmur esquerdo. Os coelhos sofreram eutanásia em 3 etapas: aos 15, aos 30 e aos 60 dias após a cirurgia. As amostras retiradas foram fixadas e radiografadas com utilização da técnica do paralelismo para análise de radiodensidade e radiopacidade no programa imagem J, depois processadas para realização de microscopia de fluorescência. As análises das microscopia confocal de fluorescência foram realizadas com o auxílio do programa Axion Vision Real 4.8 (Zeiss) para observação da formação óssea. Os resultados obtidos pela metodologia empregada indicaram que os enxertos empregados visando a regeneração óssea apresentaram capacidade efetiva de formação óssea.

Conclusão: todos os substitutos ósseos foram capazes de promover a formação óssea. Os grupos coágulo, autógeno, PLGA, PLGA+HA, gerou menos osso novo em comparação com os grupos Bio-Oss e Orthogen, embora as diferenças na área de formação ossea não foram significativas.

Palavras-chave: Enxertos ósseos, fêmur de coelho, defeitos semicríticos, substitutos ósseos.

SUMÁRIO

Capítulo I	21
.1 <i>Introdução</i>	21
.2 <i>Abstract</i>	23
Capítulo II.....	25
.1 <i>Artigo: Análise da formação óssea em defeitos preenchidos com diferentes tipos de substitutos ósseos: estudo em coelhos</i>	25
.2 <i>Artículo: Analisis de la formación ósea en defectos rellenados con diferentes tipos de substitutos óseos: estudio en conejos.</i>	42
Capítulo III	59
.1 <i>Bibliografia consultada</i>	59
Capítulo IV	65
.1 <i>Metodologia expandida</i>	65
.2 <i>Análise em microscópio de fluorescência</i>	68
.3 <i>Análise radiográfica</i>	65

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O processo alveolar sofre grande reabsorção óssea após a extração de dentes. Esta perda parece ser mais acentuada durante a fase inicial de reparo, porém continua ao longo do tempo¹. Altura e espessura ósseas inadequadas podem comprometer a reabilitação de pacientes com próteses sobre implantes. Diferentes técnicas e materiais têm sido descritos na literatura como alternativas para compensar essa perda óssea, como enxertos ósseos horizontais, verticais, levantamento do seio maxilar, enxertos interposicionais e distração osteogênica, Regeneração óssea guiada, todas elas apresentando vantagens e desvantagens que devem ser cuidadosamente avaliadas antes do procedimento cirúrgico².

O sucesso dessas técnicas em geral se mede pela manutenção da vascularização da área receptora para incorporação e remodelação dos enxertos³. O enxerto de osso autógeno de áreas doadoras intra ou extraorais é utilizado para a regeneração de tecidos ósseos e é considerado como "padrão ouro"⁴ do tratamento. O reparo do enxerto autógeno envolve os processos de osteocondução, com a manutenção do arcabouço físico das partículas que facilitam a agiogênese e a penetração das células; de osteoindução, quando proteínas liberadas têm a capacidade de estimular osteoblastos e pré-osteoblastos para formar o novo osso; e de osteogênese, provendo células osteoprogenitoras viáveis. Vários aspectos do processo de reparo dos enxertos são similares ao reparo de fraturas⁵. Entretanto, o enxerto autógeno exige uma segunda área cirúrgica, prolongando o tempo do procedimento e aumentando a morbidade e o risco de complicações pós-operatórias⁶. A exigência de uma área doadora para essa reconstrução ainda permanece como um desafio, pois embora o uso de enxerto ósseo autógeno seja o padrão ouro para esses procedimentos, as dificuldades relacionadas à quantidade limitada de material ósseo autógeno disponível nas áreas doadoras intra e extraorais, e as frequentes morbidades e complicações locais⁷ nessas áreas, constituem obstáculos consideráveis. De uma maneira geral, o enxerto autógeno é o material ideal de preenchimento de defeitos ósseos, visto o potencial osteogênico que a técnica apresenta. No entanto, nem sempre a utilização desse material é viável. Para a

coleta de osso autógeno há a necessidade de procedimentos cirúrgicos com variados graus de morbidade. Como o material precisa ser coletado do osso ilíaco, da tíbia, do ramo ascendente da mandíbula, da calota ou do mento, muitas vezes faz-se inevitável a anestesia geral⁸ do paciente.

Tal fato tem fomentado pesquisas baseadas no desenvolvimento de biomateriais, fatores de crescimento e novas soluções alternativas ao osso autógeno utilizando substitutos ósseos e/ou membranas^{9, 10}. A possibilidade de recuperação de defeitos ósseos há muito tempo desperta o interesse dos pesquisadores no sentido do desenvolvimento de materiais que possam apresentar características biológicas aceitáveis para serem usados como substitutos dos tecidos ósseos. A regeneração ou reparação de um tecido requer a presença de um arcabouço capaz de trocar sinais químicos e bioquímicos com o meio ambiente fisiológico a fim de estimular a atividade das células progenitoras visando uma diferenciação seletiva¹¹.

O comportamento ideal dos materiais de enxerto é que eles permitam sua reabsorção e completa remodelação para a constituição do novo osso. Entretanto, a taxa de reabsorção varia de um material para outro, o que pode comprometer sua utilização, principalmente em áreas com repercussões estéticas. A reabsorção relativamente rápida dos enxertos ósseos autógenos tem levado à procura de substitutos ósseos mais estáveis ao longo do tempo⁵. No entanto, nenhum dos biomateriais disponíveis comercialmente combina todas as características definidas como ideais para os materiais de enxerto⁴.

Ainda que o osso tenha uma boa capacidade de cicatrização em comparação com outros tecidos, o seu potencial de regeneração é limitado¹². Em tais casos, o uso em enxertos ósseos de derivados ou substitutos ósseos é indicado para promover a cicatrização e regeneração^{13, 14, 15}. As alternativas para o uso de enxertos ósseos autólogos são biomateriais xenógenos, alógenos e aloplásticos^{16, 17}. Estes últimos são particularmente interessantes porque evitam complicações potencialmente infecciosas relacionadas aos materiais derivados de fontes biológicas^{18, 19}. Tais materiais incluem compostos cerâmicos e polímeros^{20, 21}. Recentemente, os materiais poliméricos têm recebido atenção dos pesquisadores e dos cirurgiões devido à sua biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e fácil manuseio^{22, 23}. Além disso, têm apresentado muitas características bioabsorvíveis, compatíveis com aplicações cirúrgicas, permitindo a regeneração óssea e evitando novas intervenções para eliminar resíduos²⁴. Os polímeros

biodegradáveis mais usados para essas aplicações são poliésteres derivados do ácido láctico, glicólico e de monômeros de caprolactona. Sua degradação nos tecidos biológicos depende da sua formulação ou coformulação, dos seus isômeros, das características cristalinas, do peso molecular e da massa, podendo estender-se por dias ou até anos. O processo de degradação constitui-se de pequenas emissões de oligômeros solúveis na forma de subprodutos, que geralmente são eliminados pelo ciclo de Krebs²⁵.

Esses biomateriais são fabricados de diferentes maneiras a fim de produzir dispositivos para as cirurgias ósseas, tais como dispositivos de fixação^{26, 27}, barreiras para conter ou excluir tecidos^{28, 29}, enxertos sólidos porosos³⁰, sólidos ou semissólidos para administrar fatores de crescimento, proteínas ósseas morfogenéticas ou adesão de proteínas^{31, 32}.

Adicionalmente, eles também podem servir como arcabouços, com o objetivo de substituir a matriz extracelular, promovendo a adesão celular e a diferenciação e deposição da matriz óssea, para depois desaparecerem gradualmente, sendo substituídos pela regeneração dos tecidos. Para estes efeitos, a arquitetura e a porosidade dos arcabouços são fundamentais para prover uma regeneração bem-sucedida.

2 ABSTRACT

The repair of bone defects in surgery remains an important source of clinical problems. Although autologous bone has been the historical pattern for these procedures as a source of material for reconstruction, it has significant limitations. In particular, the donor site morbidity, including pain, loss of function and local lesions in the harvesting process, limits the supply of bone. The use of allografts would also result in significant problems, including disease transmission, rejection by the host and the lack of osteoinductive properties¹. In an effort to solve these problems, the search for an ideal material has led to the development of several reconstructive options for bone engineering. Such materials include synthetic bone substitutes, or bone morphogenic proteins xenogeno and allogeneous^{2,3}, and more recently, calcium phosphate⁴. The development of synthetic resorbable scaffolds for inorganic or polymeric^{5,6} compositions as carriers of progenitor cells of various tissues has facilitated the movement toward this ideal

material^{7,8}. Although several strategies based on engineering of bone cells have been widely studied⁹, other studies also illustrated several issues that still need to be addressed in designing the ideal framework. For example, some calcium phosphate scaffolds have a limited capacity to degrade *in vivo*¹⁰, while other degrade rapidly in the presence of explanted bone. In addition, some both inorganic¹¹ and organic¹² frameworks have been used although geometries prevent the penetration of bone cells and other tissues. However, biodegradable scaffolds were presented inorganic and organic allowing tissue invasion, resulting in bony union criticism, free from faults or defects between the restoration and function after implantation of autologous cells. Such strategies for engineering scaffolds are based on bone from a practical standpoint, therapeutic, as a function of autologous cells and degradable scaffolds.

Thus, although previous work demonstrating the feasibility of how to approach various aspects of the problem, a comprehensive strategy still needs to be properly established, a clinically applicable and reproducible. The current limitations of these approaches are related to the architecture and composition of the implanted scaffold, which should allow a three-dimensional distribution of cells *in vitro*, thereby accelerating bone healing *in vivo*¹⁴. Despite these developments, the ideal substitute for autologous bone is not yet available. The purpose of this study was to evaluate the quality of bone formation and repair of bone substitutes tested from defects induced in experimental rabbit femur. The hypothesis of this study was the best bone formation would occur with the bone substitute in the negative group compared to clot.

CAPÍTULO II

1 ARTIGO: ANÁLISE DA FORMAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS PREENCHIDOS COM DIFERENTES TIPOS DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS: ESTUDO EM COELHOS

Este artigo está formatado de acordo com as normas da revista!!!

Ivan Contreras Molina *
Ricardo Hochheim Neto †
Ricardo de Souza Magini ‡
Cesar Augusto Margalhães Benfatti ||

* Especialista em Odontologia Restauradora pelo CEO, Mestrando em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

† Mestre e Doutor em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Professor Titular da FURB – Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

‡ Mestre e Doutor em Periodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo, Brasil, Professor Adjunto da UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

|| Mestre e Doutor em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Professor Convidado da UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Endereço para correspondência:

* Ivan Contreras Molina

Rua João Pio Duarte Silva 250, bloco 4, apartamento 104

Córrego Grande

88037-000, Florianópolis, SC

Brasil

Fone: +55.48.9648.5759

Endereço eletrônico: dr.ivancontreras@gmail.com.

Resumo

Objetivo: o objetivo deste estudo foi testar a influência dos arcabouços na neoformação óssea em defeitos de coelhos. **Materiais e métodos:** foram criados 6 defeitos considerados semicríticos, de 5 mm de diâmetro, em 21 coelhos da raça Nova Zelândia. Cada animal recebeu 6 enxertos, aplicados 3 no fêmur direito e 3 no fêmur esquerdo. Os coelhos sofreram eutanásia em 3 etapas: aos 15, aos 30 e aos 60 dias após a cirurgia. As amostras retiradas foram fixadas e radiografadas com utilização da técnica do paralelismo para análise de densidade, depois processadas por microscopia óptica. A análise com microscopia de fluorescência foi realizada em computador com o programa Axion Vision Real 4.8 (Zeiss) para observação da neoformação óssea. **Resultados:** se obtiveram pela metodologia empregada que os enxertos empregados visando a regeneração óssea apresentaram capacidade efetiva de formação óssea. **Conclusão:** todos os substitutos ósseos foram capazes de promover a formação óssea. Os grupos cóagulo, autógeno, PLGA, PLGA+HA, gerou menos osso novo em comparação com os grupos Bio-Oss e Orthogen, embora as diferenças na área de formação ossea não foram significativas.

Palavras-chave: Enxertos ósseos, defeitos críticos, substitutos ósseos, neoformação óssea.

INTRODUÇÃO

A reparação de defeitos ósseos na cirurgia continua a representar uma fonte importante de problemas clínicos. Embora o osso autógeno tenha sido o padrão histórico para esses procedimentos como fonte de material de reconstrução, ele apresenta limitações significativas. Em particular, a morbidade do sítio doador, incluindo dor, perda da função e lesões locais no processo de colheita, limita a oferta de osso. O uso de aloenxertos também implica em problemas significativos, incluindo a transmissão de doenças, a rejeição pelo hospedeiro e a falta de propriedades osteoindutoras¹. Em um esforço para resolver estes problemas, a busca de um material ideal tem levado ao desenvolvimento de várias opções reconstrutivas para a engenharia óssea. Estes materiais incluem substitutos ósseos sintéticos, proteínas morfogenéticas ou osso

xenogeno e alogeno^{2, 3} e, mais recentemente, fosfato de cálcio⁴. O desenvolvimento de arcabouços sintéticos reabsorvíveis de composições inorgânicas ou poliméricas^{5, 6} como portadores de células progenitoras de vários tecidos tem facilitado o movimento em direção a esse material ideal^{7, 8}. Embora várias estratégias baseadas em engenharia de células de tecido ósseo tivessem sido amplamente analisadas⁹, outros estudos também ilustraram várias questões que ainda precisam ser abordadas no projeto do arcabouço ideal. Por exemplo, alguns arcabouços de fosfato de cálcio apresentam uma capacidade limitada para se degradarem *in vivo*¹⁰, enquanto outros degradam-se rapidamente na presença de medula explantada. Além disso, alguns arcabouços tanto inorgânicos¹¹ como orgânicos¹² têm sido utilizados embora suas geometrias impeçam a penetração das células ósseas e de outros tecidos. No entanto, foram apresentados arcabouços biodegradáveis inorgânicos e orgânicos que permitiam a invasão de tecidos¹³, resultando em uniões ósseas críticas, isentas de falhas ou defeitos entre a restauração e a função após a implantação de células autólogas. Tais estratégias para a engenharia óssea baseadas em arcabouços devem partir de um ponto de vista prático, terapêutico, como função de células autólogas e arcabouços degradáveis. Assim, embora trabalhos anteriores demonstrem a viabilidade de vários aspectos como abordagem do problema, uma estratégia completa ainda precisa ser devidamente estabelecida, de forma clinicamente aplicável e reproduzível. As atuais limitações dessas abordagens estão relacionadas à arquitetura e à composição do arcabouço implantado, o qual deverá permitir uma distribuição tridimensional de células *in vitro*, acelerando assim a cicatrização óssea *in vivo*¹⁴.

Apesar desses desenvolvimentos, o substituto ideal para o osso autólogo ainda não está disponível. O propósito deste estudo foi avaliar a formação óssea e a qualidade da reparação óssea dos substitutos testados a partir de defeitos experimentais induzidos em fêmur de coelho. A hipótese principal deste estudo foi que a melhor formação óssea ocorreria com os substitutos ósseos em comparação com o grupo negativo coágulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte e um coelhos machos, da linhagem Nova Zelândia, com um ano de idade, pesando de 4 kg, foram usados nesta pesquisa. Neles,

foram provocados 6 defeitos considerados semicríticos, de 5 mm de diâmetro, nos fêmures direito e esquerdo (3 defeitos em cada fêmur). Os coelhos foram subdivididos em 6 grupos:

- Grupo I: preenchido com coágulo (grupo controle);
- Grupo II: enxerto autógeno (retirado durante o preparo dos sítios dos defeitos e triturado);
- Grupo III: enxerto xenógeno Orthogen (Baumer);
- Grupo IV: enxerto xenógeno (Bio-Oss®);
- Grupo V: enxerto sintético PLGA;
- Grupo VI: enxerto PLGA + HA.

Os seis grupos foram comparados em 3 períodos: "A" (15 dias), "B" (30 dias) e "C" (60 dias de pós-operatório).

PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os coelhos foram anestesiados, realizou-se uma incisão na pele, tecido subcutâneo, elevando o periósteeo até o osso, para a criação dos três defeitos semicríticos de 5 mm em cada fêmur, totalizando 6 defeitos por coelho. Esses defeitos foram preenchidos com os enxertos mencionados, incluindo o grupo coágulo, conforme descrito anteriormente, e casualizados (Fig. 1 e 2). Após o procedimento, o periósteeo foi fechado com sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon) e a pele, com sutura não reabsorvível (Nylon Ethicon). Concluídos os procedimentos operatórios, os coelhos foram mantidos em caixas e medicados sob protocolos de antibioticoterapia e alívio da sintomatologia dolorosa, com analgésico e anti-inflamatório por via intramuscular ao longo de três dias. Também lhes foi ministrado antibiótico durante sete dias, por via intramuscular. Os animais receberam tetraciclina, na proporção de 25 mg/kg, intramuscular, nos primeiros 15 dias, como marcador ósseo.

Os coelhos foram eutanaziados nos períodos predeterminados: "A" (15 dias), "B" (30 dias) e "C" (60 dias de pós-operatório). Após o sacrifício, os fêmures foram isolados, fixados em formol a 10% por 5 dias e, 72 horas depois, as peças foram cortadas, radiografadas, desidratadas e descalcificadas com EDTA 10% (Merk^R). Após a descalcificação, as peças ósseas foram desidratadas e incluídas em parafina. A seguir, foram microtomizadas em espessura de 0,5 micrômetros, obtendo-se cortes semisseriados das peças a cada 1 mm em micrótomo Microm (Zeiss, Alemanha).

ANÁLISE EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

Para a avaliação da área de formação óssea deste estudo, utilizaram-se um microscópio de fluorescência confocal de varredura a laser (LEICA TCS-SPE, Mannheim, Alemanha) e um microscópio de luz (Zeiss Axioskop II, Alemanha) acoplado a um programa de análise digitalizada (KS 300 Imaging System *release 3.0 – copyright 1997 by Carl Vision GmbH, Alemanha*). Tetraciclina foi o marcador ósseo utilizado, observado sob microscopia de fluorescência. A tinção correspondente ao marcador foi a cor verde. Obtiveram-se 3 lâminas de cada tempo por grupo, num total de 152 lâminas para leitura. Uma vez selecionada a área, a região foi fotografada com uma câmera digital acoplada ao microscópio. As fotografias das lâminas foram então analisadas no programa Professional Imaging for Microscopy, Axion Vision Real 4.8 (Zeiss, Alemanha) por um único examinador "cego" e devidamente calibrado. As medidas foram obtidas em um círculo no centro da lâmina. A área foi padronizada pelo mesmo programa em 150.000 *pixels*, correspondendo à área de formação óssea da lâmina, de onde se obtiveram os valores de densitometria verde. Foram analisadas 3 lâminas por grupo, nos três períodos de 15 dias, 30 dias e 60 dias de pós-operatório.

ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os coelhos foram submetidos a radiografias dos fêmures osteotomizados em série padronizada imediatamente após a cirurgia e aos 15, 30 e 60 dias. Os fêmures foram radiografados com a utilização de dispositivo posicionador do paralelismo para radiologia (RIM). Todas as radiografias tiveram tamanho padronizado. Para quantificar as informações de taxa de formação de osso disponíveis nestas séries radiográficas e para eliminar a variação da radiodensidade entre as radiografias, medir a quantidade óssea com base na área radiopaca e a radiodensidade dentro do defeito, foi utilizado o *software ImageJ 1.31 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA)*. Obtidas 42 radiografias dos 6 grupos nos 3 períodos de tempo, as imagens foram digitalizadas e padronizadas em cor cinza, em uma escala de 8 *bits* a 70 *kbits* visando uma melhor definição de cor. Prevendo uma possível alteração de cor, foram definidas uma cor cinza máxima e uma mínima. A área de análise de partícula foi a mesma para todos os testes, de 0,165

megapixels. Para chegar ao resultado apurado, foi calculada a média das medições após análise por observadores independentes.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram digitalizados e organizados para comparação entre os grupos. A análise dos resultados foi feita com o teste Tukey e realizada através do *software* ESTATISTICA 6.0 para ambos estudos, tanto para a microscopia de fluorescência quanto para a análise radiográfica.

RESULTADOS

ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Este trabalho analisou a reparação óssea dos defeitos criados e preenchidos com biomateriais: um total de 126 defeitos com diâmetros de 5 mm. A análise radiográfica avaliou a área radiopaca e a radiodensidade com o *software* citado e não encontrou diferença estatística significativa entre os grupos testados referentes aos períodos de 15 e 60 dias (Fig. 3 e 4); com relação à densidade óptica, observou-se maior radiopacidade no grupo Bio-Oss. Já no grupo de 30 dias (Fig. 5) verificou-se diferença significativa entre os grupos coágulo e PLGA + HA, com $P < 0,005$, mostrando uma radiodensidade óptica maior PLGA + HA e tendo uma menor formação óssea o grupo Coágulo (Fig. 6).

ANÁLISE COM MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

Aos 15 dias de pós-operatório constatou-se uma formação maior de osso no grupo Bio-Oss, no grupo coágulo, no grupo PLGA e no grupo PLGA + HA (Fig. 7). Aos 30 dias também houve diferença no comportamento dos grupos, apresentado maior formação óssea o grupo Bio-Oss do que o grupo Orthogen, autógeno, PLGA + HA. O grupo Coágulo mostrou maior formação do que o grupo PLGA + HA, o grupo PLGA, o grupo autógeno e o grupo Orthogen (Fig. 8). Aos 60 dias (Fig. 9 e 10) igualmente verificaram-se diferenças entre os grupos de amostras, com maior formação óssea no grupo Bio-Oss do que no grupo Orthogen, o grupo autógeno, o grupo PLGA + HA. O grupo autógeno

do que no grupo PLGA e no grupo PLGA do que no grupo PLGA + HA (Fig. 11).

A área de formação óssea no grupo coágulo teve aumento gradativo nos três períodos, sendo inferior ao enxerto autólogo (padrão ouro). No enxerto xenólogo Orthogen verifica-se quantidade moderada aos 15 e 30 dias, sofrendo pequena diminuição (reabsorção) aos 60 dias. No enxerto xenólogo Bio-Oss® a maior quantidade ocorre aos 15 dias, reabsorvendo leve e lentamente aos 30 dias e aumentando aos 60 dias. Já o polímero composto de PLGA está presente aos 15 dias, sofrendo leve e gradativa reabsorção nos períodos seguintes. O grupo PLGA + HA não apresenta diferença significativa em todos os períodos, o que é confirmado por estudos que mostram a presença de HA até 44 meses após sua instalação.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados, nos períodos de 15, 30 e 60 dias de pós-operatório, substitutos ósseos enxertados em 6 defeitos criados em fêmures de coelhos. Uma das principais verificações deste estudo foi que a presença de biomateriais, independentemente das propriedades, associou-se à formação de osso em toda a área.

A matriz mineral bovina é dos materiais mais utilizados, pois permite a formação de osso novo, sendo assim osteocondutiva. A microscopia eletrônica mostra a formação de osso em contato direto com a superfície dos biomateriais, sem que tecidos moles intervenham diretamente. Esta observação está de acordo com resultados encontrados anteriormente na literatura de diferentes biomateriais a partir de descobertas em cães¹⁵ e seres humanos^{16, 17, 18, 19}.

Um grupo de pesquisadores americanos realizou, em 2004²⁰, um trabalho com o plasma rico em plaquetas (PRP) conjuntamente com enxertos alógenos e xenólogos em cirurgias reconstrutivas para implantes. O estudo compara a formação e a cicatrização óssea em defeitos em calvária de coelhos com osso autólogo, xenólogo com PRP. Um grupo sem enxerto serviu como controle. Radiografias mostram um crescimento em densidade óssea do Bio-Oss, osso autólogo e Bio-Oss + PRP maior do que o defeito controle em todos os tempos de avaliação; porém, clinicamente é difícil determinar pelas radiografias o quanto esses materiais se apresentam densos. Comparando esses resultados com

este estudo, os enxertos apresentam resultados similares na formação de novo osso, mas é difícil uma interpretação radiográfica precisa.

Guerra *et al.*²¹, 2010, avaliam a osseointegração de implantes colocados em áreas com criação de defeitos ósseos usando três técnicas de regeneração óssea. Os implantes foram instalados e os defeitos foram preenchidos com diferentes biomateriais, animais sacrificados a 4 e 8 semanas. No presente estudo, em todos os grupos houve um aumento progressivo no volume de osso novo ao longo do tempo. O experimento demonstrou que a associação da membrana de colágeno reabsorvível com biomateriais ajuda na regeneração óssea avançada, com uma grande parcela do osso regenerado em contato com a superfície do implante. Este estudo mostrou, igualmente, que a regeneração de defeitos com biomateriais é um método previsível.

Megan E. *et al.*²², 2007, utilizaram um modelo de rato criando defeitos de 8 mm para avaliar quantitativamente a capacidade do ácido Poly(L-lactide-co-D,L-lactide) como arcabouço, com ou sem fatores de crescimento, para promover a cura do osso. Análises micro-CT sequenciais mostraram que o crescimento ósseo aumentou significativamente entre 4 e 16 semanas para os defeitos, com ou sem fatores de crescimento. A avaliação histológica indicou que o primeiro osso formado ocorreu na periferia dos arcabouços, seguido por mais deposição mineral limitada no interior do arcabouço, sugerindo que as células que participam na resposta da cura provêm principalmente do periósteo. Este estudo apresenta um modelo de defeito segmentar desafiador que facilita a avaliação quantitativa das estratégias para reparar defeitos ósseos críticos. Cada região do defeito foi melhorada através da implantação estrutural dos arcabouços em combinação com fatores de crescimento. Resultado compatível com os resultados desta pesquisa, mostrando que os arcabouços proveem sinais osteoindutores para a formação do novo osso.

Kai-Olaf H.²³ colocou-se a seguinte pergunta: "É possível estimular a osteocondução e a osteogênese para melhorar a formação óssea em defeitos de tamanho crítico, a fim de evitar o enxerto ósseo?" O pesquisador criou defeitos de tamanho crítico, de 5 cm³, na mandíbula anterior de 16 miniporcões adultos. Os defeitos foram preenchidos com 60% de hidroxapatita e 40% cerâmica bifásica. Cinco semanas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e os defeitos analisados microscopicamente, histologicamente e radiograficamente. Os resultados apontaram maior taxa de formação de osso novo no grupo

dos biomateriais (73% do defeito anterior). A biomatriz foi degradada na mesma velocidade com que o osso novo foi estabelecido. No grupo controle, foi observada uma formação óssea de apenas 59%. Notou-se que a biodegradação do material cerâmico bifásico altamente poroso ocorreu em paralelo à formação do novo osso. Na análise radiográfica não foi encontrada diferença estatisticamente significante, resultado semelhante ao apurado por este estudo.

O modelo de coelho é um dos mais comumente utilizados para avaliar substitutos ósseos^{24, 25}. Lekovic V. e colaboradores criaram um defeito de 5 mm de diâmetro realizado no côndilo femoral dos coelhos para obtenção de um defeito de tamanho crítico para um osso longo. De acordo com um estudo prévio, a cura espontânea observou-se depois de 30 a 90 dias²⁶. Em contraste, os dados histomorfométricos demonstraram que o material experimental é capaz de promover a cicatrização óssea mesmo em um defeito ósseo grande como no fêmur do coelho. A maturação óssea melhorou de 30 a 90 dias com a reabsorção simultânea do material. Dados sobre o desenvolvimento da formação óssea mostraram que durante os 30 a 90 dias o material permite a remodelação óssea reticular em direção a uma estrutura trabecular. A partir da formação óssea observada no dia 30, que é caracterizada por trabéculas, a reparação do defeito deu-se em um prazo de 90 dias, evoluindo para uma caracterização semelhante à do osso normal. Este fenômeno é, provavelmente, reforçado pela composição e características da superfície dos materiais^{27, 28}.

Apesar da metodologia de pesquisa, das concentrações e da localização favorável pela nutrição, os enxertos apresentaram resultados similares aos deste trabalho, o que também sucede em relação a outras pesquisas que utilizaram metodologias distintas. Neste estudo, o grupo coágulo demonstrou aumento gradativo nos três períodos, sendo superior no enxerto autógeno (padrão ouro). Isto pode ser explicado pela anatomia óssea do coelho, já que sua tíbia apresenta tecido gorduroso na região central, o que faz com que o enxerto vá reabsorvendo à medida que se aproxima do centro do osso. O osso liofilizado xenógeno Orthogen pareceu ser um excelente material pelo aumento moderado nos primeiros 30 dias e aumento significativo aos 60 dias. No xenógeno Bio-Oss® obtivemos um crescimento inicial considerável, com aumento gradativo até os 60 dias. No grupo PLGA constatou-se pequeno crescimento ósseo aos 15 dias, aumentando consideravelmente aos 30 e 60 dias. Com referência ao grupo PLGA + HA, o crescimento ósseo foi

acentuado e equilibrado nos três períodos. Várias análises microscópicas, radiográficas ou estatísticas discutidas na literatura apresentaram resultados similares com relação à utilização dos mais variados biomateriais.

CONCLUSÃO

Todos os substitutos ósseos foram capazes de promover a formação óssea. Os grupos coágulo, autógeno, PLGA, PLGA+HA, gero menos osso novo em comparação com os grupos Bio-Oss e Orthogen, embora as diferenças na área de formação óssea não foram significativas.

REFERÊNCIAS

- 1.- ITO, T.; SAKANO, S.; SUGIURA, H. *et al.* "Sensitivity of osteoinductive activity of demineralized and defatted rat femur to temperature and duration of heating". *Clin Orthop* 1995;316:267–275.
- 2.- SALYER, K. E.; HALL, C. D. "Porous hydroxyapatite as an onlay bonegraft substitute for maxillofacial surgery". *Plast Reconstr Surg* 1995;84:236–244.
- 3.- WEINMANN, J. P.; SICHER, H. *Bone and Bones*. 2nd ed. St. Louis: CV Mosby Company, 1955.
- 4.- RIPAMONTI, U. "Smart biomaterials with intrinsic osteoinductivity: geometric control of bone differentiation". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:215–222.
- 5.- ATHANASIOU, K. A.; AGRAWAL, C. M. (eds). "Orthopedic polymeric biomaterials: applications of biodegradables". *Biomaterials* 2000;21(Suppl).
- 6.- DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000.
- 7.- MOONEY, D. J.; SANO, K.; KAUFMANN, P. M. *et al.* "Long term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges". *J Biomed Mater Res* 1997;37:413–420.
- 8.- KIM, W. S.; VACANTI, C. A.; UPTON, J. *et al.* "Bone defect repair with tissue-engineered cartilage". *Plast Reconstr Surg* 1994;94:580–584.

- 9.- NIKLASON, L. E. "Engineering of bone grafts". *Nature Biotech* 2000; 18:929–930.
- 10.- FLEMING, J. E., JR; CORNELL, C. N.; MUSCHLER, G. F. "Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering". *Orthop Clin North Am* 2000;31:357–374.
- 11.- KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P. "Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical sized segmental bone defect". *Tissue Eng* 1997;3:173–185.
- 12.- ISHAUG-RILEY, S. L.; CRANE, G. M.; GURLEK, A. *et al.* "Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery". *J Biomed Mater Res* 1997;36:1–8.
- 13.- BAKSH, D.; DAVIES, J. E. "Design strategies for 3-dimensional *in vitro* bone growth in tissue-engineering scaffolds". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:488–495.
- 14.- HOLY, C. E.; FIALKOV, J. A.; SHOICHET, M. S. *et al.* "In vivo models for bone tissue-engineering constructs". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:496–504.
- 15.- RICCI, J. L.; SPIVAK, J. M.; ALEXANDER, J.-J. "Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material. Physical-chemical properties and *in vivo* bone response". *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:969-978.
- 16.- VLASSIS, J. M.; HURZCLER, M. B.; QUINONES, G. R. "Sinus lift augmentation to facilitate placement of nonsubmerged implants: a clinical and histological report". *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1993;5(2):15-23.
- 17.- WHITTAKER, J. M.; JAMES, R. A.; LO/ADA |; CORDOVA, C.; GAREY, D. J. "Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental implant sites. Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eightmonth autopsy report". *J Oral Implantol* 1989; XV:141-144.
- 18.- JUDY, K. W. M. "Oral impiantology case reports". *N Y State Dent J* 1986;52(10):24-26.
- 19.- WAGNER, J. R. "A clinical and histological case study using resorbable hydroxylapatite for the repair of osseous defects prior to

- endosseous implant surgery". *J Oral ImpUmtol* 1989; XV: 186-192.
- 20.- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. "Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study". *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, Lombard, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan./Feb. 2004.
- 21.- GUERRA, I.; MORAIS BRANCO, F.; VASCONCELOS, M.; AFONSO, A.; FIGUEIRAL, H.; ZITA, R. "Evaluation of implant osseointegration with different regeneration techniques in the treatment of bone defects around implants: an experimental study in a rabbit model". *Clin Oral Implants Res.* 2011 Mar;22(3):314-22. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02002.x. Epub 2010 Sep 27.
- 22.- MEGAN E. OEST; KENNETH M. DUPONT; HYUN-JOON KONG; DAVID J. MOONEY; ROBERT E. GULDBERG "Quantitative Assessment of Scaffold and Growth Factor-Mediated Repair of Critically Sized Bone Defects" *Journal of Orthopaedic Research* July 2007.
- 23.- KAI-OLAF HENKEL1; THOMAS GERBER2; PETER DO" RFLING3; KARSTEN K. H. GUNDLACH1; VOLKER BIENENGRÄ" BER1 "Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts". *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2005) 33, 45–49.
- 24.- WHITTAKER, J. M.; JAMES, R. A.; LO/ADA |; CORDOVA, C.; GAREY, D. J. "Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental implant sites. Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eightmonth autopsy report". *J Oral Implantol* 1989; XV:141-144.
- 25.- MAYFIELD, L. J. A.; SKOGLUND, A.; HISIG, P.; LANG, N. P.; ATTSTROM, R. (2001) "Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study". *Clinical Oral Implants Research* 12: 508–514.
- 26.- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; KENNEY, E. (2002) "Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study". *Journal of Periodontology* 73: 198–205.

- 27.- MURAKANI, N.; SATIO, N.; TAKAHASHI, J.; OTA, H.; HORIUCHI, H.; NAWATA, H. *et al.* "Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaces prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier". *Biomaterials* 2003;24:2153-9.
- 28.- SAITO, N.; OKADA, T.; HORIOUCI, H.; OTA, H.; TAKAHASHI, J.; MURATAMI, N. *et al.* "Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers". *Bone* 2003;32:381-6.

LEGENDAS DOS GRÁFICOS E TABELAS (Parte 1)

Fig. 1: Defeitos preenchidos com Bio-Oss, PLGA e Orthogen de izquierda a derecha.

Fig. 2: Defeitos preenchidos com PLGA + HA, osso autógeno e coágulo de izquierda a derecha.

Fig. 3: Gráfico da análise da radiodensidade radiográfica, 15 dias.

Fig. 4: Gráfico da análise radiográfica mostrando a radiodensidade aos 60 dias.

Fig. 5: Radiografia, 30 dias ,grupo PLGA + HA, osso autógeno e coágulo.

Fig. 6: Gráfico da análise radiográfica, 30 dias.

Fig. 7: Gráfico da área de formação óssea, 15 dias.

Fig. 8: Gráfico da área de formação óssea, 30 dias.

Fig. 9: Imagem obtida com a microscopia de fluorescência, 60 dias, Bio-Oss, PLGA e Orthogen.

Fig. 10: Imagem obtida a Microscopia de fluorescência, 60 dias, PLGA + HA, osso autógeno e coágulo.

Fig. 11: Gráfico da área de formação óssea, 60 dias.

Fig. 1.

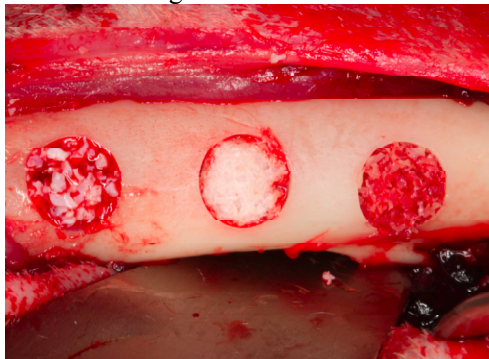


Fig. 2.



Fig. 3.

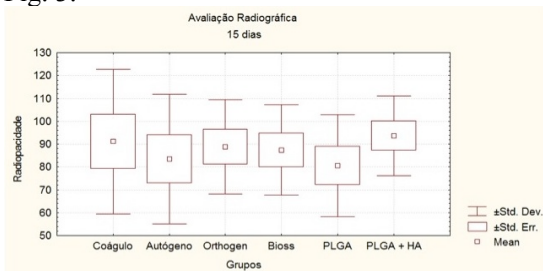


Fig. 4.

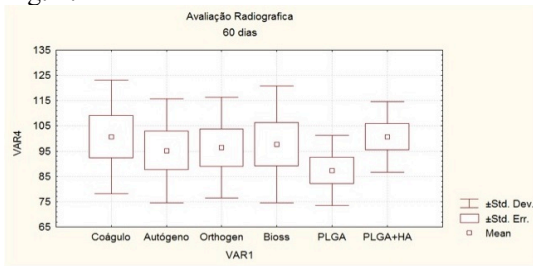


Fig. 5.

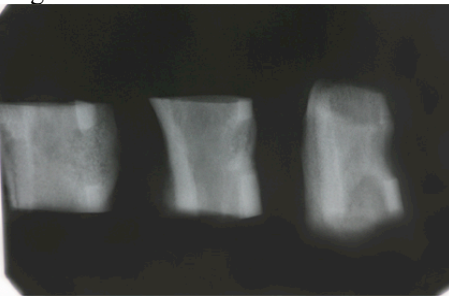


Fig. 6.

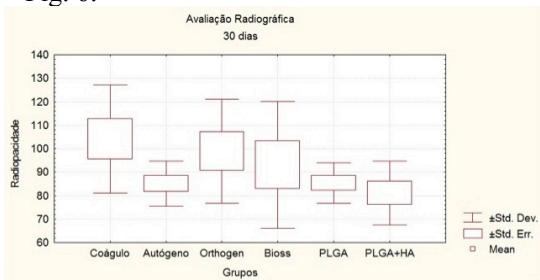


Fig. 7.

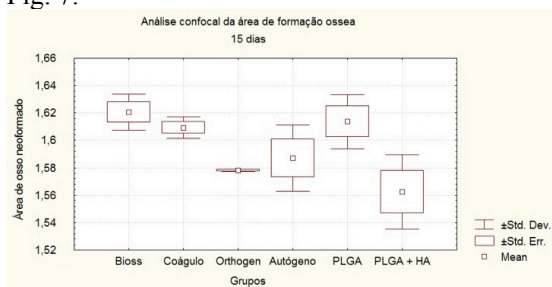


Fig. 8.

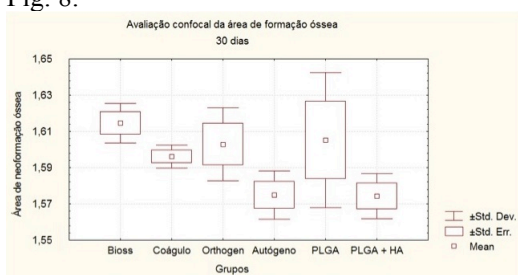


Fig. 9.

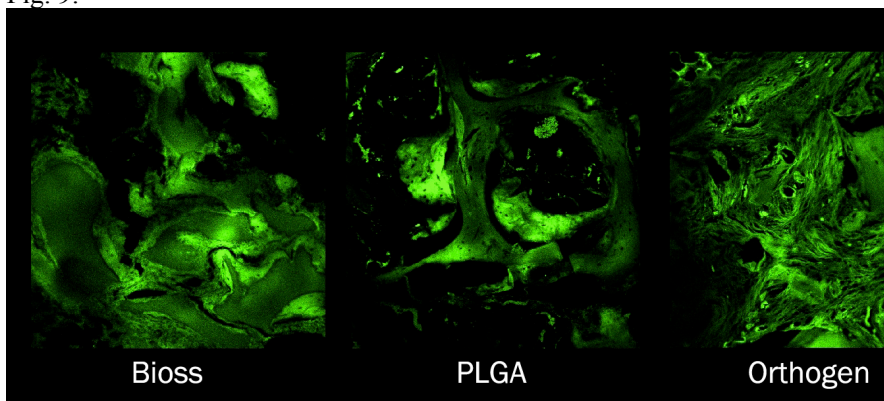


Fig. 10.

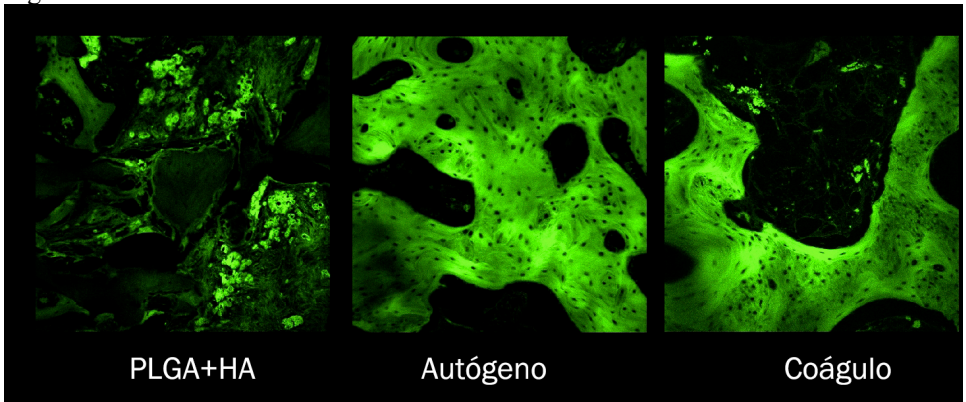
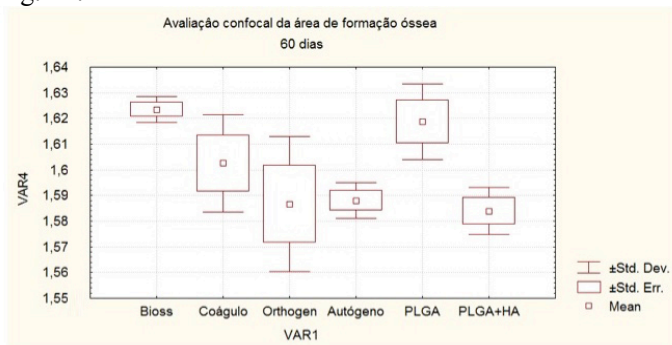


Fig. 11.



2 ARTICULO: ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN ÓSEA EN DEFECTOS
LLENADOS CON DIFERENTES TIPOS DE SUSTITUTOS ÓSEOS: ESTUDIO EN
CONEJOS

Este artículo está formateado de acuerdo con las normas de la revista Acta odontológica Venezolana.

Ivan Contreras Molina *
Ricardo Hochheim Neto †
Ricardo de Souza Magini ‡
Cesar Augusto Margalhães Benfatti ||

* Especialista en Odontología Restauradora por el CEO, Cursando la Maestría en Implantología, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

† Maestría y Doctorado en Implantología, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Profesor Titular da FURB – Universidad Regional de Blumenau, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

‡ Maestría y Doctorado en Periodoncia, Facultad de Odontología de Bauru, São Paulo, Brasil, Profesor Adjunto de la UFSC – Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

|| Maestría y Doctorado en Implantología, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Profesor Invitado de la UFSC – Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Dirección para correspondencia:

* Ivan Contreras Molina

Rua João Pio Duarte Silva 250, bloco 4, apartamento 104

Córrego Grande

88037-000, Florianópolis, SC

Brasil

Fone: +55.48.9648.5759

Endereço eletrônico: dr.ivancontreras@gmail.com.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue probar la influencia de los arcabocos en la neoformación ósea en defectos creados en conejos. **Materiales y Métodos:** fueron creados 6 defectos considerados semicríticos, de 5 mm de diámetro, en 21 conejos de raza Nova Zelandia. Cada animal recibió 6 injertos, aplicados 3 no fémur derecho y 3 en el fémur izquierdo. Los conejos sufrirán eutanasia en 3 etapas: a los 15, a los 30 y a los 60 días después de la cirugía. las Muestras fueron retiradas fijadas y radiografiadas con la utilización de la técnica de paralelismo para el análisis de radiopacidad y radiodensidad, después procesadas por microscopía óptica. El análisis con microscopía confocal de fluorescencia fue realizado en un computador con el programa Axion Vision Real 4.8 (Zeiss) para observación de la neoformación ósea. **Resultados:** se obtuvieron por la metodología utilizada que los injertos empleados indujeron la regeneración ósea presentaron capacidad efectiva de formación ósea. **Conclusión:** todos los substitutos óseos fueron capaces de promover la formación ósea. Los grupos coagulo, autógeno, PLGA, PLGA+HA, genero menos Hueso novo en comparación con los grupos Bio-Oss y Orthogen, aun las diferencias en el área de formación ósea no fueron significativas.

Palabras-Llave: Injertos óseos, defectos críticos, substitutos óseos, neoformación ósea.

INTRODUCCION

La reparación de defectos óseos en la cirugía continua representando una fuente importante de problemas clínicos. Aun el hueso autólogo tenga sido el Standard histórico para estos procedimientos como fuente de material de reconstrucción, el presenta limitaciones significativas. En particular, la morbilidad del sitio donador, incluido dolor, pérdida de la función y lesiones locales en el proceso de colecta, limitada oferta de hueso. El uso de aloenxertos también implica en problemas significativos, incluyendo la transmisión de enfermedades, el rechazo por el huésped e la falta de propiedades osteoinductoras¹. En un esfuerzo para resolver estos problemas, la búsqueda de un material ideal tiene llevado al desenvolvimiento de varias opciones

reconstructivas para la ingeniería ósea. Estos materiales incluyen sustitutos óseos sintéticos, proteínas morfogenéticas o hueso xenogeno y alogeno^{2,3} y, recientemente, fosfato de calcio⁴. el desenvolvimiento de arcabucos sintéticos reabsorbibles de composiciones inorgánicas o poliméricas^{5,6} como portadores de células progenitoras de varios tejidos han facilitado el movimiento en dirección a este material ideal^{7,8}. Aun varias estrategias basadas en ingeniería de células de tejido óseo han sido ampliamente analizadas⁹, otros estudios también ilustraran varias preguntas que aun precisan ser abordadas en el proyecto de arcaboco ideal. Por ejemplo, algunos arcabocos de fosfato de calcio presentan una capacidad limitada para degradarse *in vivo*¹⁰, cuando otros se degradan rápidamente en la presencia de medula explantada. Además de, algunos arcabocos tanto inorganicos¹¹ como organicos¹² tienen sido utilizados aun sus geometrías impiden la penetración de las células óseas y de otros tejidos. Sin embargo, fueron presentados arcabocos biodegradables inorgánicos y orgánicos que permiten la invasión de tejidos¹³, resultando en uniones óseas críticas, exentas de fallas o defectos entre la restauración y la función después de la implantación de células autólogas. Tales estrategias para la ingeniería ósea basada en arcabocos deben partir de un punto de vista práctico, terapéutico, como función de células autólogas e arcabocos degradables. Aun trabajos anteriores demostraron la viabilidad de varios aspectos como abordaje del problema, una estrategia completa aun necesita ser debidamente establecida, de forma clínicamente aplicable y reproducible. Las actuales limitaciones de estos abordajes están relacionadas a la arquitectura e la composición del arcaboco implantado, el cual deberá permitir una distribución tridimensional de células *in vitro*, acelerando así la cicatrización ósea *in vivo*¹⁴.

A pesar de estos desenvolvimientos, el sustituto ideal para el hueso autólogo aun no está disponible. El propósito de este estudio fue evaluar la formación ósea y la cualidad de la reparación ósea de los sustitutos probados a partir de defectos experimentales inducidos en fémur de conejo. La hipótesis principal de este estudio fue que la mejor formación ósea ocurriría con los sustitutos óseos en comparación con o grupo negativo cóagulo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Veinte y un conejos machos, de linaje de Nova Zelandia, con un año de edad, pesando de 4 kg, fueron usados en esta investigación. En ellos, fueron provocados 6 defectos considerados semicríticos, de 5 mm de diámetro, en los fémures derecho y izquierdo (3 defectos en cada fémur). Los conejos fueron subdivididos en 6 grupos:

- Grupo I: Llenado con coágulo (grupo control);
- Grupo II: Injerto autógeno (retirado durante el preparo de los sitios de los defectos y triturado);
- Grupo III: injerto xenógeno Orthogen (Baumer);
- Grupo IV: injerto xenógeno (Bio-Oss®);
- Grupo V: injerto sintético PLGA;
- Grupo VI: injerto PLGA + HA.

Los seis grupos fueron comparados en 3 períodos: "A" (15 días), "B" (30 días) y "C" (60 días de pós-operatório).

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Los conejos fueron anestesiados, se realizó una incisión en la piel, tejido subcutáneo, elevando un periósteo hasta hueso, para la creación de los tres defectos semicríticos de 5 mm en cada fémur, totalizando 6 defectos por conejo. Estos defectos fueron llenados con los injertos mencionados, incluyendo el grupo coágulo, conforme o lo descrito anteriormente, y casualizados (Fig. 1 e 2). Después del procedimiento, el periósteo fue cerrado con una sutura reabsorbibles (Vicryl Ethicon) y la piel, con sutura no reabsorbibles (Nylon Ethicon). Concluidos los procedimientos operatorios, los conejos fueron mantenidos en jaulas y medicados sobre protocolos de antibioticoterapia y alivio de la sintomatología dolorosa, con analgésico y anti-inflamatório por vía intramuscular a lo largo de tres días. También fue ministrado antibiótico durante siete días, por vía intramuscular. Los animales recibieron tetraciclina, en la proporción de 25 mg/kg, intramuscular, nos primeros 15 días, como marcador óseo.

Los conejos fueron eutanaziados en los períodos predeterminados: "A" (15 días), "B" (30 días) e "C" (60 días de pós-operatorio). Después del sacrificio, los femures fueron aislados, fijados en formol al 10% por 5 días y, 72 horas después, las piezas fueron cortadas, radiografiadas, deshidratadas y descalcificadas con EDTA 10% (Merk^R). Después de la descalcificación, las piezas óseas fueron deshidratadas y incluidas en parafina. A seguir, fueron microtomizadas

en espesura de 0,5 micrometros, obteniendo cortes semiseriados de las piezas a cada 1 mm en micrótopo Microm (Zeiss, Alemanha).

ANÁLISIS EN MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

Para la evaluación del área de formación ósea de este estudio, se utilizo un microscopio de fluorescencia confocal de varredura a laser (LEICA TCS-SPE, Mannheim, Alemania) y un microscopio de luz (Zeiss Axioskop II, Alemania) acoplado a un programa de análisis digitalizado (KS 300 Imaging System *release 3.0 – copyright 1997 by Carl Vision GmbH, Alemania*). Tetraciclina fue el marcador óseo utilizado, observado sobre microscopia de fluorescencia. La tinción correspondiente al marcador fue el color verde. Se obtuvieron 3 laminas de cada tiempo por grupo, en un total de 152 laminas para lectura. Una vez seleccionada el área, en la región fue fotografiada con una camera digital acoplada al microscopio. Las fotografías de las laminas fueron entonces analizadas el programa Professional Imaging for Microscopy, Axion Vision Real 4.8 (Zeiss, Alemania) por un único examinador "ciego" y debidamente calibrado. Las medidas fueron obtenidas en un círculo en el centro de la lamina. El área fue estandarizada por el mismo programa en 150.000 *pixels*, correspondiendo al área de formación ósea de la lamina, de donde se obtuvieron los valores de densitometria verde. Fueron analizadas 3 laminas por grupo, en los tres períodos de 15 días, 30 días e 60 días de pós-operatório.

ANÁLISIS RADIOGRÁFICO

Los conejos fueron sometidos a radiografías de los femures osteotomizados en serie estandarizada inmediatamente después de la cirugía y a los 15, 30 y 60 días. Los femurs fueron radiografiados con la utilización de un dispositivo posicionador de paralelismo para radiología (RIM). Todas las radiografías tuvieron un tamaño padronizado. Para cuantificar las informaciones de taza de formación de ósea disponible en estas series radiográficas y para eliminar la variación de radiodensidad entre las radiografías, medir la cantidad ósea con base en el área radiopaca y la radiodensidad dentro del defecto, fue utilizado el *software ImageJ 1.31 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA)*. Se obtuvieron 42 radiografías de los 6 grupos en los 3 períodos de tiempo, las imágenes fueron digitalizadas y estandarizadas en color gris, en una

escala de 8 *bits* a 70 *kbits* obteniendo una mejor definición de color. Previendo una posible alteración de color, fueron definidos un color gris máximo y uno mínimo. La área de análisis de partícula fue la misma para todas las pruebas, de 0,165 *megapixels*. Para llegar al resultado, fue calculada la media de las mediciones después de análisis por observadores independientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron digitalizados y organizados para la comparación entre los grupos. El análisis de los resultados fue hecho con el test de Tukey y realizada a través del *software* ESTADISTICA 6.0 para ambos estudios, tanto para la microscopia de fluorescencia como para el análisis radiográfico.

RESULTADOS ANÁLISIS RADIOGRÁFICO

Este trabajo analiza la reparación ósea de defectos creados y rellenados con biomateriales: en un total de 126 defectos con diámetros de 5 mm. A análisis radiográfica evaluó el área radiopaca y la radiodensidad con el *software* citado y no encontró diferencia estadística significativa entre los grupos testados referentes a los períodos de 15 y 60 días (Fig. 3 e 4); con relación a la densidad óptica, se observó una mayor radiopacidad en el grupo Bio-Oss. Ya en el grupo de 30 días (Fig. 5) se verificó una diferencia significativa entre los grupos coágulo y PLGA + HA, con $P < 0,005$, mostrando una radiodensidad óptica mayor PLGA + HA y teniendo una menor formación ósea el grupo Coágulo (Fig. 6).

ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

A los 15 días de pós-operatório se constató una formación mayor de hueso en el grupo Bio-Oss, en el grupo coágulo, en el grupo PLGA y en el grupo PLGA + HA (Fig. 7). A los 30 días también hubo diferencia en el comportamiento de los grupos, presentado mayor formación ósea el grupo Bio-oss que el grupo Orthogen, autógeno, PLGA + HA. El grupo Coágulo mostró mayor formación que el grupo PLGA + HA, que el grupo PLGA, que el grupo autógeno y que el grupo Orthogen (Fig. 8).

A los 60 días (Fig. 9 y 10) igualmente se encontraron diferencias entre los grupos de muestras, con mayor formación ósea en el grupo Bio-Oss que en el grupo Orthogen, que el grupo autógeno, que el grupo PLGA + HA. El grupo autógeno mostró una diferencia mayor que el grupo PLGA y el grupo PLGA + HA (Fig. 11).

La área de formación ósea en el grupo coágulo tuvo un aumento gradativo en los tres períodos, siendo inferior al injerto autógeno (estándar de oro). En el injerto xenógeno Orthogen se verificó una cantidad moderada a los 15 y 30 días, sufriendo una pequeña disminución (reabsorción) a los 60 días. En el injerto xenógeno Bio-Oss® la mayor cantidad ocurrió a los 15 días, reabsorbiendo leve y lentamente a los 30 días y aumentando a los 60 días. Ya el polímero compuesto de PLGA está presente a los 15 días, sufriendo una leve y gradativa reabsorción en los períodos siguientes. El grupo PLGA + HA no presentó diferencia significativa en todos los períodos, lo que es confirmado por estudios que muestran la presencia de HA hasta 44 meses después de su instalación.

DISCUSION

En el presente estudio fueron evaluados, en los períodos de 15, 30 e 60 días de pós-operatório, substitutos óseos injertados em 6 defectos creados en femures de conejos. Una de las principales verificaciones de este estudio fue que la presencia de biomateriales, independientemente de las propiedades, se asocia a la formación de hueso en toda el área.

La matriz mineral bovina es de los materiales mas utilizados, ya que permite la formación de hueso novo, siendo así osteocondutivo. La microscopia electrónica muestra la formación de hueso en contacto directo con la superficie de los biomateriales, sin que los tejidos blandos intervengan directamente. Esta observación está de acuerdo con resultados encontrados anteriormente en la literatura de diferentes biomateriales a partir de evidencia en perros¹⁵ y seres humanos^{16, 17, 18, 19}.

Un grupo de investigadores americanos realizo, en 2004²⁰, un trabajo con plasma rico en plaquetas (PRP) conjuntamente con injertos alógenos y xenógenos en cirugías reconstructivas para implantes. El estudio compara la formación y la cicatrización ósea en defectos en cráneo de conejos con hueso autógeno, xenógeno con PRP. Un grupo

sin injerto sirvió como control. Radiografías mostraron un crecimiento en densidad ósea de Bio-Oss, hueso autógeno y Bio-Oss + PRP mayor que el defecto control en todos los tiempos de evaluación; sin embargo, clínicamente es difícil determinar por las radiografías cuanto estos materiales se presentan densos. Comparando estos resultados con este estudio, los injertos presentan resultados similares en la formación de nuevo hueso, mas es difícil una interpretación radiográfica precisa.

Guerra *et al.*²¹, 2010, evalúan la oseointegración de implantes colocados en áreas con creación de defectos óseos usando tres técnicas de regeneración ósea. Los implantes fueron instalados y los defectos fueron rellenados con diferentes biomateriales, animales sacrificados a 4 y 8 semanas. En el presente estudio, en todos los grupos hubo un aumento progresivo en el volumen de hueso novo a lo largo del tiempo. El experimento demostró que la asociación de la membrana de colágeno reabsorbibles con biomateriales ayuda en la regeneración ósea avanzada, con una gran parte de hueso regenerada en contacto con la superficie del implante. Este estudio mostró, igualmente, que la regeneración de defectos con biomateriales es un método previsible.

Megan E. *et al.*²², 2007, utilizaron un modelo de rata creando defectos de 8 mm para evaluar cuantitativamente la capacidad de ácido Poly(L-lactide-co-D,L-lactide) como arcaboco, con o sin factores de crecimiento, para promover la cura de Hueso. Análisis micro-CT secuenciales mostraron que el crecimiento óseo aumento significativamente entre 4 y 16 semanas para los defectos, con o sin factores de crecimiento. La evaluación histológica indico que el primer hueso formado ocurrió en la periferia de los arcabocos, seguido por mas deposición mineral limitada en el interior del arcaboco, sugiriendo que las células que participan en la respuesta de la cura provienen principalmente del periostio. Este estudio presenta un modelo de defecto segmentar desafiador que facilita la evaluación cuantitativa de las estrategias para reparar defectos óseos críticos. Cada región del defecto fue mejorada a través de la implantación estructural de los arcabocos en combinación con factores de crecimiento. Resultado compatible con los resultados de esta investigación, muestra que los arcabocos provén señales osteoinductores para la formación de novo osso.

Kai-Olaf H.²³ realiza la siguiente pregunta: "Es posible estimular la osteocondución e la osteogenese para mejorar la formación ósea en defectos de tamaño crítico, a fin de evitar el injerto óseo?" el

investigador creó defectos de tamaño crítico, de 5 cm³, en la mandíbula anterior de 16 miniporcinos adultos. Los defectos fueron rellenados con 60% de hidroxapatita y 40% cerámica bifásica. Cinco semanas después de la cirugía, los animales fueron sacrificados e los defectos analizados microscópicamente, histológicamente y radiográficamente. Los resultados apuntan a mayor tasa de formación de osso novo en el grupo de los biomateriales (73% do defeito anterior). La biomatriz fue degradada en la misma velocidad con que el osso novo fue establecido. En el grupo control, fue observada una formación ósea de apenas 59%. Se observó que la biodegradación del material cerámico bifásico es altamente poroso ocurrió en paralelo la formación de novo osso. En el análisis radiográfica no fue encontrada diferencia estadísticamente significativa, resultado semejante a este estudio.

El modelo de conejo es uno de los más utilizados para evaluar substitutos óseos^{24, 25}. Lekovic V. y colaboradores crearon un defecto de 5 mm de diámetro realizado en el condilo femoral de los conejos para la obtención de un defecto de tamaño crítico para un hueso largo. De acuerdo con un estudio previo, la cura espontánea se observó después de 30 a 90 días²⁶. En contraste, los datos histomorfométricos demostraron que el material experimental es capaz de promover la cicatrización ósea mismo en un defecto óseo grande como el fémur de conejo. La maduración ósea mejoró de 30 a 90 días con la reabsorción simultánea del material. Datos sobre el desenvolvimiento de la formación ósea muestran que durante los 30 a 90 días el material permite la remodelación ósea reticular en dirección a una estructura trabecular. A partir de la formación ósea observada en el día 30, que es caracterizada por trabéculas, la reparación del defecto se encontró en un plazo de 90 días, evolucionando para una caracterización semejante a la de hueso normal. Este fenómeno es, probablemente, reforzado por la composición y características de la superficie de los materiales^{27, 28}.

A pesar de la metodología de investigación, de las concentraciones y de la localización favorable por la nutrición, los injertos presentan resultados similares a los de este trabajo, o que también sucede en relación a otras investigaciones que utilizaron metodologías distintas. Este estudio, el grupo coágulo demostró aumento gradativo en los tres períodos, siendo superior el injerto autógeno (estándar de oro). Esto puede ser explicado por la anatomía ósea del conejo, ya que su tibia presenta tejido grasoso en la región central, lo que hace con que el injerto se va reabsorbiendo a medida que

se aproxima al centro de hueso. El hueso liofilizado xenógeno Orthogen parece ser un excelente material por el aumento moderado en los primeros 30 días y aumento significativo a los 60 días. En el xenógeno Bio-Oss® obtuvimos un crecimiento inicial considerable, con aumento gradativo hasta los 60 días. En el grupo PLGA se corroboró un pequeño crecimiento óseo a los 15 días, aumentando considerablemente a los 30 y 60 días. Con referencia al grupo PLGA + HA, el crecimiento óseo fue acentuado y equilibrado en los tres periodos. Varios análisis microscópicos, radiográficos o estadísticos discutidos en la literatura presentaron resultados similares con relación a la utilización de biomateriales.

CONCLUSION

Todos los substitutos óseos fueron capaces de promover la formación ósea. Los grupos coágulo, autógeno, PLGA, PLGA+HA, genero menos osso novo en comparación con los grupos Bio-Oss y Orthogen, aunque las diferencias en el área de formación ósea no fueron significativas.

REFERENCIAS

- 1.- ITO, T.; SAKANO, S.; SUGIURA, H. *et al.* "Sensitivity of osteoinductive activity of demineralized and defatted rat femur to temperature and duration of heating". *Clin Orthop* 1995;316:267–275.
- 2.- SALYER, K. E.; HALL, C. D. "Porous hydroxyapatite as an onlay bonegraft substitute for maxillofacial surgery". *Plast Reconstr Surg* 1995;84:236–244.
- 3.- WEINMANN, J. P.; SICHER, H. *Bone and Bones*. 2nd ed. St. Louis: CV Mosby Company, 1955.
- 4.- RIPAMONTI, U. "Smart biomaterials with intrinsic osteoinductivity: geometric control of bone differentiation". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:215– 222.
- 5.- ATHANASIOU, K. A.; AGRAWAL, C. M. (eds). "Orthopedic polymeric biomaterials: applications of biodegradables". *Biomaterials* 2000;21(Suppl).
- 6.- DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000.

- 7.- MOONEY, D. J.; SANO, K.; KAUFMANN, P. M. *et al.* "Long term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges". *J Biomed Mater Res* 1997;37:413–420.
- 8.- KIM, W. S.; VACANTI, C. A.; UPTON, J. *et al.* "Bone defect repair with tissue-engineered cartilage". *Plast Reconstr Surg* 1994;94:580–584.
- 9.- NIKLASON, L. E. "Engineering of bone grafts". *Nature Biotech* 2000; 18:929–930.
- 10.- FLEMING, J. E., JR; CORNELL, C. N.; MUSCHLER, G. F. "Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering". *Orthop Clin North Am* 2000;31:357–374.
- 11.- KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P. "Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical sized segmental bone defect". *Tissue Eng* 1997;3:173–185.
- 12.- ISHAUG-RILEY, S. L.; CRANE, G. M.; GURLEK, A. *et al.* "Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery". *J Biomed Mater Res* 1997;36:1–8.
- 13.- BAKSH, D.; DAVIES, J. E. "Design strategies for 3-dimensional *in vitro* bone growth in tissue-engineering scaffolds". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:488–495.
- 14.- HOLY, C. E.; FIALKOV, J. A.; SHOICHET, M. S. *et al.* "In vivo models for bone tissue-engineering constructs". In: DAVIES, J. E. (ed). *Bone Engineering*. Toronto: em squared Inc, 2000:496–504.
- 15.- RICCI, J. L.; SPIVAK, J. M.; ALEXANDER, J.-J. "Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material. Physical-chemical properties and *in vivo* bone response". *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:969-978.
- 16.- VLASSIS, J. M.; HURZCLER, M. B.; QUINONES, G. R. "Sinus lift augmentation to facilitate placement of nonsubmerged implants: a clinical and histological report". *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1993;5(2):15-23.
- 17.- WHITTAKER, J. M.; JAMES, R. A.; LO/ADA |; CORDOVA, C.; GAREY, D. J. "Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental implant sites.

- Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eightmonth autopsy report". *J Oral Implantol* 1989; XV:141-144.
- 18.- JUDY, K. W. M. "Oral impiantology case reports". *N Y State Dent J* 1986;52(10):24-26.
 - 19.- WAGNER, J. R. "A clinical and histological case study using resorbable hydroxylapatite for the repair of osseous defects prior to endosseous implant surgery". *J Oral ImpUmtol* 1989; XV: 186-192.
 - 20.- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. "Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study". *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, Lombard, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan./Feb. 2004.
 - 21.- GUERRA, I.; MORAIS BRANCO, F.; VASCONCELOS, M.; AFONSO, A.; FIGUEIRAL, H.; ZITA, R. "Evaluation of implant osseointegration with different regeneration techniques in the treatment of bone defects around implants: an experimental study in a rabbit model". *Clin Oral Implants Res.* 2011 Mar;22(3):314-22. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02002.x. Epub 2010 Sep 27.
 - 22.- MEGAN E. OEST; KENNETH M. DUPONT; HYUN-JOON KONG; DAVID J. MOONEY; ROBERT E. GULDBERG "Quantitative Assessment of Scaffold and Growth Factor-Mediated Repair of Critically Sized Bone Defects" *Journal of Orthopaedic Research* July 2007.
 - 23.- KAI-OLAF HENKEL1; THOMAS GERBER2; PETER DO`RFLING3; KARSTEN K. H. GUNDLACH1; VOLKER BIENENGRA` BER1 "Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts". *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2005) 33, 45–49.
 - 24.- WHITTAKER, J. M.; JAMES, R. A.; LO/ADA |; CORDOVA, C.; GAREY, D. J. "Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental implant sites. Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eightmonth autopsy report". *J Oral Implantol* 1989; XV:141-144.
 - 25.- MAYFIELD, L. J. A.; SKOGLUND, A.; HISIG, P.; LANG, N. P.; ATTSTROM, R. (2001) "Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study". *Clinical Oral Implants Research* 12: 508–514.

- 26.- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; KENNEY, E. (2002) "Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study". *Journal of Periodontology* 73: 198–205.
- 27.- MURAKANI, N.; SATIO, N.; TAKAHASHI, J.; OTA, H.; HORIUCHI, H.; NAWATA, H. *et al.* "Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaces prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier". *Biomaterials* 2003;24:2153-9.
- 28.- SAITO, N.; OKADA, T.; HORIOUCI, H.; OTA, H.; TAKAHASHI, J.; MURATAMI, N. *et al.* "Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers". *Bone* 2003;32:381-6.

LEYENDAS DE LOS GRÁFICOS Y TABELAS (Parte 1)

Fig. 1: Defectos rellenados con Bio-Oss, PLGA y Orthogen de izquierda a derecha.

Fig. 2: Defectos rellenados con PLGA + HA, hueso autógeno y coágulo de izquierda a derecha.

Fig. 3: Gráfico del análisis de la radiodensidad radiográfica, 15 días.

Fig. 4: Gráfico del análisis radiográfico mostrando la radiodensidad a los 60 días.

Fig. 5: Radiografía, 30 días ,grupo PLGA + HA, hueso autógeno y coágulo.

Fig. 6: Gráfico del análisis radiográfico, 30 días.

Fig. 7: Gráfico del área de formación ósea, 15 días.

Fig. 8: Gráfico del área de formación ósea, 30 días.

Fig. 9: Imagen obtenida con microscopia de fluorescência, 60 días, Bio-Oss, PLGA e Orthogen.

Fig. 10: Imagen obtenida en Microscopia de fluorescência, 60 días, PLGA + HA, osso autógeno e coágulo.

Fig. 11: Gráfico del área de formação ósea, a los 60 días.

Fig. 1.

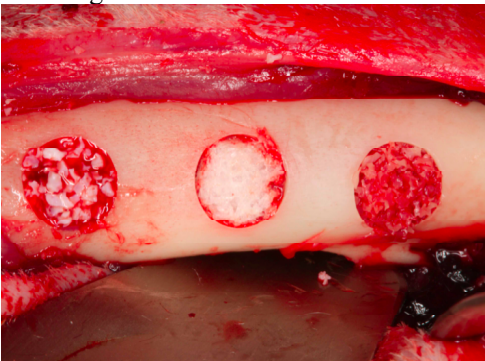


Fig. 2.



Fig. 3.

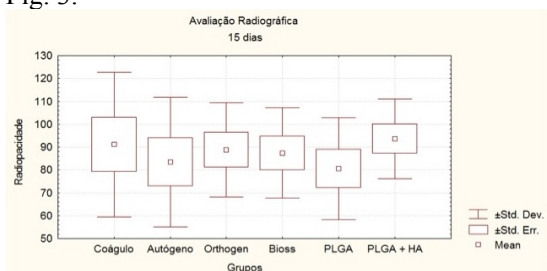


Fig. 4.

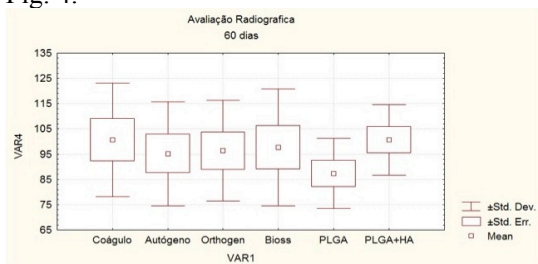


Fig. 5.

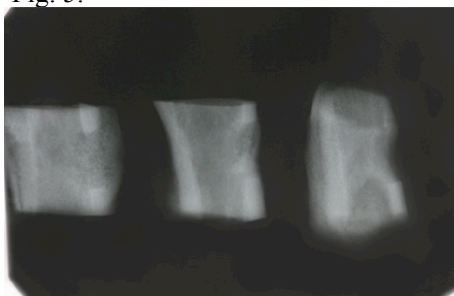


Fig. 6.

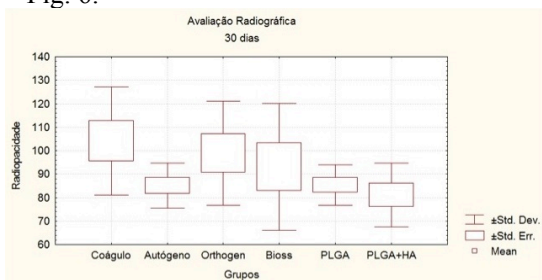


Fig. 7.

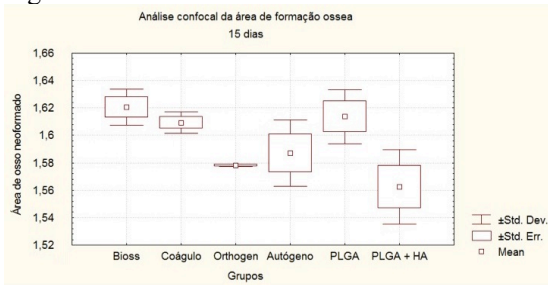


Fig. 8.

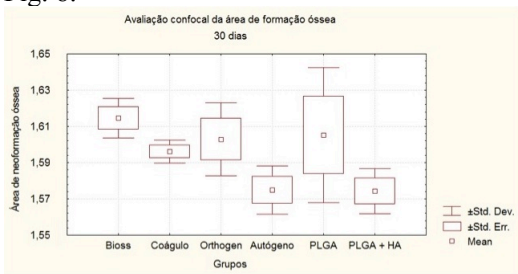


Fig. 9.

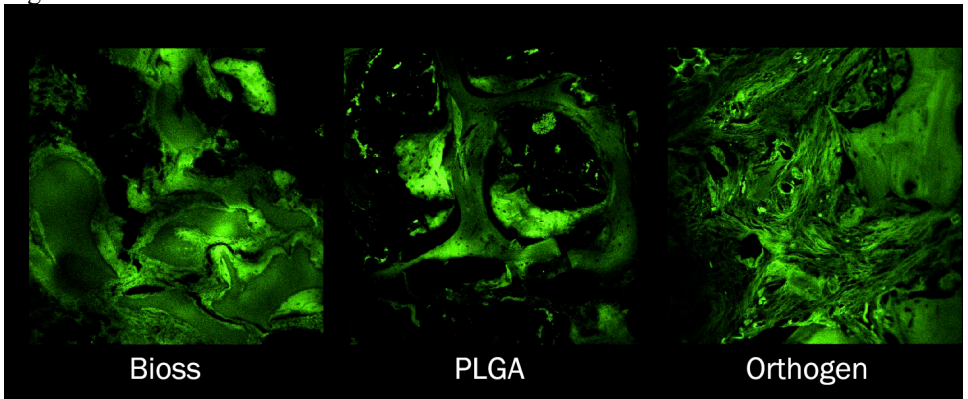
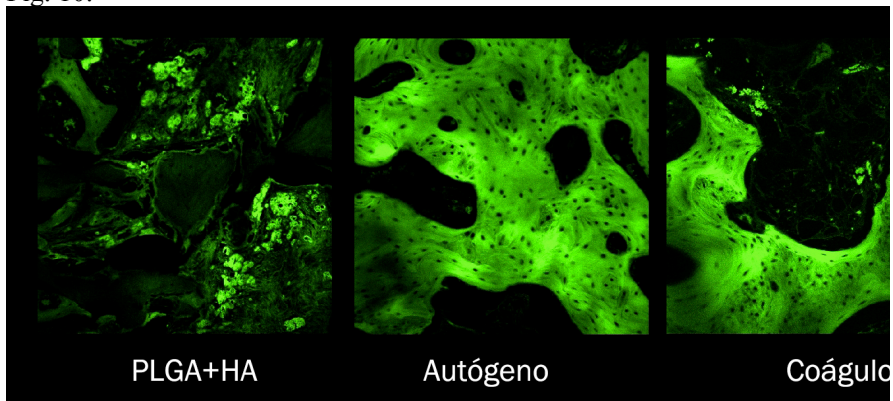


Fig. 10.



CAPÍTULO III

I BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1.- ARAÚJO, M.; LINDHE, J. (2005). "Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog". *Journal of clinical periodontology* 32. 212-218.
- 2.- CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. (2008). "Bone augmentation procedures in implant dentistry". *The international journal of oral and maxillofacial implants* 24. 237-259.
- 3.- SJÖSTRÖM, M.; LUNDGREN, S.; SENNERBY, L. "A histomorphometric comparison of the bone graft-titanium interface between interpositional and onlay/inlay bone grafting techniques". *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:52-62.
- 4.- PETROVIC, L.; SCHLEGEL, A. K.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; WILTFANG, J. "Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering". *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 2006;21:225-231.
- 5.- HALLMAN, M.; THOR, A. (2008) "Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry". *Periodontology* 2000. 47: 172-192.
- 6.- SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; ECKERT, S. E.; WEAVER, A. L. "Regenerative potencial of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts in peri-implant defects: a histomorphometric analysis in dogs". *J. Periodontol* 2005;76:1637-1644.
- 7.- MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. (2007) "Bone augmentation techniques". *Journal of Periodontology* 78: 377-396.
- 8.- BRANEMARK, P. I.; SVENSSON, B.; VAN STEENBERGHE, D. "Ten-year survival rates of fixed prosthesis on four of six implants *ad modum* Branemark in full edentulism". *Clinical Oral Implants Research*, Göteborg, v.6, n.227, p.31,1995.
- 9.- BUSER, D.; DULA, K.; HESS, D.; HIRT, H. P.; BELSER, U. C. "Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes". *Periodontol* 2000; 19:151-63.

- 10.- HAMMERLE, C. H.; KARRING, T. "Guided bone regeneration at oral implant sites". *Periodontol* 2000, 1998;17:151-75.
- 11.- YANNAS, I. V. 2001. *Tissue and Organ Regeneration in Adults*. Springer, New York.
- 12.- PERRY, C. R. "Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes". *Clin Orthop* 1999;360:71-86.
- 13.- URIST, M. R.; JURIST, J. M.; DUBUC, F. L.; STRATES, B. S. "Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits". *Clin Orthop* 1970;68:279-93.
- 14.- URIST, M. R.; JURIST, J. M.; DUBUC, F. L.; STRATES, B. S. "Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits". *Clin Orthop* 1970;68:279-93.
- 15.- GOLDBERG, V. M.; STEVENSON, S. "Natural history of autografts and allografts". *Clin Orthop* 1987;225:7-16.
- 16.- TREJO, P. M.; WELTMAN, R.; CAFFESSE, R. "Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial". *J Periodontol* 2000;71:1852-61.
- 17.- TORRICELLI, P.; FINI, M.; ROCCA, M.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. "Xenogenic demineralized bone matrix: osteoinduction and influence of associated skeletal defects in heterotopic bone formation in rats". *Int Orthop* 1999;23:178-81.
- 18.- QUATTLEBAUM, J.; MELLONIG, J. T.; HANSEL, N. "Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects". *J Periodontol* 1988;59:394-7.
- 19.- TURNER, D.; MELLONIG, J. T. "Antigenicity of freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects". *J Periodontol Res* 1981;16:89-99.
- 20.- BOWEN, J. A.; MELLONIG, J. T.; GRAY, J. L.; TOWLE, H. T. "Comparison of decalcified freeze-dried bone allograft and porous particulate hydroxyapatite in human periodontal osseous defects". *J Periodontol* 1989;60:647-54.
- 21.- CARMAGNOLA, D.; ADRIAENS, P.; BERGLUNDH, T. "Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss". *Clin Oral Impl Res* 2003;14:137-43.
- 22.- GARG, A. K. "Grafting materials in repair and restoration". In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. (editors). *Tissue engineering. Application in maxillofacial surgery and*

- periodontics*. Chicago: Quintessence International Co; 1999. p. 83-101.
- 23.- GRIFFITH, L. G. "Polymeric biomaterials". *Acta Mater* 2000;48: 263-77.
 - 24.- LEUNG, K. S.; HUNG, L. K.; LEUNG, P. S. *Biodegradable implants in fracture fixation*. Singapore: World Scientific Publishing Co; 1994.
 - 25.- VERT, M.; LI, S.; SPENDEHAUER, G.; GUERIN, P. "Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters". *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:432-46.
 - 26.- PELTONIEMI, H.; ASHAMMAKHI, N.; KONTIO, R.; WARIS, T.; SALO, A.; LINDQVUST, C. *et al.* "The use of bioabsorbable fixation devices in craniomaxillofacial surgery". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:5-14.
 - 27.- FERRETTI, C.; REYNEKE, J. P. "Mandibular sagittal split osteotomies fixed with biodegradable or titanium screws: a prospective, comparative study of postoperative stability". *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93: 534-7.
 - 28.- CRUMP, T. B.; RIVERA-HIDALGO, F.; HARRISON, J. W.; WILLIAMS, F. E.; GUO, I. V. "Influence of three membrane types on healing of bone defects". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:365-74.
 - 29.- HAÛMMERLE, C. H. F.; LANG, N. P. "Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials". *Clin Oral Impl Res* 2001; 12:9-18.
 - 30.- MURAKANI, N.; SATIO, N.; TAKAHASHI, J.; OTA, H.; HORIUCHI, H.; NAWATA, H. *et al.* "Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaces prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier". *Biomaterials* 2003;24:2153-9.
 - 31.- SAITO, N.; OKADA, T.; HORIOUCI, H.; OTA, H.; TAKAHASHI, J.; MURATAMI, N. *et al.* "Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers". *Bone* 2003;32:381-6.
 - 32.- EL-AMIN, S. F.; LU, H. H.; KHAN, Y.; BUREMS, J.; MITCHELL, J.; TUAN, R. S. *et al.* "Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable

- polymers applicable for tissue engineering". *Biomaterials* 2003;24:1213-21.
- DORAIRAJAN, A.; REDDY, R. M.; KRIKLER, S. "Outcome of acetabular revision using an uncemented hydroxiapatite-coated component: two- to five-year results and review". *J Arthroplasty* 2005;20:209.
- ISHIHARA, K.; ARAI, H.; NAKABAYASHI, N.; MORITA, S.; FURUYA, K. "Adhesive bone cement containing hydroxiapatite particle as bone compatible filler". *J Biomed Mater Res* 1992;26:937.
- LOPES, M. A.; MONTEIRO, F. J.; SANTOS, J. D. "Glass-reinforced hydroxiapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics". *Biomaterials* 1999;20:2085.
- LANSMAN, S.; PAAKKO, P.; RYHANEN, J.; KELLOMAKI, M.; WARIS, E.; TORMALA, P.; WARIS, T.; ASHAMMAKHI, N. "Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design". *J Craniofacial Surg*, 2006;17(6): 1121-1128.
- GÓMEZ, G.; KORIKAKOSKI, S.; GONZÁLEZ, M. M.; LANSMAN, S.; ELLA, V.; SALO, T.; KELLOMAKI, M.; ASHAMMAKHI, N.; ARNAUD, E. "Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer". *J Craniofacial Surg*, 2006; 17(5): 935-942.
- SUI, G.; YANG, X.; MEI, F.; HU, X.; CHEN, G.; DENG, X.; RYU, S. "Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration". *J Biomed Mater Res* 2007; 82A : 445-454.
- RICCI, J. L.; SPIVAK, J. M.; ALEXANDER, J.-J. "Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material. Physical-chemical properties and *in vivo* bone response". *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50:969-978.
- VLASSIS, J. M.; HURZCLER, M. B.; QUINONES, G. R. "Sinus lift augmentation to facilitate placement of nonsubmerged implants: a clinical and histological report". *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1993;5(2):15-23.
- WHITTAKER, J. M.; JAMES, R. A.; LO/ADA |; CORDOVA, C.; GAREY, D. J. "Histological response and clinical evaluation of heterograft and allograft materials in the elevation of the maxillary sinus for the preparation of endosteal dental implant sites.

- Simultaneous sinus elevation and root form implantation: an eightmonth autopsy report". *J Oral Implantol* 1989; XV:141-144.
- JUDY, K. W. M. "Oral impiantology case reports". *N Y State Dent J* 1986;52(10):24-26.
- WAGNER, J. R. "A clinical and histological case study using resorbable hydroxylapatite for the repair of osseous defects prior to endosseous implant surgery". *J Oral ImpUmtol* 1989; XV: 186-192.
- MAYFIELD, L. J. A.; SKOGLUND, A.; HISIG, P.; LANG, N. P.; ATTSTROM, R. (2001) "Evaluation following functional loading of titanium fixtures placed in ridges augmented by deproteinized bone mineral. A human case study". *Clinical Oral Implants Research* 12: 508–514.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; KENNEY, E. (2002) "Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study". *Journal of Periodontology* 73: 198–205.
- YILDIRIM, M.; SPIERERMANN, H.; BIESTERFELD, S.; EDELHOFF, D. (2000) "Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood: a histologic and histomorphometric study in humans". *Clinical Oral Implants Research* 11: 217–229.
- WETZEL, A. C.; STICH, H.; CAFFESSE, R. G. (1995) "Bone apposition into oral implants in the sinus area filled with different graft materials: a histological study in beagle dogs". *Clinical Oral Implants Research* 6: 155–163.
- CARMAGNOLA, D.; ADRIAENS, P.; BERGLUNDH, T. "Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss". *Clin Oral Impl Res* 2003;14:137-43.
- BOWEN, J. A.; MELLONIG, J. T.; GRAY, J. L.; TOWLE, H. T. "Comparison of decalcified freeze-dried bone allograft and porous particulate hydroxyapatite in human periodontal osseous defects". *J Periodontol* 1989;60:647-54.
- SHERWOOD, J. K.; RILEY, S. L.; PALAZZOLO, R.; BROWN, S. C.; MONKHOUS, D. C.; COATES, M. *et al.* "A three-dimensional osteocondral composite scaffold for articular cartilage repair". *Biomaterials* 2002;23: 4739-51.

- LEUNG, K. S.; HUNG, L. K.; LEUNG, P. S. *Biodegradable implants in fracture fixation*. Singapore: World Scientific Publishing Co; 1994.
- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. "Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study". *Int. J. Oral Maxillofac. Implants, Lombard*, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan./Feb. 2004.
- SCHOU, S. *et al.* "Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys". *Clin. Oral Implants Res.*, Copenhagen, v. 14, n. 5, p. 535-547, Oct. 2003.
- GUERRA, I.; MORAIS BRANCO, F.; VASCONCELOS, M.; AFONSO, A.; FIGUEIRAL, H.; ZITA, R. "Evaluation of implant osseointegration with different regeneration techniques in the treatment of bone defects around implants: an experimental study in a rabbit model". *Clin Oral Implants Res.* 2011 Mar;22(3):314-22. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02002.x. Epub 2010 Sep 27.
- MEGAN E. OEST; KENNETH M. DUPONT; HYUN-JOON KONG; DAVID J. MOONEY; ROBERT E. GULDBERG. "Quantitative Assessment of Scaffold and Growth Factor-Mediated Repair of Critically Sized Bone Defects". *Journal of Orthopaedic Research*, July 2007.
- KAI-OLAF HENKEL¹; THOMAS GERBER²; PETER DO³RFLING³; KARSTEN K. H. GUNDLACH¹; VOLKER BIENENGRÄ¹BER¹. "Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts". *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* (2005) 33, 45–49.

CAPÍTULO IV

1 METODOLOGIA EXPANDIDA

Foram provocados 6 defeitos considerados críticos, de 5 mm de diâmetro, em vinte e um coelhos machos da linhagem Nova Zelândia, com um ano de idade, pesando de 2 a 4 kg, procedentes do Biotério da UNISUL. Os coelhos usados nesta pesquisa tiveram os defeitos introduzidos nos fêmures direito e esquerdo (3 defeitos em cada fêmur). Os animais foram subdivididos em 6 grupos:

- Grupo I: preenchido com coágulo (grupo controle);
- Grupo II: enxerto autógeno (retirado durante o preparo dos sítios dos defeitos e triturado);
- Grupo III: enxerto xenógeno Orthogen (Baumer) (Fig. 1);
- Grupo IV: enxerto xenógeno (Bio-Oss®) (Fig. 2);
- Grupo V: enxerto alógeno PLGA (Fig. 3);
- Grupo VI: enxerto alógeno PLGA + HA (Fig. 4).

Os seis grupos foram comparados em 3 períodos: "A" (15 dias), "B" (30 dias) e "C" (60 dias de pós-operatório).

Os coelhos foram sometidos a anestesia geral com uma injeção intramuscular de 1:1 tiletamina + zolazepam 33 mg/kg + 0,5 mg/kg de morfina + 1 mg/kg de xilazina na mesma seringa. Antes do procedimento cirúrgico foram ministradas antibioticoterapia profilática e medicação anti-inflamatória, na dosagem de 40.000 UI/kg de penicilina benzatina + triancinolona a 0,02 mg/kg. Os fêmures, após seleção para os procedimentos cirúrgicos (aproximadamente 2 cm acima da articulação do joelho), foram tricotomizados e, então, realizada a antisepsia com iodopovidona. Realizou-se uma incisão na pele (Fig. 5), tecido subcutâneo, elevando o perióstio até o osso, para a criação dos três defeitos semicríticos de 5 mm em cada fêmur, totalizando 6 defeitos por coelho. A área de criação dos defeitos foi demarcada com uma broca trefina de 5 mm de diâmetro, a distância mínima entre o centro de duas marcações estabelecida em 14 mm, preservando no mínimo 3 mm entre as perfurações, e aprofundadas por 5 mm. As perfurações foram realizadas a 1.600 rpm (com um motor específico para este fim), mantendo irrigação abundante de soro fisiológico com o intuito de

dissipar o calor proveniente do atrito da broca com o tecido ósseo. Foram casualizadas as áreas onde os diferentes enxertos foram realizados de tal forma que se eliminasse a influência da variável qualidade óssea, pois o osso vai se tornando mais medular conforme se aproxima da cabeça do fêmur. Ao final foram confeccionados e regenerados 126 defeitos em 21 coelhos. Os defeitos (semi) críticos foram confeccionados mantendo um espaçamento de três a quatro milímetros entre eles visando a preservação da resistência óssea dos fêmures (Fig. 4). Neste coelho operado, a ordem de instalação dos arcabouços seguiu a rotação planejada no sentido horário, em função da mudança de qualidade óssea na região próxima ao joelho (mais cortical) e em direção ao quadril (mais esponjosa), na perna direita, com o primeiro defeito sendo preenchido com Bio-Oss®, o segundo com PLGA e o terceiro com osso xenógeno da Baumer (Orthogen), conforme se vê na Fig. 8. O osso obtido durante a confecção dos defeitos com broca trefina foi particulado com um triturador específico e enxertado no grupo II (Fig. 8 e 9). Os defeitos dos demais grupos foram preenchidos conforme citado anteriormente; para tal, sempre iniciamos a cirurgia no lado oposto ao enxerto autógeno para obtenção de maior quantidade de material. O protocolo cirúrgico para o fêmur esquerdo deste coelho foi o preenchimento do primeiro defeito próximo ao joelho com PLGA + HA, o segundo com osso autógeno e o terceiro com a preservação do coágulo como grupo controle (Fig. 10). Totalizando 6 defeitos por coelho, eles foram preenchidos com os biomateriais e grupo coágulo conforme descrito anteriormente. Após o procedimento, o perióstio foi fechado com sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon) (Fig. 11) e a pele foi fechada com sutura não reabsorvível (Nylon Ethicon) (Fig. 12).

Concluídos os procedimentos operatórios, os coelhos foram mantidos em caixas e medicados sob protocolos de antibioticoterapia e alívio da sintomatologia dolorosa, além de receberem tetraciclina a cada 7 dias, a qual atuará como marcador ósseo. Os animais foram medicados com um agente analgésico e anti-inflamatório administrado por injeção intramuscular na dose de 1 ml/5 kg (Ketoprofeno a 1%), ao longo dos três dias subsequentes, com o objetivo de controlar a dor e o edema da área operada. Também receberam antibiótico (Pentabiótico) durante sete dias, por via intramuscular, na dose de 40.000 UI/kg de penicilina benzatina por dia, bem como o uso tópico diário de Rifocina *spray* por

sete dias. Os animais receberam um marcador ósseo, tetraciclina, na proporção de 25 mg/kg, intramuscular, nos primeiros 15 dias.

Essa marcação tem por objetivo determinar a capacidade de modulação óssea dos materiais a serem estudados. Durante o período do experimento e permanência no Biotério Central da UFSC, os animais receberam dieta padrão uma vez ao dia, sem limitações no regime de ingestão de água.

Após o sacrifício dos coelhos, os fêmures foram recolhidos, fixados em formol tamponado a 10%, desidratados e descalcificados. Os espécimes foram incluídos em paraplast, cortados longitudinalmente e corados com coloração de van Kossa e azul de Toluidina. Depois disso, foi feito o preparo para observação em microscopia confocal de varredura a laser e microscopia óptica de luz. As imagens de cada campo visível foram capturadas digitalmente e combinadas para ilustrar o conjunto. Os procedimentos veterinários pré, trans e pós-operatórios dos animais, bem como a rotina de tratamento, foram realizados e supervisionados por médicos veterinários. Nos períodos predeterminados "A" (duas semanas), "B" (quatro semanas) e "C" (oito semanas), os animais foram sacrificados através do procedimento de eutanásia com aprofundamento anestésico seguido de injeção endovenosa de cloreto de potássio (KCl) a 19,1%. As amostras foram armazenadas em solução de formol a 10% e, passadas 72 horas, as peças foram cortadas e radiografadas. A primeira eutanásia foi realizada após 15 dias, a segunda aos 30 dias e a terceira aos 60 dias de pós-operatório, e as peças fixadas em formol 10% em água destilada, sendo obtidas as peças inteiras que, após 72 horas submersas neste produto, foram seccionadas perpendicularmente ao longo do eixo da peça óssea e separadas as amostras, preservando-se mais ou menos 2 a 3 mm de osso sadio junto às amostras (Fig. 13 e 14).

As peças foram radiografadas, desidratadas e descalcificadas em EDTA 10% (Merk®) em recipientes plásticos separados e rotulados. Foram feitas 5 trocas, de dois em dois dias, e, posteriormente, no mínimo mais 3 trocas semanais até a total descalcificação das amostras, que foram testadas por instrumento perfurante e radiografias até não mais se observarem estruturas calcificadas em suas imagens (radiografias quase totalmente radiolúcidas). As peças ósseas foram embrulhadas em papel toalha com suas identificações, postas em cassetes e levadas a desidratação por banhos sucessivos em soluções de álcool 70%, 80%, 90%, etílico (absoluto, 100%) e xilol, e passaram ao

processo de inclusão em parafina por um aparelho Histotécnico. Foram então incluídas em parafina e microtomizadas em espessuras de 0,5 micrômetros, obtendo-se cortes semisseriados das peças a cada 1 mm em um micrótomo Microm (Zeiss, Alemanha). Os cortes foram efetuados longitudinalmente ao osso e perpendicularmente às amostras, partindo da base da peça em direção ao defeito realizado.

2 ANÁLISE EM MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

Para avaliação da área de formação óssea deste estudo, utilizou-se um microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS-SPE, Mannheim, Alemanha) e um microscópio de luz (Zeiss Axioskop II, Alemanha) acoplado a um programa de análise digitalizada (KS 300 Imaging System *release 3.0 – copyright 1997 by Carl Vision GmbH, Alemanha*). Tetraciclina foi o marcador ósseo utilizado, observado sob microscopia de fluorescência. A coloração correspondente ao marcador foi a cor verde. Obtiveram-se 3 lâminas por grupo de cada período pós-operatório, num total de 152 lâminas para leitura (Fig. 15 e 16). Uma vez selecionada a área da lâmina, a região foi fotografada com uma câmera digital acoplada ao microscópio. As fotografias das lâminas foram então analisadas através do programa Professional Imaging for Microscopy, Axion Vision Real 4.8 (Zeiss®) por um único examinador "cego" e devidamente calibrado. As medidas foram obtidas em um círculo no centro da lâmina. A área foi padronizada pelo mesmo programa em 150.000 *pixels*, correspondendo à área de formação óssea da lâmina, de onde se obtiveram os valores de densitometria verde.

3 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As amostras foram analisadas após seleção das peças e sua fixação com formol 10% Merk. Em seguida, foram radiografadas com a utilização de dispositivo posicionador do paralelismo para radiologia (RIM). Para a realização das radiografias foi utilizado um aparelho de raios X Dabi Atlante 70 kV. As peças de 15, 30 e 60 dias foram dispostas de forma idêntica, posicionadas na mesma ordem a partir da saliência indicatória da parte frontal da película: de trás (haste do

dispositivo radiográfico) (Fig. 17 e 18) para a frente, todas na mesma ordem, de acordo com o protocolo cirúrgico do primeiro coelho operado. As amostras dos biomateriais foram colocadas perpendicularmente para que pudesse ser observado o ganho ou a perda óssea em altura. A densidade radiográfica (escala de cinza) da região de interesse (área circular de 5 mm de diâmetro) (Fig. 19 e 20) foi calculada utilizando o *software ImageJ 1.31 (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA)*. Obtidas 42 radiografias dos 6 grupos nos 3 períodos de tempo, após sua análise por observadores independentes as imagens foram digitalizadas e padronizadas em cor cinza, em uma escala de 8 bits, prevendo uma possível alteração de cor.

FIGURAS E LEGENDAS (Parte 2)

Fig. 1: Orthogen.

Fig. 2: Bio-Oss.

Fig. 3: PLGA.

Fig. 4: PLGA + HA.

Fig. 5: Incisão da fázia muscular.

Fig. 6: Espaçamento dos defeitos.

Fig. 7: Remoção do osso, 5 mm de diâmetro.

Fig. 8: Defeitos preenchidos com Bio-Oss, PLGA e Orthogen.

Fig. 9: Obtenção de osso com trefina.

Fig. 10: Osso autógeno triturado.

Fig. 11: Defeitos preenchidos com PLGA + HA, autógeno e coágulo.

Fig. 12: Sutura de primeiro plano com fio reabsorvível (Vicryl Ethicon).

Fig. 13: Sutura de segundo plano com fio não reabsorvível (Nylon Ethicon).

Fig. 14: Obtenção das amostras de 60 dias, fêmur direito e fêmur esquerdo.

Fig. 15: Amostras de 60 dias com Bio-Oss, Coágulo e Autógeno.

Fig. 16: Amostras de 60 dias com PLGA + HA, autógeno e coágulo.

Fig. 17: Dispositivo utilizado para tomada de radiografias.

Fig. 18: Posicionador do paralelismo.

Fig. 19: Radiografia de 60 dias do grupo Bio-Oss, PLGA e Orthogen.

Fig. 20: Radiografia de 60 dias do grupo PLGA + HA, osso autógeno e coágulo.

Fig. 1.



Fig. 2.



Fig.3.

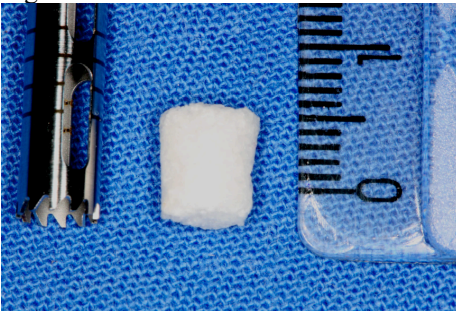


Fig. 4.

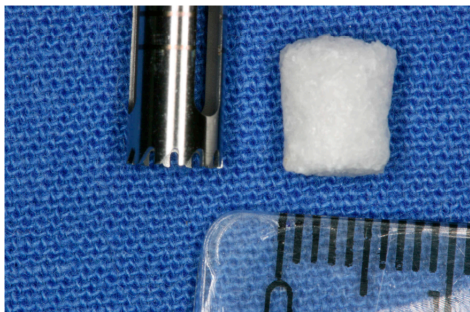


Fig. 5.

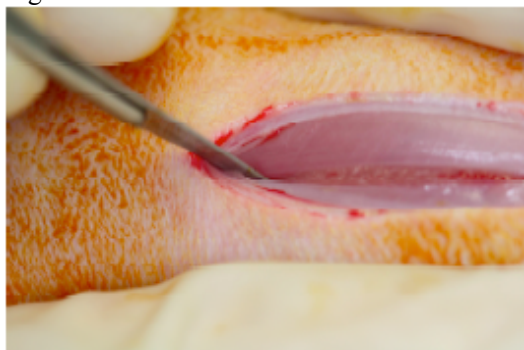


Fig. 6.

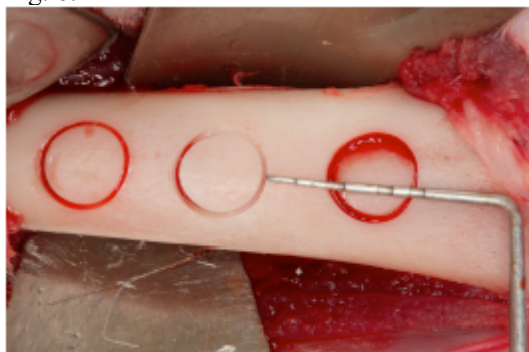


Fig. 7.

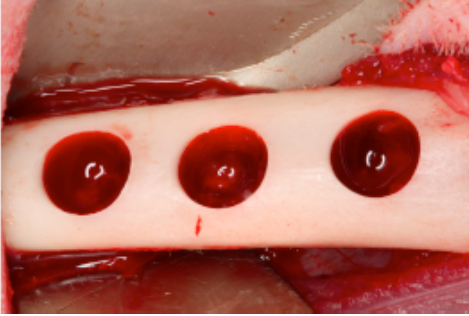


Fig. 8.

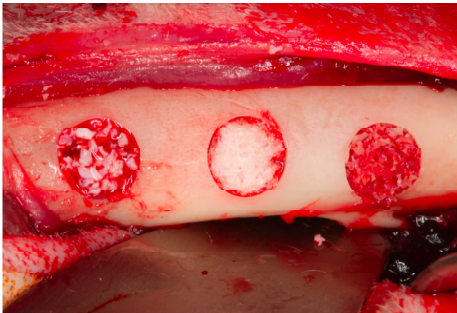


Fig. 9.



Fig. 10.

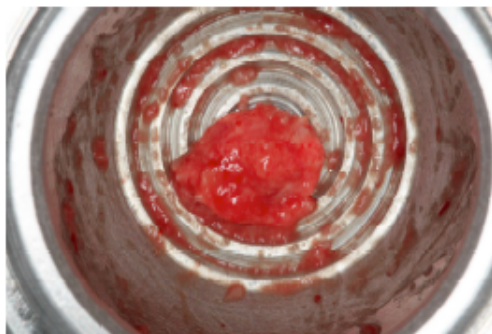


Fig. 11.



Fig 12.



Fig. 13.



Fig.14.

60

Diac



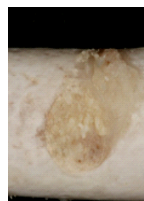
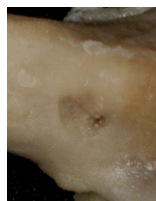
Fig. 15.



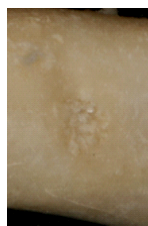
60
Esquerda

Dias

BIO-OSS



COÁGULO



AUTÓGENO

O



AUTÓGENO

Fig. 16.

60 Dias

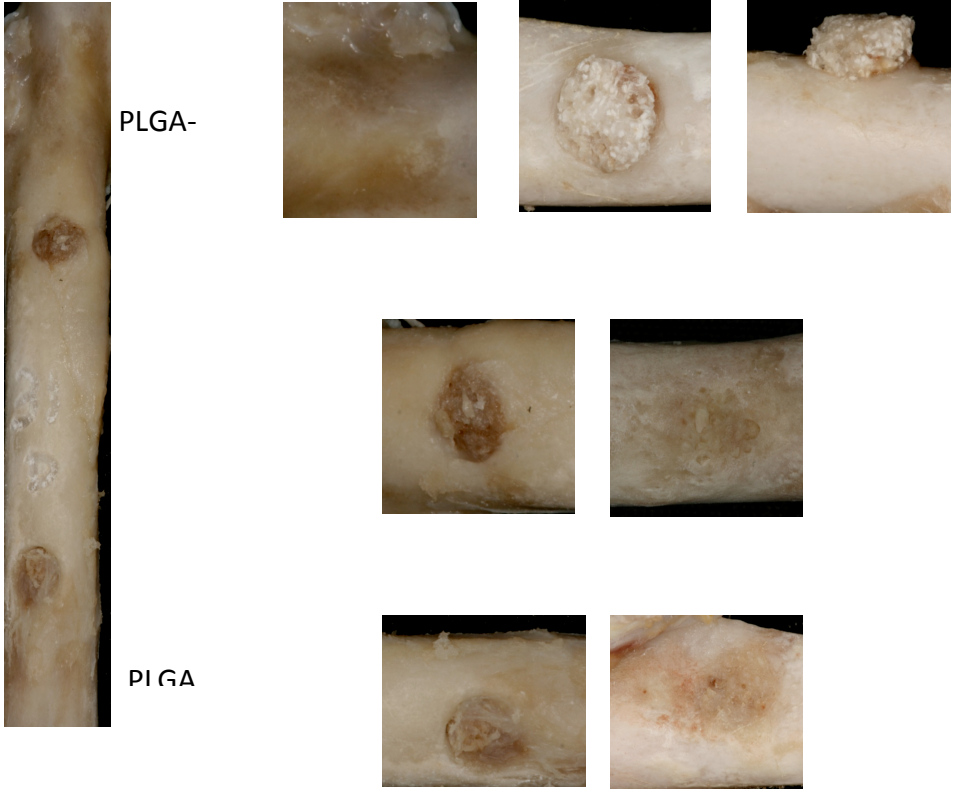


Fig. 17.
Fig. 18.

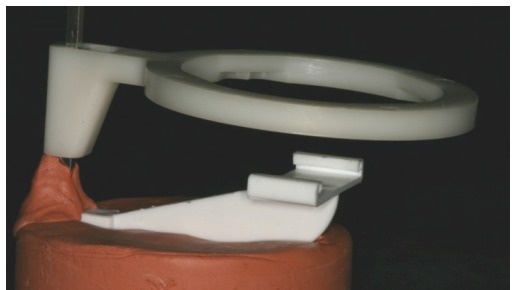


Fig. 19.

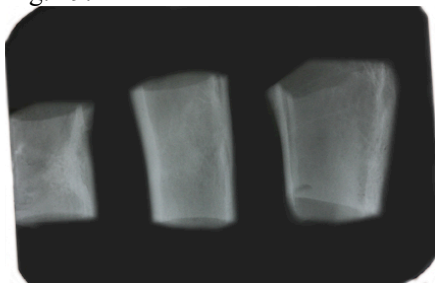


Fig. 20.

