

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

RICARDO HOCHHEIM NETO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA DE
DIFERENTES ARCABOUÇOS EM DEFEITOS
CONFECCIONADOS EM FÊMURES DE COELHOS**

**FLORIANÓPOLIS
2010**

RICARDO HOCHHEIM NETO

**ANÁLISE DE TESTES REGENERATIVOS DE DIFERENTES
ARCABOUÇOS EM FÊMURES DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Implantodontia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

**FLORIANÓPOLIS
2010**

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca Universitária da FURB

H685a

Hochheim Neto, Ricardo

Análise de testes regenerativos de diferentes arcabouços
em fêmures de coelhos / Ricardo Hochheim Neto. –
Florianópolis: 2010.

98 p. : il.

Orientador: Ricardo de Souza Magini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa
Catarina, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia

1. Implantodontia. 2. Estereologia. I. Magini, Ricardo
de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 617.69

RICARDO HOCHHEIM NETO

**ANÁLISE DE TESTES REGENERATIVOS DE DIFERENTES
ARCABOUÇOS EM FÊMURES DE COELHOS**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de maio de 2010.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti
Membro

Prof. Dr. André Luis Zétola
Membro

Prof. Dr. Ricardo Tramonte
Membro

Prof. Dr. Aguedo Aragones
Membro

Dedico este trabalho a meu pai que durante toda sua e minha vida, incluindo período em que cursei Odontologia na Universidade Federal de Santa Catarina, e após ter me formado, no convívio durante momentos de alegria e tristeza, e no período que atuamos conjuntamente em sua clínica se mostrando um grande mestre e amigo de enorme destreza e conhecimentos não somente profissionais, que cresceu a muitas pessoas com sua personalidade, honestidade e infinitos ensinamentos. Que Deus o tenha.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos a minha família. Meu irmão Günther Jr. que sempre serviu de exemplo e inspiração em meus afazeres, inclusive na escolha da profissão. Meus pais com extremo destaque por me trazerem ao mundo e pela educação e exemplos proporcionados. Minha mãe Renildes ao se formar em Farmácia, na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Santa Catarina já em 1958, pela dedicação no decorrer da pesquisa com grande apoio e incentivo, e meu pai Günther em Odontologia na mesma faculdade em 1957, e que me iniciou na minha profissão em 1981, como grande mestre de grandes conhecimentos. Meus avós, paterno e materno, Ricardo Hochheim Sobrinho e Beno Baltazar Wiedercker, já odontólogos formados pelas escolas politécnicas de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que geraram respectivamente a Universidade Federal de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, por momentos de contato com a profissão já durante a infância.

Aos funcionários do CEPID (Dolores, Gisella e Mirian), pelo convívio, dedicação e amizade. A secretaria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Ana pela educação, competência e sempre pronto atendimento. As queridas amigas Neli e Elizia, Biólogas do Laboratório de Patologia da Universidade Regional de Blumenau, responsáveis pelo trabalho de confecção das lâminas histológicas, sob orientação do professor Doutor Ricardo Tramonte, grande personalidade, já meu mestre no período da graduação pela amizade e auxílio na orientação para confecção e interpretação do trabalho histológico e resultados do trabalho científico.

Ao Dr. Aguedo Aragonés por todas as oportunidades e fornecimento de três biomateriais utilizados nesta pesquisa.

Aos colegas de Doutorado, Cleide, Aline, João Rodrigo e César (Co-Orientador), todos de capacidade indiscutível, pelo ótimo convívio, amizade e colaboração mútua.

Aos professores do curso pela sua dedicação.

Nosso coordenador, Doutor Antonio Carlos Cardoso pela sua capacidade, competência, organização, reconhecimento e conhecimentos transmitidos tanto nas áreas de Oclusão e Prótese, como na Implantodontia.

Meu orientador Ricardo de Souza Magini, como amigo sempre muito humano com sua visão na escolha de seus discípulos e temas a

serem abordados, provando sua inteligência com seu sucesso profissional, servindo de exemplo e inspiração a todos que o cercam.

Aos amigos Scarso, Dinato e Zétola pelos vastos ensinamentos.

Aos colegas Mestrados, Gustavo, Pamela, Ernesto, João, Niltom, Leonardo, Zé e Armando pela amizade, companheirismo e auxílio no trabalho.

A amiga Norma, funcionária da FURB colaborando em nossa tese na radiologia.

HOCHHEIM NETO, Ricardo. **Análise de testes regenerativos com diferentes arcabouços em fêmures de coelhos**. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar histologicamente a influência de: dois enxertos ósseos bovinos, Orthogen (Baumer) e Bio-Oss®; dois polímeros compostos, PLGA (Boehringer Ingelheim) e PLGA+HA, (HA Genius-Baumer), osso autógeno e controle negativo de coágulo, relacionando-os a presença de tecido inflamatório, materiais de enxerto, osso neofformatado, tecidos conjuntivos e adiposos. **Materiais e métodos:** 21 coelhos da raça Nova Zelândia foram utilizados neste trabalho. Cada animal recebeu 6 enxertos sendo dois grupos de controle colocados no fêmur direito e esquerdo. Os coelhos sofreram eutanásia em 3 etapas nos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. As amostras retiradas dos animais foram processadas para microscopia óptica e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). A análise quantitativa foi feita em cortes nas lâminas seguindo o procedimento para análises esterrológicas segundo os parâmetros estipulados por Mandarin-de-Lacerda (2003). Os resultados obtidos pela metodologia empregada indicaram que a regeneração óssea dos enxertos empregados foram superiores quando comparados ao coágulo. **Conclusão:** Todos os substitutos ósseos tiveram melhor resultado em relação ao controle negativo.

Palavras-chave: Engenharia tecidual óssea. Enxertos Heterógenos. Enxertos Poliméricos. PLGA. Hidroxiapatita. Estereologia.

HOCHHEIM NETO, Ricardo. **Comparative analysis of regenerative tests which different scaffolds on rabbit's femurs**. 2010. 98 p. Thesis (Doctorate in Dentistry) - Postgraduate Program of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

ABSTRACT

Purpose: The goal of this investigation was to evaluate the histological influences of two bovine bone grafts, Orthogen and Bio-Oss[®], two composite polymers, PLGA and PLGA+HA (HA-Genius-Baumer), autogenous and negative control clot, in relation of inflammatory tissue, graft tissue, neo formatted bone, conjunctive and adipose tissues. **Materials and methods:** one animal sample of 21 rabbits from the New Zealand breed was used. Each animal received 6 grafts, 2 groups control placed in the right and left femurs. The rabbits were divided in 3 groups and 15, 30 and 60 days for euthanasia. The samples were processed through the hematoxylin and eosin (he) technique. Quantitative analysis was made in blades with stereology according Mandarin of Lacerda (2003). **Results:** We showed with this methodology high bone regeneration in all grafted area compared to coagulum defects. **Conclusion:** All bone substitutes and autogenous bone had the best result compared with negative control.

Keywords: Bone tissue engineering. Xenogenous. Grafts. Polimeric Grafts. PLGA. Hydroxyapatite. Stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Osso Xenógeno (Orthogen Baumer)	41
Figura 02 - Bio-Oss®	41
Figura 03 - Arcabouço PLGA vista lateral	42
Figura 04 - Arcabouço de PLGA+HA vista lateral	42
Figura 05 - Arcabouço PLGA compatível com o diâmetro da trefina (5 mm)	43
Figura 06 - Equipe cirúrgica da pós-graduação em odontologia (Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes dentários da UFSC)	44
Figura 07 - Desinfecção e Incisão cutânea	45
Figura 08 - Incisão da fáscia muscular	45
Figura 09 - Exposição do periósteo e acesso direto a estrutura óssea	46
Figura 10 - Localização da primeira perfuração	46
Figura 11 - Espaçamento dos defeitos	47
Figura 12 - Remoção da estrutura óssea com 5 mm de profundidade e 5 mm de diâmetro	48
Figura 13 - Primeiro defeito direito preenchido com Bio-Oss®	48
Figura 14 - Inserção do PLGA no defeito direito	49
Figura 15 - Segundo defeito direito preenchido com PLGA	49
Figura 16 - Preenchimento do terceiro defeito com Orthogen	50
Figura 17 - Obtenção de osso autógeno através de broca trefina	50
Figura 18 - Amostra de enxerto autógeno trefinado	51
Figura 19 - Obtenção de todas as amostras de enxerto autógeno	51
Figura 20 - Triturador de osso	52
Figura 21 - Osso autógeno triturado	52
Figura 22 - Primeiro defeito esquerdo (inserção do arcabouço de PLGA+HA)	53
Figura 23 - PLGA+HA inserido	53
Figura 24 - Segundo defeito esquerdo (inserção de osso autógeno triturado)	54
Figura 25 - Enxerto autógeno instalado	54
Figura 26 - Terceiro defeito esquerdo (alvéolo com preservação de coágulo)	55
Figura 27 - Sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon)	55
Figura 28 - Sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon)	56
Figura 29 - Sutura do segundo plano com fio não absorvível (Nylon Ethicon)	56

Figuras 30 a 36 - Fêmur direito - 15 dias	59
Figuras 37 a 40 - Fêmur esquerdo -15 dias	60
Figuras 41 e 42 - Grupo de 30 dias direita e esquerda	61
Figuras 43 a 46 - Fêmur direito - 30 dias	62
Figuras 47 a 50 - Fêmur esquerdo - 30 dias	63
Figura 51 - Grupo de 60 dias direita e esquerda	64
Figuras 52 a 59 - Fêmur direito - 60 dias	65
Figuras 60 a 66 - Fêmur esquerdo - 60 dias	66
Figura 67 - Desenho da sequência de remoção das amostras indicando o sentido dos cortes realizados no micrótomo para obtenção das lâminas	67
Figura 68 - Desenho dos cortes microtométricos transversais aos cilindros das amostras	68
Figura 69 - Amostra da lâmina histológica	68
Figura 70 - Lâminas 15 dias (A com Régua e B com Grelha)	70
Figura 71 - Exemplo PLGA 15 dias	72
Figura 72 - Exemplo de Coágulo 30 dias (Osteócito)	73
Figura 73 - Exemplo de PLGA 30 dias	73
Figura 74 - Exemplo de PLGA+HA 30 dias	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - TI - QA em cm^2	75
Gráfico 2 - TI - QA em cm^2 - 15, 30 e 60 dias	75
Gráfico 3 - ME - QA em cm^2	76
Gráfico 4 - ME - QA em cm^2 - 15, 30 e 60 dias	77
Gráfico 5 - ON - QA em cm^2	78
Gráfico 6 - ON - QA em cm^2 - 15, 30 e 60 dias	78
Gráfico 7 - TC - QA em cm^2	79
Gráfico 8 - TC - QA em cm^2 - 15, 30 e 60 dias	80
Gráfico 9 - TA - QA em cm^2	81
Gráfico 10 - TA - QA em cm^2 - 15, 30 e 60 dias	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Somatório de perfis de Tecido Inflamatório em cm ²	74
Tabela 2 - Somatório de perfis de Material de Enxerto em cm ²	76
Tabela 3 - Somatório de perfis de Osso Neoformado em cm ²	77
Tabela 4 - Somatório de perfis de Tecido Conjuntivo em cm ²	79
Tabela 5 - Somatório de perfis de Tecido Adiposo em cm ²	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD-i	Densidade Óssea Peri-implantar
BIC	Contato Osso-Implante
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
cm	Centímetro
CO ₂	Gás Carbônico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Food and Drug Administration
GF/PL	Conformação Gasosa e Partículas por Lixiviação
GPC	Permeação Cromatográfica Gel
H ₂ O	Água
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
HCAEC	Células Endoteliais da Artéria Coronária de Humanos
hESCs	Células Mesenquimais Indiferenciadas de Embriões Humanos
hPBDs	Células Derivadas de Osso Humano Primário
ISO	International Standardization for Organization
KCL	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
µm	Micrometro
m/m	Massa por Massa
m/v	Massa por Volume
ME	Material de Enxerto
MET ou TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV ou SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
mm	Milímetro
MTT	Teste de Citotoxicidade
NHA	Hidroxiapatita Nanoparticulada
non-HA	Hidroxiapatita Nanoparticulada
ON	Osso Neoformado
PCL	Poli(ε-caprolactona)
OC-hESCs	Células Osteogênicas Derivadas de Células Mesenquimais Indiferenciadas de Seres Humanos
PDLLA	Poli(ácido DL-láctico)
PGA	Poliácido Glicólico
PLA	Poliácido Láctico

PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLLA	Poli(ácido L-láctico)
POE	Poliortoésteres
PTFE	Politetrafluoretileno
PVA	Poliálcool Vinílico
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
QA	Densidade de Perfis
rhBMP-2	Proteína Óssea Morfogenética Humana Recombinante
RPM	Rotação Por Minuto
SC/EL	Método eg-somatória de Solvente e Partículas
GF/PL	Técnica de Conformação Gasosa por Lixiviação
TA	Tecido Adiposo
TC	Tecido Conjuntivo
TCP	Fosfato Tricálcio
TI	Tecido Inflamatório
TPS	Spray de Plasma de Titânio
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	43
4.2	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	66
4.3	DENSIDADES DE PERFIS NA ÁREA-TESTE (QA) EM ESTEREOLOGIA	70
4.3.1	Cálculo da Densidade de Perfis	71
5	RESULTADOS	72
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

A possibilidade de recuperação de defeitos ósseos há muito tempo desperta o interesse dos pesquisadores em desenvolverem materiais que possam apresentar características biológicas aceitáveis e serem usados como substitutos dos tecidos ósseos. De uma maneira geral, o enxerto autógeno é o material ideal de preenchimento de defeitos ósseos, visto o potencial osteogênico que o mesmo apresenta, no entanto, nem sempre a utilização desse material é viável. Para coleta de osso autógeno há necessidade de procedimentos cirúrgicos com variados graus de morbidade, sendo este coletado do osso ilíaco, tíbia, ramo ascendente da mandíbula, calvária ou mento, necessitando muitas vezes de anestesia geral (BRANEMARK; SVENSSON; VAN STEENBERGHE, 1995).

A cirurgia de enxerto ósseo reconstrutiva do esqueleto maxilofacial é apropriada para ser usada na reabilitação funcional da maxila, e pode ser usada para reparar defeitos traumáticos, atróficos ou congênitos (JENSEN; SINDET-PEDERSEN; ENEMARK, 1998).

O enxerto de ossos é realizado para colocar implantes endósseos em pacientes com defeitos maxilares resultantes de ressecamento tumoral ou em pacientes com séria reabsorção óssea do processo alveolar maxilar (DARLE, 1999 apud HOCHHEIM NETO, 2002).

A instalação de implantes para reabilitação protética na maxila em pacientes com extensiva perda óssea e de tecidos moles é ainda um desafio. Frequentemente, estes pacientes seriam idealmente tratados com enxertos aposicionais ou levantamento do assoalho do seio maxilar e ou nasais (SCHRAMM et al., 1999; TRIPLETT; SCHOW; LASKIN, 2000; WEISCHER; SCHETTLER; MOHR, 1997).

Neste contexto, em função da necessidade de reabilitar pacientes totalmente edêntulos, foram desenvolvidos os implantes odontológicos. Tal empreitada obteve tamanho índice de sucesso que com o decorrer dos anos fez surgir uma especialidade na área odontológica, sucedendo-se alternativas de reabilitações parciais, unitárias, etc. Assim sendo, devido ao alto índice de sucesso seu uso nos tratamentos de próteses unitárias, parciais fixas, pacientes edentados totais, fissurados palatais e submetidos à hemimaxilectomias, promove o restabelecimento das funções do sistema estomatognático como estética, fonética, função mastigatória e condição emocional do paciente. Em função da polêmica em relação aos enxertos em seios maxilares, a alta porcentagem de insucesso e da necessidade da obturação de comunicações bucossinusais

o Professor Per Ingvar Branemark e sua equipe desenvolveram o implante zigomático, e o primeiro paciente foi tratado no ano de 1989. Estes implantes foram desenvolvidos com finalidade de ancoragem no osso zigomático para solução em reabilitações orais em ressecções de maxilas e fissurados palatinos, sendo atualmente aplicadas nas maxilas posteriores atrésicas (HOCHHEIM NETO, 2002).

Estes obstáculos encontrados pela implantodontia têm feito com que pesquisadores procurem alternativas para minimizar o trauma para resolução de determinados casos. Entre as técnicas atuais podemos citar os osteótomos de Summers, distração óssea, fatores de crescimento ósseo, plasma enriquecido, materiais aloplásticos modernos associados a membranas lentamente absorvíveis e as novas superfícies dos implantes (TRIPLETT; SCHOW; LASKIN, 2000).

A base de uma reabilitação oral com implantes dentários representa uma presença óssea suficiente nas dimensões horizontal como vertical. Nisso, parece evidente que exatamente a manutenção do osso maxilar depois da extração dentária no âmbito de um atendimento imediato da ferida de extração merece uma consideração central. Uma compensação de processos de atrofia, que se instalam regularmente no decorrer da regeneração óssea dinâmica dos alvéolos pós-extração, possibilitaria uma inserção de implante mais simples, e com isso, mais previsível, sem a necessidade de processos adicionais de terapia reconstrutiva. Isso é especialmente importante com respeito à duração da terapia, mas também com relação à estética e a carga mastigatória para o paciente (ROTHAMEL et al., 2007).

A reabsorção óssea ao redor dos dentes resulta em perda dentária, criando uma situação comprometedora para restauração de implantes osseointegrados. Enxerto ósseo é um procedimento cirúrgico comum desenvolvido para regenerar o rebordo alveolar. O enxerto ósseo autógeno é considerado “Padrão ouro” para enxerto em defeitos ósseos orais. Um material de enxerto ideal tem que favorecer a produção de osso por meios viáveis de osteoblastos transplantados, pela osteoindução de células mesenquimais, ou por osseocondução pela superfície celular. Isso matém o osso maduro no decorer do tempo sem perda de função e evita ao mínimo o risco de infecção e antigenicidade. Deve ter a capacidade de incorporar dentro do osso sadio e estar disponível em grande quantidade. Futuramente estas estruturas terão que estabilizar implantes (AGHALOO; MOY; FREYMILLER, 2004).

A previsibilidade dos implantes universalizou a osseointegração para o tratamento dos edêntulos totais, parciais e unitários. Todavia, os procedimentos cirúrgicos pré-implantes, frequentemente, são

necessários para permitir o posicionamento ideal (estética e função) e o comprimento e diâmetro adequados dos implantes. Logo, o planejamento reverso é imprescindível para visualizar a exigência da reconstrução (vertical e horizontal) de maxilares atroficos (MAGINI; GOMES JUNIOR, 2007).

Métodos diversos são utilizados para essa finalidade, tais como: enxertos ósseos (por meio da osteogênese, osteoindução e osteocondução); substitutos de enxertos ósseos (por meio de osteoindução e/ou osteocondução); regeneração óssea guiada (utilização de membranas para exclusão tecidual, estabilização do coágulo e manutenção do espaço, com conseqüente neoformação óssea); e distração osteogênica (tração lenta e contínua de fragmento ósseo fraturado cirurgicamente) (MAGINI; GOMES JUNIOR, 2007).

Desde a década de 60, implantes temporários, confeccionados de polímeros biorreabsorvíveis, ganharam uma importância crescente na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas, *stents* e dispositivos ortopédicos. Atualmente fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro (STARES, 2007; VALIMAA; LAAKSOVIRTA, 2004).

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas (ROSENBERG et al., 2006; STARES, 2007).

O uso de polímeros bioabsorvíveis como o material de sutura iniciou aproximadamente 50 anos atrás. O ácido poliglicólico (PGA) tem sido usado mundo afora como material de sutura biodegradável desde 1970 (MÄKELÄ et al., 2008).

Com relação à dimensão dos poros, Hulbert et al. (1970) demonstrou inicialmente que poros interconectados com diâmetro mínimo de 100 μm eram necessários para o crescimento adequado do osso. O mesmo concluiu que tamanhos menores de poros permitiriam a mineralização incompleta do tecido infiltrado (STARES, 2007).

Diversos tipos de biomateriais, sejam de origem biológica ou sintética, vêm sendo utilizados na prática da bioengenharia tecidual com finalidades de regeneração ou formação de novos tecidos. A bioengenharia tecidual compila conhecimentos de grandes áreas da ciência como a biologia, medicina e engenharia. Os biomateriais escolhidos para tal prática devem estimular a adesão, diferenciação e proliferação celular, e ainda promover a produção de moléculas específicas do tecido em questão. Vários destes biomateriais se encontram em testes em diferentes estágios, enquanto outros estão

liberados para uso clínico, por exemplo, os implantes para usos ortopédicos e odontológicos (ANDRADE; DOMINGUES, 2006; STARES, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A presente pesquisa tem o propósito de testar arcabouços de copolímero de PLGA+HA, PLGA, dois ossos xenógenos (Orthogen-Baumer[®], BIO-OSS[®]), osso autógeno (Padrão Ouro) e Coágulo. Estes foram analisados histologicamente com Microscopia Óptica após instalação em fêmures de coelhos Nova Zelândia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Apresentar resultado de exame histomorfométrico (Microscopia Óptica) com avaliação estereológica das amostras e compará-las com o grupo controle no seguinte quesito:

- a) Avaliação da Densidade de Perfis de cada um dos elementos presentes dentro da área do enxerto (QA) segundo os princípios de Cavalieri citados por Mandarin-de-Lacerda. Foram observadas as seguintes estruturas retiradas do centro das amostras:
 - Tecido inflamatório;
 - Materiais enxertados;
 - Osso neoformado;
 - Tecido conjuntivo;
 - Tecido adiposo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os polímeros sintéticos biorreabsorvíveis encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros. Os mesmos são aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA). Um material conveniente para implantes ósseos seria aquele que funciona como suporte para o crescimento tecidual, além de favorecer a migração das células da borda de um defeito em direção ao implante, sustentando o crescimento celular. Destes polímeros sintéticos biorreabsorvíveis o PLA tem um tempo médio de degradação de 6 a 12 meses, e o PGA de 1 a 2 meses (ATTAWIA; HERBERT; LAURENCIN, 1995 apud STARES, 2007).

Polímeros bioabsorvíveis de poli(α -hidroxila) ácidos, como por exemplo, polilactida ou poliglicolida, podem apresentar estabilidades diferentes conforme sua espessura, estrutura e composição química (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; KOHAL et al., 1998).

Esse copolímero no formato de suportes porosos apresentou respostas de células osteoblásticas que o mostram como material conveniente para aplicações em tecido ósseo (ISHAUG et al., 1997, ISHAUG-RILEY et al., 1998).

Peter e colaboradores (1998) descrevem um compósito formado de partículas de PLGA moídas e moldadas por compressão com partículas de hidroxiapatita (HA) o qual aumentou a resistência à compressão do material compósito.

O trabalho “análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos” teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade de blocos de enxerto de osso bovino esponjoso acelular e desmineralizado (GenOx[®], Baumer S.A.). Um bloco cilíndrico (5x12 mm) de material de enxerto foi implantado em músculo abdutor da coxa de 30 ratos, sendo os animais sacrificados 3, 7, 14, 21 e 28 dias (n=6) após as cirurgias. Após a tomada das radiografias, as peças foram removidas para o processamento histológico. A análise histológica mostrou que nos períodos de 3 e 7 dias foi evidenciado um processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de neutrófilos, reabsorção do coágulo sanguíneo e angiogênese. Entre 14 e 21 dias,

verificou-se a reabsorção da matriz implantada por células mononucleadas, raras células gigantes e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso rico em vasos e células. Aos 28 dias, na maioria dos casos, observaram-se apenas pequenos fragmentos de matriz implantada envoltos por tecido conjuntivo característico da região. Radiograficamente não se notou evidências de mineralização. Com base nos resultados obtidos concluíram que o enxerto de matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco é biocompatível quando implantado em tecido conjuntivo intramuscular de ratos, sendo absorvido e substituído por tecido conjuntivo característico da região, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica (SANADA et al., 2003).

Estudos efetuados por longo período de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (KAWACHI et al., 2000 apud STARES, 2007).

O material precisa ainda ser capaz de reproduzir síntese para garantir formato consistente no final; deve ser versátil para uma variedade de técnicas de processamento de polímeros; deve reter resistência suficiente em todo o tempo para ser efetivo na terapia clínica; durante o período em que o material está no organismo, ele não deve sustentar reações inflamatórias ou resposta a corpo estranho que necessitem sua remoção; deve ser completamente reabsorvido sem deixar evidências histológicas de resíduos; e além da reabsorção completa do material ele deve ser pequeno, para que sua presença no organismo seja neutra (PIETRZAK; SARVER; VERSTYNNEN, 1996).

As diferenças no metabolismo final dos polímeros são relativamente desprezíveis, mas as taxas de degradação variam. O critério geral para a seleção de um polímero para uso como biomaterial é comparar as propriedades mecânicas e o tempo de degradação necessário após a implantação. O polímero ideal para uma aplicação deve ter as seguintes propriedades: não provocar resposta inflamatória ou tóxica desproporcional ao efeito benéfico; ser metabolizado no organismo após ter efetuado seu propósito sem deixar resquícios; ser facilmente processado na forma final do produto; e ser facilmente esterelizado (MIDDLETON; TIPTON, 2000).

Mecanicamente a reabsorção ocorre em duas fases: Primeiramente a água infiltra o polímero e ataca as cadeias do polímero, causando divisão da cadeia via hidrólise. Isto geralmente ocorre *in vivo*,

independentemente da atividade enzimática. Fatores que afetam a acessibilidade da água ao polímero podem ter significativo efeito na reabsorção. O processo de degradação primária é mediado pela hidrólise. Assim, os produtos da quebra devem ser solúveis em água, para que as altas concentrações destes produtos possam se difundir. Segundo, como a massa do polímero perde a forma e consistência devido à redução do peso molecular podendo formar partículas que podem ser fagocitadas pelos macrófagos. A última digestão celular (via macrófagos) dos produtos quebrados deve ocorrer juntamente com os caminhos estabelecidos dentro da célula para que o produto final da oxidação ocorra naturalmente, assim como água e dióxido de carbono, os quais são excretados pelos rins e pulmões (BUCHOLZ et al., 1994).

As taxas de degradação e o grau de reação a corpo estranho são determinados pelo peso molecular inicial e composição química do material. Quando uma célula viva entra em contato com um biomaterial, ela responde de uma maneira específica que é determinada pela natureza física da superfície do material e pelo ambiente local. A natureza da resposta celular decidirá se o implante será encapsulado com tecido fibroso, ou se iniciará o crescimento ósseo. Existem quatro possíveis respostas que podem ocorrer: morte do tecido (material tóxico), formação de tecido fibroso (material inerte), formação interfacial de osso (material bioativo) ou reposição por tecido circunvizinho (material biodegradável) (AN et al., 1994 apud STARES, 2007; DI SILVIO; DALBY; BONFIELD, 2002).

Os poli(α -hidróxi ácidos), em especial o PLA, PGA e seus copolímeros são frequentemente usados para a fabricação de dispositivos biorreabsorvíveis em reparos de tecidos moles e duros. Biodegradabilidade e bioatividade são combinações desejáveis para um biomaterial otimizado. Os materiais compósitos oferecem uma vantagem excepcional e permitem o desenvolvimento de implantes biorreabsorvíveis e bioativos com propriedades físicas e mecânicas otimizadas. Além disso, os materiais compósitos podem ser projetados de tal maneira que sua taxa de reabsorção combine com a taxa de formação do tecido novo. Atualmente, partículas de HA e TCP são combinadas com arcabouços porosos de polímeros biodegradáveis como enxertos em reparos ósseos (ROETHER et al., 2002).

Sanada e colaboradores, em 2003, fizeram análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de blocos de enxerto de osso bovino esponjoso acelular e desmineralizado (GenOx[®],

Baumer S.A.). Um bloco cilíndrico (5x12 mm) de material de enxerto foi implantado em músculo abductor da coxa de 30 ratos, sendo os animais sacrificados 3, 7, 14, 21 e 28 dias (n=6) após as cirurgias. Após a tomada das radiografias, as peças foram removidas para o processamento histológico. A análise histológica mostrou que nos períodos de 3 e 7 dias foi evidenciado um processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de neutrófilos, reabsorção do coágulo sanguíneo e angiogênese. Entre 14 e 21 dias, verificou-se a reabsorção da matriz implantada por células mononucleadas, raras células gigantes e sua substituição por tecido conjuntivo fibroso rico em vasos e células. Aos 28 dias, na maioria dos casos, observaram-se apenas pequenos fragmentos de matriz implantada envolto por tecido conjuntivo característico da região. Radiograficamente não se notou evidências de mineralização. Com base nos resultados obtidos concluíram que o enxerto de matriz de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco é biocompatível quando implantado em tecido conjuntivo intramuscular de ratos, sendo absorvido e substituído por tecido conjuntivo característico da região, sem qualquer indício de ocorrência de osteogênese ectópica.

Rossi, Weinfeld e Miranda (2005) pesquisaram enxerto de osso bovino tipo “cone alveolar” em alvéolos de humanos. Os autores avaliaram a eficácia do osso bovino do tipo “cone alveolar” na estimulação da neoformação óssea em alvéolos dentários de humanos. Foram executadas 15 exodontias, com enxertia do osso bovino nos alvéolos envolvidos. Realizaram dois tipos de avaliações radiográficas da região enxertada com auxílio da computação: mensuração entre dois pontos determinados e histograma dos valores da densidade óptica a cada mês até completar 6 meses. Decorrido esse período, os alvéolos foram reabertos e o conteúdo da porção central colhido para ser submetido a estudo histológico. Verificou-se que no período de 6 meses a matriz mineral bovina apresentou-se sem vitalidade, radiograficamente sua densidade óptica não comprovou a neoformação óssea e, por meio de mensuração entre dois pontos, não ocorreu reabsorção óssea alveolar estatisticamente significante. Esses fatos não comprovaram a eficiência do uso do enxerto para melhorar o leito receptor de futuro implante. Utilizaram análise de variância por postos de Friedman. Foi constatada pequena diminuição na altura, porém, não houve diferença significante entre os períodos estudados.

Os materiais compósitos sólidos são os quais contém dois ou mais materiais constituintes distintos. Os materiais bioabsorvíveis mais comumente utilizados em técnicas de reparo ósseo incluem o poliácido

lático (PLA) e o poliácido glicólico (PGA) e seus copolímeros (PARK; BRONZINO, 2003 apud STARES, 2007; PYLES, 2003).

Weï e Ma (2004) investigaram um novo compósito formado de nanopartículas de HA incorporados em arcabouços porosos de PLLA usando técnicas de separação de fase induzidas termicamente para o uso na liberação de BMPs. Os mesmos demonstraram que as nanopartículas de HA foram incorporadas com sucesso nos arcabouços de PLLA. A incorporação das nanopartículas de HA melhorou as propriedades mecânicas e a adsorção de proteínas.

Segundo Rossi, Weinfeld e Miranda (2005) a atrofia fisiológica do rebordo alveolar decorrente de perdas dentárias é progressiva e irreversível, constituindo problema de difícil solução para a reconstrução protética e para a instalação de implantes osseointegrados. Assim, várias soluções têm sido propostas para reconstrução do osso perdido, como o uso de enxertos ósseos autógenos, substitutos ósseos alógenos, enxertos xenógenos, enxertos aloplásticos, regeneração óssea guiada, distração osteogênica, fatores de crescimento e combinações dessas alternativas. Estudos clínicos e experimentais prévios demonstraram a eficácia da osteointegração entre tecido ósseo do hospedeiro e o tecido ósseo enxertado em cirurgias maxilofaciais em humanos, em coelhos, em cães, em ratos e em macacos. Dentre os vários materiais existentes de origem bovina, o “cone alveolar” é considerado um material de enxerto xenógeno anorgânico com propriedades osteocondutoras, que funcionaria como um arcabouço para permitir o crescimento de capilares, de tecido perivascular e de células osteoprogenitoras oriundas do leito receptor 5, sendo indicado na preservação da dimensão óssea da crista alveolar para uma posterior reabilitação com implantes osseointegrados.

Com o objetivo de acelerar a cura de um defeito pode-se cultivar células ósseas sobre o suporte de biomaterial, sem que seja preciso, assim, esperar o tempo de migração de células osteoblásticas na região de implante. Além disso, deve apresentar propriedades mecânicas similares ao tecido ósseo, ser osteoindutivo e osteocondutivo a fim de sustentar e induzir a formação de um neotecido ósseo e osteointegrativo para que haja uma boa fixação biológica do suporte com o osso (LEONG; JIANG; LU, 2006).

A obtenção de um biomaterial que atraia interesse para ser usado como substituto ósseo deve ter características tais como, gerar uma resposta inflamatória mínima (biocompatibilidade) e ser degradado pelo organismo (biodegradabilidade) (KUMARASURIYAR et al., 2005).

Dall'Antonia et al. (2006) comentaram a observância considerável do desenvolvimento tecnológico dos biomateriais e importância da evolução dos métodos e conhecimentos da fisiologia óssea. Desta forma, tornou-se possível influenciar seletivamente a formação óssea, controlando a qualidade e a quantidade de osso no interior das estruturas bucais. Entretanto, a pesquisa sobre material de implante ideal para substituição do enxerto ósseo autógeno ainda persiste como um dos grandes desafios da odontologia moderna.

Três são as estratégias utilizadas para este fim: a condução, o transplante de células e/ou tecidos e a indução na diferenciação celular. No método de transplante de células o veículo não só transporta as células ou tecido como serve de guia para o crescimento de novo tecido. E no método de indução emprega o arcaço para transporte e sustentação de proteínas indutivas (KAIGLER; MOONEY, 2001).

Ekholm e colaboradores, em 2006, efetuaram estudo histológico e imuno-histoquímico da reação de tecidos a poliortoésteres sólidos em coelhos. Em muitos casos apenas a presença temporária de um biomaterial é necessária no suporte, aumento ou reposição tecidual. Nesses casos materiais biodegradáveis são melhores alternativas que os bioestáveis. Atualmente, polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados no campo da cirurgia bucomaxilofacial em suturas, artifícios de fixação de fraturas e membranas absorvíveis. Os polímeros mais frequentes utilizados são os poliésteres alifáticos, como ácido poliglicólico (PGA) e polilático (PLA). Poliortoéster é a superfície erosionada do polímero que vem sendo desenvolvida desde 1970, mas é usada somente em sistemas com formas semissólidas para liberação de drogas. O intuito desse estudo foi a evolução da reação de tecidos a poliortoésteres (POE) sólidos histologicamente e imuno-histoquimicamente. Tempo de reabsorção e efeito de dois diferentes métodos de esterilização (radiação gama e óxido etileno) em relação à reabsorção também foram avaliados. O material foi introduzido na tíbia e subcutaneamente no ramo mandibular em 24 coelhos. O acompanhamento foi feito em 1-10, 14 e 24 semanas. Estudos histológicos mostraram que POE induzem uma inflamação moderada aos tecidos ósseos e moles. Em 24 semanas a inflamação foi suave em tecidos moles e moderada na estrutura óssea. Nos estudos imuno-histoquímicos nenhuma grande camada fluorescente de tenascina e fibronectina foi achada adjacente ao implante. A reabsorção das rodas foi mais rápida quando esterilizada com raios gama do que com gás óxido de etileno. A reabsorção completa foi além de 24 semanas em ambos os grupos. Clinicamente a cicatrização foi diferenciada e os

implantes foram bem tolerados pelo tecido vivo. Isto encorajou os autores a continuarem estudos com este interessante novo material para encontrar uma resposta ideal para o preenchimento ósseo e fixação de fraturas.

A construção de arcabouços tridimensionais de polímeros biodegradáveis por vapor solvente baseados em adesão celular foi estudada por Ryu et al. (2007), tornando-se importante para controlar o crescimento com arcabouços artificiais. Tecidos com a pele, vasos sanguíneos e cartilagem possuem multileitos estruturais com diferentes células em cada conteúdo. Com o artifício tecnológico de microfabricação um método modelo de arcabouço para polímeros biodegradáveis como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e o copolímero polilático-co-glicólico (PLGA) foi desenvolvido para construir arcabouços micronanométricos. O método enfatiza interconexões microfluidas entre leitos com arcabouços e manutenção de alta resolução geométrica durante o processo de adesão para desenvolvimento dos mais variados tecidos. Micro-orifícios (10-100 μm), microfluidos e microcavitados são todos criados por micromodelagem e adesão baseada por vapor solvente de leitos micromodelados preservando estruturas de tamanhos necessários. Amostras de arcabouços são construídas com propósitos de canais direcionados para crescimento de células com tamanhos de necessidade específica. Além disso, extensões destas técnicas para criar trabalhos microvasculares com entreleitos são possíveis. Cultivando células endoteliais da artéria coronária de humanos (HCAECs) em amostras de arcabouços, demonstraram a biocompatibilidade do desenvolvimento do processo e a grande influência da alta resolução microgeométrica no crescimento de células endoteliais da artéria coronária de seres humanos (HCAECs).

O termo biorreabsorvível refere-se a dispositivos sólidos de materiais poliméricos que são passíveis de degradação pela diminuição da cadeia macromolecular, cujos subprodutos são reabsorvidos *in vivo*, isto é, eles são quebrados em moléculas que podem ser encaminhadas para rotas metabólicas. Assim sendo, o poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA é degradado pela quebra das ligações ésteres que produzem, como último subproduto, moléculas de ácido glicólico dirigidas ao ciclo de Krebs (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; MESSIAS et al., 2009; SANTOS JUNIOR.; WADA, 2007).

Num primeiro momento, os biomateriais eram criados com a intenção de gerarem o mínimo de resposta inflamatória ou imunológica, isto é, que eles fossem inertes. Porém, atualmente, buscam-se estratégias

que incentivam respostas teciduais favoráveis, como a proliferação e diferenciação de células de tecido lesado. O PLGA é largamente investigado como suporte para cultura de células. Suportes desse polímero foram capazes de sustentar adesão e proliferação de células osteoblásticas, bem como, a síntese de colágeno tipo I e a produção de matriz mineralizada (SANTOS JUNIOR; WADA, 2007 apud MESSIAS et al., 2009).

Diversos estudos mostram que suportes enriquecidos com hidroxiapatita crescem as funções de células osteoblásticas *in vitro*, tais como, crescimento celular e síntese de fosfatase alcalina (HUANG; MIAO, 2007; KIM et al., 2006).

Outros materiais que vêm recebendo atenção são: o Poliacido láctico, o poliacido glicólico, hidroxiapatita ou a mistura dos mesmos aos fatores de crescimento. Com intuito de suprir as limitações de técnica e tentar alcançar a excelência biológica do osso autógeno vem se empregando uma quantidade significativa de materiais aloplásticos (AL RUHAIMI, 2001).

A aplicabilidade desses materiais em organismos humanos depende de suas propriedades biológicas, químicas, físicas e mecânicas (ALIZADEH; MARGUSSI, 2002 apud CRUZ, 2004; BRANDA et al., 2002; COSTA et al., 2003).

Rothamel e colaboradores, em 2007, examinaram alterações dimensionais do osso maxilar depois do atendimento de feridas de extração com réplicas de raiz de β -TCP de encaixe exato em comparação com alvéolos não preenchidos. Num total de dez cães, foi colocada imediatamente depois da extração do primeiro pré-molar, uma réplica de raiz de encaixe perfeito de grânula de β -TCP reticulado de polilactida nos alvéolos. Alvéolos de extração não tratados no lado oposto serviam de controle *split-mouth*. Depois de três e seis meses, respectivamente, foram sacrificados cinco animais e os correspondentes setores maxilares examinados histológica e histomorfometricamente.

Rimondini e colaboradores utilizaram o método de injeção gasosa em 2005, realizando estudo experimental *in vivo* de regeneração óssea em defeitos críticos usando copolímero de PLA/PGA biodegradável. O assentamento foi feito em osso saudável padrão após implantação de PLA/PGA 50%/50% dispersado em solução aquosa de PGA e dextrano usando como substituto ósseo em modelo animal. Dois grupos de cinco coelhos foram usados. Em ambos os côndilos femurais foram realizados defeitos críticos de 6x10 mm. No lado direito PLA/PGA foi inserido, e no lado esquerdo permaneceu vazio, em 30 e 90 dias após a cirurgia os animais foram sacrificados. Os defeitos do lado esquerdo não

preenchidos mostraram uma cicatrização não espontânea após 30 e 90 dias. Concluíram que o copolímero de PLA/PGA em meio hidrossolúvel induz crescimento ósseo em defeitos críticos através de teste de Wilcoxon. Teste de Mann-Witney foi utilizado para comparação de mensurações entre os sítios e osso normal em 30 e 90 dias.

Têm-se verificado que a utilização do colágeno como carreador não é satisfatória, em decorrência da baixa resistência à pressão dos tecidos moles. Por sua vez, outros carreadores, como as hidroxiapatitas apresentam elevada resistência mecânica, todavia, ou não são absorvíveis ou o são em intervalos muito longos de tempo. Suportes porosos de hidroxiapatita são também muito estudados como biomaterial para engenharia de tecido ósseo atualmente, apresentando, porém, o inconveniente de possuírem propriedades mecânicas aquém das compatíveis com o osso. Materiais cerâmicos possuem alta fragilidade, além de serem difíceis de moldar. Por isso, aliando polímeros biodegradáveis em suportes enriquecidos com biocerâmica podem vencer tais limitações, criando compósitos altamente biocompatíveis. Os materiais baseados em fosfatos de cálcio, tais como, hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcio (TCP) e cimentos de fosfato de cálcio, têm atraído a atenção dos pesquisadores como biomaterial para a engenharia de tecido ósseo, graças à excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e taxas variadas de degradação, além de estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células osteoblásticas (HUANG; MIAO, 2007; MÜLLER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2005).

Soren Schou e colaboradores (2003b) estudaram a preparação da superfície do implante em tratamento cirúrgico experimental de peri-implantite, com enxerto de osso autógeno e membrana de politetrafluoretileno expandidas (PTFE) e avaliação estereológica em macacos cinomólogos. Os métodos foram jato de pó abrasivo único + ácido cítrico, jato de pó abrasivo único, gaze embebida em solução salina + ácido cítrico e gaze embebida alternativamente em clorexidine e solução salina:

- a) Unidade de ar pó abrasiva + ácido cítrico (Ap+Ci): a superfície do implante foi preparada com a mistura de bicarbonato de sódio (profjetdentisplay, USA), solução salina e ar por cinco minutos na unidade de ar pó abrasiva (cavitron) a uma distância de 1 mm, de acordo com a recomendação do fabricante. Finalmente a solução saturada de ácido cítrico em cotonetes foi aplicada por 2 minutos após vinte vezes irrigado com soro;

- b) Unidade de ar pó abrasiva (Ap): o mesmo procedimento descrito em “a” foi usado, porém, sem ácido cítrico. Consequentemente, a superfície do implante foi preparada pela unidade de ar pó abrasiva por 5 minutos e irrigada 20 vezes com solução salina;
- c) Gaze embebida em solução salina + ácido cítrico (Ci): a superfície do implante foi limpa por 5 minutos com gaze embebida em solução salina. O ácido cítrico foi então aplicado por 2 minutos seguido por 20 irrigações salinas;
- d) Alternativa de gaze embebida em clorexidine e solução salina (Ch): a superfície do implante foi limpa por 5 minutos por gaze embebida em clorexidine aquosa a 0,1% e solução salina, e finalmente irrigada alternativamente 20 vezes pela mesma solução. Todos os defeitos foram preenchidos com partículas de osso autógeno embebidas em sangue autógeno depois de confecção de múltiplas perfurações na superfície óssea.

Um total de 64 implantes com tratamento de superfície com *spray* de plasma de titânio (TPS) foi instalado em 8 macacos (*Macaca fascicularis*). Depois de um período de três meses com controle de placa, peri-implantite experimental foi induzida. A perda óssea de 4 a 6 mm foi estabilizada após 9 a 17 meses e o controle de placa foi reimplementado. Os defeitos peri-implantares foram cirurgicamente expostos, o tecido de granulação foi removido, e cada superfície implantar foi preparada por um dos procedimentos acima mencionados. Os defeitos foram então preenchidos com enxerto de osso autógeno particulado e cobertos por uma membrana de PTFE. Os animais foram sacrificados depois de 6 meses. Os parâmetros de evolução clínica, radiográfica incluindo subtração radiográfica digital quantitativa, histologia e estereologia. Não revelando significante diferença entre os métodos. Porém, a regeneração óssea total e considerável osseoreintegração foi obtida independente do método aplicado. A média de contato ósseo ao implante observado foi de 39 a 46% dentro dos defeitos. O método de análise esterológica usado no presente estudo é um ótimo meio de obtenção de estimativas não pré-dispostas de contato osso-implante (BIC), e densidade óssea peri-implantar (BD-i) em sessões osso-implante.

Soren Schou e colaboradores (2003a), trabalharam também da mesma forma com osso mineral anorgânico poroso de origem bovina (Bio-Oss[®]) e membrana de PTFE no tratamento de peri-implantite em macacos cinomólogos. A evolução do efeito osso mineral anorgânico poroso de origem bovina (Bio-Oss[®]) e membrana de PTFE no

tratamento de peri-implantite foi por eles estudado. Um total de 64 implantes com tratamento de superfície com *spray* de plasma de titânio (TPS) foi instalado em 8 macacos (*Macaca Fascicularis*). Depois de um período de cicatrização de três meses com controle de placa, peri-implantite experimental caracterizada por perda óssea de 4 a 6 mm foi induzida durante um período de 9 a 18 meses. O tratamento cirúrgico envolvendo Bio-Oss® + membrana, Bio-Oss®, membrana, ou a confecção apenas de um retalho convencional (controle) foi confeccionado. Os animais foram sacrificados 6 meses depois do tratamento. A evolução dos parâmetros clínicos, radiográficos incluindo subtração radiográfica digital quantitativa, histologia, e estereologia demonstraram tecido peri-implantar saudável independente da técnica cirúrgica aplicada. Porém, a quantidade de reosseointegração e a quantidade total de osso (Bio-Oss® e Osso regenerado) foi significativamente maior em defeitos tratados com membrana cobrindo Bio-Oss® quando comparado com os três procedimentos terapêuticos e a média de contato com osso implante de 36% foi obtida junto aos defeitos tratados com membrana recoberto Bio-Oss®. Os valores correspondentes dos três outros procedimentos terapêuticos foram de 13 a 23%. As partículas de Bio-Oss® foram em geral superiormente integradas com osso regenerado, mas as partículas na parte oclusal dos defeitos foram inteiramente circundadas por tecido conectivo não respectivo da membrana de cobertura. O presente estudo demonstra que o tratamento cirúrgico envolvendo Bio-Oss® recoberto por uma membrana de PTFE e uma modalidade de tratamento viável de peri-implantite experimental ao redor de implantes com o tratamento de superfície por plasma *spray* de titânio (TPS) em macacos cinomólogos. Porém, o tratamento não vem a ser encorajador observando-se o resultado obtido com enxerto ósseo autógeno particulado e membrana de cobertura documentado no mesmo tipo de estudo experimental. A estereologia foi uma boa alternativa para obtenção de resultados destas duas pesquisas.

A perda de elementos dentários por trauma gera reabsorções rápidas nos alvéolos, principalmente nas tábuas ósseas vestibulares, levando inevitavelmente os pacientes à necessidade de reconstruções com materiais de enxerto. A atrofia fisiológica do rebordo alveolar é progressiva e irreversível (ROSSI; WEINFELD; MIRANDA, 2005).

Aghaloo, Moy e Freymiller (2004) pesquisaram o plasma rico em plaquetas (PRP) conjuntamente com autógeno, xenográfico no osso oral e maxilofacial e cirurgias reconstrutivas para implantes. Esse estudo compara a cicatrização óssea e a formação em defeitos em crânios de

coelhos com osso autógeno, xenógeno e xenógeno com PRP, com grupo sem enxerto como controle. Quinze coelhos Nova Zelândia foram incluídos nesta pesquisa. Quatro defeitos idênticos, com 4 mm de diâmetro, foram criados no crânio de cada coelho e imediatamente enxertados com todos os materiais. Cinco coelhos foram acompanhados 1 mês, 5 coelhos por 2 meses e 5 por 4 meses. Radiografias mostram um crescimento em densidade óssea do Bio-Oss[®], osso autógeno e Bio-Oss[®] + PRP do que o defeito controle em todos os tempos de avaliação, porém, clinicamente é difícil determinar o quanto esses materiais aparecem densos na radiografia. Histomorfometria mostrou que o incremento ósseo na área dos defeitos autógenos e poliméricos compostos foi significativamente superior que o visto com outros materiais de enxerto ou defeito controle.

Rimondini e colaboradores em estudo experimental *in vivo* de regeneração óssea em defeitos críticos, usando copolímero de PLA/PGA biodegradável injetado, em 2005, observaram que o assentamento foi feito em osso saudável padrão após implantação de PLA/PGA 50%/50% dispersado em solução aquosa de PGA e dextrano usando como substituto ósseo em modelo animal. Dois grupos de cinco coelhos foram usados. Em ambos os côndilos femurais foram realizados defeitos críticos de 6x10 mm. No lado direito PLA/PGA foi inserido e no lado esquerdo permaneceu vazio. A perda de elementos dentários por trauma gera reabsorções rápidas nos alvéolos, principalmente nas tábuas ósseas vestibulares, levando inevitavelmente os pacientes à necessidade de reconstruções com materiais de enxerto. Após 30 e 90 dias da cirurgia os animais foram sacrificados. Os defeitos do lado esquerdo, não preenchidos, mostraram uma cicatrização não espontânea após 30 e 90 dias. Sítios preenchidos com material experimental mostraram novo osso com extensão de 11,46% e 76,82% após 30 dias, e 75,98% e 95,34% após 90 dias. A histomorfometria mostrou incremento de osso maturado entre os 30 e 90 dias nos sítios experimentais aos 90 dias, não houve diferença estatística em se comparando com o osso normal. Copolímeros de PLA/PGA dispersados em matriz hidrossolúvel parecem um material osteocondutivo apropriado em defeitos ósseos de tamanho crítico. Testes de Wilcoxon foram utilizados entre os 30 e 60 dias para acessar o ganho ósseo. Teste de Man Whitney com método de Monte Carlo para probabilidade computadorizada foi usado para comparar as mensurações entre os sítios cicatriciais aos 30, 60 dias e o osso normal com microscopia eletrônica de varredura.

Kim e colaboradores trabalharam com arcabouços compósitos de PLGA+HA para engenharia tecidual em 2006. Segundo os autores, arcabouços compósitos biocerâmicos poliméricos biodegradáveis podem ultrapassar as limitações de substitutos ósseos cerâmicos convencionais sobre fragilidade e dificuldade de modelagem. Frequentemente métodos convencionais de fabricação de arcabouços poliméricos biocerâmicos compósitos, muitas vezes usam solventes orgânicos (método eg-somatória de solvente e partículas) (SC/EL) levando efeito nocivo às células teciduais. Além disso, as soluções poliméricas cobrem as cerâmicas e retardam sua exposição a superfícies dos arcabouços, causando interferências na probabilidade que as células osteogênicas venham a (semear) contatar com as cerâmicas bioativas. Neste estudo, um método modelo de fabricação de arcabouço compósito biocerâmico nanopolimérico com alta exposição das biocerâmicas nas superfícies dos arcabouços foi desenvolvido para uma engenharia tecidual óssea eficiente. Arcabouços de PLGA-HA foram fabricados pela técnica de conformação gasosa e partículas por lixiviação (GF/PL) sem uso de solventes orgânicos. Este método expõe significativamente mais as nanopartículas de HA nos arcabouços do que a técnica convencional (SC/PL). Os arcabouços de GF/PL apresentam estrutura porosa interconectada, sem assentamento superficial e exibindo superfície com propriedades mecânicas de entrelaçamento superiores a todos os arcabouços fabricados pelo método SC/PL. Vários tipos de arcabouços foram cultivados *in vitro* com células osteoblásticas e calvária de ratos, ou implantados subcutaneamente por várias semanas. Os arcabouços de GF/PL mostraram crescimento celular significativamente maior, atividade de fosfatase alcalina e mineralização *in vitro* comparados com arcabouços de SC/PL. Os arcabouços de GF/PL tiveram resultado de maior exposição das nanopartículas de HA na superfície do arcabouço comparado com o método convencional. Análise de DNA, quantidade de cálcio, microscopia eletrônica de varredura, implantação subcutânea em ratos com microscopia óptica tendo como análise estatística de variância (ANOVA, SAS Institute Inc., Cary, NC) e $p < 0.05$.

Sargis Sedrakyan e colaboradores desenvolveram trabalho científico em 2006 com engenharia tecidual do pequeno osso da mão denominado planax, através de arcabouços de polímeros, ácido polilático e poliglicólico. O PLGA foi processado pelo método da lixiviação do arcabouço com solvente a base de cloreto de sódio em uma forma do pequeno osso distal do dedo (planax). A mistura determinada como adequada foi de 85% de PLA e 15% de PGA para a confecção da forma e tamanho adequados para o planax. As porosidades variaram de

250-425-micrometros. Os arcabouços foram todos revestidos por periósteo bovino. Condrócitos foram injetados nas terminações articulares. Seis arcabouços foram inseridos cirurgicamente no tecido subcutâneo dorsal em ratos alcoolizados. Depois de 8 (n=2) ou 16 semanas (n=4) todos os implantes demonstraram de osso e cartilagem em tamanho e forma do osso planax, que foi mantido em todo período do estudo. A evolução histológica mostrou a presença homogênea de osso e cartilagem com diferenciação progressiva e produção de matriz de 8 a 16 semanas, formando um osso endocondral igualmente neste período. Analisaram as amostras morfológicamente, histologicamente e análise molecular do RNA. Essas descobertas sugerem que o polímero poroso de PLGA e uma técnica efetiva como material sintético biodegradável no crescimento tecidual ósseo e cartilagenoso articular na forma do planax humano. Rossi, Weinfeld e Miranda (2005) pesquisaram enxerto de osso bovino tipo “cone alveolar” em alvéolos de humanos. Os autores avaliaram a eficácia do osso bovino do tipo “cone alveolar” na estimulação da neoformação óssea em alvéolos dentários de humanos. Foram executadas 15 exodontias, com enxertia do osso bovino nos alvéolos envolvidos. Realizaram dois tipos de avaliações radiográficas da região enxertada com auxílio da computação: mensuração entre dois pontos determinados e histograma dos valores da densidade óptica a cada mês até completar 6 meses. Decorrido esse período, os alvéolos foram reabertos e o conteúdo da porção central colhido para ser submetido a estudo histológico. Verificou-se que no período de 6 meses a matriz mineral bovina apresentou-se sem vitalidade, radiograficamente sua densidade óptica não comprovou a neoformação óssea e, por meio de mensuração entre dois pontos, não ocorreu reabsorção óssea alveolar estatisticamente significativa. Esses fatos não comprovaram a eficiência do uso do enxerto para melhorar o leito receptor de futuro implante. Utilizaram análise de variância por postos de Friedman. Foi constatada pequena diminuição na altura, porém, não houve diferença significativa entre os períodos estudados.

Dall’Antonia et al. desenvolveram pesquisa com implante de osso cortical bovino inorgânico liofilizado (Gen-Ox[®]) em alvéolos dentais e avaliação microscópica em ratos, publicando em 2006. Para tanto, foram empregados 32 ratos divididos em 2 grupos com 16 (controle e experimental). Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 15 e 30 dias após o ato cirúrgico. As peças obtidas contendo as hemimaxilas foram fixadas, desmineralizadas e incluídas em parafina para

microtomia. Os cortes semisseriados obtidos foram corados em hematoxilina e eosina para análise em microscópio óptico. Os resultados obtidos mostram que o material é bem aceito pelo organismo, sendo lentamente.

Eeva Mäkelä e colaboradores, em 2007, desenvolveram um trabalho com rodas compósitas de ácido polilático poliglicólico (80% /20) autorreforçados com 2 mm de diâmetro e 36 mm em comprimento sendo implantados no tecido subcutâneo do dorsal de 20 coelhos. Osteotomias em distal de fêmur foram fixadas com estes cilindros (12x15 mm) nos coelhos. O acompanhamento variou entre 3 e 4 semanas. Depois de 6 meses as propriedades mecânicas foram reduzidas significativamente, mas as osteotomias cicatrizaram normalmente. A presente investigação mostra que as propriedades de fixação mecânica do SR-Polilático-glicólico (80/20) são viáveis para fixação de osteotomias em coelhos desde que técnica cirúrgica seja correta.

Kim e colaboradores em 2008 reportaram formação de osso em vivo a partir de células derivadas de embriões humanos em células osteogênicas em arcabouços de ácido poli(D,L-lactico-coglicólico) / hidroxiapatita (PLGA) / HA e a eficiência da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas de embriões humanos (hESCs) por cocultura com células derivadas de osso humano primário (hPBDs) com uso de fatores xenógenos. Nesse estudo exploraram células osteogênicas derivadas de (hESCs); (OC-hESCs) usando método reportado previsível que seria capaz de regeneração óssea tecidual em vivo. Arcabouços compostos tridimensionais porosos de PLGA/HA foram utilizados com veículos de liberação celular. Implantação em vivo de (OC-hESCs) semeadas em arcabouços mostraram formação óssea significativa em sites subcutâneos de ratos imunodeficientes em 4 e 8 semanas depois da implantação. Entre tanto implantação de controle de arcabouços sem células ou arcabouços com fibroblastos da pele não demonstraram nem um novo osso formado. Em adição a presença de 1 μ g de BMP 2 em arcabouço cresceu nova formação óssea em termos de mineralização e expressão gênica de marcadores ósseos específicos. De acordo com análise de Fish, implantação de OC-hESCs resulta em regeneração das lojas, sugerindo que a implantação de células participa na formação de novo osso. Concluindo, OC-hESCs regeram com sucesso quando implantados *in vivo*, e esta regeneração pode ser favorecida pela incrementação da administração de BMP 2. Estes resultados sugerem a possibilidade clínica do OC-hESCs como boa alternativa para origem de células para regeneração óssea. A cultura celular sobre biomateriais compõe um passo importante no entendimento de respostas diretas de

células de tecidos específicos, funcionando como ferramenta imprescindível na Engenharia Tecidual. Por meio dessa técnica é possível compreender fenômenos como adesão, proliferação e diferenciação celular induzidas por tais biomateriais.

A porosidade é um aspecto importante para o crescimento celular, pois o meio de cultura e os fatores de crescimento difundem-se livremente para o interior do biomaterial. O tamanho dos poros, sua distribuição e a interconectividade são características importantes em um suporte. Uma porosidade adequada – considerando tamanho, forma, morfologia da parede – para semeadura de células, adesão, crescimento e formação de tecido novo e para transporte de nutrientes e de resíduos metabólicos do implante, bem como, o estímulo à vascularização são importantes considerações. Na literatura é geralmente citado que poros numa faixa que varia de 100 a 400 μm são adequados para a regeneração óssea (MESSIAS et al., 2009; MIAO et al., 2008; SARAZIN; ROY; FAVIS, 2004; TANG; HUNT, 2006).

No método de transplante de células, o veículo não só transporta as células ou tecido, como serve de guia para o crescimento de novo tecido. E no método de indução emprega o arcabouço para transporte e sustentação de proteínas indutivas. As características desejadas de um material ósteo-substituto são: biocompatibilidade, previsibilidade e aplicação clínica sem riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, além da aceitação por parte do paciente (SICCA et al., 2000).

A busca incansável do homem por padrões de vida superiores e longevidade tem gerado cada vez mais a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas ou patogenias. A necessidade por novos materiais que substituam tecidos humanos tem levado pesquisadores de diferentes áreas a investigar diversos materiais com características favoráveis ao processo de recuperação (STARES, 2007).

Ryu e colaboradores em 2007 realizaram trabalho importante para controlar o crescimento celular dentro e com arcabouços artificiais. Tecidos como a pele, vasos sanguíneos e cartilagem possuem multileitos estruturais com diferentes células em cada conteúdo. Com o artifício tecnológico de microfabricação um método modelo de arcabouço para polímeros biodegradáveis como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e o copolímero polilático-co-glicólico (PLGA) foi desenvolvido para construir arcabouços multileitos microfluidos. O método enfatiza interconexões microfluidas entre leitos com arcabouços e manutenção de alta resolução geométrica durante o processo de adesão para criação de arcabouços multileitos variando entre 10-100 μm

baseado por vapor solvente. Amostras de arcabouços são construídas com propósitos de canais direcionados para crescimento de células com tamanhos de necessidade específica.

Je Yong Choi et al. (2007) realizaram estudo por inibição do crescimento ósseo cicatricial com pamidronato em defeitos criados na calvária de coelhos usando PLGA como material liberador de drogas. Na análise histológica a formação óssea teve diferenciação entre os grupos em uma semana, porém, ela se tornou mais lenta nos grupos do pamidronato que nos controles apenas com PLGA depois de duas semanas.

Em relação à localização do implante, deve-se levar em conta a vascularização local e a solitação mecânica. Se um polímero biorreabsorvível é implantado num local de alta vascularização (grande atividade vital), sua velocidade de degradação será mais rápida em relação a uma região menos vascularizada, de funções passivas. Locais de grande solitação mecânica também têm sido descritos como aceleradores da degradação (HOLLINGER; BATTISTONE, 1986 apud STARES, 2007).

No ambiente local da implantação, uma alta taxa de metabolismo tecidual local e uma excelente circulação poderiam facilitar a degradação do material. Por outro lado, uma baixa taxa de metabolismo local e pobre circulação poderiam levar a uma reabsorção retardada (PIETRZAK et al., 1996).

Li Yao et al. (2008) explicaram o efeito funcional de micromoldes de PLGA no crescimento guiado de inervação. Quando a coadaptação é impossível no reparo de injúrias nervosas, uma ponte de biomaterial em forma de arcabouço promove um suporte estrutural para o crescimento de células neurológicas e re-estabelecimento do nervo. Para tal, esses microarcabouços foram fabricados com filmes de PLGA usando um método a laser. Este estudo indicou que a superfície do micromolde conjugado com moléculas funcionais podem ser usados para regeneração nervosa.

Em estudo *in vitro* realizado em 2009 por Messias e colaboradores, foram realizadas observações morfológicas das células sobre os suportes de PLGA e PLGA+HA. Células foram submetidas a testes de citotoxicidade e adesão. Adicionalmente a morfologia foi observada em microscopia de varredura e síntese de colágeno mensurados pelo método colorimétrico de Sinus Red. Os resultados mostraram que o material não foi citotóxico e a hidroxiapatita cresceu a adesão celular. Por meio de microscopia eletrônica de varredura além de testes de adesão e citotoxicidade pela atividade mitocondrial de

metabolização de MTT obtiveram os resultados. A produção de colágeno também foi investigada como indício de produção de matriz extracelular por meio do teste colorimétrico Sirius Red. Os resultados revelam que as células com morfologia osteoblástica, as quais puderam se aderir e espalhar pelos arcabouços. Além disso, o material não apresentou toxicidade às células, sendo que a combinação com a hidroxiapatita não afetou a viabilidade celular comparada aos arcabouços sem hidroxiapatita. Todavia, os resultados demonstram que a adição de partículas de hidroxiapatita inferiores a 1000 μm aumentou a taxa de adesão celular conforme nosso estudo *in vivo* através de estereologia com relação ao PLGA+HA no quesito de neoformação óssea.

Neste trabalho, suportes tridimensionais porosos de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA, 82/18 (m/m) dissolvidos em clorofórmio (Merck) (10% w/v), contendo ou não partículas de hidroxiapatita (HA) que adicionada após dissolução em sacarose (Shynth) (30% w/v) nos arcabouços de PLGA+HA foram adicionadas as partículas de cerâmica de hidroxiapatita (Genius-Baumer) (20% m/v). Tais soluções foram vertidas em moldes cúbicos de silicone medindo cerca 5 cm de diâmetro por 5 cm de comprimento em forma de cilindro. Após evaporação do solvente em temperatura ambiente, removeu-se a sacarose usando poliálcool vinílico (PVA). A sacarose se solubiliza em PVA deixando espaços que constituem os poros (inferiores a 1000 μm). Cada amostra foi modelada em cilindros de 5 mm de diâmetro por 5 de comprimento para a utilização nos experimentos. A esterilização foi efetuada com Plasma de Peróxido de Hidrogênio em invólucro específico Johnson and Johnson utilizados na Tese de Conclusão de Curso de André Dutra Messias, do Laboratório de Biomateriais, Centro de Ciências Médicas e Biológicas, PUC-SP sob orientação de Aguedo Aragonés, Eliana Aparecida de Rezende Duek que foram testados *in vitro*.

Para o resultado deste trabalho usamos estes arcabouços e os citados nos objetivos tendo os princípios de Cavalieri para avaliação em microscopia óptica, para determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais. O matemático Bonaventura Cavalieri propôs cortar um objeto em cortes paralelos com uma distância conhecida e medir as áreas dos cortes do objeto. Conjunto de linhas ou pontos que devem ser sobrepostos à imagem observada ao microscópio para a contagem estereológica. Técnica do século passado, muito laboriosa, criada em 1883 por Born, técnico no laboratório do anatomista Whilhem His, é um

exemplo de modelo tradicional de Reconstrução Anatômica. Trata-se basicamente de estudar uma determinada amostra de cortes aleatórios de uma estrutura tridimensional sem que isto diminua a acurácia do método de contagem (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para testarmos o potencial regenerativo dos arcabouços foram criados 6 defeitos considerados críticos de 5 mm de diâmetro nos fêmures direito e esquerdo (3 defeitos em cada fêmur) de 21 coelhos machos, da linhagem Nova Zelândia, com um ano de idade, pesando de 2 a 4 kg, procedentes do Biotério UNISUL, subdivididos em 6 grupos:

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

Os seis grupos foram comparados em 3 períodos: “A” (15 dias), “B” (30 dias) e “C” (60 dias) do pós-operatório, para verificação dos quesitos citados nos objetivos acima.

O protocolo apresentado abaixo será o utilizado neste trabalho. O sentido de rotação será horário, ou seja, as amostras vão sendo modificadas de local, o que é necessário, pois, a qualidade (circulação sanguínea) próxima ao joelho e no centro dos fêmures dos coelhos é mais pobre do que próxima a cabeça do quadril.

A técnica para a confecção dos arcabouços de PLGA e PLGA+HA usados foi a de evaporação de solvente e, para a produção de poros, o método de lixiviação de porógenos. A partir do copolímero na forma de pó, foram preparadas soluções de poli(L-ácido lático-co-ácido glicólico) PLGA (Böehringer Ingelheim) nas proporções 82/18 (m/m) pela diluição em clorofórmio (Merck) (10% m/v). Após completa dissolução do copolímero, foi adicionada sacarose (Synth) (30% m/v) com granulometria inferior a 1000 µm.



Figura 01 - Osso Xenógeno (Orthogen Baumer)



Figura 02 - Bio-Oss®

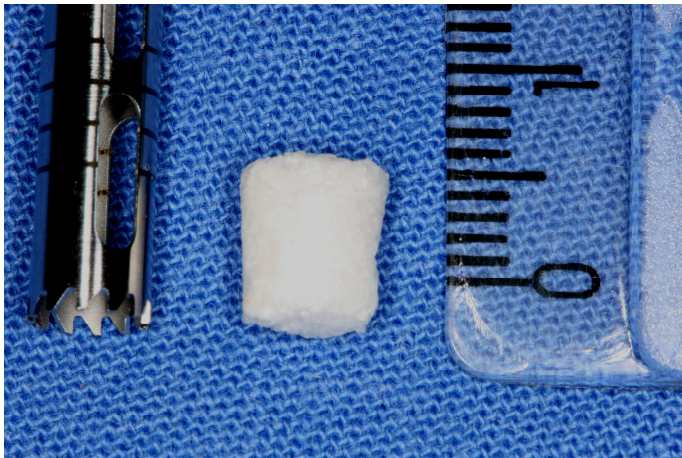


Figura 03 - Arcabouço PLGA vista lateral



Figura 04 - Arcabouço de PLGA+HA vista lateral

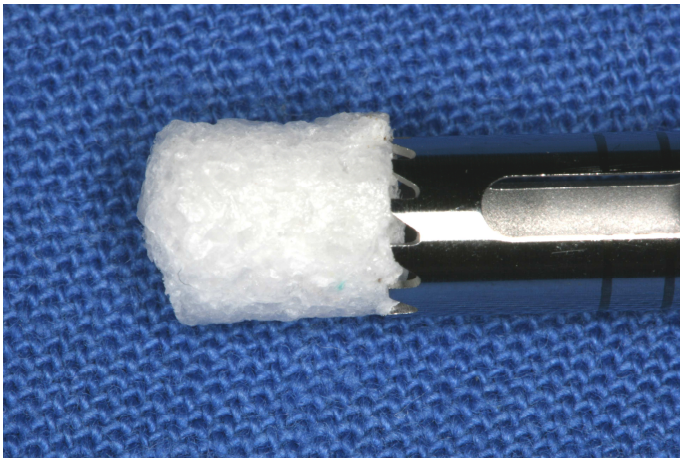


Figura 05 - Arcabouço PLGA compatível com o diâmetro da trefina (5 mm)

* PLGA+HA compatível com a altura da primeira marcação da broca trefina (5 mm).

4.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os coelhos foram devidamente anestesiados por um veterinário habilitado. Previamente aos procedimentos cirúrgicos os coelhos foram novamente pesados na sala do pré-operatório.

Após a pesagem e obedecendo a sequência estabelecida para cirurgia, cada coelho recebeu uma injeção, via intramuscular de 1:1 tiletamina + zolazepam 33 mg/kg + 0,5 mg/kg de morfina + 1 mg/kg de xilazina, na mesma seringa.

Havendo necessidade durante o procedimento cirúrgico, fez-se um reforço anestésico com a metade da dose-mãe. Manteve-se acesso venoso, durante o mesmo ato, com solução fisiológica a 0,9%, possibilitando a hidratação e administração de outras drogas, caso houvesse necessidade. Estes procedimentos foram realizados pelos médicos veterinários Geraldo J. S. Bernardes e Sandro Melim Sgrott. O ato cirúrgico foi realizado em ambiente cirúrgico com protocolo de esterilização. Antibioticoterapia profilática e medicação anti-

inflamatória foram administradas 40.000 UI/kg de penicilina benzatina + triancenolona 0,02 mg/kg, previamente ao procedimento cirúrgico. Inicialmente, os fêmures dos animais (aproximadamente 2 cm acima da articulação do joelho) foram tricotomizados, e então, realizada a antisepsia com iodopovidona.

A cirurgia foi realizada em ambiente cirúrgico com protocolo de esterilização, com auxílio da equipe de alunos de Mestrado e Doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina (Fig. 06). Antibioticoterapia profilática e medicação anti-inflamatória (40.000 UI/kg de penicilina benzatina + triancenolona 0,02 mg/kg) foram administradas previamente ao ato cirúrgico.



Figura 06 - Equipe cirúrgica da pós-graduação em odontologia (Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes dentários da UFSC)

O bisturi (Bard-Parker nº 3) munido de lâmina número 15 foi introduzido perpendicularmente à pele e aprofundado pelo tecido subcutâneo, fáscia, camadas musculares e periósteo, até alcançar o plano ósseo.

Isto possibilitou a elaboração do retalho total e o descolamento do periósteo com descolador (FREER), com o objetivo de proporcionar o acesso e visão necessária à área operatória para a criação dos três defeitos semicríticos de 5 mm em cada fêmur, totalizando 6 defeitos por

coelho, sendo regenerados com algum tipo de biomaterial e grupo controle conforme descrito anteriormente.



Figura 07 – Desinfecção e Incisão cutânea

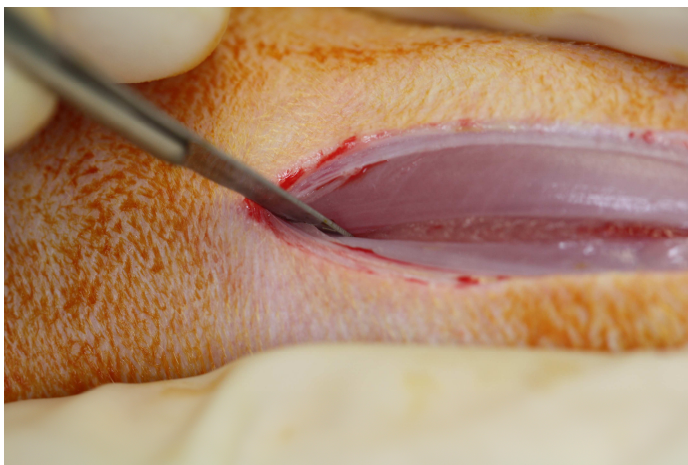


Figura 08 - Incisão da fáscia muscular



Figura 09 - Exposição do periósteo e acesso direto a estrutura óssea

A área de criação do defeito foi demarcada com uma broca trefina de 5 mm de diâmetro, sendo que a distância mínima entre o centro das duas marcações foi de 14 mm, preservando no mínimo 3 mm entre as perfurações. Esta penetrou a cortical atingindo o osso medular subjacente, aprofundando por 5 mm.

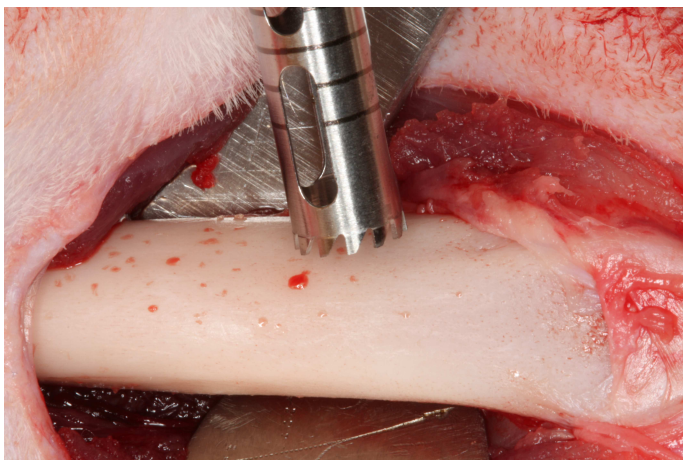


Figura 10 - Localização da primeira perfuração

As perfurações foram realizadas a 1.600 rpm (com um motor específico para este fim), com irrigação abundante com soro fisiológico, com 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 eliminará a variável qualidade óssea, pois o osso vai se tornando mais medular conforme aproxima da cabeça do fêmur. Ao final foram confeccionados e regenerados 126 defeitos em 21 coelhos.

Os defeitos (semi) críticos foram confeccionados montando um espaçamento de três a quatro milímetros entre os mesmos para preservação da resistência óssea dos fêmures.

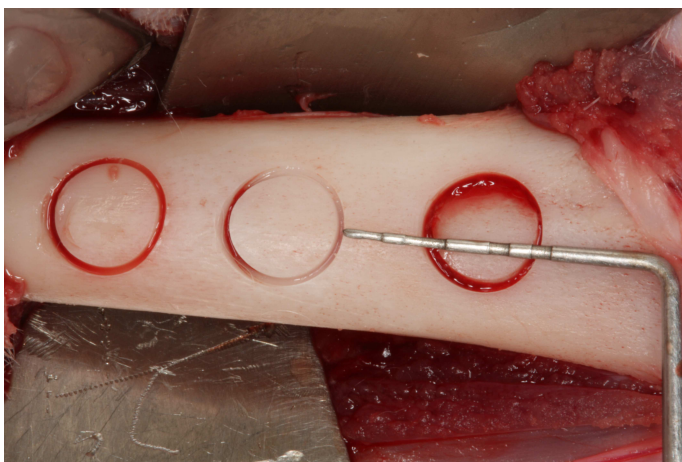


Figura 11 - Espaçamento dos defeitos

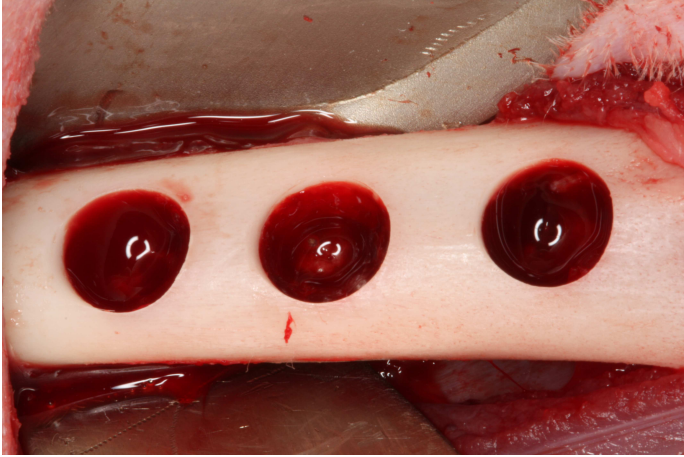


Figura 12 - Remoção da estrutura óssea com 5 mm de profundidade e 5 mm de diâmetro

Neste coelho operado, a ordem de instalação dos arcabouços seguindo a rotação horária prevista pela mudança de qualidade óssea na região próxima ao joelho (mais cortical), em direção ao quadril (mais esponjoso), na perna direita, com o primeiro defeito sendo preenchido com Bio-Oss[®] (Fig. 13), o segundo com PLGA, e o terceiro com osso xenógeno da Baumer (Orthogen) visto na figura 16.



Figura 13 - Primeiro defeito direito preenchido com Bio-Oss[®]



Figura 14 - Inserção do PLGA no defeito direito



Figura 15 - Segundo defeito direito preenchido com PLGA

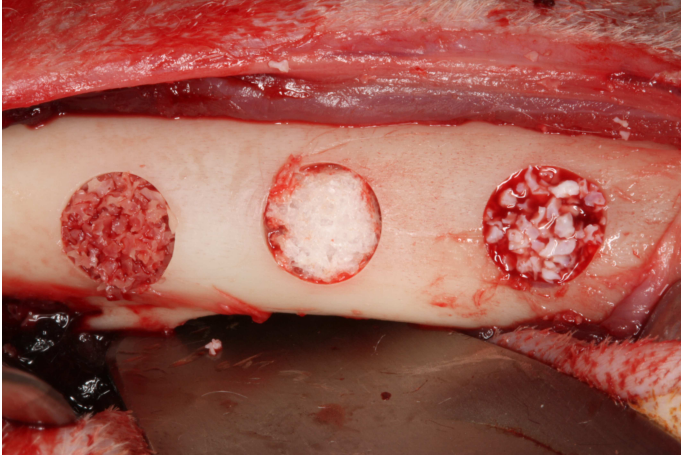


Figura 16 - Preenchimento do terceiro defeito com Orthogen

O osso obtido durante a confecção dos defeitos com broca trefina foi particulado com um triturador específico e enxertado no grupo II. Os defeitos dos demais grupos foram preenchidos conforme citado anteriormente, para tal, sempre iniciamos a cirurgia no lado oposto ao enxerto autólogo para maior obtenção de quantidade do mesmo (Figs. 17-19).

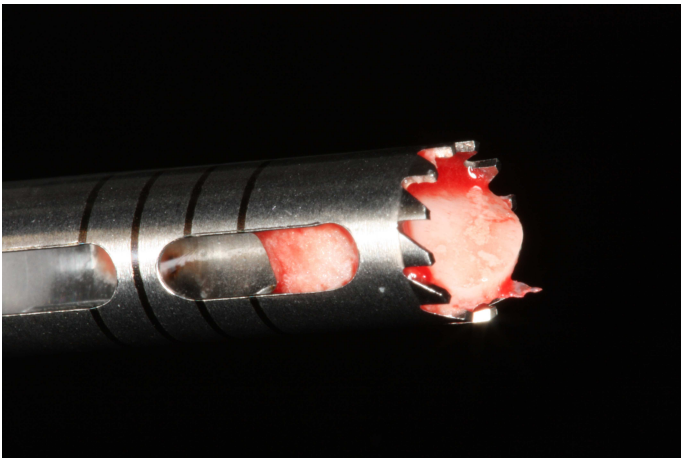


Figura 17 - Obtenção de osso autólogo através de broca trefina

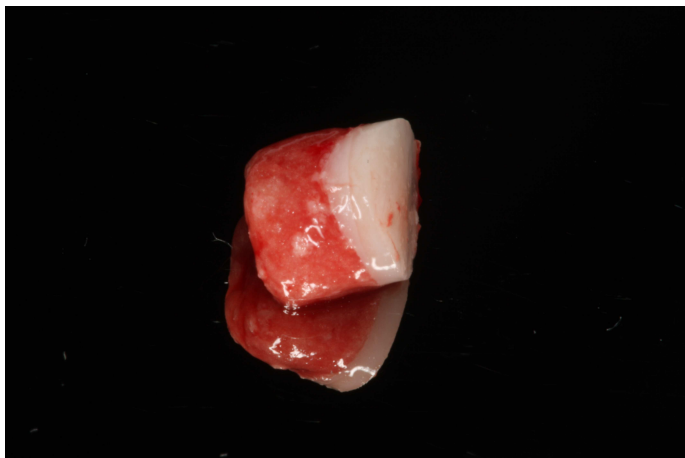


Figura 18 - Amostra de enxerto autógeno trefinado

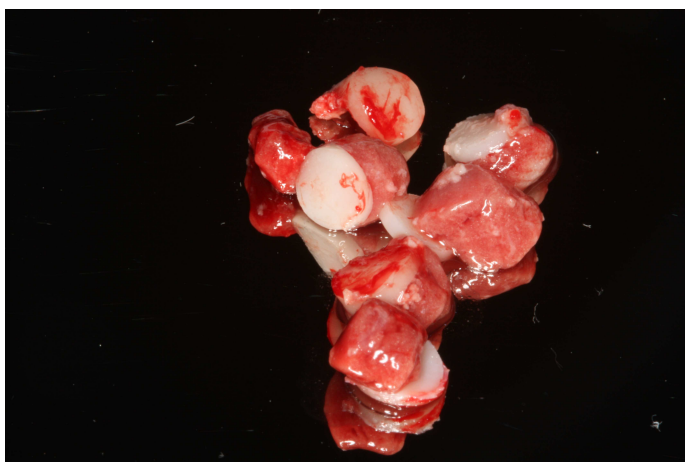


Figura 19 - Obtenção de todas as amostras de enxerto autógeno

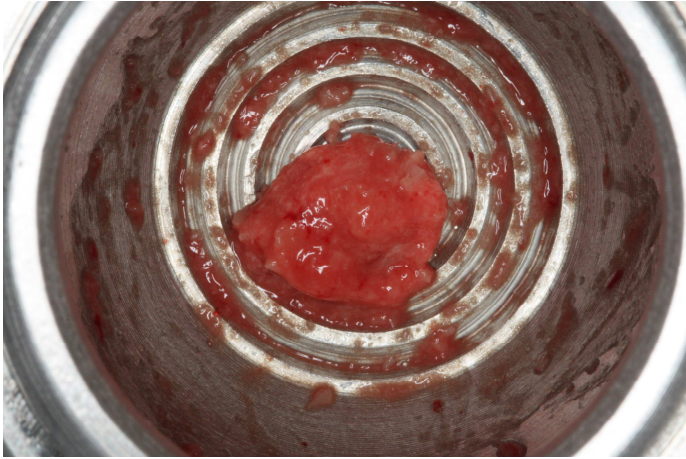


Figura 20 - Triturador de osso

O protocolo cirúrgico para o fêmur esquerdo deste coelho foi o preenchimento do primeiro defeito próximo ao joelho com PLGA+HA (Figs. 22 e 23), o segundo com osso autógeno (Figs. 24 e 25) e o terceiro preservando o coágulo com o grupo controle (Fig. 26).

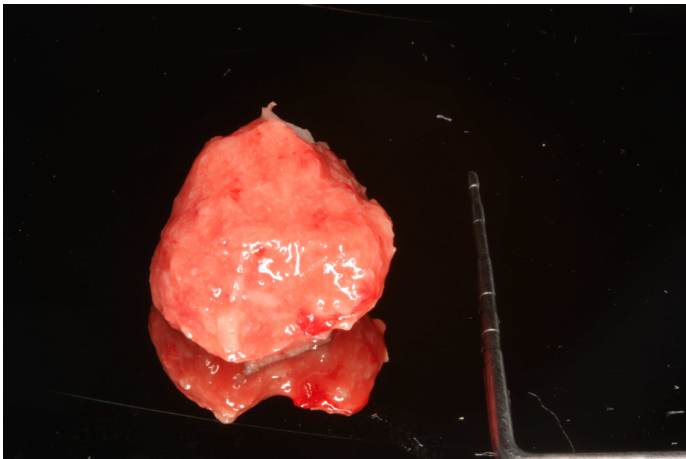


Figura 21 - Osso autógeno triturado



Figura 22 - Primeiro defeito esquerdo (inserção do arcabouço de PLGA+HA)



Figura 23 - PLGA+HA inserido

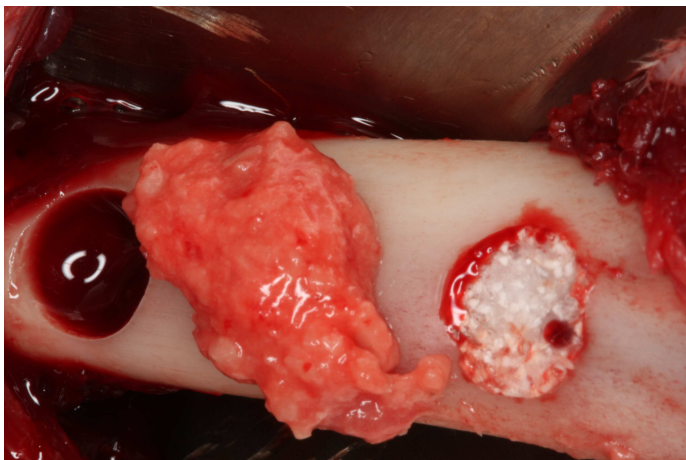


Figura 24 - Segundo defeito esquerdo (inserção de osso autógeno triturado)

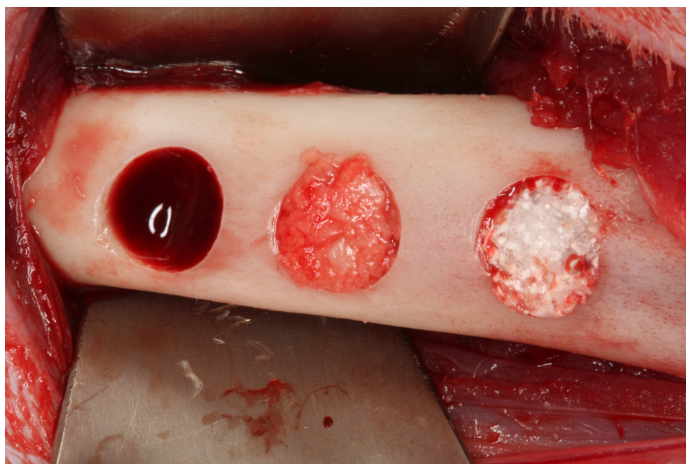


Figura 25 - Enxerto autógeno instalado



Figura 26 - Terceiro defeito esquerdo (alvéolo com preservação de coágulo)

A sutura foi realizada com porta-agulhas Mayo Regar e fio de sutura reabsorvível.

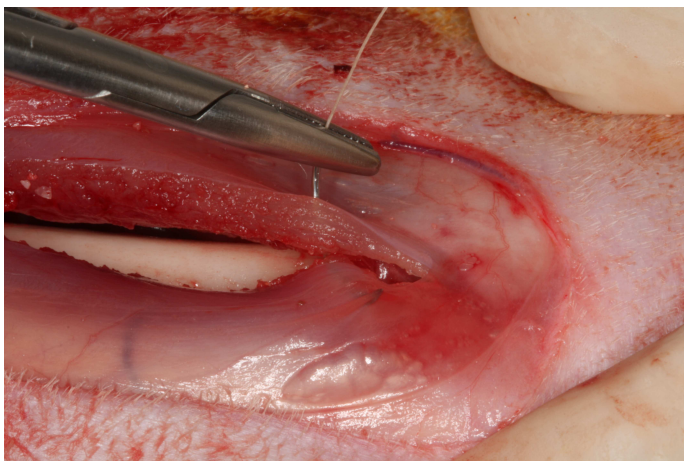


Figura 27 - Sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon)



Figura 28 - Sutura reabsorvível (Vicryl Ethicon)



Figura 29 - Sutura do segundo plano com fio não absorvível (Nylon Ethicon)

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. Os procedimentos

veterinários pré, trans e pós-operatórios dos animais, bem como a rotina de tratamento, foram realizados e supervisionados por Médicos Veterinários

Após os procedimentos operatórios, os coelhos foram mantidos em boxes e medicados sob protocolos de antibioticoterapia e alívio da sintomatologia dolorosa, além de receberem terramicina a cada 7 dias que atuou como antibiótico. Os animais receberam um agente analgésico e anti-inflamatório, administrado por injeção intramuscular, na dose de 1 ml/5 kg (Ketoprofeno 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, uso tópico diário de Rifocina *spray* por sete dias. Os animais receberam tetraciclina, na proporção de 25 mg/kg, intramuscular, nos primeiros 15 dias.

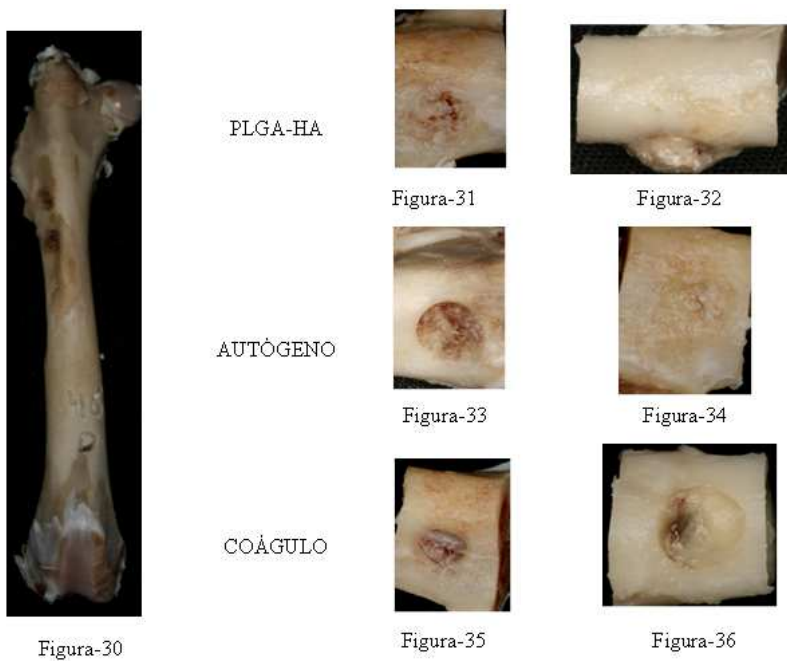
Após o sacrifício, os fêmures foram recolhidos, fixados em formal tamponado 10%, desidratados e descalcificados. Os espécimes foram incluídos em paraplást, cortados longitudinalmente e corados com Hematoxilina e Eosina. Após foi feito o preparo para observação em microscopia confocal de varredura a laser e microscopia óptica de luz. As imagens de cada campo visível foram capturadas digitalmente e combinadas para ilustrar o conjunto.

Nos períodos pré-determinados: “A” (15 dias), “B” (30 dias) e “C” (60 dias) os animais foram sacrificados através do procedimento de eutanásia com aprofundamento anestésico seguido de injeção endovenosa de Cloreto de Potássio (KCL) 19,1%, as amostras foram armazenadas em solução de formol 10% e após 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; as peças fixadas em formol 10% em H₂O destilada sendo obtidas as peças inteiras, que após 72 horas submersos neste produto foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo de peça óssea e separadas as amostras preservando mais ou menos 2 a 3 mm de osso sadio ao lado das amostras.

Estas foram descalcificadas em EDTA 10% Merk em recipientes plásticos separados e rotulados. Foram feitas 5 trocas de 2 e 2 dias e posteriormente, mais no mínimo, 3 trocas semanais até total descalcificação das mesmas testadas por instrumento perfurante e radiografias onde não se observa estruturas calcificadas em suas imagens (radiografias quase totalmente radiolúcidas).

Estão dispostas nas imagens deste coelho operado segundo as amostras após fixação sequenciadas nas figuras seguintes:

- No fêmur direito, PLGA+HA, Autógeno e Coágulo com 15 dias (Figs. 30 a 36);
- No fêmur 15 dias esquerdo, Bio-Oss[®], PLGA e Orthogen (Figs. 37 a 40);
- No fêmur direito no período de 30 dias (Figs. 41 e 42);
- No fêmur direito, 30 dias, Autógeno, PLGA+HA, Orthogen (Figs. 43 a 46);
- No fêmur esquerdo, 30 dias, Coágulo, Bio-Oss[®], PLGA (Figs. 47 a 50);
- Fêmures de 60 dias, peça inteira (Fig. 51);
- No fêmur direito, PLGA+HA, Orthogen, PLGA aos 60 dias (Figs. 52 a 59);
- No fêmur esquerdo aos 60 dias, Bio-Oss[®], Coágulo, Autógeno (Figs. 60 a 66).

15 dias direito**Figuras 30 a 36 - Fêmur direito - 15 dias***

* Figuras 31, 33, 34, 35 e 36 – vista de inserção; figuras 32 – vista lateral

15 dias esquerdo



Figura 37

BIO-OSS



Figura 38

PLGA

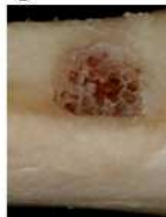


Figura 39

ORTHOGEN



Figura 40

Figuras 37 a 40 - Fêmur esquerdo -15 dias

30 dias



Figura 41



Figura 42

Figuras 41 e 42 - Grupo de 30 dias direita e esquerda

30 dias direito

Figura 43

AUTÓGENO

PLGA-HA

ORTHOGEN



Figura 44



Figura 45



Figura 46

Figuras 43 a 46 - Fêmur direito - 30 dias

30 dias esquerdo

Figura 47

COÁGULO



Figura 48

BIO-OSS



Figura 49

PLGA



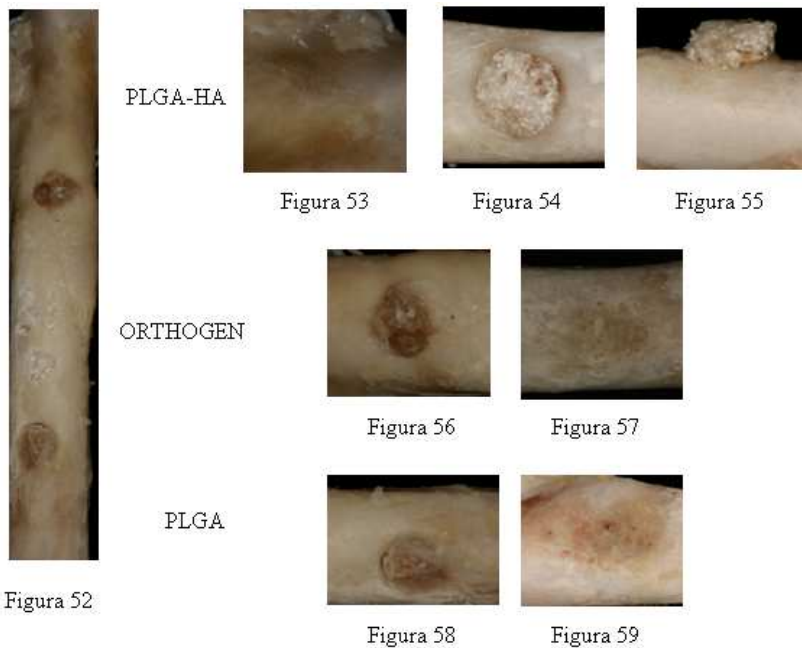
Figura 50

Figuras 47 a 50 - Fêmur esquerdo - 30 dias

60 dias



Figura 51 - Grupo de 60 dias direita e esquerda

60 dias direito**Figuras 52 a 59 - Fêmur direito - 60 dias***

* Figura 55 – vista lateral

60 dias esquerdo



Figura 60

BIO-OSS



Figura 61

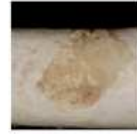


Figura 62

COÁGULO



Figura 63



Figura 64

AUTÓGENO



Figura 65



Figura 66

Figuras 60 a 66 - Fêmur esquerdo - 60 dias

4.2 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

As lâminas obtidas foram submetidas à análise estereológica segundo os seguintes parâmetros:

As amostras progressivas de 5 mm instaladas nos fêmures dos coelhos foram cortadas transversalmente (Fig. 67) em 21 coelhos sendo 6 defeitos semicríticos de 5 mm de diâmetro e profundidade, 3 em cada fêmur, finalizamos 126 amostras ósseas que foram microtomizadas a cada 1 mm com 0,5 micras de espessura (Fig. 68), totalizando 630 amostras dispostas em lâminas para escolha aleatória de 90 lâminas, 5 lâminas de cada grupo de 5 tecidos ou materiais, totalizando 350 tecidos e amostras.

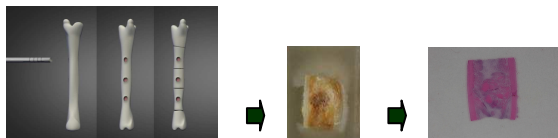


Figura 67 - Desenho da sequência de remoção das amostras indicando o sentido dos cortes realizados no micrótomo para obtenção das lâminas

Em nosso trabalho fotografamos as lâminas através da utilização de Microscopia Óptica com um aumento de 400X para visualizarmos toda a amostra do enxerto e as corticais presentes em uma área situada dentro do implante. Dentro desta área vamos quantificar os diversos elementos presentes em cinco regiões distintas, localizados próximos ao centro da amostra.

As peças foram descalcificadas em EDTA 10% Merk em recipientes plásticos separados e rotulados.

Foram feitas 5 trocas de 2 e 2 dias e posteriormente, mais no mínimo, 3 trocas semanais até total descalcificação das mesmas testadas por instrumento perfurante e radiografias onde não se observa estruturas calcificadas, ou seja, de suas imagens (radiografias quase totalmente radiolúcidas).

As peças ósseas foram levadas ao processo de inclusão em parafina por um aparelho histotécnico. Foram então incluídas em parafina e microtomizadas em espessura de 0.5 micrometros, obtendo-se cortes semisseriados das peças a cada 1 mm em Micrótomo Microm (Zeiss-Germany) totalizando 5 cortes (Fig. 69). Os cortes foram efetuados longitudinalmente ao osso e perpendicularmente as amostras, partindo da base da peça em direção ao defeito realizado.

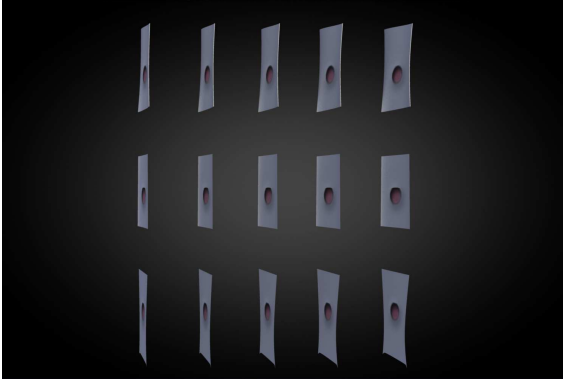


Figura 68 - Desenho dos cortes microtométricos transversais aos cilindros das amostras*

* Obs.: Figura 55.

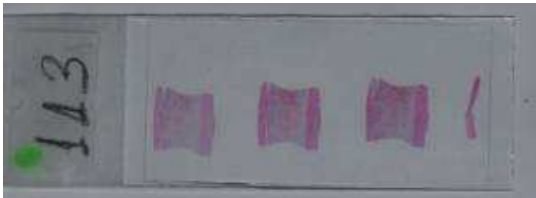


Figura 69 - Amostra da lâmina histológica

As lâminas obtidas foram coradas pelo método de coloração utilizando-se Hematoxilina e Eosina. Observamos então em microscopia óptica de luz, uso de grelha pré-determinada no MOTic Image e régua no sentido vertical e horizontal com 1.000 μm . As lâminas foram retiradas aleatoriamente das amostras e cada campo visível foi capturado digitalmente e combinado para avaliar QA.

A análise das lâminas foi realizada segundo o princípio de Cavalieri para determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

As lâminas, para avaliação microscópica e análise estereológica, e morfométrica, com base nos princípios acima estipulados, seguiram as seguintes etapas:

- As lâminas foram fotografadas através da utilização de Microscópio óptico (Labophot II – NiKon), acoplado a um sistema de captura de imagem (Mothic Image). Com a objetiva de 400X, foram obtidas fotos para visualizarmos toda a amostra do enxerto em uma área situada dentro do enxerto ósseo. Dentro desta área foram localizados 4 pontos próximos aos extremos (grelha), com espaçamentos da amostra centralizada localizada no centro dos enxertos. Para tal usamos um sistema teste calibrado para fotos de 400X dessas regiões previamente demarcadas nas fotografias digitais, com base nos princípios acima citados.
- Visualizamos e calculamos o número de amostras de cada tecido acima citado (objetivos específicos) dentro de uma área de 15 quadrados de grelha, tendo cada um $0,00397 \text{ mm}^2$, totalizando $0,059 \text{ mm}^2$, e área total de $0,29775 \text{ mm}^2$ sendo a Área Teste;
- Seleccionamos 90 lâminas aleatoriamente, totalizando 5 lâminas de cada grupo, das quais foi numerada a quantidade dos 5 tecidos ou materiais nos 3 períodos de tempo estipulados nos objetivos totalizando 1050 amostras.

Para tal usamos este sistema-teste calibrado para fotos de 400X, para favorecer a avaliação dessas regiões que estarão previamente demarcadas nas fotografias digitais nos seguintes quisitos:

- a) Avaliação da área ocupada por cada um dos elementos presentes nos enxertos segundo os princípios de Cavalieri, através de parâmetros de área de perfis, número de perfis e número de objetos dentro de uma área conhecida;
- b) Avaliação da Densidade de Perfis de cada uma dos elementos presentes dentro da área do enxerto. Verifica quanto de um determinado volume é ocupado dentro de uma área-teste delimitada pelo sistema-teste. Avaliação da Densidade de Perfis de cada uma dos elementos presentes dentro da área delimitada no espaço das amostras dos 15 quadrados de grelha e avaliações histológicas excluindo as linhas de intersecções das amostras com as linhas limítrofes direita e inferior (linhas proibidas). Verifica quanto de um determinado volume é ocupado dentro de uma área-teste delimitada pelo sistema-teste de cada tecido ou material citado nos objetivos segundo os princípios de Cavalieri citados por Mandarim-de-Lacerda (2003).

Densidades de perfis na área-teste (QA) representada pela quantidade de imagens da estrutura em uma determinada área-teste,

delimitada pelo sistema-teste e calculada tendo em conta o aumento do microscópio. Isto vai calcular a densidade de perfis de sistema-teste através da fórmula abaixo:

$$QA = \frac{\Sigma \text{perfis}}{AT} \text{ 1/cm}^2$$

4.3 DENSIDADES DE PERFIS NA ÁREA-TESTE (QA) EM ESTEREOLOGIA

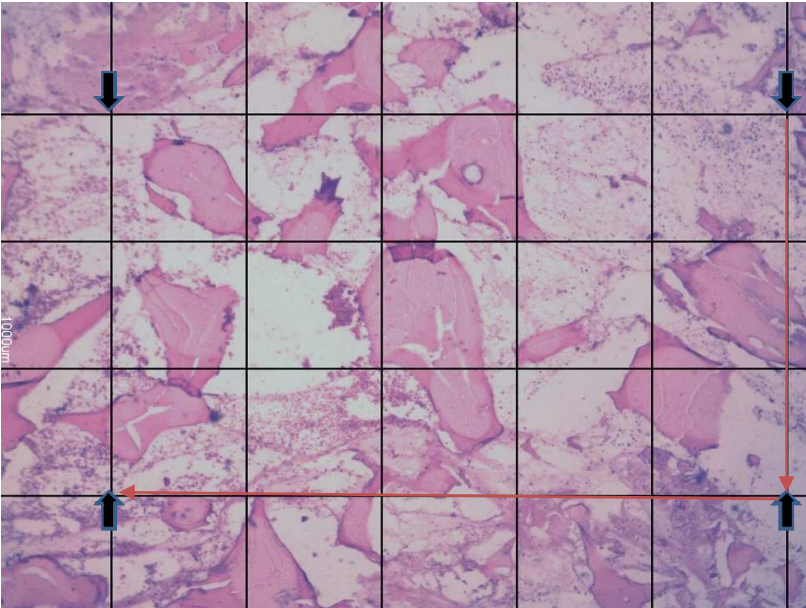


Figura 70 - Lâminas 15 dias (A com Régua e B com Grelha)*

* Grupo A -BIO-OSS® em microscopia óptica delimitando a “Área-Teste”. Setas azuis indicam os limites da área-teste. Setas vermelhas as “linhas proibidas”.

Representa a quantidade de imagens da estrutura em uma determinada área-teste, delimitada pelo sistema-teste e calculada tendo em conta o aumento do microscópio. Um quadrado de grelha corresponde a $0,00397 \text{ mm}^2$. Totalizamos $0,00397 \times 15$ quadrados de grelha analisados em cada lâmina = $0,05955 \text{ mm}^2$. Valor área de 5 amostras = 0.29775 mm^2 em aumento de 400X.

4.3.1 Cálculo da Densidade de Perfis

$$QA = \frac{\Sigma \text{perfis}}{AT} \text{ 1/cm}^2$$

$$AT = 0.29775 \text{ mm}^2$$

Aplicabilidade – Determinação direta para calcular números de estruturas em uma imagem. Como no exemplo abaixo:

$$\text{Ex.: QA-PLGA+HA-TI-60 dias} = \frac{7 \text{ perfis}}{AT} \text{ 1/cm}^2 = 2,350 \text{ cm}^2$$

$$AT = 0.29775 \text{ mm}^2$$

$$\text{QA-PLGA+HA-TI-60 dias} = 7/\text{cm}^2 \text{ divididos por } 0,29775 \text{ mm}^2 = 23.50 \text{ mm}^2 = 2.350 \text{ cm}^2$$

5 RESULTADOS

Este trabalho conseguiu avaliação da reparação óssea dos defeitos criados e preenchidos com biomateriais em relação aos dos grupos controle, tecido conjuntivo, tecido inflamatório e tecido adiposo, e matérias de enxerto foram calculados aos 15, 30 e 60 dias através de estereologia após contagem dos tecidos encontrados dentro do centro das lâminas digitalizadas, excluindo aqueles em contato com as linhas direita e inferior dos limites da grelha, denominadas linha proibida, segundo os princípios de Cavalieri.

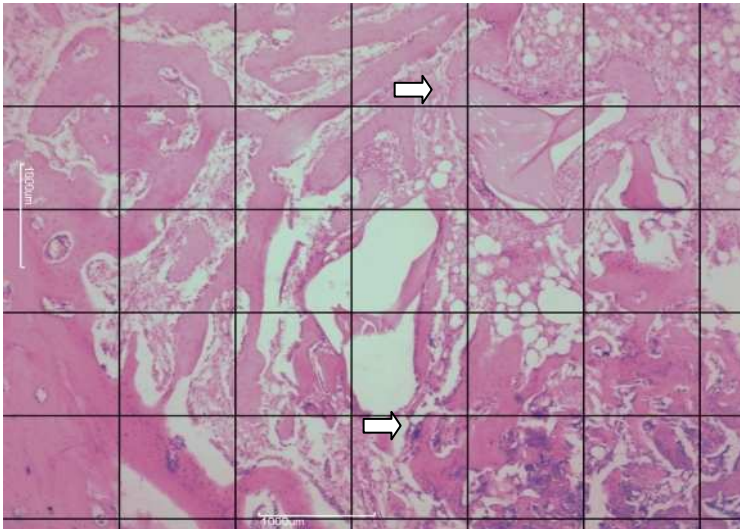


Figura 71 - Exemplo PLGA 15 dias*

* Seta superior - tecido conjuntivo; seta inferior - tecido inflamatório.

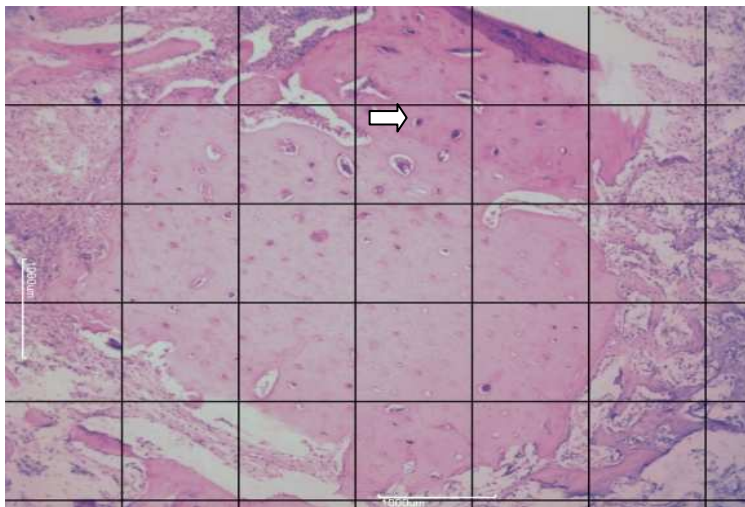


Figura 72 - Exemplo de Coágulo 30 dias (Osteócito)

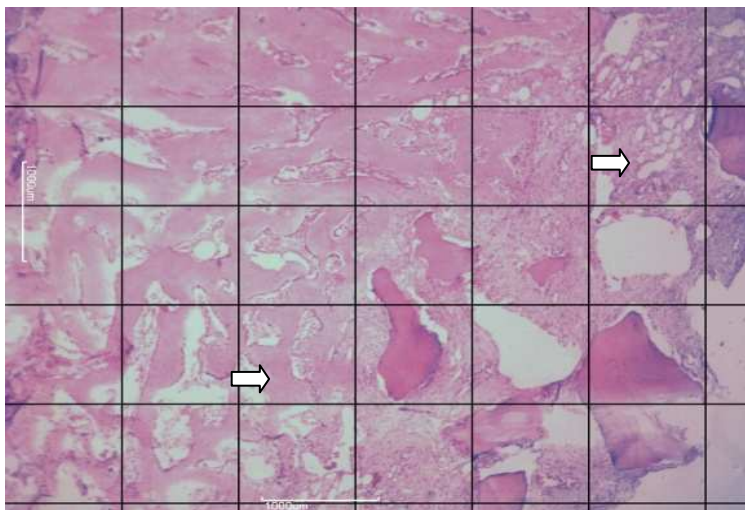


Figura 73 - Exemplo de PLGA 30 dias*

* Seta superior - células adiposas; seta inferior - material de enxerto.

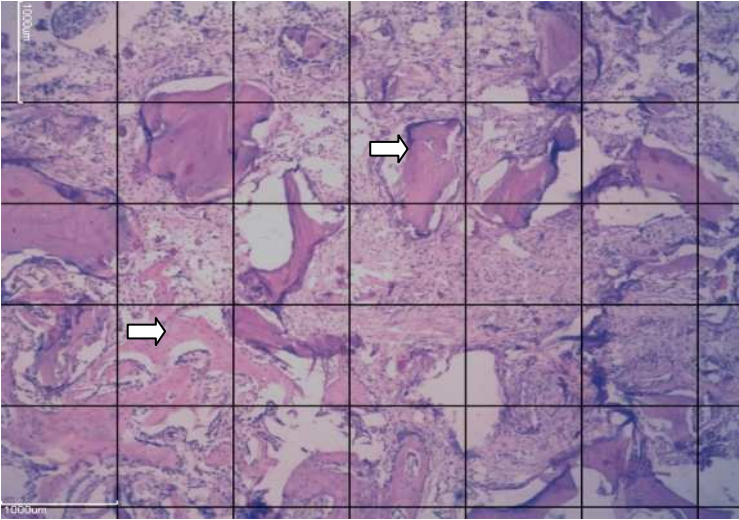


Figura 74 - Exemplo de PLGA+HA 30 dias *

* Seta superior - material de enxerto; seta inferior - osso neoformado.

Tabela 1 - Somatório de perfis de Tecido Inflamatório em cm²

	15 Dias	30 Dias	60 Dias
Coágulo	1,679	7,388	0,671
Autógeno	1,443	0,338	1,443
Orthogen	2,35	5,037	2,35
Bio-Oss®	0	0,268	5,037
PLGA	4,03	1,343	4,03
PLGA+HA	5,709	4,701	2,35

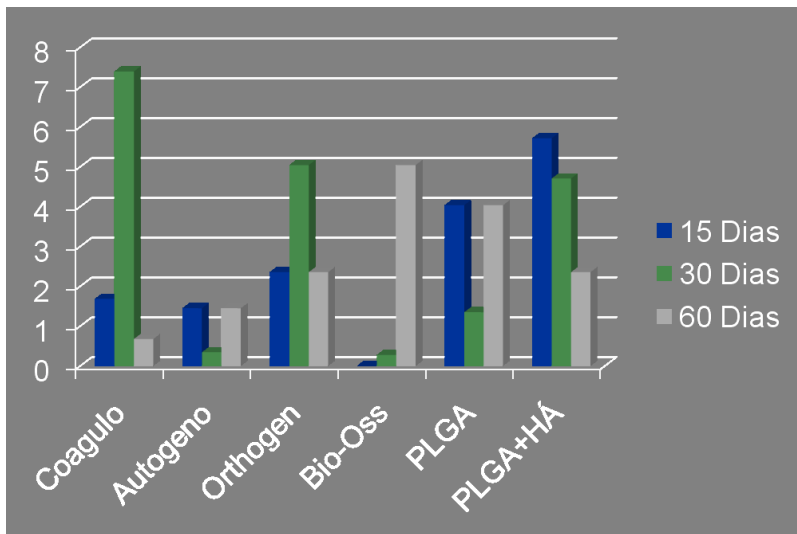


Gráfico 1 - TI - QA em cm²

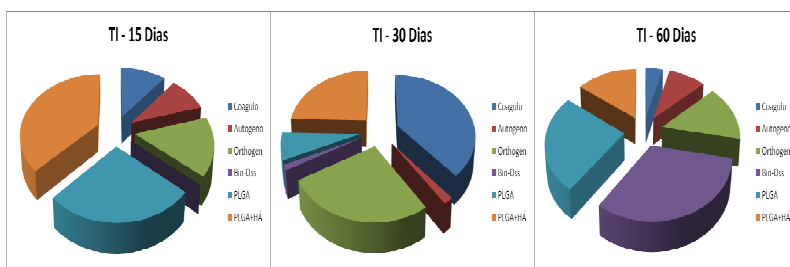


Gráfico 2 - TI - QA em cm² - 15, 30 e 60 dias

O tecido inflamatório mostrou aumento insignificante aos 15 dias e moderado aos 30 e 60 dias, em se tratando do grupo controle coágulo negativo. No grupo controle positivo (autógeno) mostrou aumento insignificante em todos os três períodos. No enxerto xenógeno

Orthogen, aumento desprezível aos 15 e 60 dias e insignificante aos 30 dias. Com o xenógeno Bio-Oss[®], aumento desprezível aos 15 e 30 dias e insignificante aos 60. O polímero de PLGA apresentou infiltrado inflamatório desprezível aos 15, 30 e 60 dias. O polímero composto de PLGA+HA apresentou uma redução em volume aos 15 e 30 dias, tornando-se insignificante nos 60 dias.

Tabela 2 - Somatório de perfis de Material de Enxerto em cm²

	15 Dias	30 Dias	60 Dias
Coágulo	0	0	0
Autógeno	23,5	14,1	22,83
Orthogen	22,166	22,539	12,426
Bio-Oss [®]	38,226	22,839	21,83
PLGA	38,226	22,839	21,83
PLGA+HA	21,158	26,868	26,632

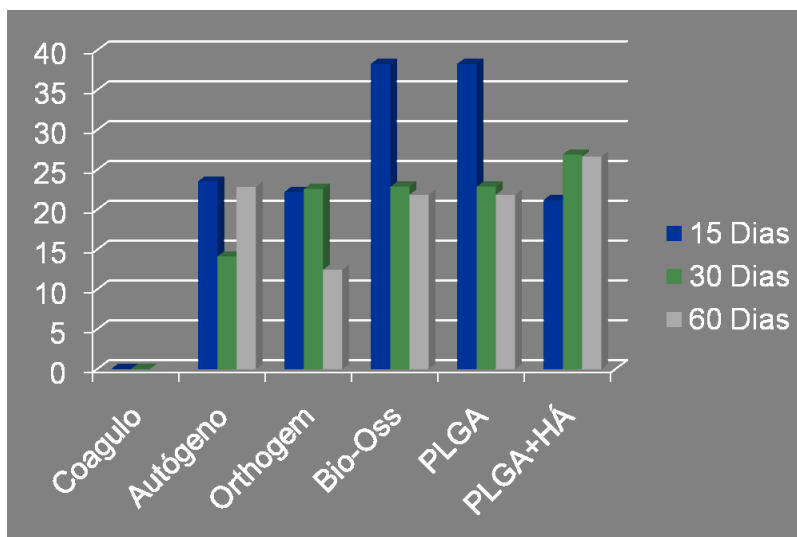


Gráfico 3 - ME - QA em cm²

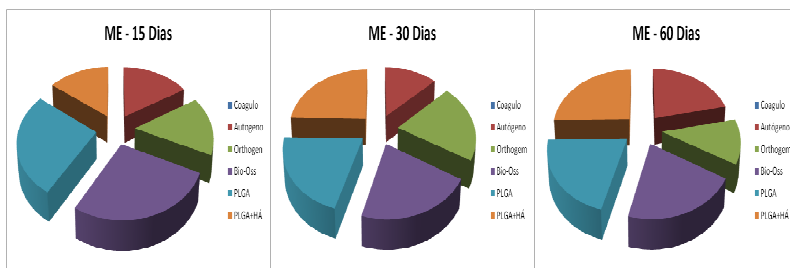


Gráfico 4 - ME – QA em cm² - 15, 30 e 60 dias

Em nosso estudo, na análise dos materiais de enxerto, no grupo controle negativo, não apresenta resultados estatísticos por estar preenchido por coágulo. No enxerto autógeno o mesmo particulado encontra-se moderadamente em todos os períodos de acompanhamento. No enxerto xenógeno Orthogen, quantidade moderada se acha aos 15 e 30 dias, sofrendo pequena diminuição (reabsorção) aos 60 dias. No enxerto xenógeno Bio-Oss[®] está em maior quantidade aos 15 dias, reabsorvendo leve e lentamente nos outros tempos. Com o polímero composto de PLGA, está mais presente aos 15 dias, sofrendo leve e gradativa reabsorção nos períodos seguintes. O grupo PLGA+HA em todos os períodos sem diferença significativa, confirmado por estudos, de que mostram a presença de HA até 44 meses após sua instalação.

Tabela 3 - Somatório de perfis de Osso Neoformado em cm²

	15 Dias	30 Dias	60 Dias
Coágulo	15,449	21,58	23,854
Autógeno	17,8	19,815	25,188
Orthogen	8,732	6,381	25,86
Bio-Oss [®]	17,464	25,86	24,817
PLGA	3,022	18,136	24,85
PLGA+HÁ	24,85	28,547	26,532

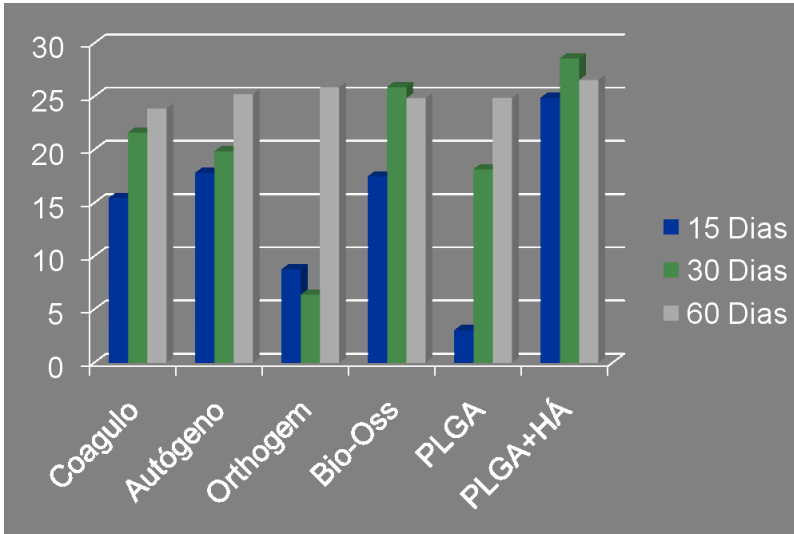


Gráfico 5 - ON - QA em cm²

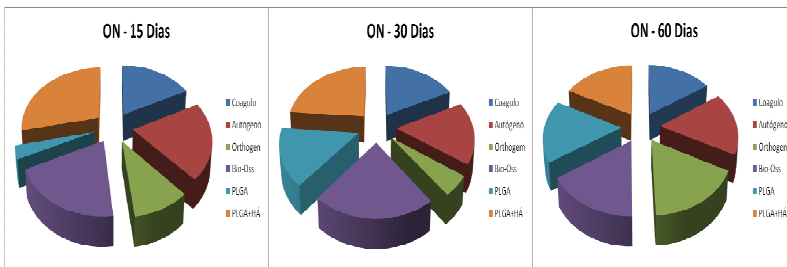
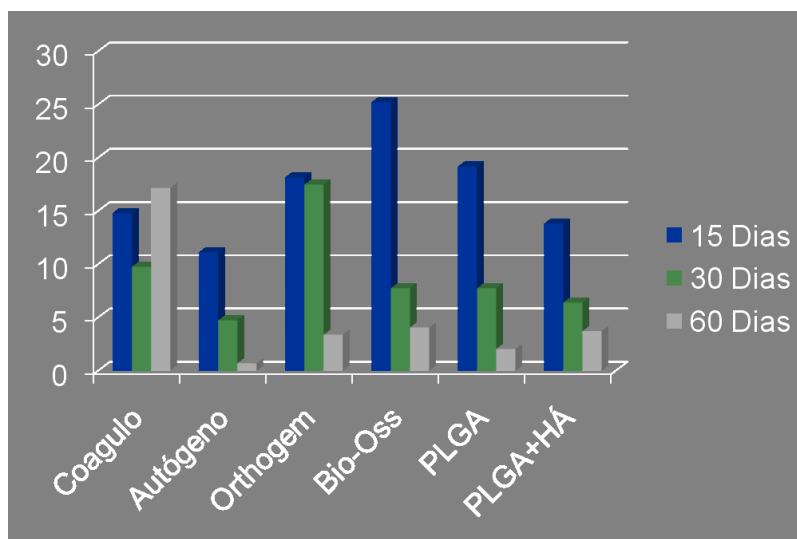


Gráfico 6 - ON - QA em cm² - 15, 30 e 60 dias

O tecido ósseo neoformado no grupo coágulo teve aumento gradativo nos três períodos, sendo superior no enxerto autógeno (Padrão ouro). No osso liofilizado xenógeno Orthogen obtivemos aumento moderado nos primeiros 30 dias, com aumento significativo aos 60 dias. No xenógeno Bio-Oss[®] obtivemos um crescimento inicial considerável com aumento gradativo aos 60 dias. No grupo PLGA, pequeno crescimento ósseo aos 15 dias, aumentando consideravelmente aos 30 e 60 dias. O grupo PLGA+HA, obteve um crescimento ósseo acentuado e equilibrado nos três períodos.

Tabela 4 - Somatório de perfis de Tecido Conjuntivo em cm²

	15 Dias	30 Dias	60 Dias
Coágulo	14,77	9,739	17,128
Autógeno	11,083	4,701	0,671
Orthogen	18,136	17,464	3,358
Bio-Oss®	25,188	7,724	4,03
PLGA	19,143	7,724	2,015
PLGA+HA	13,769	6,381	3,694

**Gráfico 7 - TC - QA em cm²**

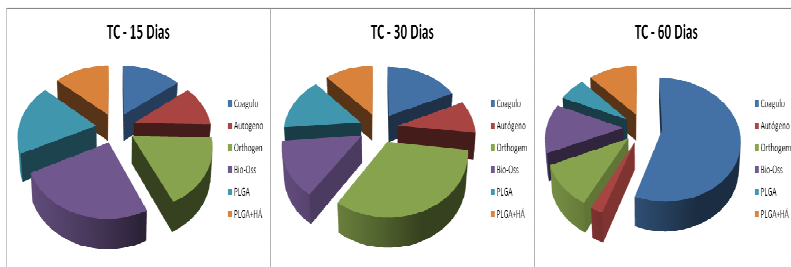


Gráfico 8 - TC - QA em cm² - 15, 30 e 60 dias

O tecido conjuntivo esteve presente em todos os grupos com redução gradativa igualitária com exceção do grupo controle negativo (coágulo), que teve aumento aos 60 dias.

Tabela 5 - Somatório de perfis de Tecido Adiposo em cm²

	15 Dias	30 Dias	60 Dias
Coágulo	6,381	4,366	8,396
Autógeno	11,418	5,037	2,015
Orthogen	4,701	8,06	8,396
Bio-Oss [®]	10,075	7,052	13,098
PLGA	8,396	2,686	7,724
PLGA+HA	8,06	2,015	6,381

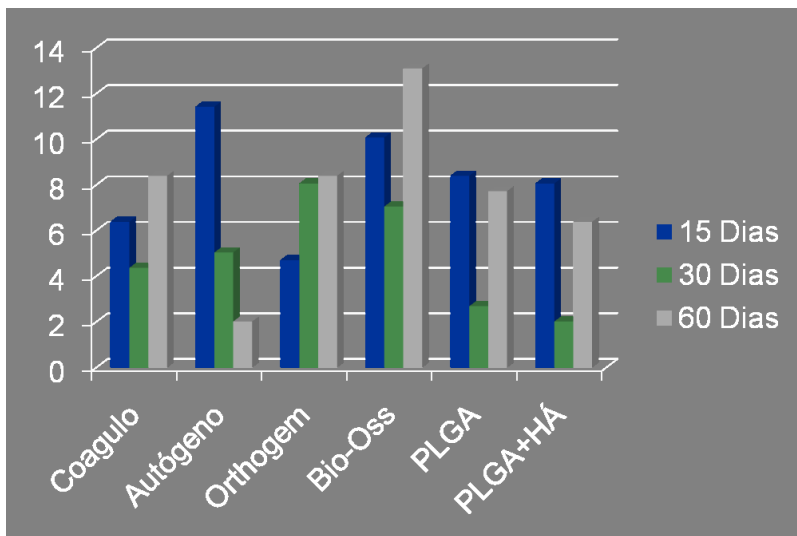


Gráfico 9 - TA - QA em cm²

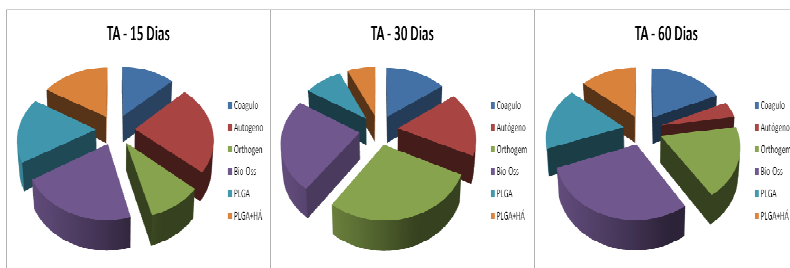


Gráfico 10 - TA - QA em cm² - 15, 30 e 60 dias

Com relação ao tecido adiposo, esteve presente aos 15 dias desde forma similar em todos os grupos. Aos 30 dias apresentou-se em maior quantidade nos ossos xenógenos, tendo aumento significativo em todos os grupos, pela grande quantidade de gordura na medular dos fêmures dos coelhos avaliados segundo os princípios estereológicos de Cavalieri, citados por Mandarin-de-Lacerda em 2004. Avaliação de tecido inflamatório, tecidos conjuntivo, remanescente de material de enxerto e tecido adiposo ainda não tinham sido observados em outros estudos por Estereologia. O tecido adiposo apresenta células mesenquimais

indiferenciadas que irão se transformar no tecido requerido pelo local de sua presença.

6 DISCUSSÃO

A incidência da perda de implantes em maxila posterior, com reabsorção acentuada após enxerto ósseo gira em torno de 15% (BRANEMARK; SVENSSON; VAN STEENBERGHE, 1995).

A cirurgia de enxerto ósseo reconstrutiva do esqueleto maxilofacial é apropriada para ser usada na reabilitação funcional da maxila e pode ser usada para reparar defeitos traumáticos, atróficos ou congênitos. Entretanto, cirurgias orais e maxilofaciais podem ter sérios problemas ao atender pacientes se o enxerto ósseo é rejeitado (DARLE, 1999 apud HOCHHEIM NETO, 2002).

Instalação de implantes pode ter um efeito dramático na estabilidade e retenção de próteses em pacientes edêntulos por maxilarectomia. Na ausência de dentes e falta de elementos de apoio para uma prótese a estabilidade é frequentemente inadequada e resultará em estética e funcionamentos insatisfatórios (IZZO et al., 1994; ROMANAS et al., 1997 apud HOCHHEIM NETO, 2002).

A necessidade de desenvolvimento de biomateriais poliméricos para reconstrução de defeitos ósseos periodontais, em reconstruções para implantodontia e em defeitos provocados nos tecidos peri-implantares, é imprescindível na odontologia atual, pela redução da morbidade dos procedimentos. A associação com células-tronco embrionárias desenvolvidas em meios de cultura em arcabouços pré-moldados, a partir de vários tecidos coletados do indivíduo é uma realidade (KIM et al., 2008).

Kim e colaboradores (2008) utilizaram arcabouços de PLGA+HA técnica de conformação gasosa, demonstrando exposição superior de partículas de HA do que na técnica com uso de solventes orgânicos.

Trabalho realizado por Rossi, Weinfeld e Miranda (2005) comprovou que a substituição do osso bovino tipo “cone alveolar” por osso natural é um processo lento, todavia, há relatos de partículas remanescentes em casos de enxertos de outros tipos de osso bovino mesmo após um período de 44 meses.

Aghaloo, Moy e Freymiller, em 2004, comprovaram que o osso autógeno e substitutos têm resultados similares estatisticamente e superiores ao grupo controle, conforme nosso estudo, utilizando estereologia.

Soren Schou e colaboradores (2003a, 2003b) estudando reconstituições ósseas em macacos concluíram que a estereologia foi uma boa alternativa para obtenção de resultados destas duas pesquisas.

Reconstruções ósseas foram feitas da mesma forma que em nosso estudo com algumas modificações utilizando osso autógeno e Bio-Oss[®], porém, com resultados similares com relação ao crescimento ósseo.

Aghaloo, Moy e Freymiller (2004) pesquisaram o plasma rico em plaquetas (PRP) conjuntamente com enxerto alográfico e xenográfico no osso oral e maxilofacial e cirurgias reconstrutivas para implantes. Esse estudo compara a cicatrização óssea e a formação em defeitos em crânios de coelhos com osso autógeno, xenógeno e xenógeno com PRP, com grupo sem enxerto como controle. Quinze coelhos Nova Zelândia foram incluídos nesta pesquisa. Quatro defeitos idênticos, com 8 mm de diâmetro, foram criados no crânio de cada coelho e imediatamente enxertados com todos os materiais. Cinco coelhos foram acompanhados 1 mês, 5 coelhos por 2 meses e 5 por 4 meses. A histomorfometria mostrou que o incremento ósseo na área dos defeitos autógenos e xenógenos, foram significativamente superiores que o grupo controle. Comparando estes resultados com nosso estudo, verifica-se que embora a localização e a metodologia das pesquisas realizadas, sejam semelhantes, os enxertos apresentam resultados similares, quando analisados por ANOVA.

Rimondini e colaboradores em estudo experimental *in vivo* de regeneração óssea em defeitos críticos, usando copolímero de PLA/PGA biodegradável injetado, em 2005, observaram que o assentamento foi feito em osso saudável padrão após implantação de PLA/PGA 50%/50% dispersado em solução aquosa de PGA e dextrano usando como substituto ósseo em modelo animal. Dois grupos de cinco coelhos foram usados. Em ambos os côndilos femurais foram realizados defeitos críticos de 6x10 mm. No lado direito PLA/PGA foi inserido e no lado esquerdo permaneceu vazio. Após 30 e 90 dias da cirurgia os animais foram sacrificados. Os defeitos do lado esquerdo não preenchidos mostraram uma cicatrização não espontânea após 30 e 90 dias. Sítios preenchidos com material experimental mostraram novo osso com extensão de 11,46% e 76,82% após 30 dias, e 75,98% e 95,34% após 90 dias. A histomorfometria mostrou incremento de osso maturado entre os 30 e 90 dias nos sítios experimentais aos 90 dias, não houve diferença estatística em se comparando com o osso normal. Copolímeros de PLA/PGA dispersados em matriz hidrossolúvel parecem um material osteocondutivo apropriado em defeitos ósseos de tamanho crítico. Testes de Wilcoxon foram utilizados entre os 30 e 60 dias para acessar o ganho ósseo. Teste de Man Whitney com método de Monte Carlo para probabilidade computadorizada foram usados para comparar as

mensurações entre os sítios cicatriciais aos 30, 60 dias e o osso normal com microscopia eletrônica de varredura. Apesar da metodologia de pesquisa, concentrações e localização favorável pela nutrição os enxertos apresentam resultados similares ao do nosso estudo mesmo com a utilização de outras metodologias.

Eeva Mäkelä e colaboradores, em 2007, desenvolveram um trabalho com rodas compósitas de ácido polilático poliglicólico (80%/20) autorreforçados com 2 mm de diâmetro e 36 mm em comprimento sendo implantados no tecido subcutâneo do dorsal de 20 coelhos. Osteotomias em distal de fêmur foram fixadas com estes cilindros (12x15 mm) nos coelhos. O acompanhamento variou entre 3 e 4 semanas. Depois de 6 meses as propriedades mecânicas foram reduzidas significativamente, mas as osteotomias cicatrizaram normalmente. A presente investigação mostra que as propriedades de fixação mecânica do SR-Polilático-glicólico (80/20) são viáveis para fixação de osteotomias em coelhos desde que técnica cirúrgica seja correta. Turkey e ANOVA foram utilizados na estatística. Nos períodos de tempo existentes em nossa pesquisa as concentrações do polímero composto foram parecidas em porcentagem, apesar de metodologia de pesquisa diferente. O trabalho de Mäkelä e colaboradores mostrou resultados similares aos nossos indicando que o método estereológico mesmo quando comparado a outros tipos de abordagem possibilitam obtenção de resultados morfométricos acurados.

Em nosso trabalho empregamos enxertos de PLGA, PLGA+HA, Bio-Oss[®], Orthogen, Autógeno (Controle Positivo) e Coágulo (Controle Negativo), avaliados através de Microscopia Óptica por estereologia e analisados tecido infamatório, material de enxerto, osso neoformado, tecidos conjuntivo e adiposo em 15, 30 e 60 dias.

Em relação ao tecido inflamatório observamos aumento insignificante aos 15 dias e moderado aos 30 e 60 dias, em se tratando do grupo controle coágulo negativo com resultados similares a Huang e colaboradores (2008). No Autógeno, considerado “padrão ouro”, o tecido inflamatório teve aumento insignificante em todos os três períodos confirmando resultados de outros estudos. No enxerto xenógeno Orthogen a presença de tecido inflamatório foi desprezível aos 15 e 60 dias e insignificante aos 30 dias mostrando-se um excelente material neste quesito. Com o xenógeno Bio-Oss[®] o tecido inflamatório desprezível aos 15 e 30 dias e insignificante aos 60 confirmando pequena presença de tecido inflamatório. O polímero de PLGA apresentou infiltrado inflamatório desprezível aos 15, 30 e 60 Dias. Estes nossos resultados quando comparados a outras publicações que

também utilizaram o PLGA tiveram resultados semelhantes. Os resultados com o polímero composto de PLGA+HA aos 15 e 30 dias relativos à quantidade de tecido inflamatório foram diminuindo, tornando-se insignificantes aos 60 dias. Isto significa que este nos parece ser também um excelente material.

Segundo Huang e colaboradores (2008) a observação histológica da resposta tecidual (1 a 9 semanas após a implantação) mostrou uma resposta inflamatória desprezível conforme artigo citado demonstrando processo de substituição.

Em nosso estudo, na análise dos materiais de enxerto, no grupo controle negativo, não apresenta resultados estatísticos por estar preenchido por coágulo. No enxerto autógeno particulado encontra-se moderadamente em todos os períodos de acompanhamento pelo processo de substituição por osteoclastos e regenerando por osteoindução, condução e osteogênese. No enxerto xenógeno Orthogen, quantidade moderada se acha aos 15 e 30 dias, sofrendo pequena diminuição (reabsorção) aos 60 dias não perdendo significativamente aos outros materiais. No enxerto xenógeno Bio-Oss[®] está em maior quantidade aos 15 dias, reabsorvendo leve e lentamente nos outros tempos conforme citações. O polímero composto de PLGA está mais presente aos 15 dias, sofrendo leve e gradativa reabsorção nos períodos, porém, não perdendo para as outras técnicas. O grupo PLGA+HA em todos os períodos sem diferença significativa discutido por estudos que mostram a presença de HA até 44 meses após sua instalação demonstrando clinicamente aumento em altura conforme imagens e revisão citadas.

O tecido ósseo neoformado no grupo coágulo demonstrou aumento gradativo nos três períodos, sendo superior no enxerto autógeno (Padrão ouro). O osso liofilizado xenógeno Orthogen pareceu ser um excelente material pelo aumento moderado nos primeiros 30 dias, com aumento significativo aos 60 dias. No xenógeno Bio-Oss[®] obtivemos um crescimento inicial considerável com aumento gradativo até os 60 dias. No grupo PLGA, pequeno crescimento ósseo aos 15 dias, aumentando consideravelmente aos 30 e 60 dias. Discutindo o grupo PLGA+HA, o crescimento ósseo acentuado e equilibrado nos três períodos. Várias análises estatísticas de artigos citados tiveram resultados similares com relação à utilização dos mais variados biomateriais.

O tecido conjuntivo esteve presente em todos os grupos com redução gradativa igualitária com exceção do grupo controle negativo

(coágulo), que teve aumento aos 60 dias, provavelmente conforme visto em outros estudos pela falta de osteocondutividade do biomateriais.

Com relação ao tecido adiposo, esteve presente aos 15 dias desde forma similar em todos os grupos. Aos 30 dias apresentou-se em maior quantidade nos ossos xenógenos, tendo aumento significativo em todos os grupos sendo pela grande quantidade de gordura na medular dos fêmures dos coelhos e não instalação de implantes osseointegráveis. Avaliação de tecido inflamatório, tecidos conjuntivo, remanescente de material de enxerto e tecido adiposo ainda não tinham sido observados em outros estudos por Estereologia demonstrando acurácia, rapidez, menor número de amostras necessárias facilitando um trabalho de pesquisa mais abrangente, avaliando segundo os princípios estereológicos de Cavalieri, citados por Mandarin-de-Lacerda em 2003.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que empregando esta metodologia em coelhos Nova Zelândia, utilizando os princípios estereológicos de Cavalieri citados por Mandarim-de-Lacerda (2003), conseguimos resultados similares e comparáveis a outros estudos e análises estatísticas, com excelentes resultados sobre os grupos controles. Todos os substitutos ósseos e osso autógeno tiveram resultados superiores comparados ao grupo controle negativo. Pudemos avaliar seis enxertos em três tempos e obtendo resultado mais rápido, fácil e acurado.

REFERÊNCIAS

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.

AL RUHAIMI, K. A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 16, n. 1, p. 105-114, Jan./Feb. 2001.

ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas: estado da arte. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 100-104, jan./fev. 2006.

ASPRINO, L. **Comparação entre substitutos ósseos de origem bovina sobre o processo de regeneração óssea guiada em defeitos perimplantares**: análise histológica e histométrica em tibia de cães. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.

ATTAWIA, M. A.; HERBERT, K. M.; LAURENCIN, C. T. Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 213, n. 2, p. 639-634, Aug. 1995.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 13-21, jan./mar. 2005.

BENGTSON, A. L. et al. Implante de Proteína Morfogenética do Osso (RHBMP-2) em arcabouço de osso inorgânico no tecido subcutâneo de rato. **Rev. FZVA**, Uruguaiana, v. 13, n. 2, p. 137-144, jul./dez. 2006.

BOYNE, P. J.; JAMES, R. A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 38, n. 8, p. 613-616, Aug. 1980.

BRANDA, F. et al. Effect of substitution M_2O_3 (M=La, Y, In, Ga, Al) for CaO on the bioactivity of 2.5CaO-2SiO₂ glass. **Biomaterials**, Guilford, v. 23, n. 3, p. 711-716, Feb. 2002.

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. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 6, n. 4, p. 227-231, Dec. 1995.

BRUGGENKATE, C. M.; VAN DEN BERGH, J. P. Maxillary sinus floor elevation: a valuable pre-prosthetic procedure. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 17, p. 176-182, June 1998.

BUCHOLZ, R. W. et al. Fixation with bioabsorbable screws for the treatment of fractures of the ankle. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v.76, n. 3, p. 319-324, Mar. 1994.

CHENG, J. C. et al. How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? **Spine**, Hagerstown, v. 27, n. 5, p. 467-474, Mar. 2002.

CHOI, J. Y. et al. Inhibition of bone healing by pamidronate in calvarial bony defects. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v. 103, n. 3, p. 321-328, Mar. 2007.

COSTA, E. et al. Biovidros: sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo de espuma. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.**, Brasília, DF, n. 30, p. 51-54, jan./jun. 2003.

CRUZ, A. C. C. **Caracterização físico-química e avaliação de biocompatibilidade de biovidros**: estudo laboratorial e histomorfométrico em ratos. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

DALL'ANTONIA, R. C. et al. Implante de osso cortical bovino inorgânico liofilizado (GEN-OX) em alvéolos dentais: estudo microscópico em ratos. **Rev. Odontol. Araçatuba**, Araçatuba, v. 27, n. 2, p. 129-135, jul./dez. 2006.

D'HOEDT, B. 10 Jahre Tübinger Implantat aus Frialit. Eine Zwischenauswertung der Implantatdatei. **Z. Zahnärztl. Implantol.**, v. 2, p. 6-10, 1986.

DI SILVIO, L.; DALBY, M. J.; BONFIELD, W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. **Biomaterials**, Guilford, v. 23, n. 1, p. 101-107, Jan. 2002.

EKHOLM, M. et al. A histological and immunohistochemical study of tissue reactions to solid poly(ortho ester) in rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 35, n. 7, p. 631-635, July 2006.

HOCHHEIM NETO, R. **Implantes zigomáticos na reabilitação oral**. 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Joinville.

HUANG, X.; MIAO, X. Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H₂O₂ foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. **J. Biomater. Appl.**, Lancaster, v. 21, n. 4, p. 351-374, Apr. 2007.

HUANG, Y. X. et al. Preparation and properties of Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/Nano-Hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds. **J. Biomater. Appl.**, Lancaster, v. 22, n. 5, p. 409-432, Mar. 2008.

HULBERT, S. F. et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 4, n. 3, p. 433-456, Sept. 1970.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M. B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 11, n. 5, p. 667-678, Sept./Oct. 1996.

ISHAUG-RILEY, S. L. et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomaterials**, Guilford, v. 19, n. 15, p.1405-1412, Aug. 1998.

ISHAUG, S. L. et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblasts culture in biodegradable polymer scaffolds. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 36, n. 1, p. 17-28, July 1997.

IZZO, S. R. et al. Reconstruction after total maxillectomy using and implant – retained prothesis: a case report. **Int. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 9, n. 5, p. 593-595, Sept./Oct. 1994.

JENSEN, J.; SINDET-PEDERSEN, S.; ENEMARK, H. Reconstruction of residual alveolar cleft defects with one-stage mandibular bone grafts and osseointegrated implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 56, n. 4, p. 460-466, Apr. 1998.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J. Dent. Educ.**, Washington, v. 65, n. 5, p. 456-462, May 2001.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 518-522, jul./ago. 2000.

KIM, S. et al. *In vivo* bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds. **Biomaterials**, Guilford, v. 29, n. 8, p. 1043-1053, Mar. 2008.

KIM, S. S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guilford, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, Mar. 2006.

KOHAL, R. J. et al. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets: an experimental study in dogs. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 69, n. 8, p. 927-937, Aug. 1998.

KUMARASURIYAR, A. et al. Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis. **Tissue Eng.**, New York, v. 11, n. 7/8, p. 1281-1295, July/Aug. 2005.

LEKHOLM, U. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II): a cross-sectional retrospective study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 53-61, Feb. 1986.

LEONG, N.L.; JIANG, J.; LU, H.H. Polymer-ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Eng. Med. Biol. Soc.**, Piscataway, NJ, v. 1, p. 2651-2654, 2006. (EMBS Annual International Conference, 28th, New York, 30 Aug.-03 Sept., 2006).

MAGINI, R. S.; GOMES JUNIOR, R. **Implantodontia**: do sonho à realidade - planejamento. Florianópolis: Multmeios, 2007. 271 p.

MÄKELÄ, E. et al. Fixation of experimental osteotomies with bioabsorbable SR-poly(lactide-polyglycolide (80/20) polymeric rods. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v. 19, n. 3, p. 1061-1067, Mar. 2008.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 4, p. 469-486, dez. 2003.

MESSIAS, A. D. **Interação entre células osteoblásticas e arcabouços do compósito de PLGA com hidroxiapatita**. 2008. 95 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Médicas e Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

MESSIAS, A. D. et al. PLGA-hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblastic-like cells. **Key Eng. Mater.**, Arlington, v. 396-398, p. 461-464, Oct. 2009.

MIAO, X. et al. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid). **Acta Biomater.**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 638-645, May 2008.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, Guilford, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, Dec. 2000.

MÜLLER, P. et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Cell. Mol. Med.**, London, v. 12, n. 1, p. 282-291, Jan./Feb. 2008.

OLIVEIRA, J. M. et al. Bonelike®/PLGA hybrid materials for bone regeneration: preparation route and physicochemical characterisation. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v. 16, n. 3, p. 253-259, Mar. 2005.

PEREIRA FILHO, V. A. et al. Bases biológicas do tecido ósseo. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento**. São Paulo: Santos, 2004. p. 45-69.

PETER, S. J. et al. Polymer concepts in tissue engineering. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 43, n. 4, p. 422-427, Winter 1998.

PIETRZAK, W. S.; SARVER, D. R.; VERSTYNEN, M. L. Bioabsorbable implants: practical considerations. **Bone**, New York, v. 19, n. 1, supl. 1, p. s109-s119, July 1996.

PYLES, M. D. **Avaliação de parafusos bioabsorvíveis na reparação de fraturas experimentais de sesamoides proximais em equinos**. 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

RIMONDINI, L. et al. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using na injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v. 99, n. 2, p. 148-154, Feb. 2005.

ROETHER, J. A. et al. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. **Biomaterials**, Guilford, v. 23, n. 18, p. 3871-3878, Sept. 2002.

ROSENBERG, O. et al. Trends and developments in the manufacturing of hip joints: an overview. **Int. J. Adv. Manuf. Technol.**, London, v. 27, n. 5/6, p. 537-542, Jan. 2006.

ROSSI, R. ; WEINFELD, I.; MIRANDA, S. L. Estudo radiográfico computadorizado e histológico de enxerto de osso bovino tipo “cone alveolar” em alvéolos de humanos. **RPG Rev. Pós-Grad.**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 186-194, abr./jun. 2005.

ROTHAMEL, D. et al. Kieferkammveränderungen nach versorgung frischer extraktionsalveolen mit poly lactidvernetzten beta-TCP wurzelreplikaten - eine histomorphometrische tierstudie. **Mund- Kiefer-Gesichtschir.**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 89-97, Apr. 2007.

RYU, W. et al. The Construction of three-dimensional micro-fluidic scaffolds of biodegradable polymers by solvent vapor based bonding of micro-molded layers. **Biomaterials**, Guilford, v. 28, n. 6, p. 1174-1184, Feb. 2007.

SANADA, J. T. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 11, n. 3, p. 209-215, jul./set. 2003.

SANTOS JUNIOR, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, São Carlos, SP, v. 17, n. 4, p. 308-317, out./dez. 2007.

SARAZIN, P.; ROY, X.; FAVIS, B. D. Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 28, p. 5965-5978, Dec. 2004.

SCHRAMM, A. et al. Rechnergestützte insertion von zygomaticus-implantaten (Branemark System) nach ablativer tumorchirurgie. **Int. Poster J. Dent. Oral Med.**, Berlin, v. 1, n. 4, 1999. Disponível em: <<http://ipj.quintessenz.de/index.php?content=issues&doc=poster&select=25>>. Acesso em: 27 nov. 2008.

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.

_____. Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 14, n. 4, p. 412-422, Aug. 2003.

SEDRAKYAN, S. et al. Tissue engineering of a small hand phalanx with a porously casted polylactic acid polyglycolic acid copolymer. **Tissue Eng.**, New York, v. 12, n. 9, p. 2675-2683, Sept. 2006.

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v.8, n. 1/2, p.1-10, jan./jun. 2000.

STARES, S. L. **Biomateriais utilizados em tecidos ósseos**. 2007. 59 f. Monografia (Especialização em Engenharia Mecânica) – Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TANG, Z. G.; HUNT, J. A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation *in vitro*. **Biomaterials**, Guilford, v. 27, n. 25, p. 4409-4418, Sept. 2006.

TAYLOR, J. C. et al. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 17, n. 3, p. 321-330, May/June 2002.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S. R.; LASKIN, D. M. Oral and maxillofacial surgery advances in implant dentistry. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 15, n. 1, p. 47-55, Jan./Feb. 2000.

VÄLIMAA, T; LAAKSOVIRTA, S. Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 7-8, p. 1225-1232, Mar./Apr. 2004.

WEI, G.; MA, P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 19, p. 4749-4757, Aug. 2004.

WEISCHER, T.; SCHETTLER, D.; MOHR, C. Titanium implants in the zygoma as retaining elements after hemimaxillectomy. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 12, n. 2, p. 211-214, Mar./Apr. 1997.

WHANG, P. G.; WANG, J. C. Bone graft substitutes for spinal fusion. **Spine J.**, New York, v. 3, n. 2, p. 155-165, Mar./Apr. 2003.

YAO, L. et al. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. **Acta Biomater.**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 580-588, Feb. 2008.