



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

M538a Mendes, Vanessa Cristina
Avaliação do reparo ósseo de cavidades preenchidas por vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado: análises biomecânica, microscópica e histométrica em cães / Vanessa Cristina Mendes. - Araçatuba : [s.n.], 2004
139 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho

1. Implante dentário endosseio 2. Materiais biocompatíveis

Black D7
CDD 617.6

Vanessa Cristina Mendes

Avaliação do reparo ósseo de cavidades preenchidas por vidro bioativo ou osso liofilizado desmineralizado: análises biomecânica, microscópica e histométrica em cães

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do “Câmpus de Araçatuba – UNESP”, para obtenção do grau de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho

Araçatuba
2004

Dados Curriculares

Vanessa Cristina Mendes

NASCIMENTO	16.7.1971 – UBERLÂNDIA/MG
FILIAÇÃO	CARLOS JUNES MENDES IVANA MARTA DIAS MENDES
1989/1993	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Federal de Uberlândia
1995/1997	Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na Universidade Federal de Uberlândia
1997/1998	Professora Substituta do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, da Universidade Federal de Uberlândia
1999/2000	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco- Maxilo-Facial, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
2001	Início do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
2002-2003	Doutorado-sanduiche na Universidade de Toronto sob a orientação do Prof. Dr. John E. Davies
2004	Defesa de tese e conclusão do Curso de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Dedicatória

Dedico esse trabalho

A vocês queridos pais,

Carlos e Ivana,

Que acreditaram no meu sonho

e me apoiaram para a sua concretização.

Obrigada pela base sólida e por tanto amor a mim dedicado.

"A vida só pode ser compreendida olhando-se para
trás;
mas só pode ser vivida olhando-se para a frente. "

Soren Kierkegaard

Agradecimentos Especiais

O Trem da Vida

“Isso mesmo, a vida não passa de uma viagem de trem, cheia de embarques e desembarques, alguns acidentes, surpresas agradáveis em alguns embarques e grandes tristezas em outros.

Quando nascemos, entramos nesse trem e nos deparamos com algumas pessoas que julgamos, estarão sempre nessa viagem conosco: nossos pais.

Infelizmente isso não é verdade, em alguma estação eles descerão e nos deixarão órfãos de seu carinho, amizade e companhia insubstituível....mas isso não impede que durante a viagem, pessoas interessantes e que virão a ser super especiais para nós embarquem. Chegam nossos irmãos, amigos, e amores maravilhosos. Muitas pessoas tomam esse trem apenas a passeio, outros encontrarão nessa viagem somente tristezas, ainda outros circularão pelo trem prontos a ajudar

quem precisa. Muitos descem e deixam saudades eternas, outros tantos passam por ele de uma forma que quando desocupam seu assento, ninguém nem sequer percebe.

Curioso é constatar que alguns passageiros que nos são tão caros acomodam-se em vagões diferentes dos nossos, portanto somos obrigados a fazer esse trajeto separados deles, o que não impede é claro, que durante a viagem, atravessemos com grande dificuldade nosso vagão e cheguemos até eles.... só que infelizmente jamais poderemos sentar ao seu lado, pois já terá alguém ocupando aquele lugar. Não importa, é assim a viagem, cheia de atropelos, sonhos, fantasias, esperas, despedidas.....porém, jamais retornos.

Façamos essa viagem então, da melhor maneira possível, tentando nos relacionar bem com todos os passageiros, procurando em cada um deles o que tiverem de melhor, lembrando sempre que em algum momento do trajeto eles poderão fraquejar e provavelmente precisaremos entender isso, porque nós também fraquejaremos muitas vezes e com certeza haverá alguém que nos estenderá a mão.

O grande mistério afinal, é que jamais saberemos em qual parada desceremos, muito menos nossos companheiros, nem mesmo aquele que está sentado ao nosso lado. Eu fico pensando se quando descer desse trem sentirei saudades....acredito que sim, me separar de alguns amigos que fiz nele será no mínimo dolorido, mas me agarro na esperança de que em algum momento estarei na estação principal e terei a grande emoção de vê-los chegar com uma bagagem que não tinham quando embarcaram.....e o que vai me deixar feliz será pensar que eu colaborei para que ela tenha crescido e se tornado valiosa.

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertold Brecht

Ao Professor Darceny Zanetta Barbosa

Pela ajuda fundamental na idealização e concretização desse trabalho.
Também pela amizade, apoio e incentivo constantes.

Professor Wilson Roberto Poi

Pelas nossas conversas sempre produtivas,
e pelos exemplos de ética e perseverança na busca de um ideal.

Professores Idelmo Rangel Garcia Júnior e Osvaldo Magro Filho (Dinho)

Pela oportunidade de uma convivência próxima e com tanto aprendizado,
não apenas de cirurgia, mas sobretudo de conduta profissional.

**"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém
Que nos faça fazer o melhor que pudermos."**

Ralph Waldo Emerson

Ao Cláudio, Andréa, Maria Paula e Gabriel, vovó Vadinha e vovó Julieta,
Pelo incentivo e apoio, e também por estarem sempre presentes, mesmo
quando distantes fisicamente.

Ao Branimir, por todos os nossos momentos juntos e por fazer parte da
minha vida de forma tão intensa, mesmo quando a distância nos separa.

Às minhas grandes amigas Ana Paula Fanezi Bassi, Alessandra Maia
Castro, Daniela Ponzoni, Laura Pagliuso Paleckis, Sônia Panzarini, e
Roberta Martinelli de Carvalho, pelos momentos inesquecíveis, pela
amizade e cumplicidade cultivadas, pelo carinho que recebi de vocês e
por todas as nossas gargalhadas.

Ao veterinário Cirilo pela anestesia e cuidados com os animais, ao colega
Ariel Lenharo, pela ajuda nas cirurgias e pelo material cedido, à Cida e
ao Felipe, também pelo auxílio nas cirurgias experimentais,

Aos Professores Tetuo Okamoto, Márcio Giamprieto Sanches, Antônio César Perri de Carvalho, Celso Koogi Sonoda, Denise Pedrini, pelas lições transmitidas e pelo carinho com que fui acolhida,

Aos companheiros do Curso de Pós-Graduação Marcos Moro, João Carlos Wagner, Luiz Francisco Coradazzi (Kiko), Paulo Norberto Hasse, Natasha Magro Érnica, Jordan Lima, Fernando Kayatt, Djalma Pereira Nunes Filho, Fernando Lupinno, Fernando Cosso, Fernando Pastor, Oscar Mosele, Ariel Lenharo, Adolfo Embacher Filho, Laércio W. Vasconcelos, Vicente de Souza Pinto, Daniel Rey de Carvalho, colegas das áreas de Estomatologia, Periodontia, Prótese, Ortodontia, Odontopediatria e Odontologia Social, alunos e ex-alunos do curso de Graduação em Odontologia - FOA - UNESP, pela amizade e enriquecedores momentos de convivência,

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Ana Cláudia Macedo (Claudinha), Maria Dirce Colli Boato, Bernadete Maria Nunes Kimura, Gilmar Martins Oliveira, Cleide Lemes Calzadilla, Sônia Maria Silva Ribeiro, Glauco José de Carvalho, Isabel Cristina Lui Poi pela atenção, carinho e auxílio quando precisei, funcionárias da secretaria Marina Midori Sakamoto Kawagoi e Adélia Barreto Claro da Silva pela atenção sempre dispensada, e aos funcionários da biblioteca, pelo atendimento exemplar sempre acompanhado por um largo sorriso,

À Dra. Mariliza Comar Astolphi de Carvalho pela atenção e o carinho com que sempre me acolheu e é claro, pelos ensinamentos fundamentais na área de prótese,

José Fernandes (Zé da Telha), Felisteus (Fifi), Renata, Silene, Patrícia, Simone, e aos funcionários do NEC-Araçatuba: Aline, Cristiane, Marli, Jane, Jorge, por tornarem agradáveis os momentos de trabalho,

Aos integrantes do grupo Bone Interface da Universidade de Toronto, com quem tive a possibilidade de conviver: Professor Ron Zohar, Antonio Salgado, Cory Goldberg, David Lickorish, Dolores Baksh, Feryal Sarraf, Jeff Karp, Jenny Clifford, Kathy Rzeszutek, Kexi Sun, Lena Kikuchi, Lianne Kark, Limin Guan, Maria Haider, Masaaki Takechi, Stuart Rae, Rahul Sarugaser, Raisa Yakubovich e Wanda Oprea, aos funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade de Toronto, especialmente Susan Carter e Robert Chernecky, e aos funcionários do Department of Comparative Medicine da Universidade de Toronto, agradeço pela amizade com que sempre me trataram e pela imensa ajuda para a concretização desse trabalho,

À Melaine Lawall e seus pais, por terem aberto a porta de sua família, permitindo que de certa forma, eu hoje faça parte dela também,

Aos queridos amigos Marisa e Gustavo Brasil, seus filhos Juliana, Luciana e Leonardo, todos os outros membros e amigos da família Brasil, Luiz e Sandra Zamuner e os filhos Daniel e Gabriel, Reynaldo e Sylvia

Todescan. Vocês se tornaram minha família brasileira no Canadá. Obrigada pelo carinho com que me acolheram e me apoiaram durante o ano que passamos juntos,

À Ana Carla Raphaelli Nahás, minha grande companheira em Toronto, pela possibilidade que tivemos de compartilhar tantas experiências novas, que resultaram em uma amizade tão sólida,

Aos amigos da Universidade Federal de Uberlândia Iris Malagoni Merquez, Aparecido Eurípedes Onório Magalhães, Cláudia Jordão, Rosana Ono, Aparecida Lourenço, Luciana Goulart, Luiz Antônio P. Marques, por permitirem que a nossa amizade sempre permaneça inalterada, mesmo quando estamos distantes,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES em especial à funcionária Fátima Solange Cid de Matos, à Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, sob a direção do prof. Dr. Marcos Macari, pela bolsa do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE) a mim concedida e pela seriedade e atendimento impecáveis desde o primeiro ao último dia do programa,

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob a direção do Professor Paulo Roberto Botacin, Comissão de Bioética em experimentação animal, CAPES e à Universidade Federal de Uberlândia, pela possibilidade de realização desse projeto.

Epígrafe

“ É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver... ”

Martin Luther King

Sumário

Lista de Figuras	17
Lista de Abreviaturas	22
Resumo.....	24
1 Introdução	27
2 Revisão da Literatura	33
3 Proposição	59
4 Material e Método	61
5 Resultado	81
6 Discussão	115
7 Conclusão	127
8 Referências Bibliográficas	129
Abstract	138

Lista de Figuras

Figura 1.	Incisão no húmero do cão.	65
Figura 2.	Exposição do tecido ósseo.	65
Figura 3.	Guia cirúrgico em posição.	65
Figura 4.	Perfuração da cavidade.	65
Figura 5.	Preenchimento da cavidade com vidro bioativo.	67
Figura 6.	Membrana de titânio sobre a cavidade.	67
Figura 7.	Sutura no pós-operatório imediato.	67
Figura 8.	Reinstalação do guia cirúrgico.	68
Figura 9.	Trefina de 2mm de diâmetro para retirada do material.	69
Figura 10.	Material encaminhado para processamento histológico.	69
Figura 11.	Implantes de titânio no centro das cavidades.	69
Figura 12.	Posição dos implantes de titânio após remoção do guia.	69
Figura 13.	Torquímetro digital.	70
Figura 14.	Teste biomecânico.	70
Figura 15.	Radiografias após sacrifício dos animais e remoção das peças.	71
Figura 16.	Soxhlet Extraction Apparatus	72
Figura 17.	Delimitação da area de interesse para análise histométrica.	75
Figura 18.	Área total do defeito.	76
Figura 19.	Software Sigma Scan Pro 4. Figura no centro representando a área total do defeito (vermelho) sobreposta pela área ocupada pelo implante de titânio (verde).	77

Figura 20.	Imagem para cálculo da porcentagem de neoformação óssea.	78
Figura 21.	Representação dos valores de contra-torque obtidos nos 4 grupos.	82
Figura 22.	Vidro bioativo. Tecido ósseo com trabeculado denso e espaços medulares. Presença de remanescentes do material. Valor de contra-torque 30,1 Ncm. Tricrômico de Masson. Original 100X.	85
Figura 23.	Vidro bioativo. Tecido ósseo ocupando boa parte da amostra. Valor de contra-torque 17,6 Ncm. Tricrômico de Masson. Original 100X.	85
Figura 24.	Vidro bioativo. Tecido denso e irregular em continuidade com o tecido ósseo. Valor de contra-torque 30,1 Ncm. Tricrômico de Masson. Original 100X.	86
Figura 25.	Vidro bioativo. Íntimo contato do tecido denso com a interface do biomaterial. Valor de contra-torque 30,1 Ncm. Tricrômico de Masson. Original 250X.	87
Figura 26.	Vidro bioativo. Área do tecido denso e irregular da figura anterior em maior aumento mostrando células arredondadas ao seu redor. Tricrômico de Masson. Original 1000X.	87
Figura 27.	Vidro bioativo. Grânulo de vidro bioativo em maior aumento mostrando cavitação e crescimento de tecido ósseo em seu interior. Tricrômico de Masson. Original 1000X.	88
Figura 28.	Vidro bioativo. Comunicação entre a porção externa e interna dos grânulos através das fissuras. Tricrômico de Masson. Original 1000X.	89
Figura 29.	Vidro bioativo. Incorporação dos grânulos de vidro bioativo ao tecido ósseo. Valor de contra-torque 43,7 Ncm. Tricrômico de Masson. Original 250X.	89
Figura 30.	Ossos liofilizados desmineralizados. Tecido ósseo com pequenas áreas interpostas por medular. Valor de contra-torque 32,8 Ncm. HE. Original 100X.	90

Figura 31.	Osso liofilizado desmineralizado. Poucos remanescentes do material no tecido ósseo. HE. Original 250X.	91
Figura 32.	Osso liofilizado desmineralizado. Detalhe da figura anterior em maior aumento para a visualização de remanescentes do material. HE. Original 1000X.	91
Figura 33.	Osso liofilizado desmineralizado. Tecido conjuntivo denso observado em alguns animais. Valor de contra-torque 4,7 Ncm. HE. Original 100X.	92
Figura 34.	Osso liofilizado desmineralizado. Partículas do material eram observadas envoltas por este tecido. HE. Original 250X.	93
Figura 35.	Osso liofilizado desmineralizado. Presença de fibroblastos no tecido conjuntivo e células gigantes ao redor do implante. HE. Original 1000X.	94
Figura 36.	Coágulo. Tecido ósseo trabecular bem organizado interposto por medular. Valor de contra-torque 7,1 Ncm. HE. Original 100X.	95
Figura 37.	Coágulo. Figura anterior em maior aumento para observação da organização do osso trabecular e medular. HE. Original 250X.	95
Figura 38.	Osso pré-existente. Presença de osso trabecular e medular. Valor de contra-torque 17,2 Ncm. HE. Original 100X.	96
Figura 39.	Osso pré-existente. Grande quantidade de medular em relação ao osso trabecular. Valor de contra-torque 25,5 Ncm. HE. Original 100X.	97
Figura 40.	Osso pré-existente. Amostra que apresentou o maior valor de contra-torque (69,6 Ncm). Observa-se o tecido ósseo compacto sem medular. HE. Original 100X.	98
Figura 41.	Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons das amostras do vidro bioativo. Original 25X.	99-100

Figura 42.	Imagem de microscopia eletrônica por retro- espalhamento de elétrons das amostras do osso desmineralizado liofilizado. Original 25X.	100- 101
Figura 43.	Imagem de microscopia eletrônica por retro- espalhamento de elétrons das amostras do coágulo. Original 25X.	102- 103
Figura 44.	Imagem de microscopia eletrônica por retro- espalhamento de elétrons das amostras do osso pré-existente. Original 25X.	103- 104
Figura 45.	Vidro Bioativo. Imagem de microscopia óptica (Original 10X) e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons (Original 22X). Valor de contra-torque 1,7 Ncm.	106
Figura 46.	Vidro bioativo. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado direito). Original 20X. Imagem correspondente de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons correspondente. Original 22X. Valor de contra-torque 1,7 Ncm.	107
Figura 47.	Vidro bioativo. Imagem anterior em maior aumento para observação de remanescentes do biomaterial implantado. Original 40X. Valor de contra-torque 1,7 Ncm.	107
Figura 48.	Vidro bioativo. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado esquerdo). Original 20X. Imagem correspondente de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons. Original 22X. Valor de contra-torque 1,7 Ncm.	108
Figura 49.	Ossos liofilizados desmineralizados. Imagem de microscopia óptica (Original 10X) e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons (original 25X). Valor de contra-torque 42,8 Ncm.	109

- Figura 50. Osso liofilizado desmineralizado. Microscopia 109
óptica do bloco mostrando a interface do implante
de titânio com o tecido ósseo (lado direito). Original
20X. Imagem de microscopia eletrônica por retro-
espalhamento de elétrons correspondente. Original
22X. Valor de contra-torque 42,8 Ncm.
- Figura 51. Osso liofilizado desmineralizado. Microscopia 110
óptica do bloco mostrando a interface do implante
de titânio com o tecido ósseo (lado esquerdo).
Original 20X. Imagem de microscopia eletrônica
por retro-espalhamento de elétrons
correspondente. Original 22X. Valor de contra-
torque 42,8 Ncm.
- Figura 52. Porcentagem de neoformação óssea nos defeitos 111
criados em húmero de cão e preenchidos pelos
biomateriais e coágulo.

Lista de Abreviaturas

BG = vidro bioativo

C = coágulo

DFDBA = (Demineralized freeze-dried bone allograft) - osso liofilizado desmineralizado

EDX = (Energy dispersive analysis) – análise por dispersão de energia

EV = via endovenosa

FOA – UNESP = Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista

FTIR = (Fourier Transform Infrared) spectroscopy - espectroscopia infravermelha de Fourier

γ = gamma

g = grama

HCl = ácido clorídrico

HE = Hematoxilina e Eosina

I = região de osso pré-existente

IM = via intramuscular

kg_y = kilogray

kv = kilovolts

LH = osso desmineralizado liofilizado humano

μm = micrometro

ml = mililitro

mm = milímetro

PMMA = polimetil metacrilato

rpm = rotações por minuto

SBF = Simulated body fluid – solução fisiológica simulada

SEM = (Scanning electron microscopy) – microscopia eletrônica de varredura

UFU = Universidade Federal de Uberlândia

MENDES, V. C. *Avaliação do reparo ósseo de cavidades preenchidas por vidro bioativo ou osso liofilizado desmineralizado: análises biomecânica, microscópica e histométrica em cães*. Araçatuba, 2004. 139p. Tese (Doutorado em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

Os objetivos do presente estudo foram analisar e comparar, em cães, a reparação óssea em defeitos preenchidos com vidro bioativo e osso desmineralizado liofilizado e comparar com áreas que não receberam biomateriais, antes e após a inserção de implantes dentários de titânio. Cavidades com 6mm de diâmetro foram realizadas em ambos os úmeros de 6 cães machos saudáveis e preenchidas com vidro bioativo, osso liofilizado desmineralizado e coágulo. Após 5 meses de reparação, foi removido tecido ósseo do centro das cavidades para análise de microscopia óptica. A seguir, implantes dentários de titânio foram colocados no centro dessas cavidades e em áreas de osso pré-existente. Três meses depois, realizou-se o teste biomecânico de contra-torque dos implantes. Os cães foram sacrificados e o tecido ósseo encaminhado para processamento e análise de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons.

No teste biomecânico não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os 4 grupos. A análise de microscopia óptica demonstrou a presença de ambos os biomateriais e tecido ósseo

neoformado na maioria das amostras do grupo experimental. Na microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons observou-se neoformação óssea em todos os grupos. Pela análise histométrica, a quantidade de neoformação óssea no grupo do vidro bioativo foi estatisticamente maior em relação aos outros grupos.

Concluiu-se que o vidro bioativo apresentou os melhores resultados em porcentagem de neoformação óssea. No entanto, uma reparação satisfatória foi demonstrada em todos os grupos, com adequada qualidade óssea ao redor dos implantes dentários.

Palavras-chave: Implante dentário endosseado, Materiais biocompatíveis

1 Introdução

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo (Junqueira & Carneiro, 1995; Davies, 2003). Cresce por aposição e possui células inclusas em sua matriz intercelular calcificada (Junqueira & Carneiro, 1995; Davies, 2003) como resultado desse processo. O metabolismo e fisiologia óssea estão relacionados com 3 tipos celulares (Garg, 1998) que apresentam diferentes características e funções.

Os osteoblastos são derivados de uma linhagem celular mesenquimal (Ten Cate, 1988; Hollinger et al., 1999) e responsáveis pela síntese de matriz óssea. Quando da mineralização da matriz, alguns osteoblastos tornam-se envoltos por ela (Davies, 2003), perdem a capacidade secretória e transformam-se em osteócitos (Junqueira & Carneiro, 1995; Guyton & Hall, 1997; Garg, 1998). Já os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, derivadas dos monócitos (Junqueira & Carneiro, 1995; Guyton & Hall, 1997) ou de células semelhantes a eles (Guyton & Hall, 1997) responsáveis pela reabsorção óssea (Junqueira & Carneiro, 1995; Guyton & Hall, 1997; Garg, 1998).

O tecido ósseo quando lesado possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes (Ludwig et al., 2000). As células da região tentam restaurar a forma e a função perdidas através da recapitulação de eventos embriológicos (Hollinger et al., 1999).

A perda óssea alveolar ocorre por vários motivos: doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas

Introdução

devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada. O interesse na utilização de biomateriais como uma alternativa aos enxertos ósseos autógenos tem aumentado, assim como os esforços para o entendimento de seus mecanismos biológicos.

Os enxertos ósseos e implantes são utilizados para fornecer arcabouço para a regeneração óssea, minimizar defeitos resultantes de trauma ou cirurgia e restaurar perdas (Garg, 1999). Seus mecanismos de ação normalmente dependem da origem e composição de cada um (Garg, 1999).

É importante que se faça uma distinção entre enxertos e implantes. O enxerto, ou transplante, é um tecido ou órgão vivo, pois contém células do doador e portanto, espera-se que sobreviva na região receptora (Bauer & Muschler, 2000). Já o implante, ao contrário, é um material sem vitalidade (Bauer & Muschler, 2000).

Apesar dos enxertos ósseos autógenos serem amplamente aceitos como padrão para o tratamento de defeitos ósseos, os implantes homogêneos e heterogêneos, e os substitutos ósseos sintéticos têm sido amplamente estudados como uma alternativa aos enxertos (Cancian et al., 1999; Ludwig et al., 2000; Cordioli et al., 2001; Von Arx et al., 2001).

Os implantes de osso homogêneo ou heterogêneo podem ser corticais ou trabeculares, osteocondutores e algumas vezes osteoindutores, dependendo da maneira em que são fabricados ou de características do doador (Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998; Lohmann et al., 2001). Destacam-se os ossos congelados (Hardin, 1994), os liofilizados (Hardin, 1994; Piattelli et al., 1996; Garg, 1999; Mellonig, 1999), os liofilizados desmineralizados (Hardin, 1994; Piattelli et al.,

Introdução

1996; Garg, 1999; Hall et al., 1999; Mellonig, 1999; Froum et al., 2002) e o osso anorgânico bovino poroso.

Os implantes aloplásticos ou sintéticos são osteocondutores. Estão disponíveis em uma variedade de texturas, tamanhos e formas, podendo ser classificados em densos, macroporosos e microporosos, ou também cristalinos, amorfos, granulares ou moldáveis (Garg, 1999). As propriedades específicas de cada material determinam sua utilização. Entre eles destacam-se, as cerâmicas sintéticas de fosfato de cálcio (hidroxiapatita e fosfato tricálcico) (Piattelli et al., 1996; Oonishi et al., 1997; Garg, 1999; Furusawa et al., 1998), os vidros bioativos (Hench & Wilson, 1984; Brink, 1997; Furusawa et al., 1998; Hench & Polak, 2002) e as cerâmicas de vidro bioativo (Hench & Wilson, 1984; Brink, 1997).

Um biomaterial é considerado osteocondutor quando for capaz de fornecer um arcabouço para células osteogênicas provenientes da região, favorecendo a formação óssea (Bauer & Muschler, 2000; Al Ruhaimi, 2001) e o crescimento de capilares e tecido perivascular (Al Ruhaimi, 2001). É osteoindutor quando promover um estímulo biológico capaz de diferenciar células mesenquimais indiferenciadas em células osteogênicas (Hardin, 1994; Bauer & Muschler, 2000).

Considera-se, para a regeneração óssea especificamente, que um biomaterial substituto ósseo deva possuir propriedades físicas, químicas e mecânicas semelhantes às do osso, uma vez que essas influenciarão no crescimento normal e na função das células ósseas (Spector, 1999). Idealmente, os substitutos ósseos deveriam ser incorporados, ou seja, completamente remodelados e substituídos pelo

Introdução

tecido ósseo neoformado quando se planeja a posterior reabilitação com implantes dentários de titânio nessas regiões (Von Arx et al., 2001).

Hench & Wilson (1984) consideraram que nenhum material implantado em tecidos vivos seja inerte. Todos induzem algum tipo de resposta dos tecidos. Os autores mencionaram 4 tipos diferentes de respostas possíveis: (1) se o material for tóxico, o tecido irá morrer, (2) se o material não for tóxico e dissolver, será substituído pelo tecido circundante, (3) se o material não for tóxico e for biologicamente inativo, será encapsulado por tecido fibroso, e (4) se o material não for tóxico e for biologicamente ativo, formará uma interface de união com o tecido circundante (Hench & Wilson, 1984; Brink, 1997).

Para Al Ruhaimi (2001), um substituto ósseo ideal deve possuir as seguintes características: compatibilidade biológica, evitar a colonização por patógenos locais ou infecção cruzada, ser osteogênico, ou segundo o autor, facilitar o crescimento de células ósseas, possuir composição física e química semelhantes ao do osso natural e fornecer um arcabouço para neoformação óssea, ser absorvível e osteotrópico, ou melhor, favorecer a formação óssea pelas suas características químicas ou estruturais, ser fonte de cálcio e fósforo, microporoso e de fácil manipulação.

A dúvida que motivou a realização desse trabalho relaciona-se à reparação óssea em grandes defeitos preenchidos por biomateriais e à qualidade do osso neoformado ao redor de implantes de titânio colocados no centro destes defeitos, completamente circundados pelo tecido ósseo reparado.

Introdução

Para isto, o vidro bioativo (BioGran, Orthovita & 3i Implant Innovations Inc., Florida, EUA) e o osso liofilizado desmineralizado humano (Ohio Valley Tissue & Skin Center, Cincinnati, Ohio, USA) foram implantados em cavidades ósseas em úmeros de cães. Os grupos foram analisados através de teste biomecânico, microscopia óptica e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons, e histometria.

2 Revisão da Literatura

2.1 Vidro bioativo

Bioatividade é a capacidade de um biomaterial em interagir com células e tecidos e induzir uma atividade biológica específica no corpo humano, refletida na união entre o material e o tecido vivo, cujo resultado é o reparo ou regeneração tecidual (Hench et al., 1971; Brink, 1997; Xynos et al., 2000; Gorustovich et al., 2002).

Uma característica única dos biomateriais com superfícies ativas é a interface com o tecido ósseo, geralmente mais forte do que o próprio osso ou o implante (Hench & Wilson, 1984).

Quando vidros reagem com os fluidos, 6 tipos distintos de reações podem ser identificadas na superfície, de acordo com as diferentes composições de cada grupo de materiais (Brink, 1997):

- ❖ No primeiro grupo, os vidros desenvolvem uma camada superficial extremamente fina e hidratada,
- ❖ No segundo grupo desenvolvem uma superfície protetora rica em sílica, mas a estrutura do vidro permanece preservada,
- ❖ O terceiro grupo representa o dos vidros bioativos, que desenvolvem uma camada na superfície rica em SiO_2 e uma segunda camada protetora, sobre essa, rica em CaO e P_2O_5 ,
- ❖ No quarto grupo observa-se cátions multivalentes como Al^{+3} , Fe^{+3} , Ti^{+4} , Zr^{+4} e Ta^{+5} , presentes no vidro ou no meio externo e diferentes camadas são formadas. Estes, ao contrário dos bioativos, não se unem aos tecidos vivos,

Revisão da Literatura

- ❖ Os vidros do quinto grupo são capazes de desenvolver um filme rico em sílica na superfície. No entanto, a concentração de sílica é muito baixa para evitar a dissolução do material,
- ❖ Finalmente, os vidros do sexto grupo são dissolvidos por inteiro. A composição de sua superfície é a mesma da base do vidro comum e uma grande quantidade de íons é perdida para o meio externo.

Em 1997, Brink destacou 3 diferenças principais entre os vidros comuns e os bioativos: primeiro, os vidros bioativos contêm <60 mol % de SiO₂. A segunda diferença é a presença de grandes quantidades de Na₂O e CaO nesses biomateriais. A presença do íon Ca⁺² leva a um aumento na durabilidade química do vidro pela forte união à sua estrutura. Finalmente, a última diferença é a presença de P₂O₅ na maioria dos vidros bioativos. O P₂O₅ é liberado após o implante do vidro, favorecendo a formação da camada de fosfato de cálcio na superfície do material (Brink, 1997). A bioatividade dos vidros pode ser comprovada nos testes in vivo. Se após a implantação do material houver a formação, na superfície, de uma camada de gel de sílica, com fosfato de cálcio sobre ela, a resposta é positiva (Brink, 1997).

Além da capacidade dos vidros bioativos de se unirem ao osso e favorecerem o crescimento através de suas características osteocondutora (Lindfors & Aho, 2000) e de biocompatibilidade (Shimizu et al., 1997; Cancian et al., 1999; Lindfors & Aho, 2000; Froum et al., 2002), não existe qualquer tipo de resposta imunológica conhecida provocada por este biomaterial (Lai et al., 2002) ou efeito de citotoxicidade (Shimizu et al., 1997; Furusawa et al. 1998; Froum et al., 2002). Atribui-se a boa biocompatibilidade do vidro bioativo à semelhança da superfície

Revisão da Literatura

ativa do material com a composição química do tecido ósseo (Hench & Wilson, 1984; Gao et al., 1995).

Um tipo de vidro bioativo muito utilizado e pesquisado atualmente apresenta como composição química: 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% NaO₂ e 6% P₂O₅ (porcentagem por peso), é absorvível (Orthovita & Implant Innovations, 1998) e os grânulos têm formatos irregulares, com tamanhos em um pequeno intervalo entre 300 a 355 µm (Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998; Orthovita & Implant Innovations, 1998; Schepers et al., 1998).

A adesão dos vidros bioativos ao tecido ósseo acontece inicialmente pela sua reatividade química com os fluidos corporais (Shapoff et al., 1997). Ocorrem uma série de reações na superfície que resultam na formação de uma camada de fosfato e cálcio, a qual se une ao tecido ósseo (Shapoff et al., 1997).

Três fatores foram considerados determinantes por Brink (1997) para controlar a união do vidro bioativo com o tecido ósseo:

- (1) a presença de um pH alcalino na superfície do implante,
- (2) o tempo necessário para a superfície se tornar alcalina e
- (3) a presença de sítios ativos de fosfato de cálcio.

O processo de união dos vidros bioativos ao tecido ósseo é descrito sinteticamente na literatura como se segue (Brink, 1997; Shapoff et al., 1997; Radin et al., 1997; Jones et al., 2001):

Revisão da Literatura

Tempo de implantação	Etapa do processo
	Rápida troca de Na^+ ou K^+ do vidro por H^+ ou H_3O^+ da solução.
	Perda da sílica solúvel na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ para a solução como resultado da quebra da união Si-O-Si e a formação de Si-OH na superfície do vidro.
	Condensação e repolimerização de uma camada rica em SiO_2 na superfície do vidro.
1 hora	Migração de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} para a superfície através da camada de SiO_2 e formação de um filme de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ sobre esta. A seguir, uma camada amorfa rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ surge com a incorporação do cálcio e fosfato dissolvidos na solução.
2 horas	Mineralização da camada de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação de íons OH^- , F^- e CO_3^{-2} , também presentes na solução. Ocorre então a formação de uma camada mista de hidroxiapatita carbonatada ou hidroxiapatita fluoro carbonada. O pH na superfície aumenta.
10 horas	Aglomeração e união química do conteúdo biológico com as camadas mencionadas acima que estão em crescimento. Isto leva à incorporação de fatores de crescimento.
20 horas	Ação de macrófagos para a limpeza da região e adesão das células osteogênicas sobre a superfície bioativa.

Revisão da Literatura

100 horas	Diferenciação das células osteogênicas em osteoblastos, deposição de matriz extra-celular e mineralização.
-----------	--

A estrutura do vidro é instável, característica proposital, para permitir a reação com os fluidos corporais e células da região (Furusawa & Mizunuma, 1997). Os grânulos são transformados por um processo de troca iônica (Schepers & Ducheyne, 1997) e adsorvem proteínas do meio (Radin et al., 1997). Inicialmente, uma camada frouxa, rica em gel de sílica é formada (Hench et al., 1971; Brink, 1997; Froum et al., 2002), sobre a qual se precipita gradualmente uma outra camada de fosfato de cálcio, responsável pelas propriedades osteocondutoras do material (Radin et al., 1997; Schepers & Ducheyne, 1997; Furusawa et al. 1998; Ong et al., 1998; Schepers et al., 1998; Froum et al., 2002), até que ocorra uma total reação em todo o grânulo (Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al. 1998). Acredita-se que essa camada externa de fosfato de cálcio se una ao tecido ósseo, pela sua semelhança com a fase mineral do osso em estrutura e composição (Brink, 1997; Radin et al., 1997; Froum et al., 2002).

A seguir, surgem fissuras nas partículas, provocando uma comunicação entre o centro da partícula, rico em silício, e o meio externo (Schepers & Ducheyne, 1997). As fissuras propiciam a ação fagocitária com conseqüente escavação da porção interna do grânulo (Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998; Schepers et al., 1998). A camada interna de gel de sílica desaparece gradualmente por um processo combinado entre a ação de macrófagos (Schepers & Ducheyne,

Revisão da Literatura

1997; Schepers et al., 1998; Furusawa et al. 1998; Froum et al., 2002) e a dissolução do sílico (Furusawa & Mizunuma, 1997).

À medida que a camada interna de gel de sílica vai sendo eliminada, permanece a camada externa de fosfato de cálcio, atuando como uma concha protetora (Schepers et al., 1991; Furusawa et al., 1998; Lai et al., 2002) que mantém o arcabouço e irá favorecer a futura neoformação óssea.

Furusawa et al. (1998) observaram, através de análise de mapeamento elemental dos grânulos, arcabouços, ou conchas de fosfato de cálcio. Isso foi verificado após 16 semanas de implantação do vidro bioativo em defeitos ósseos na região posterior da mandíbula de rato. A concentração de silício havia sido reduzida a níveis compatíveis com o fisiológico, o que para os autores, representava o término da primeira fase de absorção dos grânulos.

O resultado da análise de mapeamento elemental descrito no trabalho de Furusawa et al. (1998) foi semelhante ao observado por Furusawa & Mizunuma (1997) em um outro trabalho prévio, após 7 meses de implantação do vidro bioativo, para o preechimento do seio maxilar em humanos, e colocação imediata ou mediata de implantes dentários de titânio.

Após a absorção das áreas ricas em silício, a porção interna da camada de fosfato de cálcio, que representa um espaço protegido no interior das partículas (Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998; Schepers et al., 1998), fica exposta aos fluidos intersticiais (Schepers et al., 1998; Froum et al., 2002). Células osteoprogenitoras penetram os grânulos e aderem-se à porção interna da camada de fosfato

Revisão da Literatura

de cálcio (Schepers & Ducheyne, 1997). Diferenciam-se em osteoblastos (Radin et al., 1997; Schepers & Ducheyne, 1997; Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998; Schepers et al., 1998) e iniciam a deposição óssea na porção central (Schepers et al., 1991; Schepers & Ducheyne, 1997; Schepers et al., 1998; Furusawa et al., 1998; Froum et al., 2002; Lai et al., 2002) A remodelação das partículas é acompanhada pela substituição do material por tecido ósseo (Froum et al., 2002).

A diferenciação de células osteogênicas em osteoblastos é um processo biológico que pode ser facilmente perturbado (Furusawa & Mizunuma, 1997). Esta diferenciação acontece nos sítios escavados e protegidos no interior das partículas, sugerindo a ausência de qualquer efeito adverso resultante da escavação do material (Furusawa & Mizunuma, 1997) e das transformações sofridas.

A característica osteocondutora peculiar do vidro bioativo foi denominada “estimulatória” ou “osteopromotora” por Shepers et al. (1991) (Schepers & Ducheyne, 1997; Schepers et al., 1991; Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998). Como resultado deste processo, muitas partículas são completamente envolvidas por tecido ósseo, principalmente em áreas próximas à superfície dos implantes (Schepers et al., 1998).

Schepers & Ducheyne (1997) relataram, após 2 meses de implantação do vidro bioativo em mandíbulas de cães, “um crescimento osteocondutivo considerável ao redor de muitos grânulos de vidro bioativo”.

O mesmo foi destacado por Cancian et al. (1999) em um experimento com defeitos bicorticais na região de ângulo, em mandíbulas

Revisão da Literatura

de macacos. Os autores compararam histologicamente, após 180 dias, a reparação dos defeitos entre o vidro bioativo e a hidroxiapatita. Observaram que no grupo do vidro bioativo os defeitos foram totalmente reparados e quase todos os grânulos haviam sido substituídos por tecido ósseo, em contraste com o grupo da hidroxiapatita, no qual não houve neoformação óssea e o material estava envolto por tecido conjuntivo fibroso.

Schepers et al. (1998) realizaram um experimento no qual defeitos ósseos em mandíbula de cão foram preenchidos por vidro bioativo de um lado e coágulo do outro (controle). Posteriormente, houve a colocação de implantes de titânio nessas áreas. Em um grupo, os implantes foram mantidos sem carga durante 3 meses. No outro, após 3 meses, foram submetidos à carga funcional por 7 semanas. Os autores observaram, histologicamente, após a carga funcional no grupo experimental, um crescimento ósseo com características osteocondutoras, e as partículas do vidro bioativo atuando como arcabouço. Esse crescimento ósseo iniciava-se na porção cortical e trabecular e proliferava-se em direção à superfície do implante de titânio.

Um outro trabalho foi realizado por Gorustovich et al. (2002) comparando a neoformação óssea ao redor de micro-implantes laminares de titânio (desenvolvidos pelos autores) em tíbia de rato. De um lado, apenas o implante de titânio foi colocado e do outro, o vidro bioativo foi implantado junto com o titânio. Observaram, histologicamente, um aumento na neoformação óssea da região medular no grupo em que o vidro bioativo estava presente com a lâmina de titânio.

Revisão da Literatura

Os implantes de vidro bioativo podem ser absorvidos tanto por um processo físico-químico como celular, ou seja, fagocitose do material (Radin et al. 2000; Al Ruhaimi, 2001). Para Shimizu et al. (1997), a degradação do vidro bioativo é dependente basicamente da ação dos macrófagos e osteoclastos. No entanto, Schmitt et al. (1997), num estudo comparando o enxerto ósseo bovino anorgânico e o vidro bioativo em defeitos ósseos de tamanho crítico no rádio de coelhos não observaram qualquer resposta osteoclástica induzida por ambos os materiais. Segundo os autores, se não foram os osteoclastos responsáveis pela degradação do vidro bioativo, essa certamente ocorreu por algum processo mediado por células com fenótipos diferentes, ou através de processos físico-químicos (Schmitt et al, 1997).

Lai et al. (2002) estudaram a excreção de silício após a implantação do vidro bioativo em tíbia de coelhos. Para isto, realizaram exames de urina nas primeiras 24h e depois semanalmente, e de sangue semanalmente, até que a quantidade de silício excretado pela urina dos animais do grupo experimental e controle fosse semelhante. Após o sacrifício dos animais removeram os rins, fígado, pulmões, linfonodos da região poplíteia, baço e tecido ósseo da região operada para análise química. Verificaram também a função renal dos animais através de exames da taxa de creatinina. O grupo controle foi submetido a cirurgia mas não recebeu os implantes. De acordo com os resultados, uma maior quantidade de silício foi excretada pelos animais do grupo experimental em relação ao controle, sendo que a maior concentração foi obtida nas primeiras 24h após a cirurgia. A quantidade de silício excretada pelos animais do grupo experimental foi maior até 24 semanas após as

Revisão da Literatura

cirurgias e não se observou acúmulo deste elemento em nenhum dos órgãos avaliados. Segundo Lai et al. (2002), o silício liberado pelo vidro bioativo foi excretado pela urina em concentrações toleráveis fisiologicamente, sem o comprometimento da função renal.

Radin et al. (2000) realizaram um experimento in vitro simulando a imersão dos grânulos de vidro bioativo do tipo 45S5 nos fluidos corporais, com a utilização de solução fisiológica simulada (SBF) com e sem a adição de soro bovino (de neonatais). Os grupos foram separados pelo tipo de solução e pela frequência de trocas (trocas periódicas ou nenhuma troca) da mesma. As soluções foram analisadas para a verificação de mudanças nas concentrações de silício, cálcio e fósforo. Os grânulos foram analisados através de microscopia eletrônica de varredura (SEM), análise por dispersão de energia (EDX) e espectroscopia infra-vermelha de Fourier (FTIR). Foi demonstrado, no grupo que continha soro bovino e que foi submetido a trocas periódicas de solução, um resultado final muito semelhante ao que acontece com os grânulos in vivo, ou seja, todo o silício foi eliminado, permanecendo uma concha externa de fosfato de cálcio (Radin et al., 2000). Os autores acreditam que o processo de escavação dos grânulos não seja apenas o resultado de um processo celular de fagocitose, mas também de um processo físico-químico paralelo de dissolução e transporte de silício através da camada rica em fosfato de cálcio (Radin et al., 1997, Radin et al., 2000). Isso resultaria no fenômeno observado in vivo, com a presença de conchas de fosfato de cálcio cuja porção interna, rica em sílica, foi degradada (Radin et al., 2000).

Revisão da Literatura

Shapoff et al. (1997) destacaram a capacidade do material de agir como hemostático e mantenedor do coágulo sanguíneo no defeito ósseo. Atribuíram a essas propriedades os bons resultados clínicos obtidos no tratamento de bolsa periodontal em humanos com o vidro bioativo. A coesividade das partículas do vidro bioativo quando umedecido facilitando a manipulação e inserção do material em cavidades e suas propriedades hemostáticas também foram consideradas por Oonishi et al. (1997), Schepers & Ducheyne (1997) e Cancian et al. (1999).

Outra vantagem para o emprego clínico do vidro bioativo é que o arcabouço de fosfato de cálcio serve para manter o volume da partícula até a substituição desta por tecido ósseo (Furusawa et al., 1998). Isto é importante nos casos onde se precisa de um material de preenchimento previsível para a manutenção do volume e altura do defeito ósseo (Furusawa et al. 1998).

Clinicamente o vidro bioativo tem sido utilizado tanto na Medicina quanto na Odontologia (Shapoff et al., 1997). O material, em suas várias formas, é indicado para as cirurgias ortopédica e plástica, em otorrinolaringologia em substituição aos 3 ossículos que conectam a cóclea à membrana timpânica (Shapoff et al., 1997). Em odontologia, é utilizado principalmente em alvéolos dentários para a manutenção do rebordo e como tratamento de defeitos ósseos periodontais (Lovelace et al., 1998).

O quadro a seguir apresenta uma sinopse de outros artigos sobre o vidro bioativo considerados para a discussão.

Revisão da Literatura

Autor(es) / Data	Material e método, resultado e conclusão
Virolainen et al. (1997)	<p>➤ Cavidades ósseas em tíbia de 20 ratos foram preenchidas por viro bioativo (S53P4), osso autógeno e coágulo. Sacrifício dos animais: 3, 7, 14, 28 e 56 dias. Realizada análise histológica e histométrica e de biologia molecular (colágeno tipo I e III, osteonectina e TGF-β1)</p> <p>➤ Análise histológica aos 7 dias: formação de tecido conjuntivo semelhante ao periósteo ao redor do vidro bioativo, orientado paralelo à superfície dos grânulos. Esta estrutura foi substituída por osso lamelar aos 28 dias. Não se observou degradação dos grânulos mediada por osteoclastos ou reação de células gigantes. Análise de biologia molecular apresentou maior diferença entre os 2 grupos experimentais na produção de colágeno tipo I.</p> <p>➤ Os resultados demonstraram que o crescimento de tecido ósseo neoformado foi mais rápido nos defeitos preenchidos por osso autógeno em relação ao vidro bioativo. Os autores sugerem outras análises de biologia molecular para ajudar no entendimento dos mecanismos de união dos materiais bioativos ao tecido ósseo.</p>
Tadjoedin et al. (2000)	<p>➤ Realizado levantamento de seio maxilar bilateral em 10 pacientes com preenchimento aleatório por osso autógeno particulado ou osso autógeno/vidro bioativo (1:1). Após 4, 5 ou 6 meses colocou-se, nessa região, 3 implantes dentários de titânio de cada lado e retirou-se material para análise histológica e histométrica. Um paciente retornou após 14 meses e recebeu implantes dentários aos 16 meses. Pacientes receberam 2 doses de tetraciclina 8 e 4 semanas antes das colocação dos implantes de titânio, para avaliação das áreas mineralizadas por microscopia de fluorescência.</p> <p>➤ Análise histológica do grupo preenchido por osso autógeno particulado: presença de osso lamelar aos 4</p>

Revisão da Literatura

	<p>meses. No grupo do vidro bioativo predominava ainda osso imaturo e muitas partículas inclusas num estroma de tecido conjuntivo vascularizado. Havia, aos 4 meses, deposição de tecido ósseo nas paredes internas das partículas, a qual aumentou com o passar do tempo. Aos 16 meses não havia mais evidência de partículas de vidro bioativo.</p> <p>➤ Concluíram que, para o aumento de seio maxilar, a utilização de partículas de vidro bioativo (diâmetro 300-355µm) em associação com osso autógeno particulado é uma alternativa aceitável à utilização do osso autógeno isoladamente.</p>
Carvalho et al. (2002)	<p>➤ Cavidades ósseas em tíbia de 20 ratos foram preenchidas por vidro bioativo, osso bovino anorgânico e coágulo. Sacrifício dos animais aos 5, 10, 20 e 30 dias após as cirurgias. Realizada análise histológica.</p> <p>➤ Observou-se presença dos biomateriais em todos os tempos de sacrifício. Havia neoformação óssea em todos os grupos e íntimo contato do tecido ósseo com os biomateriais nos tempos mais tardios. O vidro bioativo apresentou trabéculas ósseas mais maduras em relação ao osso bovino anorgânico.</p> <p>➤ Concluíram que os biomateriais utilizados promoveram adequadamente o reparo das cavidades e não foram absorvidos nos tempos pós-operatórios avaliados.</p>
Norton & Wilson (2002)	<p>➤ Alvéolos dentários de 17 pacientes com indicação de exodontias foram curetados vigorosamente e a porção cortical perfurada, para a obtenção de um leito sangrante. Dois tipos de vidro bioativo (Perioglas e Biogran) foram implantados. Utilizou-se membrana em casos de ausência da tábua óssea vestibular ou lingual. O tempo para a colocação dos implantes dentários de titânio foi determinado pela análise radiográfica dos alvéolos. Com uma trefina de 2,5mm removeu-se osso do</p>

Revisão da Literatura

	<p>centro dos alvéolos antes da colocação dos implantes de titânio para análise histológica das amostras.</p> <p>➤ Observou-se, nas amostras retiradas antes de 6 meses a presença de um tecido conjuntivo aderente intimamente relacionado com o vidro bioativo e foi relatada ausência de tecido ósseo. Nas amostras retiradas após 7 meses, o tecido ósseo aparecia próximo à superfície das partículas do vidro. As fissuras nas partículas foram também relatadas e não houve possibilidade de distinção histológica entre os 2 tipos de material.</p> <p>➤ Concluíram que o vidro bioativo permitiu a lenta incorporação do tecido ósseo neoformado após 7 meses de implantação. E que a colocação precoce de implantes dentários de titânio nesse tecido em reparação não tem um impacto negativo no resultado clínico.</p>
--	--

QUADRO 1: Outros artigos publicados sobre vidro bioativo considerados na discussão desse trabalho.

2.2 Osso Liofilizado Desmineralizado

Atribui-se a ampla utilização do osso liofilizado desmineralizado à capacidade osteoindutora do biomaterial em regiões ectópicas de tecido mole ou em sítios ósseos (Lovelace et al., 1998; Schwartz et al., 1998) e ao conteúdo e difusibilidade das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) presentes no material (Ong et al., 1998; Lohmann et al. 2001).

Osteoindução, por definição é a capacidade de um material em formar osso em tecidos que não teriam esta capacidade por si só (Wozney et al. 1988; Lohmann et al. 2001).

O processo de desmineralização expõe as proteínas osteoindutoras localizadas na matriz óssea (Mellonig et al., 1992),

Revisão da Literatura

podendo ativá-las (Schwartz et al., 1996). As BMPs, os fatores de crescimento e as citoquinas interagem com as células mesenquimais ou precursores osteogênicos indiferenciados e estimulam a diferenciação dessas em células osteogênicas (Lohmann et al. 2001).

Diferentes processos são utilizados para a desmineralização do osso (Hardin, 1994). O processo é iniciado com a remoção do tecido do doador o mais cedo possível, para se evitar a contaminação e garantir a atividade das BMPs (Hardin, 1994). Geralmente, o osso é imerso em ácido clorídrico e depois sua gordura removida (Hardin, 1994). Após lavagem abundante, realiza-se o processo de liofilização, para o armazenamento do material (Hardin, 1994).

A desmineralização expõe o tecido a produtos químicos virucidas e bactericidas, tornando remota a possibilidade de transmissão de doenças (Mellonig et al., 1992; Hardin, 1994). O osso desmineralizado também é considerado clinicamente não-imunogênico (Hardin, 1994).

Após a etapa de desmineralização, o que permanece no tecido é uma matriz de colágeno tipo I (Hardin, 1994; Ludwig et al., 2000) e proteínas como as BMPs (Hardin, 1994; Ludwig et al., 2000), sendo que 90% das proteínas presentes no tecido ósseo são eliminadas (Hardin, 1994). O colágeno no osso desmineralizado é osteocondutivo e as proteínas morfogenéticas são osteoindutivas.

O processo de liofilização consiste no congelamento do osso e a seguir, na sublimação do gelo, através de vácuo ao redor da amostra, processada em uma câmara de vácuo (Hardin, 1994). A antigenicidade do material é diminuída (Hardin, 1994). A estabilidade final do produto é

Revisão da Literatura

determinada pelo conteúdo residual de água, sendo a maior desvantagem desse processo a reabsorção, que ocorre de forma imprevisível (Hardin, 1994).

Ludwig et al. (2000) afirmaram que após o processo de liofilização, as células osteoprogenitoras são destruídas, mas as propriedades osteocondutoras permanecem no material. Os autores acreditam, a partir de resultados obtidos em experimentos com animais, que a concentração absoluta dos fatores osteoindutivos na matriz óssea demineralizada seja extremamente baixa e que haja uma diminuição do potencial osteogênico em humanos.

Schwartz et al. (1998) relataram a possibilidade das proteínas ósseas morfogenéticas estarem presentes no osso liofilizado desmineralizado em uma quantidade insuficiente para promover formação óssea em níveis detectáveis, ou poderiam também estar inativas. Por este motivo, consideram que a variabilidade nos resultados após a utilização desse material estaria relacionada às técnicas de processamento do mesmo ou características do doador.

Existem diferenças na capacidade de neoformação óssea induzida pelo osso liofilizado desmineralizado proveniente de diferentes bancos de ossos (Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998; Ong et al., 1998; Lovelace et al., 1998; Bauer & Muschler, 2000; Lohmann et al. 2001; Paul et al. 2001). Estas são atribuídas aos diferentes métodos de obtenção do osso ou ao tempo para a retirada do osso após a morte do doador, resultando na perda da capacidade osteoindutora após tempos prolongados (Hardin, 1994; Schwartz et al., 1996). Além disto, temperaturas de armazenamento (Schwartz et al., 1996), e o

Revisão da Literatura

processamento do material, como por exemplo, o tempo de desmineralização, distribuição do tamanho das partículas, neutralização das partículas desmineralizadas e diferenças no processo de esterilização (Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998; Ludwig et al., 2000; Lohmann et al., 2001) também podem ter alguma influência.

Outra explicação estaria relacionada com as características do doador (Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998; Lohmann et al., 2001), como a idade, condição médica, patologias anteriores, terapia com drogas ou alterações genéticas (Schwartz et al., 1996).

Schwartz et al. (1996) testaram, em sítos ectópicos de formação óssea, 6 amostras de osso liofilizado desmineralizado provenientes de diferentes bancos de ossos e também lotes diferentes dos mesmos bancos. Na análise dos resultados os autores observaram uma grande variação na capacidade osteoindutora entre os diferentes bancos de ossos. No entanto, houve também diferenças entre os lotes provenientes do mesmo banco, o que levou à hipótese de que a variabilidade clínica do osso liofilizado desmineralizado poderia relacionar-se com a idade ou o gênero dos doadores (Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998).

A influência da idade em relação à capacidade indutora do osso liofilizado desmineralizado foi demonstrada em outro experimento realizado por Schwartz et al. (1998) com ratos atímicos. O osso liofilizado desmineralizado foi proveniente de bancos de ossos de doadores humanos. Foram comparados 27 lotes de um mesmo banco de ossos, considerado altamente capaz de induzir formação óssea (Schwartz et al., 1996). A metodologia utilizada foi a mesma do trabalho realizado pelos

Revisão da Literatura

autores em 1996 e descrita anteriormente (Schwartz et al., 1996). De acordo com os resultados obtidos, os autores verificaram que nem todos os lotes apresentaram a mesma capacidade de osteoindução e concluíram que essa capacidade não estaria relacionada com a resposta dos animais, uma vez que foram utilizados animais com características uniformes. A diferença na capacidade osteoindutora dos materiais estava relacionada com a idade do doador. Doadores com mais de 50 anos apresentaram os piores resultados. No entanto, diferenças relativas ao gênero dos doadores não foram detectadas. Concluíram, portanto, que apesar do osso liofilizado desmineralizado possuir capacidade osteoindutora, essa pode variar consideravelmente entre amostras do mesmo banco de ossos, dependendo da idade do doador (Schwartz et al., 1998).

Mais tarde, em 2001, Lohmann et al. realizaram um outro experimento com metodologia semelhante, comparando implantes de osso liofilizado mineralizado e desmineralizado obtidos de pacientes com menos de 42 anos e mais de 70 anos de idade. Observaram que apenas o osso liofilizado demineralizado proveniente de pacientes com menos de 42 anos apresentou propriedades osteoindutivas. Como todas as amostras de osso liofilizado desmineralizado foram preparadas da mesma maneira, os autores também atribuíram o resultado encontrado às diferenças na faixa etária dos doadores.

Para Lohmann et al. (2001), uma controvérsia ainda permanece em relação a idade do doador, uma vez que a fisiologia pode variar em indivíduos mais velhos, e nestes casos, outros fatores além da

Revisão da Literatura

idade poderiam também confundir a análise a respeito da capacidade osteoindutora desses biomateriais.

Haas et al. (2002a) acreditam que o potencial osteogênico do osso desmineralizado depende também da espécie doadora e que esse potencial diminui a medida que aumenta a hierarquia evolutiva. No entanto, apesar de alguns ossos liofilizados desmineralizados apresentarem pequena ou nenhuma capacidade osteoindutora, eles podem agir como osteocondutores (Piattelli et al., 1996; Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998; Ludwig et al., 2000) e mantenedores de espaço (Schwartz et al., 1998).

Segundo Piattelli et al. (1996) os mecanismos de neoformação óssea provocados pelo osso liofilizado desmineralizado estariam relacionados às mudanças bioquímicas sofridas pelas partículas que levariam à calcificação dessas. Essa remineralização estimularia a absorção por osteoclastos presentes na região, os quais seriam capazes de atrair osteoblastos para a superfície do material, permitindo a deposição óssea sucessiva (Piattelli et al, 1996).

A sequência de eventos histológicos descrita para a incorporação dos implantes ósseos homogêneos ou heterogêneos ao leito receptor é a mesma descrita para os enxertos ósseos autógenos, mas ocorre de forma mais lenta e menos completa do que a observada nos enxertos (Ludwig et al., 2000; Bauer & Muschler, 2000). Quando totalmente incorporados, os implantes ósseos homogêneos ou heterogêneos comportam-se de maneira semelhante ao osso autógeno, sofrendo remodelação de acordo com os estímulos mecânicos (Ludwig et al., 2000).

Revisão da Literatura

Em um experimento com o osso liofilizado mineralizado e desmineralizado em humanos, Piattelli et al. (1996) observaram, após 6 meses de implantação, melhores resultados de neoformação óssea no grupo do osso mineralizado.

Von Arx et al. (2001), em um estudo piloto com 3 cães, testaram o fosfato tricálcio (TCP) e o osso liofilizado desmineralizado homogêneo na reparação de defeitos alveolares de 2 paredes. Os biomateriais foram mantidos em posição por membranas de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) e parafusos de suporte. No grupo controle foi utilizado o osso autógeno em bloco com e sem membrana. Apesar de não terem encontrado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, os autores observaram que o grupo do enxerto autógeno em bloco em associação com a membrana propiciou os melhores resultados clínicos, histológicos e histomorfométricos de aumento ósseo. A utilização de partículas de osso liofilizado desmineralizado e fosfato tricálcio não favoreceu a neoformação óssea nos defeitos criados.

Xiao et al. (1996) investigaram, através de análise histológica e imunohistoquímica, a resposta tecidual às partículas de osso liofilizado desmineralizado implantadas para o aumento de rebordo em defeitos ósseos em humanos. Uma membrana de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) foi colocada sobre os defeitos para a manutenção dos biomateriais em posição. Os autores descreveram, na análise após 9 a 13 meses de implantação, que a maior parte das partículas estava cercada por tecido conjuntivo fibroso com

Revisão da Literatura

mínima evidência de neoformação óssea. Concluíram, portanto, ser questionável a utilização desse material com a finalidade proposta.

Haas et al. (2002a,b) realizaram um experimento para comparar o osso liofilizado desmineralizado de origem homogênea e heterogênea para o levantamento de seio maxilar e colocação simultânea de implantes cilíndricos de titânio com superfície de plasma spray de titânio. Utilizaram como controle o osso medular retirado da crista ilíaca e colocação do implante de titânio sem preenchimento do seio maxilar. Os resultados foram avaliados por análises histológica, histométrica e biomecânica. Observaram, nas análises histológica e histométrica, que o osso liofilizado desmineralizado nas 2 formas testadas não foi capaz de melhorar a interface com o implante de titânio em relação aos grupos controles. O osso autógeno apresentou os melhores resultados em todas as análises (Haas et al., 2002a). Na análise biomecânica, o osso liofilizado desmineralizado homogêneo, surpreendeu os autores, apresentando o segundo melhor resultado (Haas et al., 2002b).

Não se sabe o significado clínico da resposta imunológica provocada pelo enxerto homogêneo ou heterogêneo (Hardin, 1994). Acredita-se que a antigenicidade seja eliminada durante o processo de liofilização ou de desmineralização do tecido ósseo (Hardin, 1994; Bauer & Muschler, 2000), no entanto em testes mais sensíveis, pode-se verificar que o osso liofilizado desmineralizado provoca uma resposta imunológica bem reduzida (Hardin, 1994).

Uma das desvantagens apontadas por alguns autores (Hall et al., 1999; Von Arx et al., 2001) para a utilização dos implantes homogêneos e heterogêneos seria o risco, mesmo que remoto, de

Revisão da Literatura

transmissão de doenças. No entanto, sabe-se que os implantes de ossos liofilizados mineralizados ou desmineralizados possuem o menor risco para a transmissão viral em relação aos ossos frescos congelados, devido à maneira pela qual são processados (Mellonig et al., 1992).

Dois casos de transmissão do vírus HIV através de implantes de osso homogêneo foram relatados na literatura (Mellonig et al., 1992). No entanto, ambos tratavam-se de implantes de ossos frescos e congelados sem nenhum método adicional de processamento (Mellonig et al., 1992).

Mellonig et al. (1992) realizaram um trabalho com 2 tipos de amostras: as que foram expostas ao vírus HIV após a retirada do doador (e contaminadas) e as provenientes de doador com sorologia positiva para o vírus HIV. Os resultados demonstraram que após o processo de desmineralização e liofilização, as amostras não continham mais o vírus. Isto indica que mesmo que um doador infectado escape da detecção do vírus nos exames laboratoriais realizados pelo banco de ossos, o processamento do material o tornará seguro para o implante em humanos (Mellonig et al., 1992).

Os quadros a seguir apresentam uma sinopse de outros artigos considerados para a discussão.

Autor(es) / Data	Material e método, resultado e conclusão
Caplanis et al. (1998)	➤ Defeitos periodontais bilaterais (caninos da maxila) foram realizados em 6 cães. Um lado foi aleatoriamente implantado com osso liofilizado desmineralizado e ambos os lados cobertos com membrana (ePTFE). Sacrifício dos

Revisão da Literatura

	<p>animais após 4 semanas da cirurgia. Realizou-se análise histológica e histométrica.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Partículas do osso desmineralizado liofilizado foram observadas envoltas por tecido conjuntivo denso com limitada, quando existente, atividade óssea ao seu redor. Observou-se nova adesão de tecido conjuntivo em ambos os grupos e neoformação óssea limitada à porção apical e coronal. ➤ Concluíram que o osso desmineralizado liofilizado não apresentou qualquer efeito adicional à regeneração óssea guiada nos defeitos criados.
Kohal et al. (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Defeitos nos alvéolos de 6 cães foram confeccionados imediatamente após exodontia e implantados com implantes dentários de titânio (3 em cada lado). Havia apenas 3 a 4mm de inserção da porção apical dos implantes em tecido ósseo. Os defeitos foram preenchidos aleatoriamente com hidroxiapatita bioabsorvível e osso liofilizado desmineralizado homogêneo. Um deles permaneceu sem biomaterial. Todos foram revestidos com membranas. Sacrificio dos animais após 6 meses. Os implantes de 4 animais foram submetidos a teste de contra-torque e os outros 2, a análise histológica e histométrica. ➤ Não foram observados remanescentes de partículas do osso liofilizado desmineralizado. ➤ Concluíram que a exposição da membrana diminuiu significativamente o valor de contra-torque nos implantes dentários; que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os biomateriais com relação aos valores de contra-torque; e que a combinação de regeneração óssea guiada com um substituto ósseo aumentou o contato osso-implante.

QUADRO 2: Artigos publicados sobre osso liofilizado desmineralizado considerados na discussão desse trabalho.

Revisão da Literatura

Autor(es) / Data	Assunto
Misch & Dietsch (1993)	➤ Revisão de literatura sobre os enxertos ósseos e biomateriais utilizados como substitutos ósseos de acordo com o mecanismo de ação de cada grupo e suas aplicações. Consideraram que em defeitos ósseos de 5 paredes espera-se o completo preenchimento da cavidade por crescimento aposicional de osso. No entanto, para a manutenção da espessura do rebordo pode-se preencher o defeito com osso autógeno ou um biomaterial absorvível.
Carvalho et al. (2002)	➤ Abordaram a histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à Implantodontia. Sobre a utilização dos biomateriais em defeitos ósseos, os autores acrescentaram sua experiência clínica às considerações de Misch & Dietsch (1993). Acreditam que em defeitos ósseos de 5 paredes o processo de reparo resultaria em novo osso, sem necessidade da utilização de biomateriais. No entanto, um biomaterial de preenchimento poderia auxiliar na manutenção do volume alveolar.
Brånemark et al. (1997)	➤ Foram instalados 3 implantes de titânio em cada tíbia de 26 ratos para análise biomecânica da osseointegração. Testes de contra-torque e de tração vertical foram realizados em 2 implantes (individuais) de cada lado imediatamente após sua instalação e depois de 2, 4, 8 e 16 semanas. Os animais foram sacrificados e as peças encaminhadas para análise histológica e histométrica. ➤ Os autores consideraram que os resultados do teste de contra-torque estariam relacionados à biomecânica da interface. Em contraste, os resultados do teste de tração vertical estariam mais relacionados com o tecido ósseo circundante.

Revisão da Literatura

Boyde & Wolfe (2000)	➤ Estudaram o padrão espacial e temporal do crescimento ósseo ao redor de cilindros e parafusos, confeccionados com 2 materiais diferentes, comumente utilizados como implantes dentários. Para isso, as amostras de implantes inseridos em tíbias de coelhos foram analisadas em microscopia óptica com visualização direta em 3 dimensões e microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons.
----------------------	--

QUADRO 3: Outros artigos publicados e considerados na discussão desse trabalho.

3 Proposição

Foi propósito deste trabalho avaliar a reparação em cavidades ósseas preenchidas por vidro bioativo, osso liofilizado desmineralizado e coágulo antes e após a instalação de implantes de titânio.

Para isto foram feitas análises biomecânica, microscópica (microscopia de luz e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons) e histométrica.

4 Material e Método

4.1 Modelo experimental*

4.1.1 Animais

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados 6 cães, machos, sem raça definida, com peso corporal variando entre 25 a 30kg. Durante o período experimental os animais receberam ração sólida e água a vontade.

Os animais foram mantidos em canil particular na cidade de Uberlândia – MG. Como parte do preparo pré-operatório, realizou-se hemograma e exame de urina dos animais. Também permaneceram em observação no canil por um período de uma semana antes das cirurgias.

4.1.2 Protocolo de anestesia e medicação complementar

Os cães foram anestesiados por um professor de anestesia animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

A medicação pré-anestésica foi iniciada 20 minutos antes da anestesia propriamente dita. Foram utilizados Sulfato de Atropina (0,044 mg/kg IM) e Acepromazina 0,2% (0,5 mg/kg) associada a Midazolam (0,2 mg/kg) pela via endovenosa. Após 10 minutos injetou-se, também por via endovenosa, Meperidina (0,3 mg/kg).

Realizou-se anestesia geral dos cães com Thiopental 2,5% (dose 12-25 mg/kg EV) através da indução “em bolus” (de uma só vez).

* Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.

Material e Método

Os animais foram intubados e monitorados durante todo o procedimento cirúrgico.

Como medicação complementar, o veterinário optou pela administração de Cefazolina (20mg/kg IM), repetido a cada 2 horas durante a cirurgia e Dipirona (25 mg/kg IM) no início da recuperação do animal.

4.2 Biomateriais

4.2.1 Vidro bioativo

O vidro bioativo utilizado foi o BioGran (Orthovita & 3i Implant Innovations Inc., EUA). Este biomaterial apresenta a seguinte composição química por peso: 45%SiO₂ 24,5%Na₂O 24,5%CaO 6%P₂O₅ e o tamanho das partículas entre 300-355µm.

Antes da implantação na cavidade, o material foi umedecido em solução salina estéril conforme recomendação do fabricante.

4.2.2 Osso liofilizado desmineralizado

O osso liofilizado desmineralizado humano foi fabricado pela empresa Ohio Valley Tissue & Skin Center, Ohio, EUA.

De acordo com informações fornecidas pelo fabricante, o lote utilizado era proveniente de cadáver de um homem branco com 50 anos de idade que apresentava testes sorológicos negativos. As partículas tinham tamanho de 250 µm e o material não possuía capacidade

Material e Método

osteointutora. O protocolo de processamento do material descrito pelo fabricante e consiste de:

Desmineralização: Utilização apenas da porção cortical que é separada da medular e moída. A seguir adiciona-se solução de 6N HCL em temperatura de 1°C-10°C. Sucessivas trocas de HCl e lavagem com água destilada pura são realizadas até que o pH atinja 5,5. A seguir mistura-se PBS à solução e aguarda-se a decantação das partículas em uma peneira com poros do tamanho desejado. Faz-se um teste para a presença de íons Ca^{+2} e o material é encaminhado para a liofilização apenas se a quantidade desse íon no material for menor do que 8%.

Liofilização: O material passa por 5 fases no interior do aparelho de liofilização. Na primeira, permanece a -20°C por 12-24h. Depois, a -10°C por 22-26h, 0°C por 6-12h, 20°C por 6-12h e finalmente 40°C por 2-7 horas. Todo o procedimento é realizado à vácuo.

O produto é embalado em condições assépticas e enviado para irradiação a 20-30 kGy.

4.2.3 Implantes dentários de titânio

Os implantes dentários de titânio utilizados foram fabricados pela empresa 3i (Implant Innovations Inc., EUA). O comprimento foi 7,0mm e o diâmetro 3,75mm e a superfície não apresentava tratamento.

4.3 Procedimento cirúrgico

4.3.1 Guias cirúrgicos

Guias cirúrgicos (Figura 3) de metal flexível e autoclavável foram confeccionados para permitir a padronização das perfurações com trefina na primeira fase. O objetivo era que se pudesse garantir a colocação exata dos implantes de titânio no centro das cavidades ósseas reparadas, durante a segunda etapa do experimento. Havia um guia cirúrgico para cada lado operado, os quais foram identificados após a utilização na primeira fase cirúrgica.

4.3.2 Cirurgias experimentais

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

A anestesia dos animais e a medicação complementar foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Procedeu-se a tricotomia na região dos dois úmeros, abrangendo toda a área entre as articulações, anti-sepsia com povidine degermante e tópico e colocação de campos cirúrgicos estéreis.

Primeira fase experimental

Uma incisão linear vertical, com cerca de 10cm de comprimento, foi feita na pele e tecido subcutâneo no sentido do longo eixo do úmero (Figura 1). Utilizou-se como referência anatômica para a incisão a articulação com a escápula e a crista óssea articular do úmero.

Material e Método



FIGURA 1: Incisão no úmero do cão.

A localização da incisão foi preconizada mais lateralmente, por se tratar de um local de inserção muscular, o que facilitou o acesso ao tecido ósseo e favoreceu a diminuição da morbidade do animal no período pós-operatório. Além disso, não

existiam vasos sanguíneos importantes nessa região.



FIGURA 2: Exposição do tecido ósseo.



FIGURA 3: Guia cirúrgico em posição.

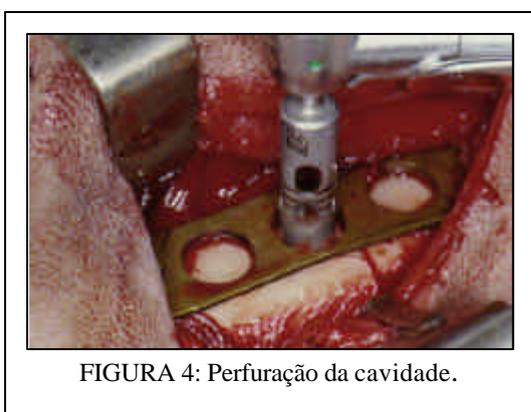


FIGURA 4: Perfuração da cavidade.

A musculatura foi divulsionada e o periósteo incisado e descolado visando adequada exposição da região óssea a ser operada (Figura 2).

Adaptou-se o guia cirúrgico de forma passiva e esse

foi fixado com parafusos de titânio (1,5mm – 3i Implant Innovations, EUA) um em cada extremidade (Figura 3).

Material e Método

O tecido ósseo foi perfurado com uma trefina de 6mm de diâmetro nos orifícios do guia (Figura 4). A cortical óssea interna determinou o limite da profundidade das perfurações e sua manutenção teve o objetivo de evitar áreas de fragilidade no osso e conseqüentes fraturas.

Algumas cavidades do guia cirúrgico não foram perfuradas. Na segunda fase, o implante de titânio foi colocado diretamente sobre o osso pré-existente nessas áreas, seguindo-se o mesmo protocolo para as cavidades preenchidas por biomateriais e coágulo. Este grupo representou o controle positivo.

O pequeno bloco contendo a cortical externa e o osso medular subjacente foi removido após cada perfuração e as cavidades foram preenchidas com osso liofilizado desmineralizado (LH), vidro bioativo (BG) e coágulo (C) (controle negativo), de acordo com o quadro a seguir. No grupo dos biomateriais utilizou-se soro como veículo.

ANIMAL	LADO DIREITO			LADO ESQUERDO		
01	LH	I	BG	I	BG	C
02	BG	C	LH	C	LH	I
03	C	LH	I	BG	C	LH
04	I	BG	C	LH	I	BG
05	LH	I	BG	I	BG	C
06	BG	C	LH	C	LH	I

Quadro 4 Distribuição dos grupos: osso liofilizado desmineralizado (LH), vidro bioativo (BG), coágulo (C) e implante em área de osso pré-existente (I).

Removeu-se os guias cirúrgicos após o preenchimento das cavidades (Figura 5). Membranas de titânio (3i Implant Innovations Inc.,

Material e Método

EUA) foram colocadas sobre os defeitos ósseos (Figura 6) e mantidas em posição pelos parafusos utilizados para a fixação do guia cirúrgico. Estes parafusos permaneceram em posição durante o processo de reparo para servirem de referência para o reposicionamento do guia cirúrgico na segunda fase do experimento.



FIGURA 5: Preenchimento da cavidade com vidro bioativo.

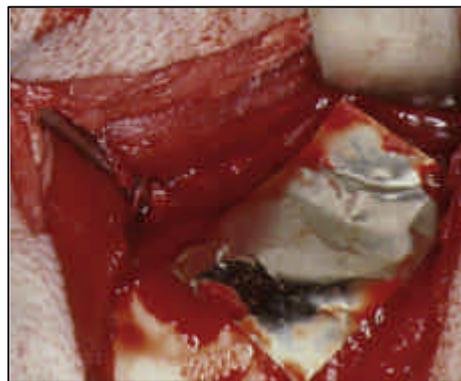


FIGURA 6: Membrana de titânio sobre a cavidade.

Suturou-se o perióstio, planos musculares e pele com fio Mononylon 40 (Ethicon). Para a proteção dos ferimentos colocou-se povidine tópico (Figura 7) e bandagem.



FIGURA 7: Sutura no pós-operatório imediato.

Material e Método

Segunda fase experimental

Foi realizada após 5 meses da primeira seguindo-se o protocolo já descrito para anestesia e medicação complementar, tricotomia, anti-sepsia e colocação dos campos estéreis.



FIGURA 8: Reinstalação do guia cirúrgico.

Uma nova incisão foi realizada sobre a anterior, os tecidos foram descolados e a área previamente operada, exposta. O guia cirúrgico foi reposicionado, seguindo-se a referência determinada pelos

parafusos de fixação que permaneceram em posição (Figura 8). A função do guia nesta fase era direcionar a instalação dos implantes de titânio exatamente no centro das cavidades reparadas, sem contato com o tecido ósseo pré-existente.

O protocolo para a instalação dos implantes de titânio foi determinado pelo fabricante. A única diferença foi na primeira perfuração, onde utilizou-se uma trefina com 2mm de diâmetro ao invés da broca de 2mm de diâmetro fornecida pelo fabricante. O objetivo era retirar material do centro das cavidades para análise histológica da reparação (Figuras 9 e 10).

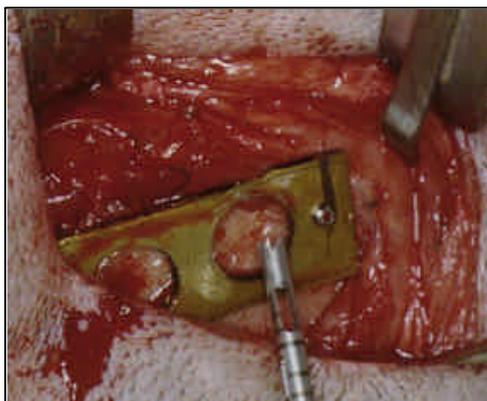
Material e Método

FIGURA 9: Trefina de 2mm de diâmetro para retirada do material.



FIGURA 10: Material encaminhado para processamento histológico.

O tecido removido foi imediatamente fixado em formol 10% e encaminhado para processamento histológico no laboratório de patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram instalados implantes de titânio no centro de todos os orifícios do guia cirúrgico (Figuras 11 e 12), inclusive nas áreas de osso pré-existente que premaneceram sem perfuração na primeira fase.

As etapas posteriores de sutura, curativos e medicação foram semelhantes às da primeira fase.

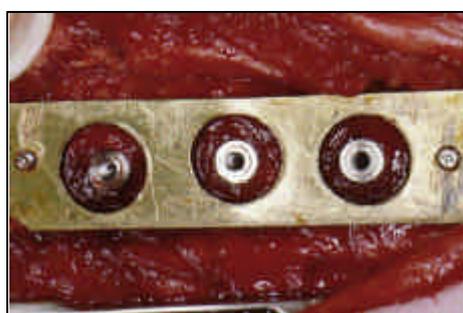


FIGURA 11: Implantes de titânio no centro das cavidades.

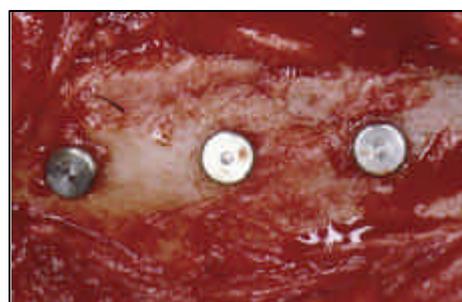


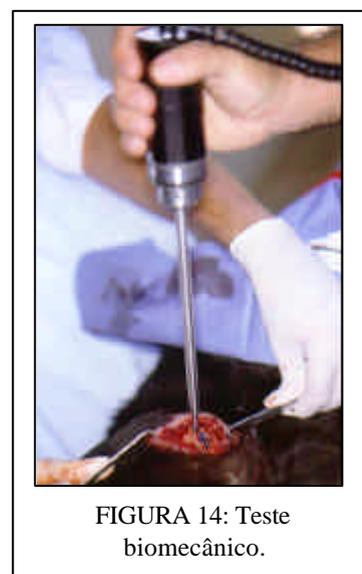
FIGURA 12: Posição dos implantes de titânio após remoção do guia.

Material e Método

Terceira fase experimental

A terceira fase foi realizada após 3 meses da instalação dos implantes de titânio. Os cães foram novamente anestesiados para o teste biomecânico.

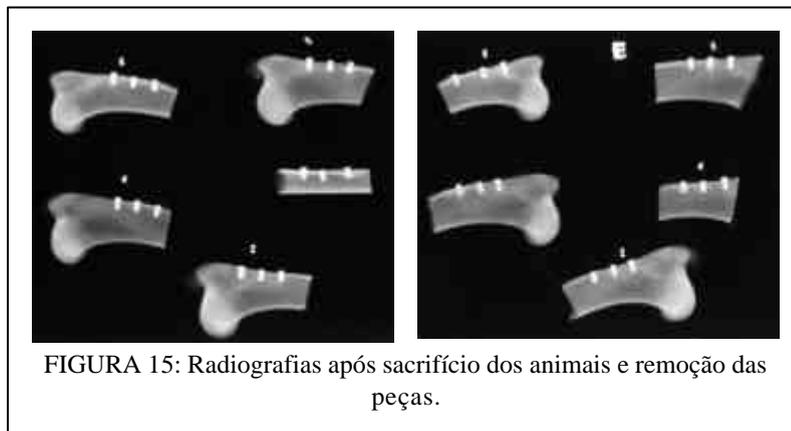
Este teste constituiu na mensuração da força de contra-torque necessária para o rompimento da interface entre o osso e o implante de titânio. Para isto utilizou-se um torquímetro digital (Mark 10 Corporation – série BG/BGI, EUA) (Figura 13). Os implantes de titânio foram desrosqueados em cerca de 40° e no momento em que se observou a fratura da interface, o movimento foi interrompido e os implantes foram reposicionados e mantidos no interior do tecido ósseo (Figura 14).



Os animais foram sacrificados por sobredosagem de anestésico e as peças removidas e fixadas em formol 10%. As amostras foram radiografadas na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Figura 15) e enviadas à Universidade de Toronto, onde foi realizado o

Material e Método

processamento laboratorial, análise de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons e análise de microscopia óptica.



4.4 Processamento para microscopia eletrônica e óptica

Inicialmente as peças foram removidas em blocos únicos com as 3 amostras de cada lado. A seguir, os blocos foram cortados e as cavidades com os implantes de titânio individualizadas para a inclusão em resina acrílica.

Verificou-se uma grande quantidade de gordura na porção medular do tecido ósseo que precisou ser removida para não interferir no processo de polimerização da resina.

4.4.1 Remoção de gordura das peças



Seguiu-se o protocolo de remoção de gordura descrito por Goldman et al. (1998) e Goldman (2001). Após desidratação das peças em concentrações gradativas de álcool durante 11 dias, os autores preconizavam a utilização de uma mistura de 50:50 heptano-isopropanol como solvente em um aparelho denominado Soxhlet

(Soxhlet Extraction Apparatus, Lab Glass, E.U.A.) (Figura 16). O procedimento durava 14 dias e consistia de ciclos repetidos de lavagem das amostras no interior do aparelho pelo solvente.

4.4.2 Microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons

Finalizado o processo de remoção de gordura, as peças foram preparadas para inclusão em resina. Primeiro, foram colocadas em álcool absoluto por 2 dias com uma troca após 24h. O objetivo era completar o processo de desidratação química e remover o solvente utilizado para a extração de gordura. A seguir, trocas diárias de solução de álcool absoluto e xilenol foram realizadas durante 5 dias, com concentrações decrescentes de álcool e crescentes de xilenol para que

Material e Método

houvesse uma infiltração gradativa no tecido ósseo e remoção de qualquer resíduo do solvente. Trocas gradativas também foram feitas para a transição entre o xilenol e o monômero de polimetil-metacrilato (Osteo-Bed, Polysciences Inc., E.U.A.), primeiro passo para a infiltração com resina.

As peças permaneceram imersas no monômero durante 6 dias a 4°C, com uma troca após 3 dias. O protocolo de infiltração com resina preconizava a imersão em 2 soluções com catalizador (peróxido de benzoil) e monômero, com concentrações crescentes durante 6 dias em cada solução e com uma troca após 3 dias. Para a inclusão, as peças foram colocadas em recipientes individuais de plástico. Os recipientes foram mantidos em estufa a temperatura de 37°C até a polimerização da resina. Depois permaneceram a temperatura de 60°C durante cerca de 24h para a finalização do processo de polimerização.

Os blocos foram seccionados ao meio com um disco diamantado (Saw Buehler) fixado a um aparelho rotatório (Precision Saw Buehler Isomet 1000) com velocidade de 875 rpm e sob irrigação abundante. A seguir foram polidos com lixas de diferentes granulações (180, 320, 4000 respectivamente) e rotação de 300 rpm. O polimento final foi feito com Alumina utilizando-se diferentes tamanhos de partículas (1µm, 0,3 µm e 0,05 µm respectivamente) em velocidade de 600 rpm.

As amostras foram cobertas por uma camada de 2nm de platina para a visualização no microscópio eletrônico (HITACHI), calibrado para 20Kv.

Material e Método

Como não foi possível obter uma imagem de toda a área de interesse devido ao tamanho dos blocos, padronizou-se a obtenção de 5 imagens (2 do lado direito, 1 da porção apical e 2 do lado esquerdo) em um aumento de 25 vezes. As imagens foram sobrepostas e montadas no software Sigma Scan Pro 4.

4.4.3 Microscopia óptica

O material removido imediatamente antes da colocação dos implantes de titânio na segunda fase cirúrgica foi fixado em formol 10% tamponado e encaminhado para processamento histológico no laboratório de patologia do Hospital de Clínicas da UFU.

As peças foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 5 μm e coradas em HE. Algumas lâminas do grupo do osso liofilizado desmineralizado e vidro bioativo foram selecionadas e coradas em Tricrômico de Masson no laboratório de histologia do Bone Interface Group – Universidade de Toronto e laboratório de histologia do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP.

Alguns blocos em resina, de amostras dos grupos experimentais foram corados com Azul de Toluidina e van Gieson após a análise de microscopia eletrônica.

4.5 Análise histométrica

A análise histométrica das imagens obtidas por microscopia eletrônica de retro-espalhamento de elétrons foi realizada através do software Sigma Scan Pro 4. A unidade de medida utilizada para o cálculo

Material e Método

das áreas foi “pixels”. Excluiu-se dessa análise o grupo no qual o implante de titânio foi inserido diretamente em osso pré-existente.

Inicialmente o defeito ósseo foi delimitado. Apesar do processo de reparação estar bem adiantado era possível identificar as paredes do defeito pela diferença de intensidade em relação ao osso maduro da região. Determinou-se o limite inferior do defeito no ápice do implante de titânio (Figura 17).



FIGURA 17- Delimitação da area de interesse para análise histométrica.

A imagem foi cortada, restando apenas a área selecionada (Figura 18), que representava a *área total do defeito*. Os valores dessa área total foram então obtidos.

Material e Método

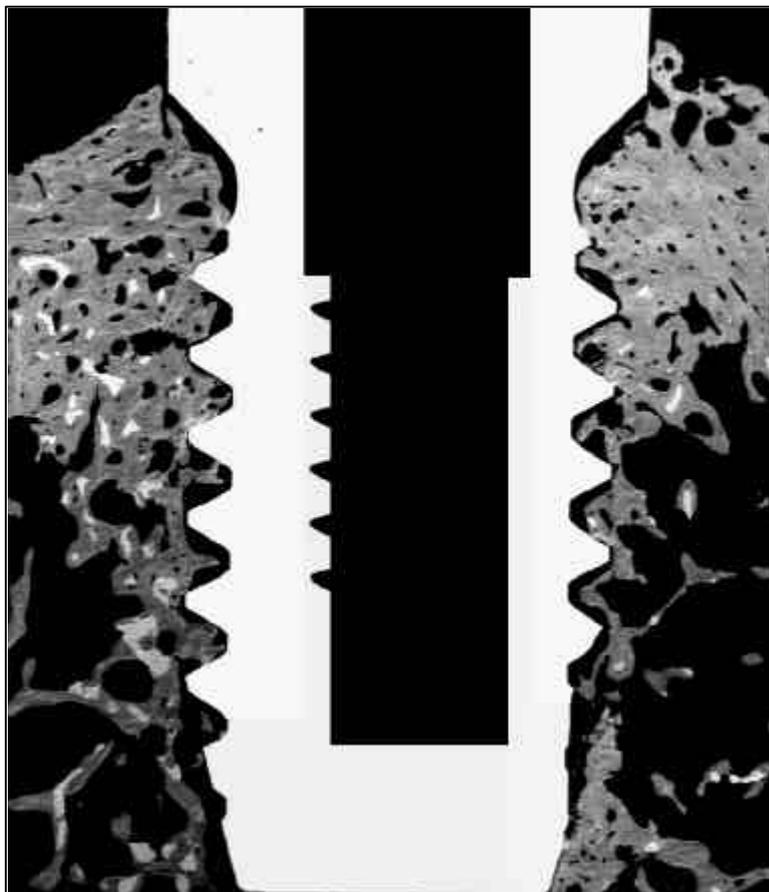


FIGURA 18- Área total do defeito.

A seguir, a *área ocupada pelo implante* foi demarcada e também mensurada. Da subtração entre a *área total do defeito* (Figura 19) e a *área ocupada pelo implante* (Figura 19), em verde, obteve-se a *possível área de neoformação óssea* do defeito (em vermelho).

Material e Método

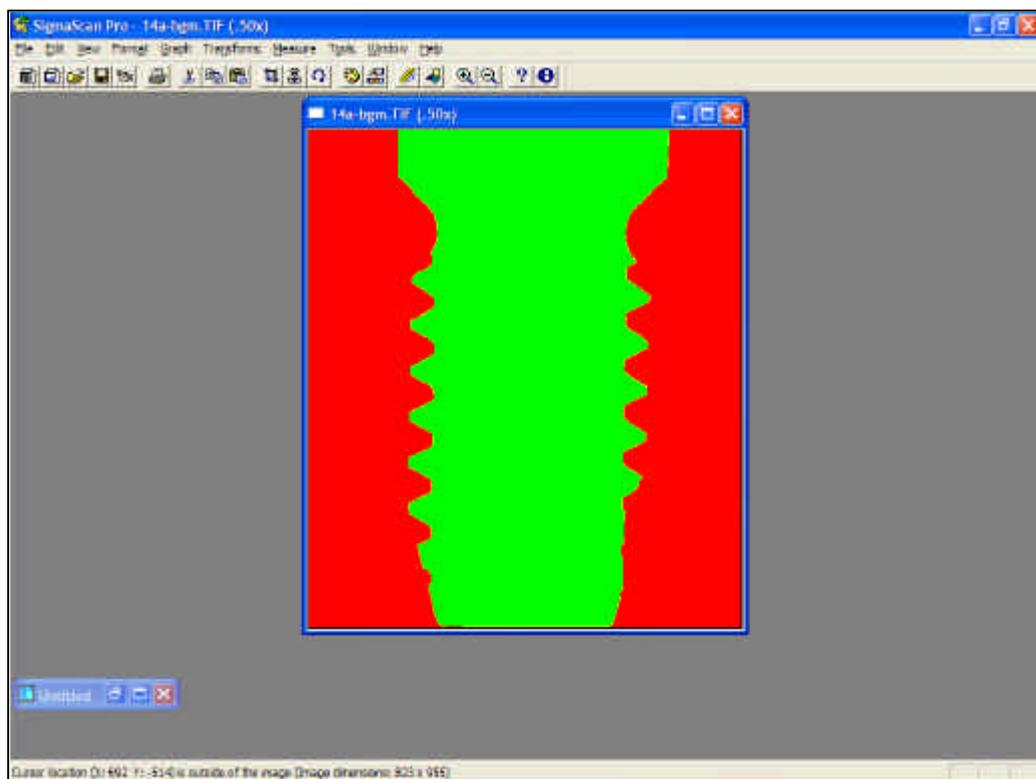


FIGURA 19- Software Sigma Scan Pro 4. Figura no centro representando a área total do defeito sobreposta pela área ocupada pelo implante de titânio (verde).

A área de possível neoformação óssea era de maior interesse para a análise histométrica, pois desejava-se calcular a porcentagem de neoformação óssea nesta.

Para que a mensuração do tecido ósseo fosse feita da forma mais precisa possível, a figura foi transportada para o software Corel Photo Paint 10. Todas as imagens que não representavam o tecido ósseo foram apagadas, restando apenas o osso em evidência (Figura 20), que foi mensurado pelo software Sigma Scan Pro 4.

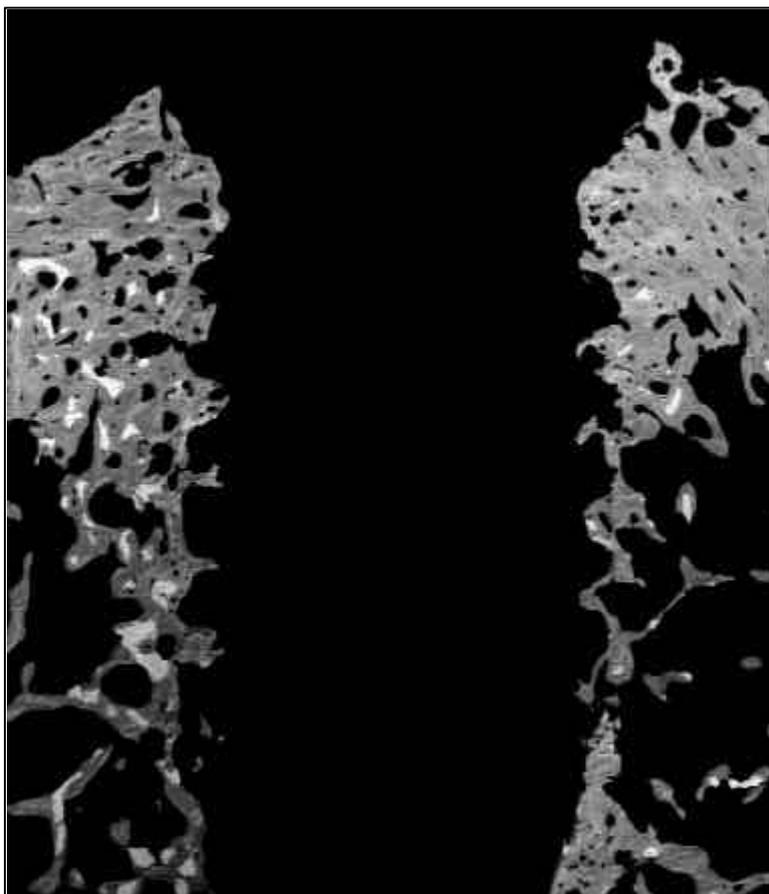


FIGURA 20- Imagem para cálculo da porcentagem de neoformação óssea.

Os valores foram transformados em porcentagem de neoformação óssea. A seguir, calculou-se a média das medidas de histometria de cada lado dos blocos (estes haviam sido seccionados ao meio). Os valores finais da porcentagem de neoformação óssea relativos a cada amostra foram representados em um gráfico em linhas (Figura 54) e analisados estatisticamente para a comparação entre os grupos.

4.6 Análise estatística

A prova estatística adequada à análise de dados relativos a duas amostras que se apresentem em escala intervalar ou de razão, é o “Teste t de Student”. Quando se têm mais de duas amostras, a prova

Material e Método

estatística adequada é o “Teste F de Snédecor”, também denominado ANOVA – Análise de Variância.

No entanto, estas provas paramétricas só podem ser aplicadas quando alguns requisitos são preenchidos. É necessário que se verifique se a distribuição dos valores é normal e se há homogeneidade entre as variâncias.

A primeira análise efetuada foi a verificação da normalidade, ou não, da distribuição dos dados, através da prova “An analysis of variance test for normality” (Shapiro & Wilk, 1965).

Como as distribuições apresentaram-se não-normais, foi aplicado um teste não paramétrico, o teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1975).

5 Resultado

5.1 Teste biomecânico e análise estatística

O cão número 1 fraturou a pata direita cerca de vinte dias após a primeira fase cirúrgica e foi eliminado do trabalho.

Os valores do teste biomecânico, representando a força de contra-torque para romper a interface do tecido ósseo com o implante estão demonstrados no quadro a seguir.

ANIMAL	LADO DIREITO			LADO ESQUERDO		
	1	2	3	1	2	3
1	LH	I	BG	I	BG	C
2	BG 21,5	C 18,8	LH 18,8	C 24,1	LH 28,9	I 38,3
3	C 32,5	LH 12,8	I 41,7	BG 30,1	C 7,1	LH 32,8
4	I 18,4	BG 21,7	C 6,3	LH 1,1	I 17,2	BG 1,7
5	LH 4,7	I 18,3	BG 43,7	I 25,5	BG 29,0	C 28,3
6	BG 17,6	C 11,2	LH 24,8	C 29,9	LH 42,8	I 69,6

Quadro 5: Representação de cada amostra com seu respectivo valor de contra-torque em Ncm.

Os valores absolutos para o teste biomecânico mostrados no quadro anterior foram representados no gráfico (Figura 21), que se segue.

Resultado

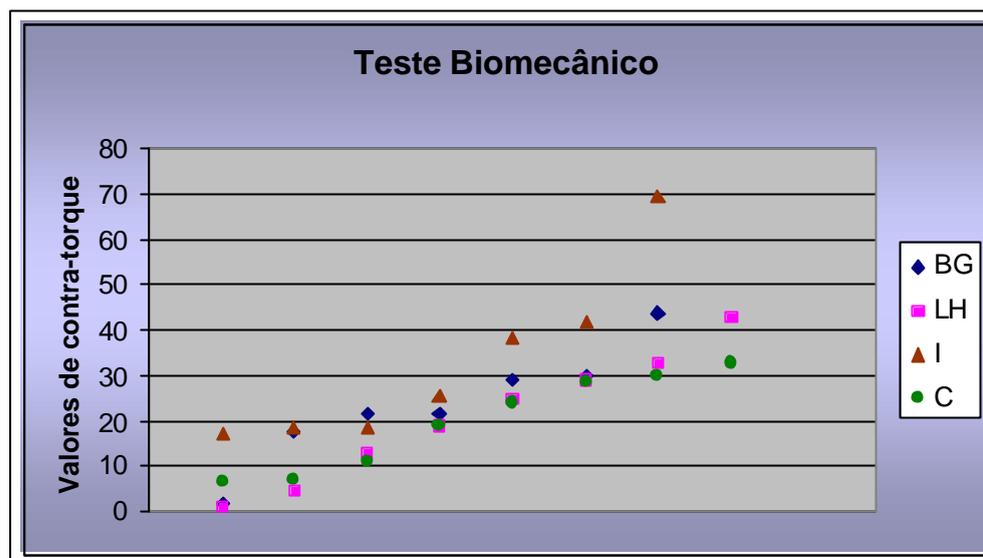


FIGURA 21- Representação dos valores de contra-torque obtidos nos 4 grupos.

A prova “An analysis of variance test for normality” (Shapiro & Wilk, 1965) para a verificação da normalidade foi feita sobre os valores de torque obtidos com o grupo do implante em osso pré-existente (controle positivo). O resultado encontrado foi $w = 0,831$ sendo que, para $n = 7$, o valor crítico de w é $0,963$. O valor de w , sendo menor do que o valor crítico, indica que a distribuição é “não-normal”.

A seguir, efetuou-se a transformação logarítmica dos dados e aplicou-se novamente a prova “An analysis of variance test for normality”. O valor encontrado foi $w = 0,888$ indicando, ainda, não-normalidade da distribuição.

Em vista desses resultados optou-se, na análise estatística, por um teste não-paramétrico, adequado a 2 amostras independentes. Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças significantes entre os resultados, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1975) aos valores relativos aos grupos tratados com o vidro bioativo, o osso liofilizado desmineralizado, e os grupos controle implante em osso pré-existente e coágulo, comparadas as séries de valores, duas a duas.

Resultado

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Probabilidades associadas aos valores de U, obtidas após aplicação do teste de Mann-Whitney aos valores relativos aos grupos do vidro bioativo, osso liofilizado desmineralizado, implante em osso pré-existente e coágulo, comparadas as séries de valores, duas a duas.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
Vidro bioativo x DFDBA	0,6434
Vidro bioativo x Implante	0,6434
Vidro bioativo x Coágulo	0,6547
DFDBA x Implante	0,3545
DFDBA x Coágulo	0,8747
Implante x Coágulo	0,2472

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 1, não foram encontradas diferenças significantes entre as variáveis analisadas.

5.2 Microscopia óptica

As amostras retiradas aos 5 meses, imediatamente antes da colocação dos implantes de titânio, foram encaminhadas para processamento histológico com inclusão em parafina e coloração em HE e Tricrômico de Masson.

5.2.1 Vidro bioativo

Numa análise de microscopia óptica em pequeno aumento observa-se, na maioria das amostras, a presença de trabeculado ósseo com interposição de osso medular (Figura 22). Em alguns animais esse tecido ósseo ocupa boa parte da amostra (Figura 23).

Remanescentes do material estão presentes em todas as amostras desse grupo (Figuras 22, 23 e 24). Os grânulos mais íntegros são observados principalmente envoltos por um tecido de aspecto fibroso e denso (Figura 23). Nas áreas de tecido ósseo compacto quase não se observa grânulos e quando presentes, estão bem diminuídos pois foram substituídos em grande parte pelo osso circundante (Figura 23).

Verifica-se, também, a presença de fissuras e escavações nos grânulos com a comunicação da parte interna com a externa (Figura 24). Em alguns casos, há deposição de tecido ósseo neoformado no centro das partículas (Figura 24).

Resultado

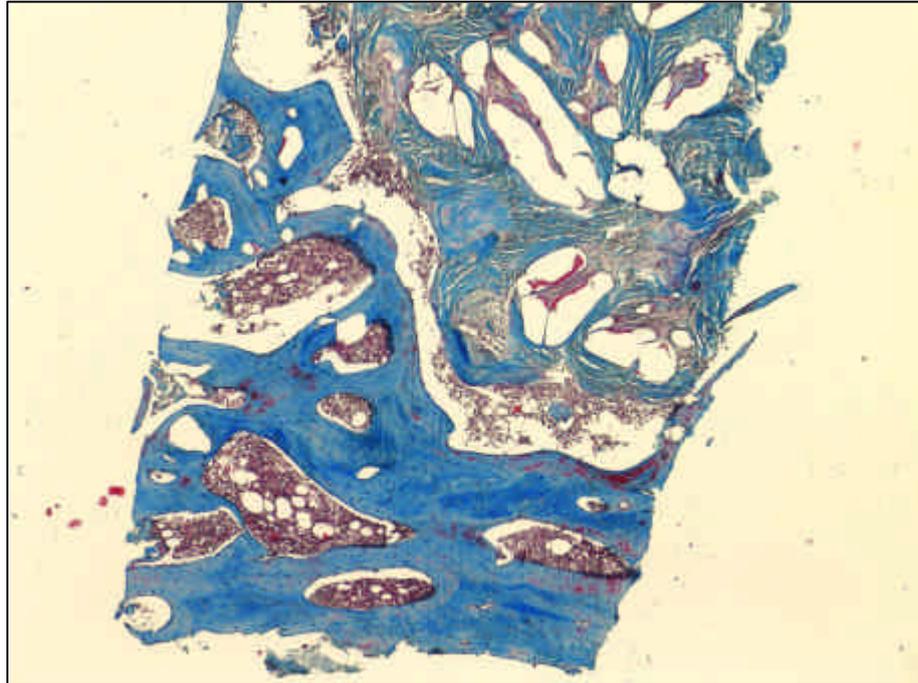


FIGURA 22- Grupo vidro bioativo. Tecido ósseo com trabeculado denso e espaços medulares. Presença de remanescentes do material. Tricrômico de Masson. Original 100X.

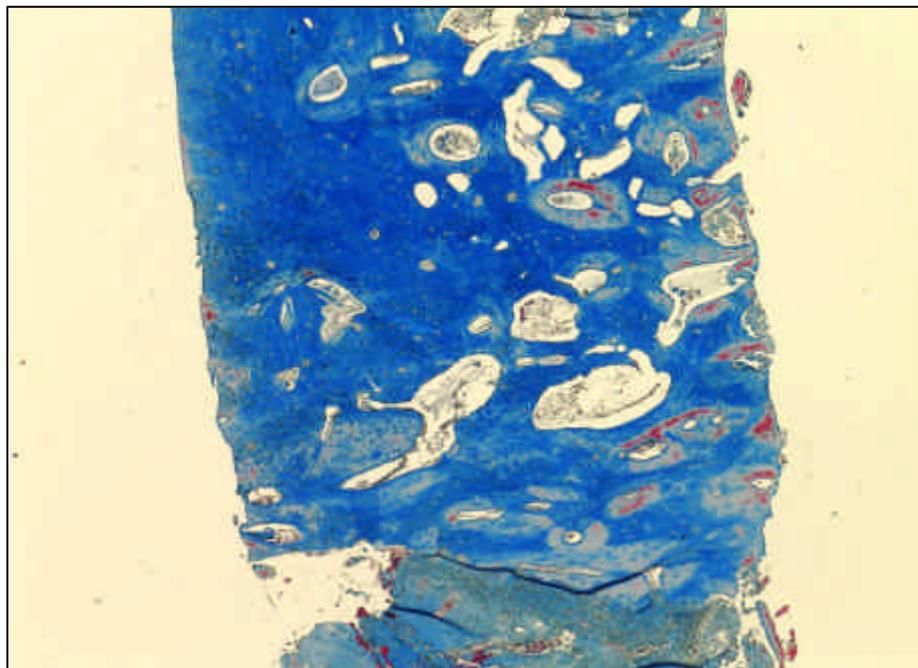


FIGURA 23- Grupo vidro bioativo. Tecido ósseo ocupando boa parte da amostra. Tricrômico de Masson. Original 100X.

Resultado

Numa outra lâmina observa-se, adjacente aos grânulos do material e próximo ao tecido ósseo com característica histológica evidente, um tecido com aspecto fibroso, denso e irregular (Figura 24).

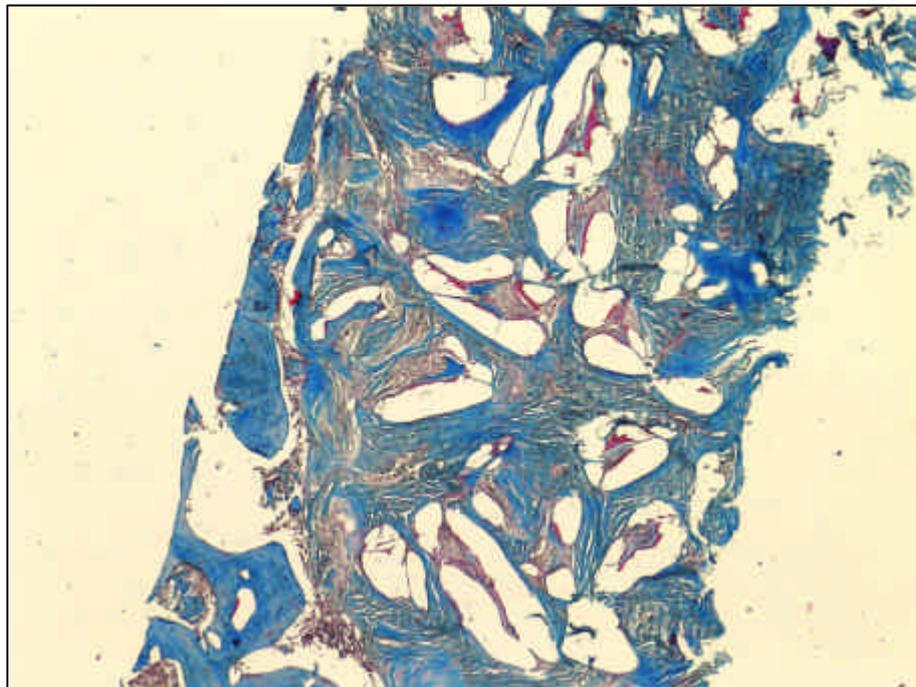


FIGURA 24- Grupo vidro bioativo. Tecido denso e irregular em continuidade com o tecido ósseo. Tricrômico de Masson. Original 100X.

Num maior aumento nota-se a continuidade desse tecido de aspecto fibroso com o osso e íntimo contato com a interface do material (Figura 25). As células em contato ou imersas neste tecido apresentam morfologia arredondada (Figura 26).

Percebe-se também a degeneração dos grânulos, com escavação e formação óssea no interior (Figura 25).

Resultado

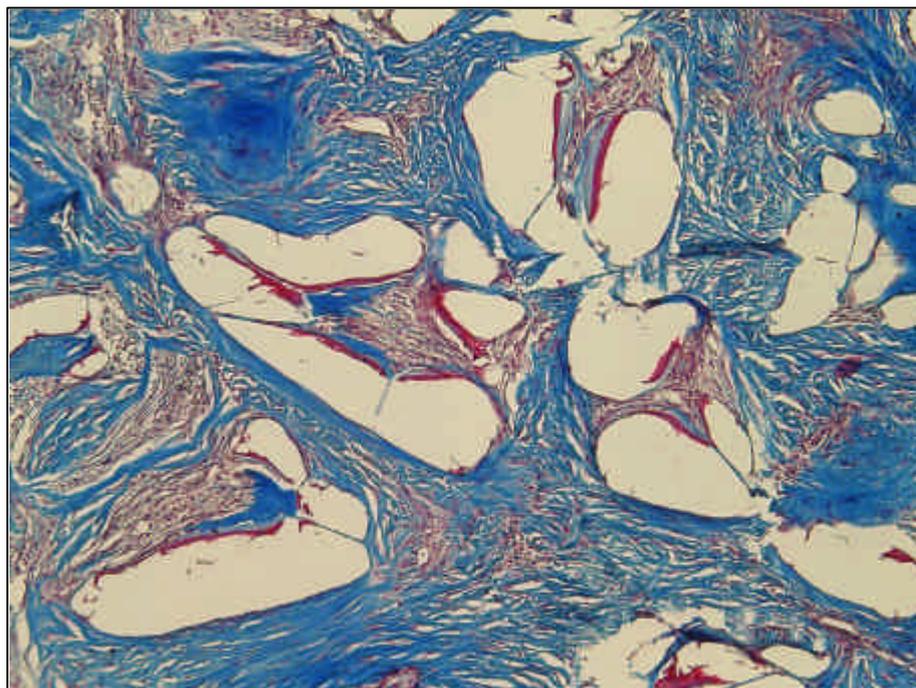


FIGURA 25- Grupo vidro bioativo. Íntimo contato do tecido denso com a interface do biomaterial. Tricrômico de Masson. Original 250X.

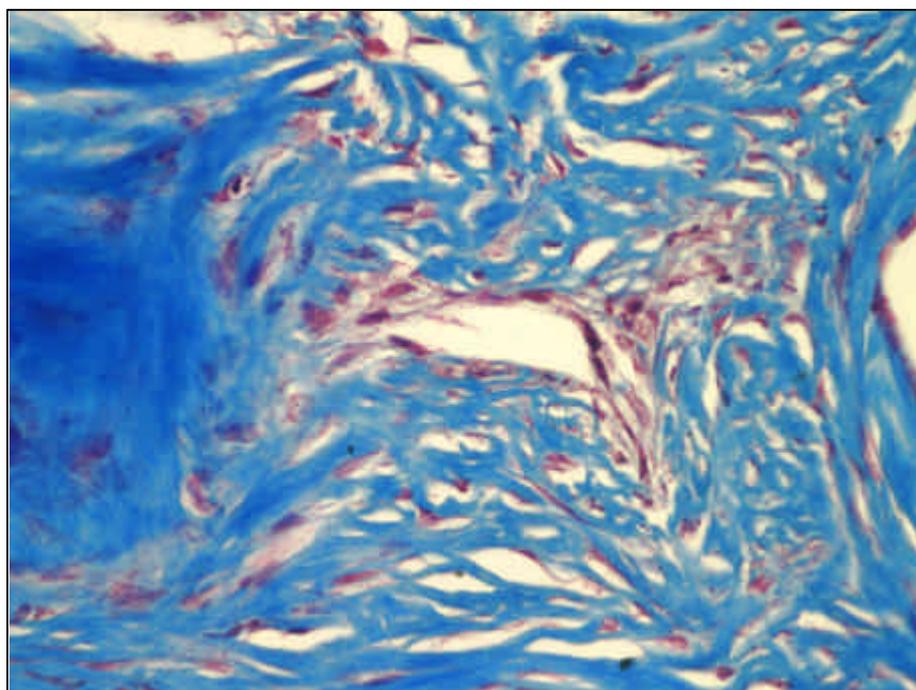


FIGURA 26- Grupo vidro bioativo. Área do tecido denso e irregular da figura anterior em maior aumento mostrando células arredondadas na região. Tricrômico de Masson. Original 1000X.

Resultado

A cavitação do vidro bioativo é observada em praticamente todos os grânulos, assim como o crescimento de tecido ósseo em seu interior (Figura 27). Esse tecido ósseo é depositado sobre a superfície interna do grânulo, evidenciando o fenômeno de osteogênese por contato, descrito por Davies (1998, 2003).

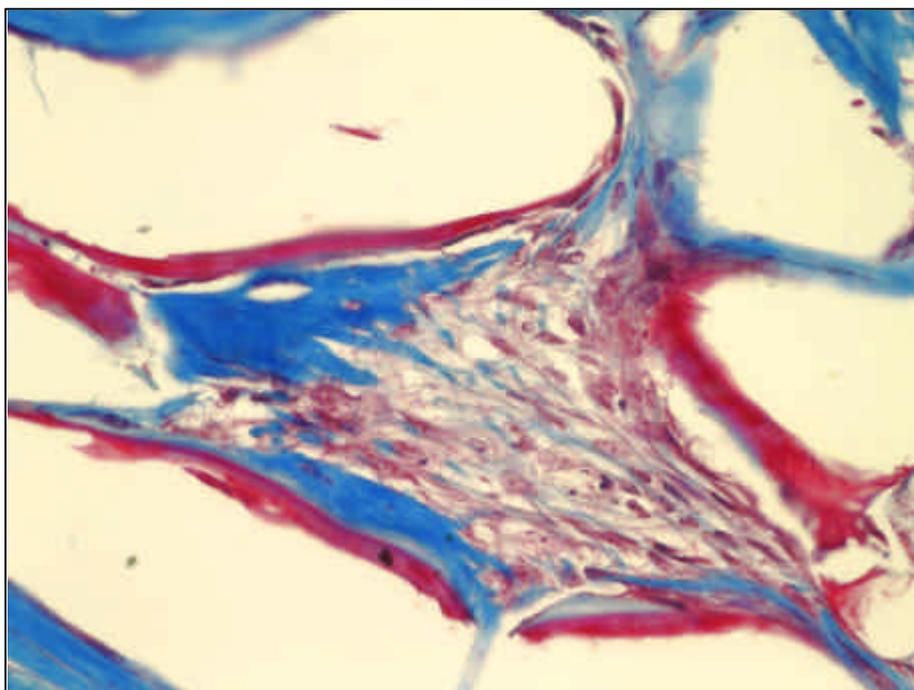


FIGURA 27- Grupo vidro bioativo. Grânulo de vidro bioativo em maior aumento mostrando cavitação e crescimento de tecido ósseo em seu interior. Tricrômico de Masson. Original 1000X.

As imagens demonstram a continuidade entre os tecidos do interior e exterior da partícula, através das cavitações e fissuras nos grânulos (Figura 28), os quais muitas vezes parecem ter sido parcialmente absorvidos ou incorporados ao tecido ósseo (Figura 29).

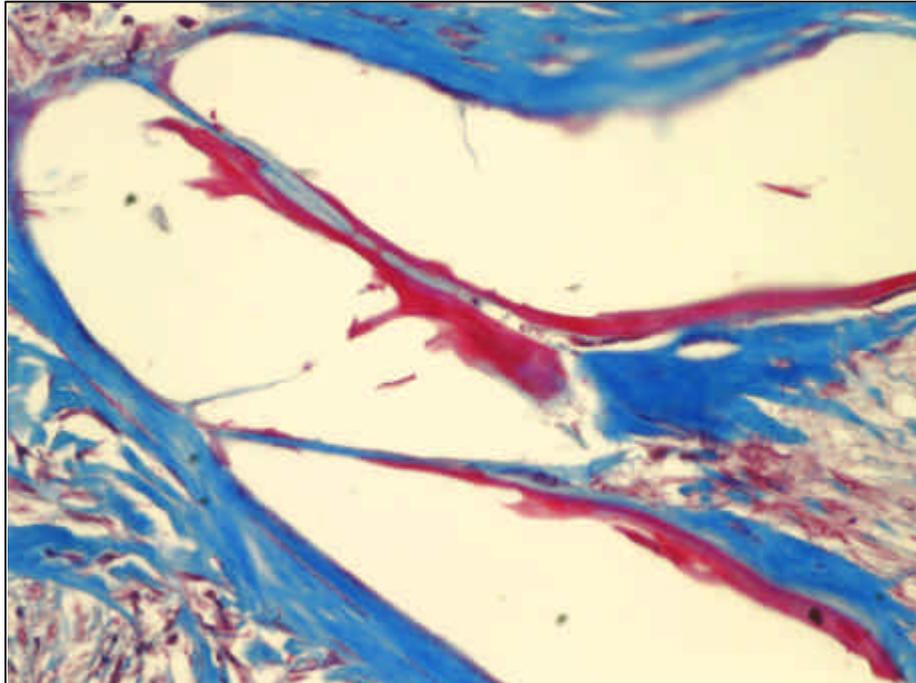
Resultado

FIGURA 28- Grupo vidro bioativo. Comunicação entre a porção externa e interna dos grânulos através das fissuras. Tricrômico de Masson. Original 1000X.

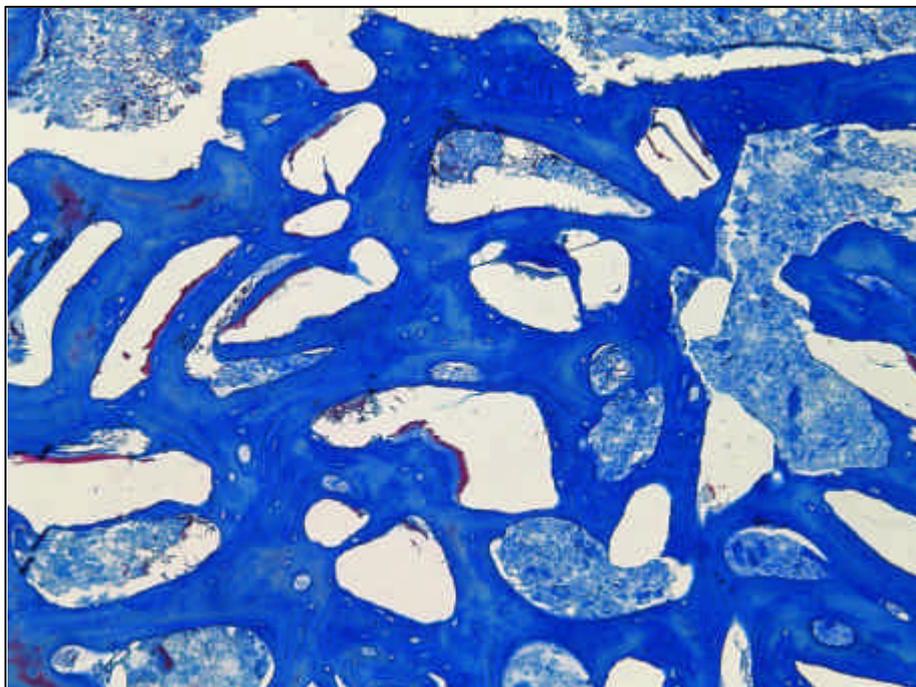


FIGURA 29- Grupo vidro bioativo. Incorporação dos grânulos de vidro bioativo ao tecido ósseo. Tricrômico de Masson. Original 250X.

5.2.2 Osso liofilizado desmineralizado

No grupo do osso liofilizado desmineralizado, assim como no do vidro bioativo, observou-se tecido ósseo maduro, com trabeculado espesso e interposição de osso medular (Figura 30).

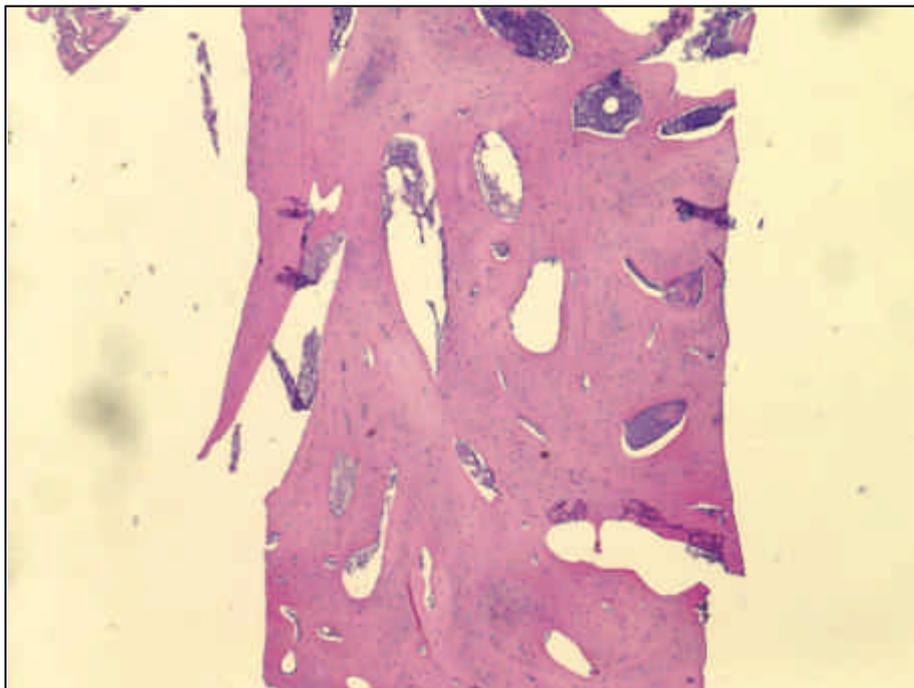


FIGURA 30- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Tecido ósseo com pequenas áreas interpostas por medular. HE. Original 100X.

Nesse grupo também havia a presença de remanescentes do material nas amostras, mas em tamanho menor do que o das partículas implantadas originalmente, sugerindo a absorção e incorporação do material pelo tecido ósseo (Figuras 31 e 32). As partículas eram evidenciadas por não apresentarem-se com células inclusas como no osso vital.

Resultado

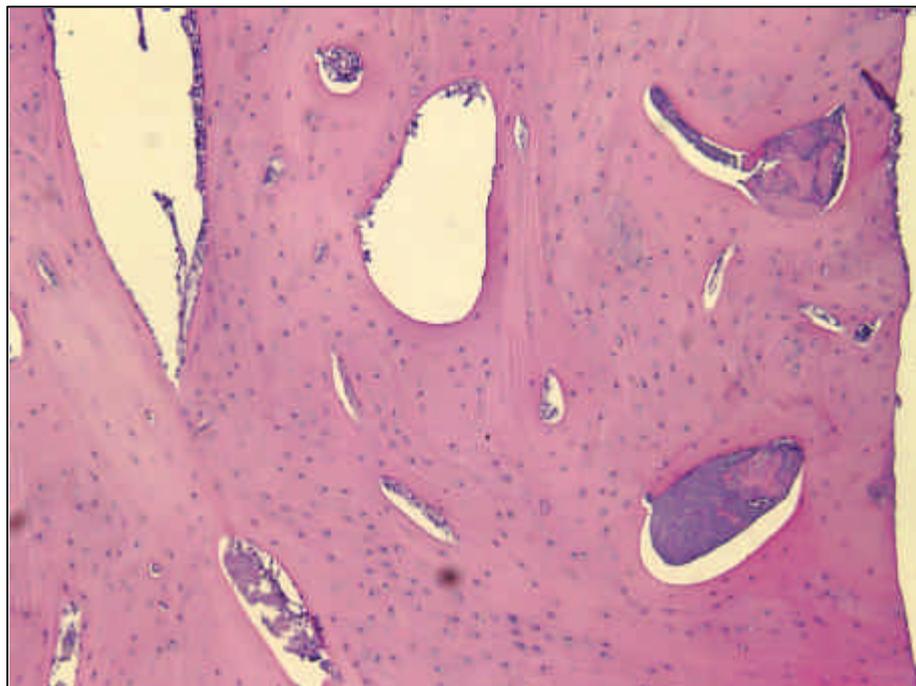


FIGURA 31- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Poucos remanescentes do material no tecido ósseo. HE. Original 250X.

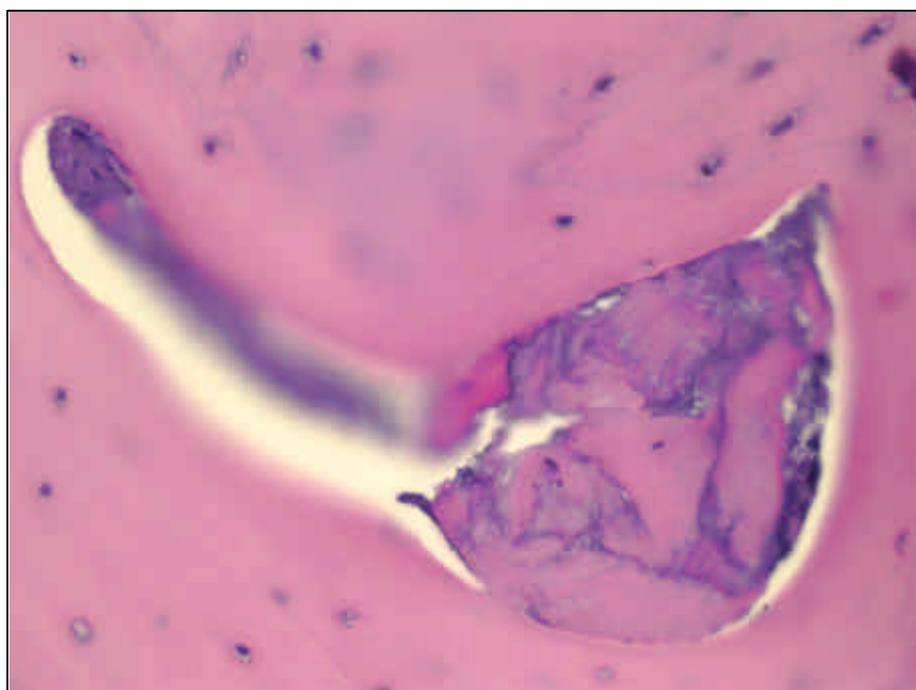


FIGURA 32- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Detalhe da figura anterior em maior aumento para a visualização de remanescentes do material. HE. Original 1000X.

Resultado

Verificou-se também, em algumas amostras, grande quantidade de tecido conjuntivo (figura 33) bastante celularizado, envolvendo o material (Figura 34). Um dos animais que apresentava este tecido obteve o menor valor de contra-torque registrado: 1,1 Ncm.

Nesses casos, os grânulos do osso liofilizado desmineralizado mostravam-se praticamente intactos (Figuras 33 e 34).

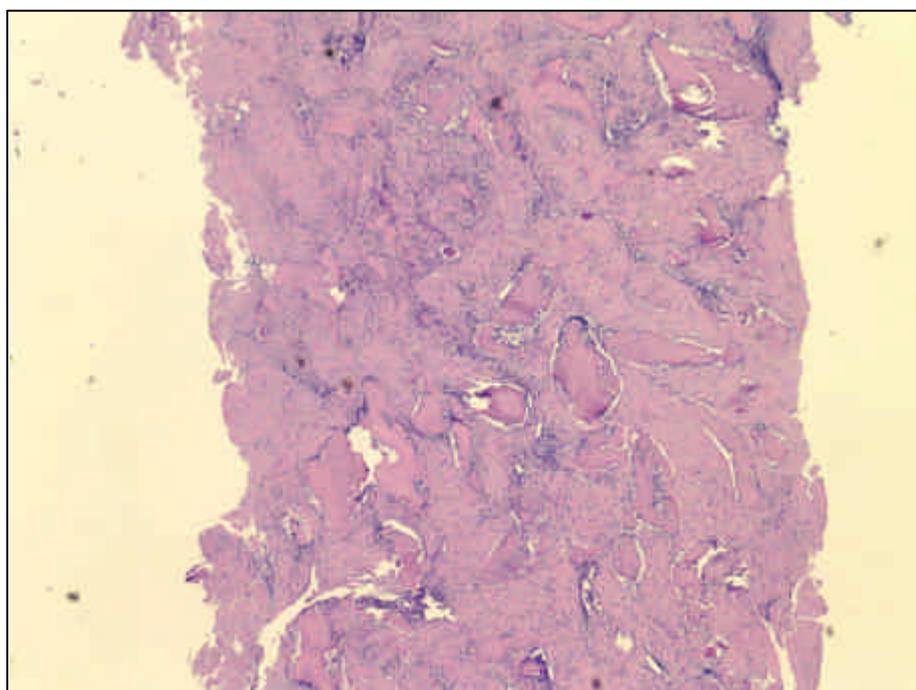


FIGURA 33- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Tecido conjuntivo denso observado em alguns animais. HE. Original 100X.

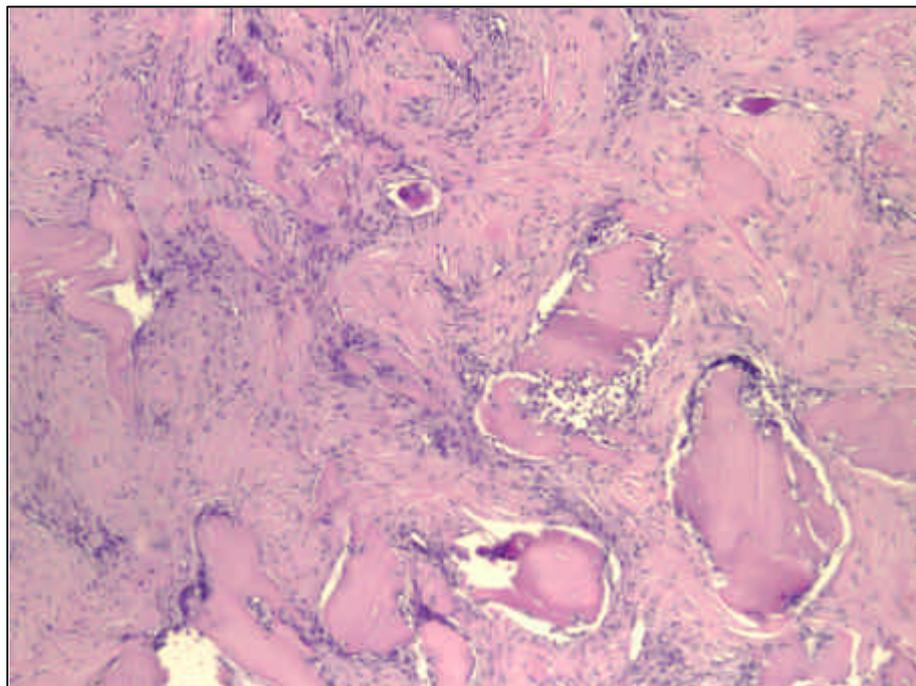
Resultado

FIGURA 34- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Partículas do material eram observadas envoltas por tecido fibroso. HE. Original 250X.

Com aspecto diferente do observado no grupo do vidro bioativo, o tecido presente ao redor dos grânulos apresentava características histológicas de tecido conjuntivo fibroso com células alongadas, possivelmente fibroblastos (figura 35).

Ao redor das partículas foram evidenciadas células gigantes (Figura 35).

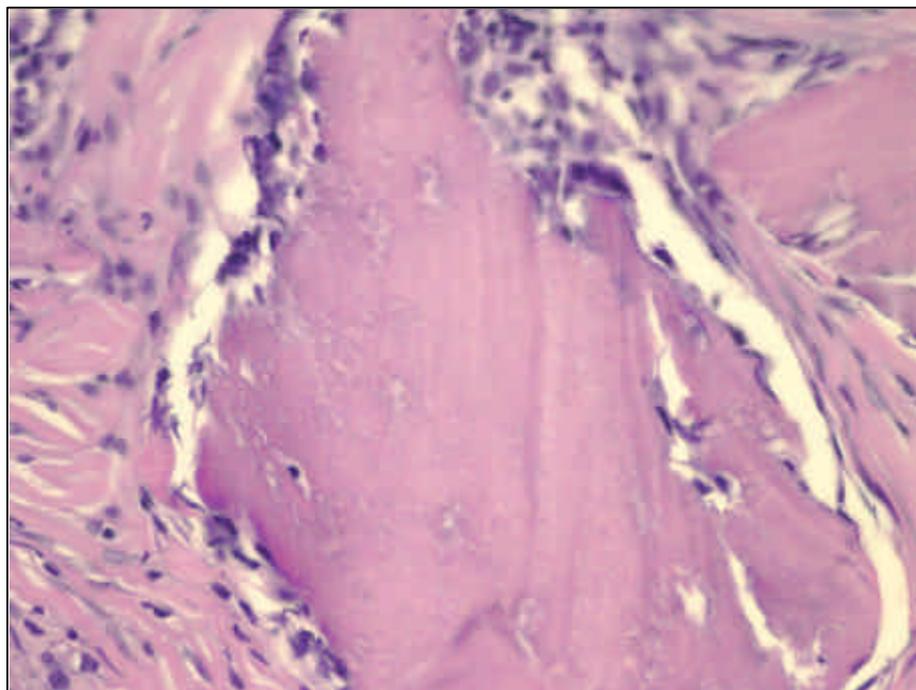
Resultado

FIGURA 35- Grupo osso liofilizado desmineralizado. Presença de fibroblastos no tecido conjuntivo e células gigantes ao redor do implante. HE. Original 1000X.

5.2.3 Coágulo

No grupo do coágulo observou-se o tecido ósseo trabecular bem organizado, interposto por tecido medular em todas as amostras (Figuras 36 e 37). A única diferença entre os animais foi a presença de tecido medular em maior quantidade em umas amostras do que em outras.

Resultado

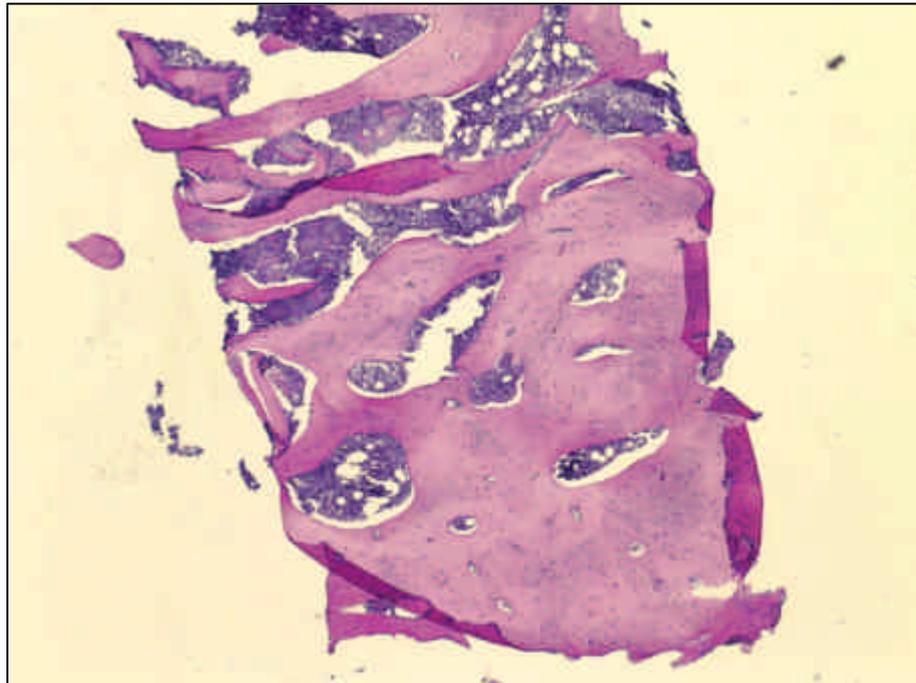


FIGURA 36- Grupo coágulo. Tecido ósseo trabecular bem organizado interposto por medular. HE. Original 100X.

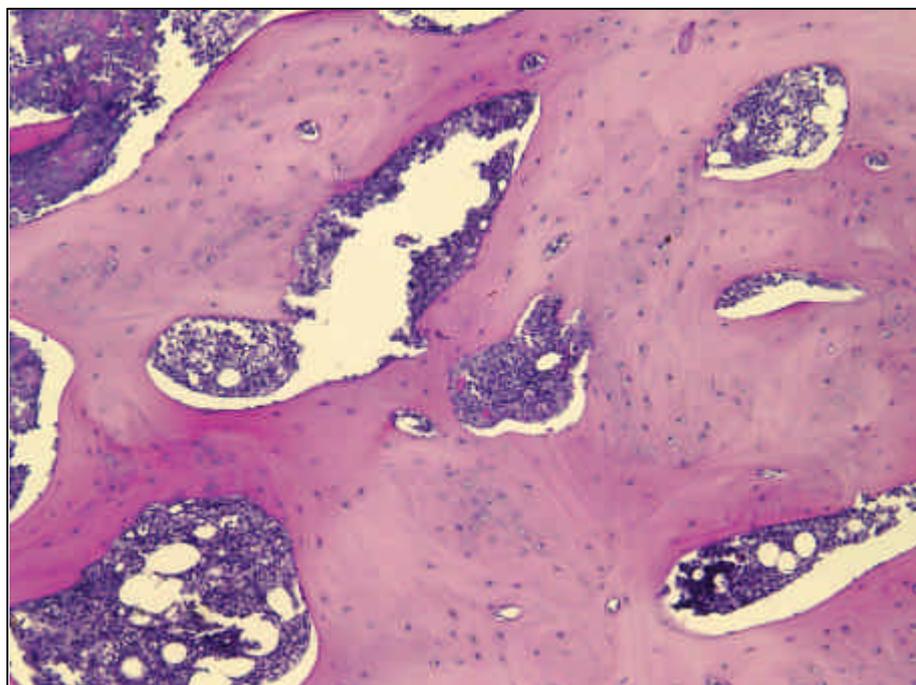


FIGURA 37- Grupo coágulo. Figura anterior em maior aumento para observação da organização do osso trabecular e medular. HE. Original 250X.

5.2.4 Osso pré-existente

As amostras de osso pré-existente também apresentaram osso trabecular bem organizado e tecido medular (Figura 38).

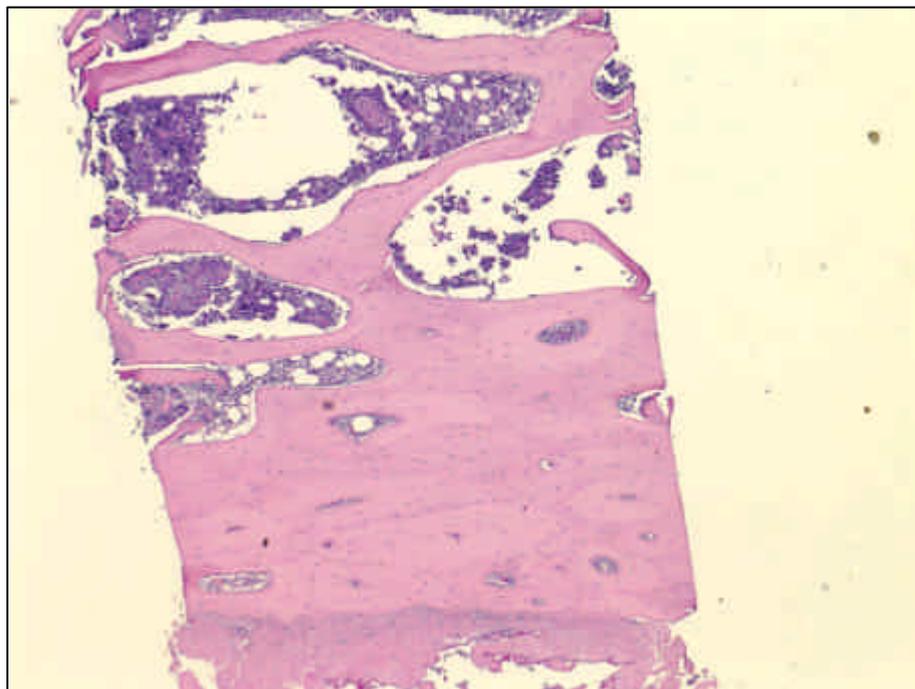


FIGURA 38- Grupo osso pré-existente. Presença de osso trabecular e medular. HE. Original 100X.

Em um animal, havia grande quantidade de medular em relação ao osso trabecular, que apresentava-se mais delgado em comparação com as outras amostras. Curiosamente, o valor de contra-torque desta amostra foi maior do que o de outras amostras do mesmo grupo com osso trabecular mais espesso e em maior quantidade em relação ao medular (Figura 39).

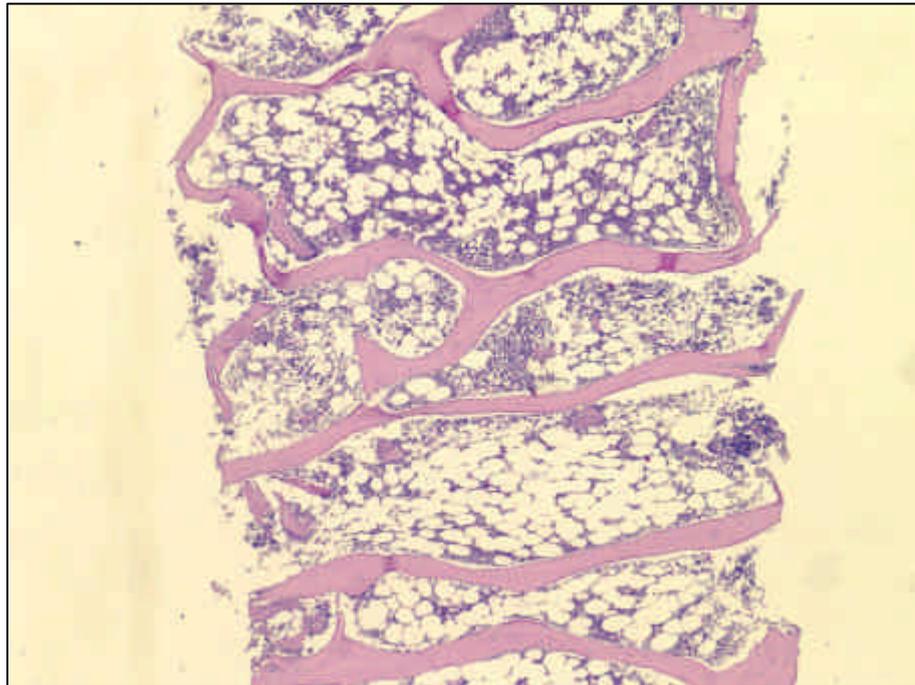
Resultado

FIGURA 39- Grupo osso pré-existente. Grande quantidade de medular em relação ao osso trabecular. HE. Original 100X.

O maior valor de contra-torque (69,6 Ncm) foi obtido neste grupo. Observou-se nessa amostra apenas tecido ósseo bem compacto e organizado sem interposição de medular (Figura 40). Era um tecido ósseo maduro com sistemas Haversianos presentes.

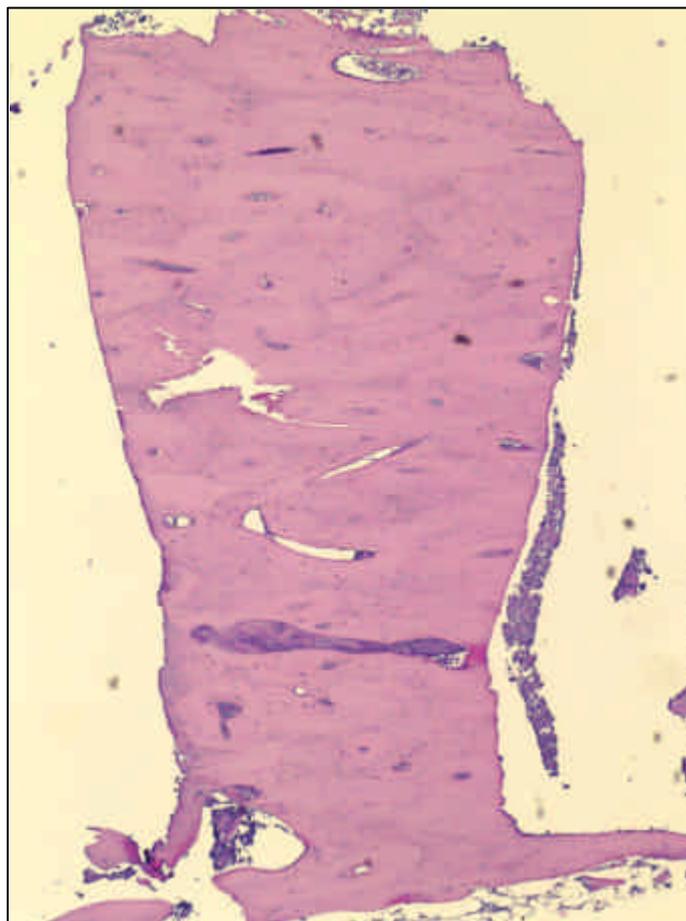


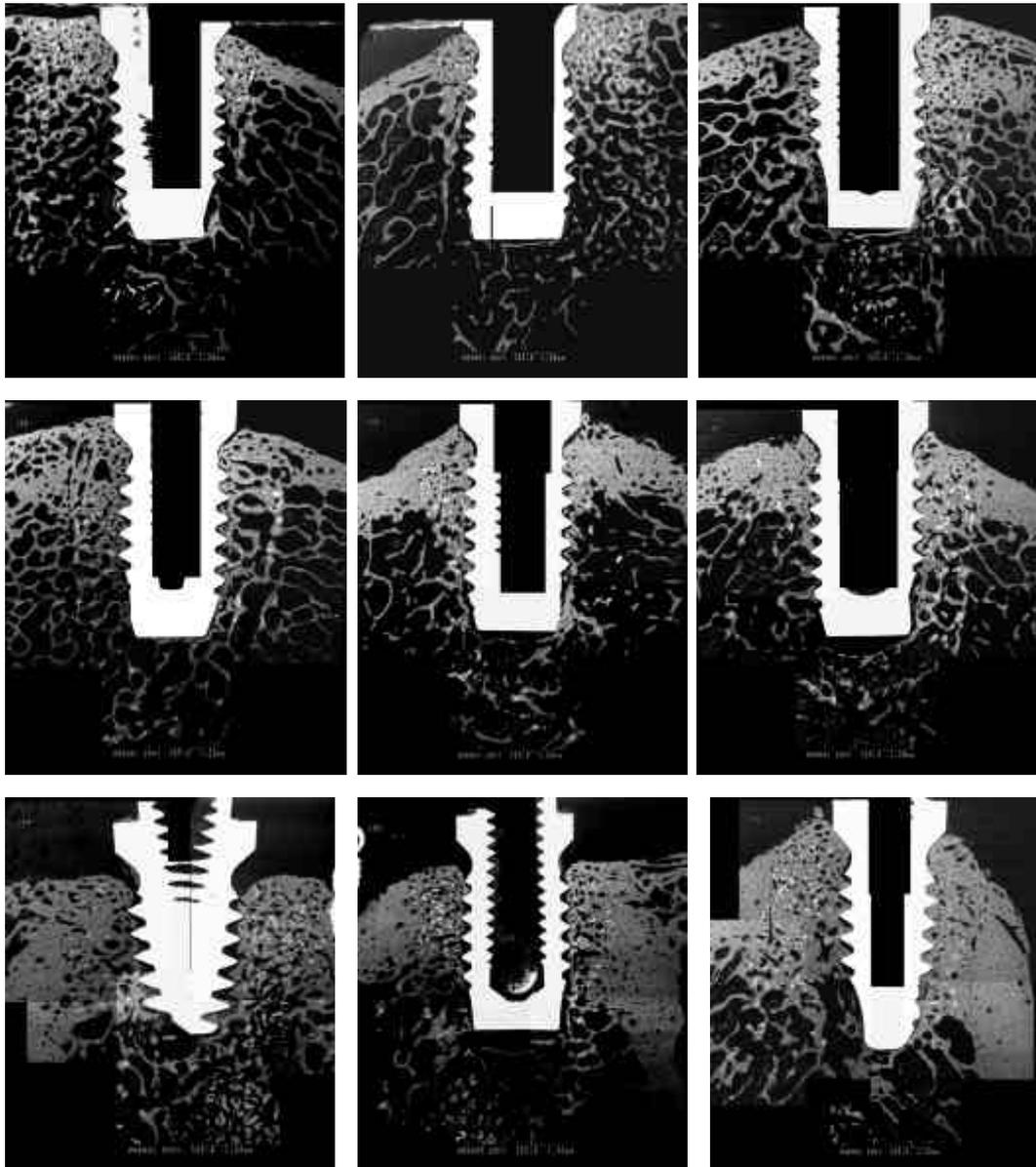
FIGURA 40- Grupo osso pré-existente. Amostra que apresentou o maior valor de contra-torque (69,6 Ncm). Observa-se o tecido ósseo compacto sem medular. HE. Original 100X.

5.3 Microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons

Como descrito no Material e Método, os blocos em resina foram seccionados e as duas metades analisadas. Eram muito grandes para visualização no microscópio eletrônico em uma só imagem. Portanto, cinco fotos com um aumento de 25X foram obtidas de toda a região (2 do lado esquerdo, 1 da porção apical do defeito e 2 do lado direito). Posteriormente estas fotos foram sobrepostas e montadas com o

Resultado
software Sigma Scan Pro 4 para a obtenção de apenas uma imagem da área total de interesse. A seguir observa-se as imagens obtidas e representadas em cada grupo.

5.3.1 Vidro bioativo



Resultado

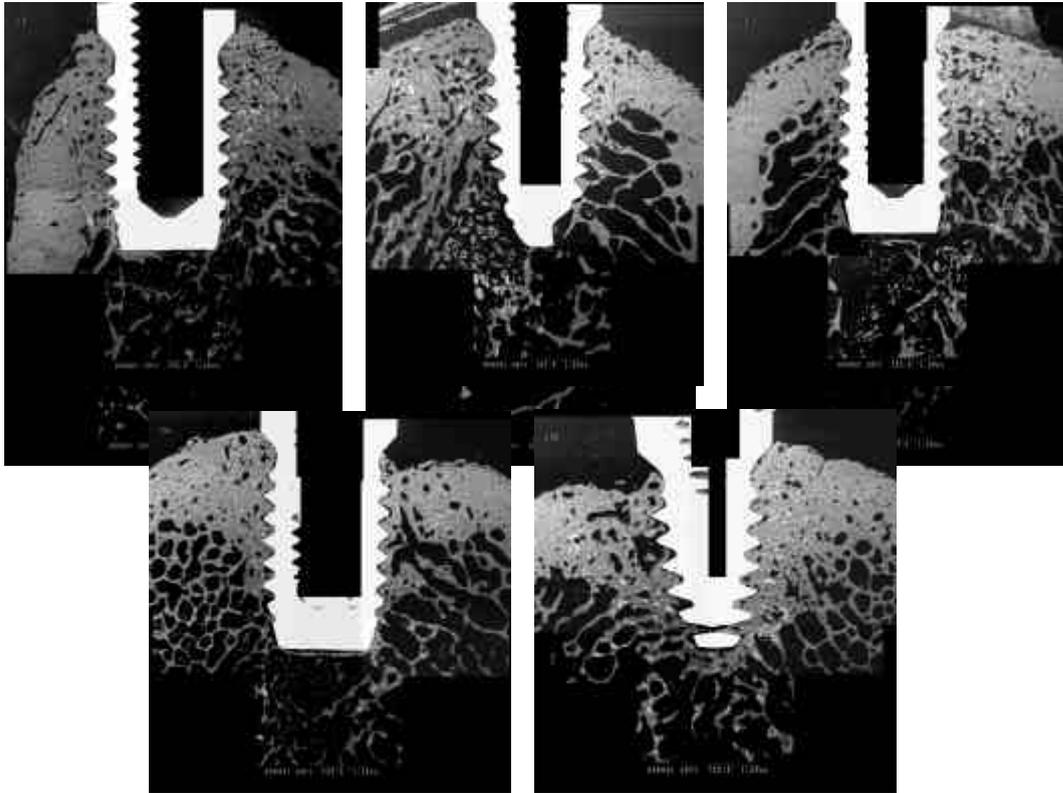


FIGURA 41- Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons das amostras do grupo do vidro bioativo. Original 25X.

5.3.2 Osso liofilizado desmineralizado

Resultado

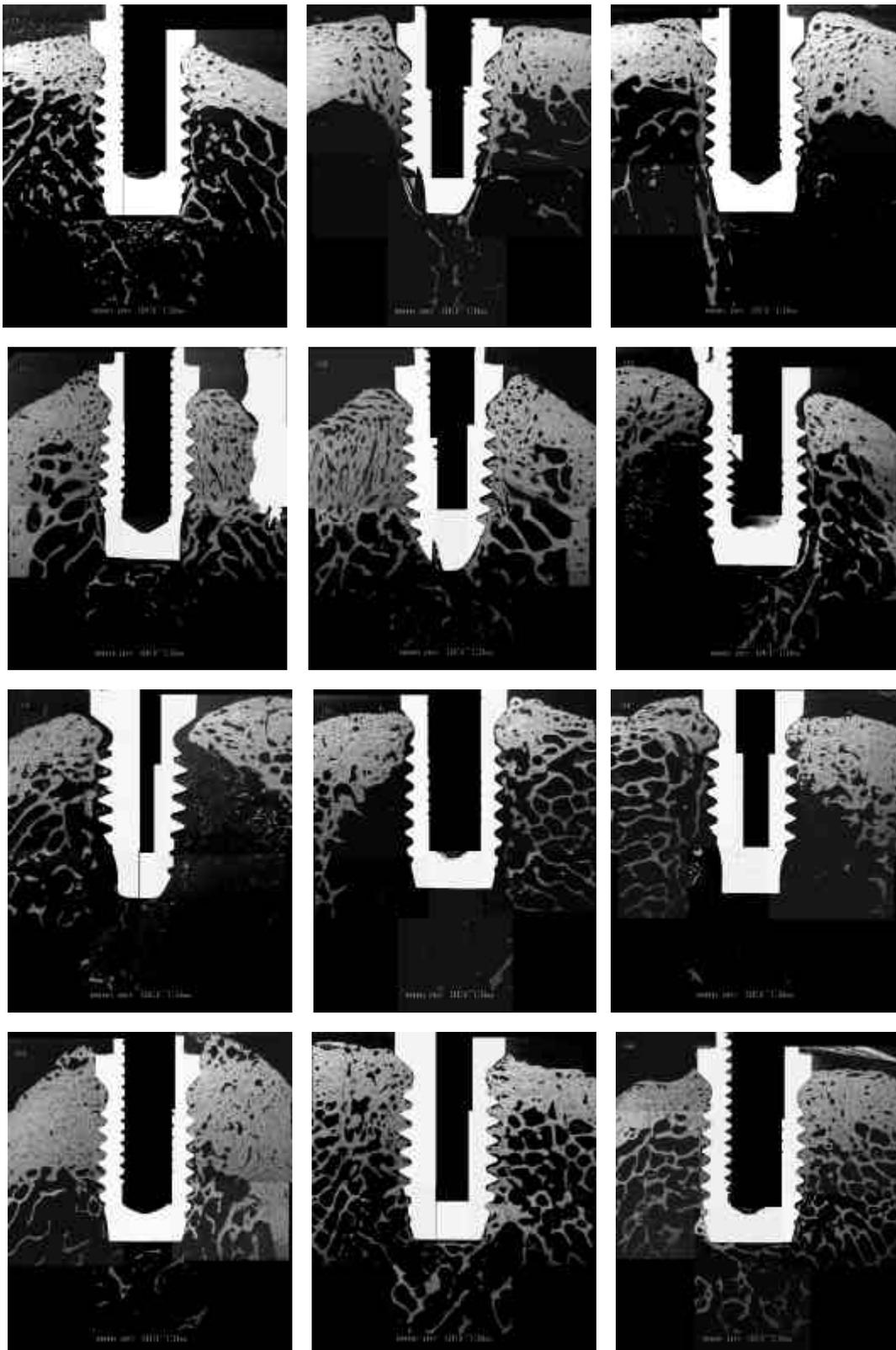
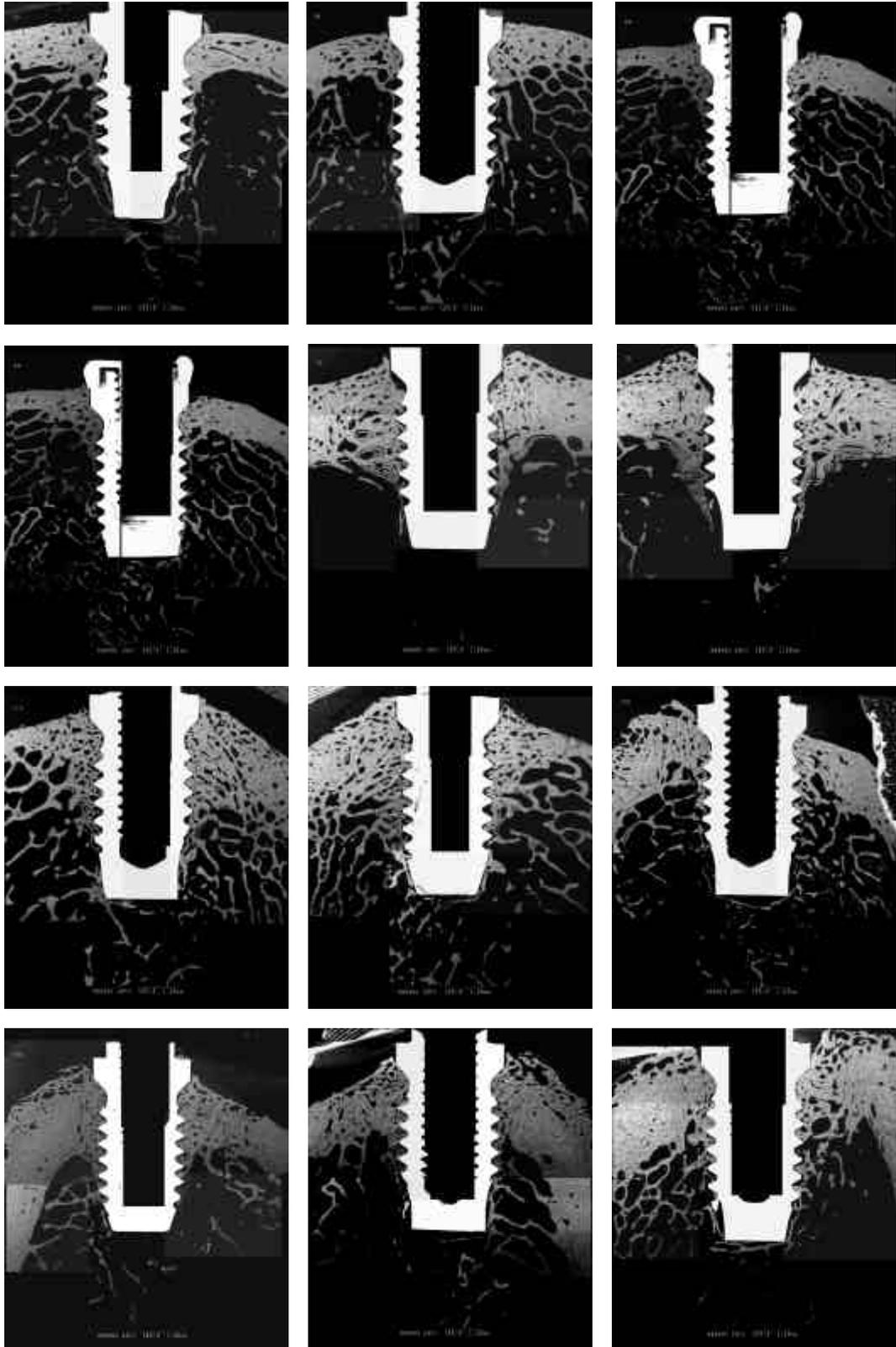


FIGURA 42- Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons das amostras do grupo do osso liofilizado desmineralizado. Original 25X.

5.3.3 Coágulo



Resultado

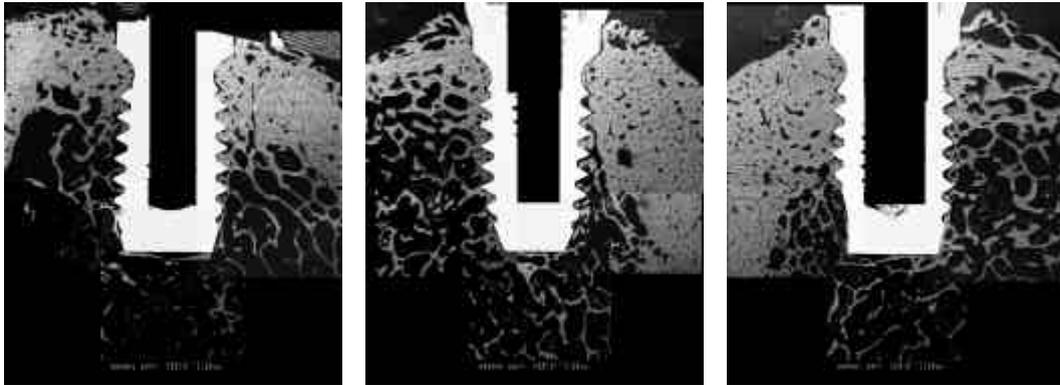
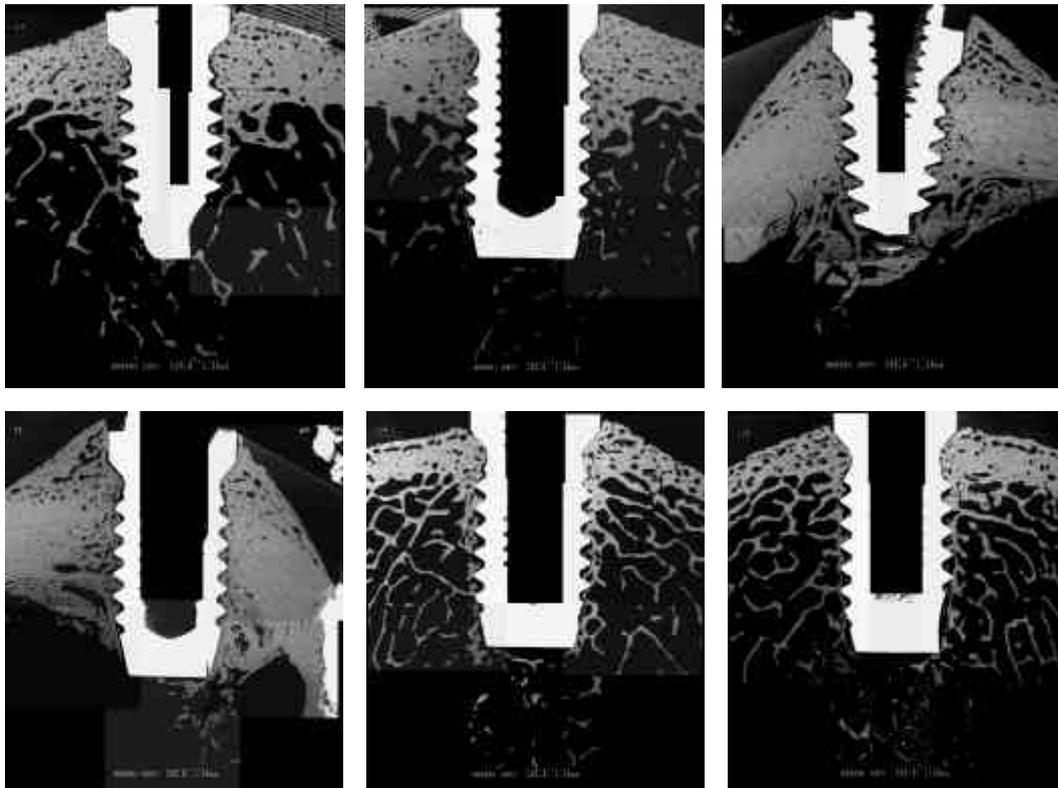


FIGURA 43- Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons das amostras do grupo do coágulo. Original 25X.

5.3.4 Osso pré-existente



Resultado

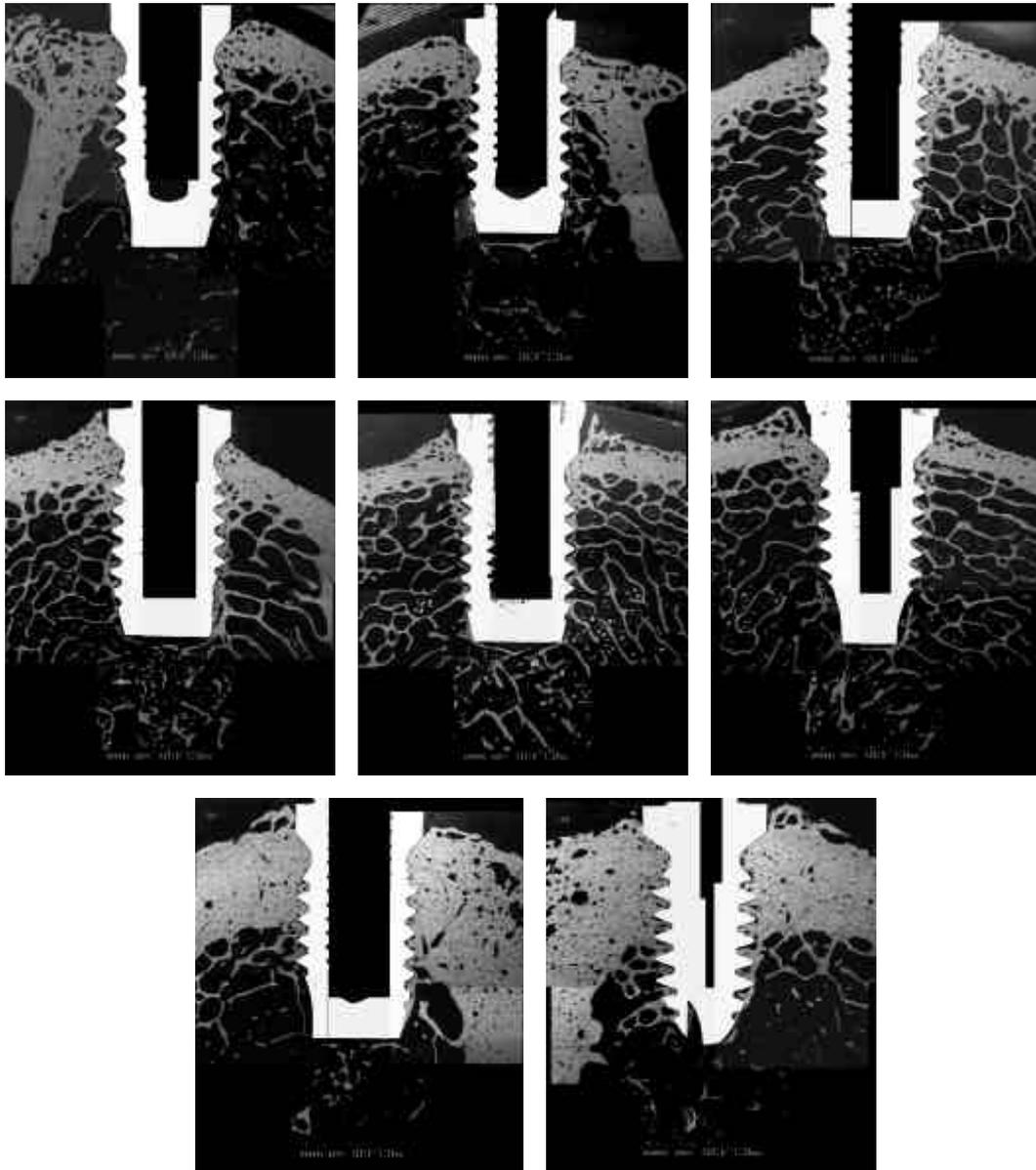


FIGURA 44- Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons das amostras do grupo do osso pré-existente. Original 25X.

Numa observação de todas as imagens, observa-se que não existem grandes diferenças na neoformação óssea entre os 4 grupos estudados.

Resultado

Em maior aumento observa-se, na porção cortical um tecido ósseo com característica lamelar, apresentando sistemas Harvesianos.

As maiores diferenças entre os grupos estão relacionadas ao padrão de reparação de cada animal e às diferenças anatômicas entre os animais, que acabaram refletidas nas cavidades e conseqüentemente, na inserção dos implantes de titânio.

5.4 Microscopia óptica X eletrônica

Alguns blocos dos grupos cujas cavidades foram preenchidas por biomateriais foram corados com Azul de Toluidina e Van Gieson. O objetivo foi analisar por microscopia óptica o tecido formado na área do defeito ósseo e ao redor dos biomateriais.

Foi colocado óleo de imersão para ajudar na estabilização da lâmina sobre os blocos, para que esses pudessem ser fotografados em um microscópio de dissecação. A lâmina de vidro tem importante papel na difração da luz e a visualização dos blocos sem ela é insatisfatória. As imagens de microscopia óptica foram comparadas com as de microscopia eletrônica da mesma região.

5.4.1 Vidro bioativo

No bloco cujas imagens são vistas a seguir, observa-se remanescentes do material incorporados ao tecido ósseo na região do defeito reparado (Figuras 45 a 48). Observa-se também que a maior parte do tecido que reparou na porção lateral do implante de titânio era cortical. No entanto, verifica-se, nesse animal, que nas roscas do implante de titânio não há o contato direto com o osso (Figuras 45 a 48). Esta amostra apresentou o valor de contra-torque mais baixo do grupo: 1,7 Ncm.

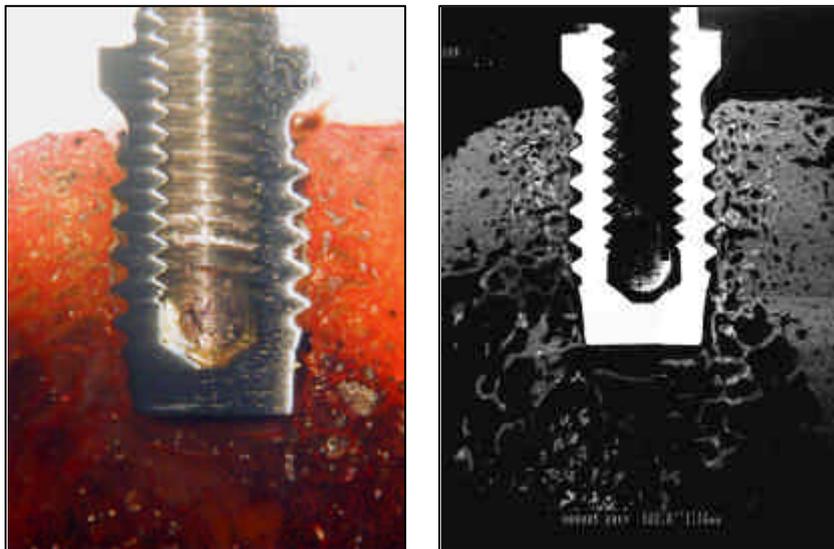


FIGURA 45- Vidro Bioativo. Imagem de microscopia óptica (Original 10X) e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons (Original 22X).

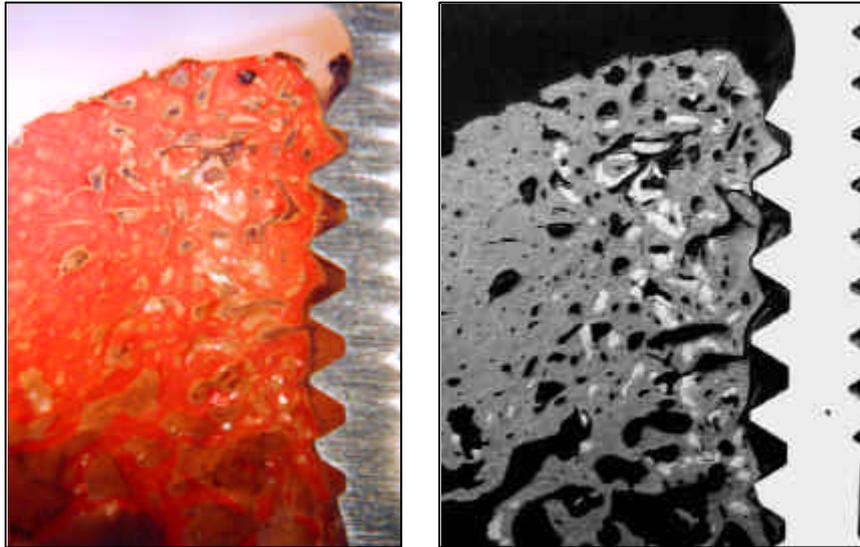
Resultado

FIGURA 46- Vidro bioativo. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado direito). Original 20X. Imagem correspondente de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons. Original 22X.



FIGURA 47- Vidro bioativo. Imagem anterior em maior aumento para observação de remanescentes do biomaterial implantado. Original 40X.

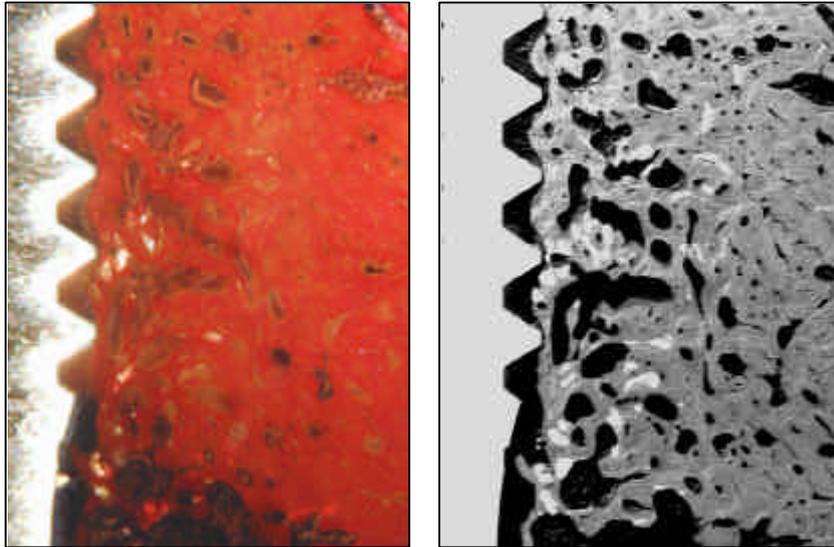
Resultado

FIGURA 48- Vidro bioativo. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado esquerdo). Original 20X. Imagem de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons correspondente. Original 22X.

É possível perceber que os remanescentes dos grânulos apresentam-se degradados e que houve a incorporação e substituição desses pelo tecido ósseo circundante. O osso neoformado na região peri-implantar é basicamente cortical. Nesse caso, houve a interposição de tecido conjuntivo, impedindo que o tecido ósseo chegasse até as roscas do implante dentário. Isto aconteceu provavelmente devido à deiscência de sutura ocorrida no cão durante o pós-operatório imediato da segunda fase cirúrgica.

5.4.2 Osso liofilizado desmineralizado

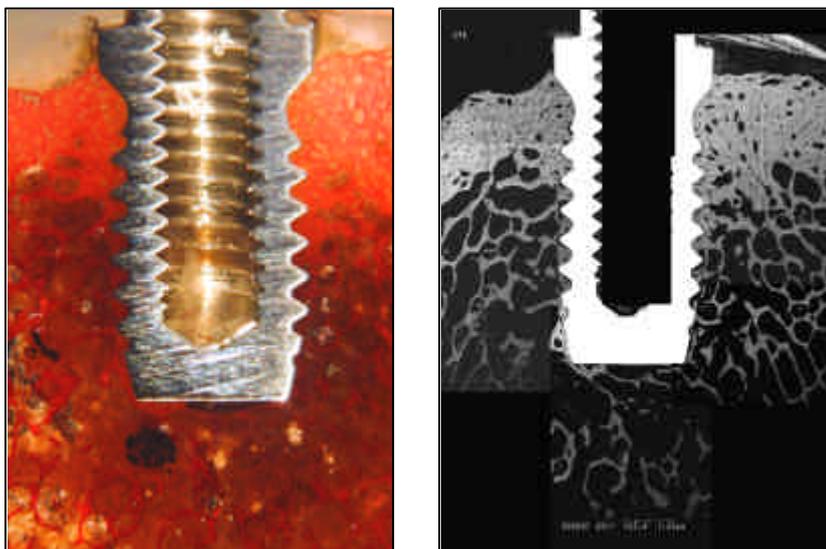


FIGURA 49- Osso liofilizado desmineralizado. Imagem de microscopia óptica (Original 10X) e eletrônica por retro-espalhamento de elétrons (original 25X).

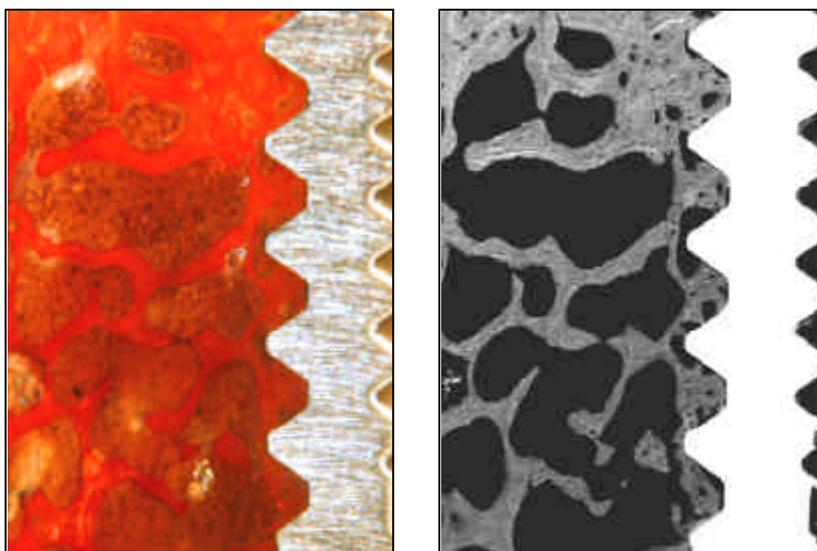


FIGURA 50- Osso liofilizado desmineralizado. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado direito). Original 20X. Imagem correspondente de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons. Original 22X.

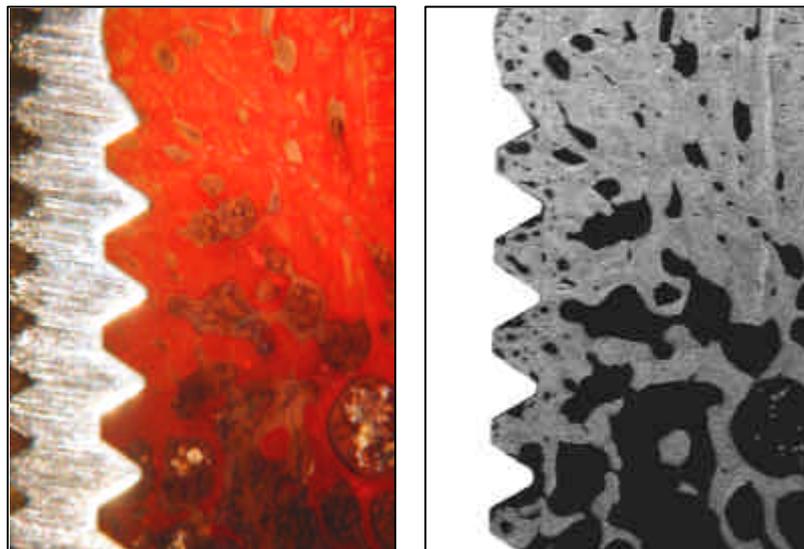


FIGURA 51- Osso liofilizado desmineralizado. Microscopia óptica do bloco mostrando a interface do implante de titânio com o tecido ósseo (lado esquerdo). Original 20X. Imagem correspondente de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons. Original 22X.

Na amostra de osso liofilizado desmineralizado em questão observa-se o contato do tecido ósseo com as roscas do implante na interface (Figuras 49 a 51). Não foi possível perceber a presença de remanescentes de osso liofilizado desmineralizado na microscopia eletrônica ou óptica. Provavelmente porque o biomaterial já havia sido totalmente absorvido ou incorporado ao osso neoformado.

5.5 Análise histométrica e estatística

Apesar do protocolo seguido para o preparo dos blocos para microscopia eletrônica ter sido o mesmo, não foi possível se obter um padrão de corte com o disco de diamante idêntico para todas as

Resultado
amostras. Por este motivo, a comparação entre grupos e até mesmo entre elementos do mesmo grupo ficou comprometida através de qualquer tipo de análise. Optou-se então pela análise histométrica através da comparação da porcentagem de neoformação óssea em cada amostra. Os valores obtidos estão representados no quadro (Quadro 6) e gráfico (Figura 52) a seguir.

ANIMAL	PORCENTAGEM DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA					
	LADO DIREITO			LADO ESQUERDO		
	BG	LH	C	BG	LH	C
2	42%	34%	30%	-	36%	30%
3	-	38%	43%	51%	50%	47%
4	46%	-	31%	47%	25%	-
5	63%	31%	-	54%	-	37%
6	53%	58%	40%	-	45%	51%

Quadro 6: Representação dos valores de porcentagem de neoformação óssea de cada amostra do grupo experimental.

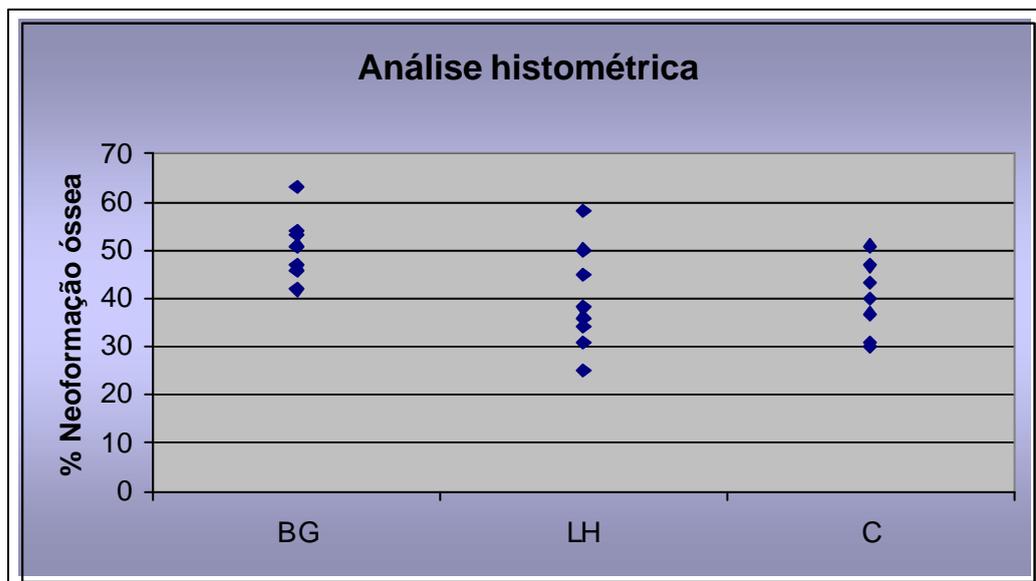


FIGURA 52- Porcentagem de neoformação óssea nos defeitos criados em húmero de cão e preenchidos pelos biomateriais e coágulo.

Resultado

A mesma prova “An analysis of variance test for normality” (Shapiro & Wilk, 1965) para a verificação da normalidade foi aplicada aos valores relativos à histometria obtidos com o coágulo, para verificação.

O resultado encontrado foi $w = 0,940$, sendo que, para $n = 14$ o valor crítico de w é $0,947$. O valor de w encontrado, sendo menor do que o valor crítico, indica que a distribuição é não-normal. Após a transformação logarítmica, a prova foi reaplicada e o resultado foi $w = 0,936$, indicando, ainda não-normalidade da distribuição.

Com interesse em se verificar a existência ou não de diferenças significantes entre os resultados obtidos com a histometria, aplicou-se o teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1975), aos valores relativos aos grupos tratados com vidro bioativo, osso liofilizado desmineralizado e coágulo, comparadas as séries de valores, duas a duas.

O nível de significância foi estabelecido em $0,05$, em uma prova bilateral. Os resultados estão demonstrados na tabela a seguir.

TABELA 2 – Probabilidades associadas aos valores de U, obtidas quando da aplicação do teste de Mann-Whitney aos valores relativos aos grupos tratados com Vidro bioativo, DFDBA e Coágulo, comparadas as séries de valores, duas a duas.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
Vidro bioativo x DFDBA	0,0011*
Vidro bioativo x Coágulo	0,0011*
DFDBA x Coágulo	0,6153

(*) $p < 0,05$

Resultado

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 2, foram encontradas diferenças significantes entre as medidas de histometria obtidas com o grupo do vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado e também, entre as medidas obtidas com o grupo do vidro bioativo e coágulo, sendo que os valores mais elevados foram os relativos ao grupo do vidro bioativo, nos dois casos.

6 Discussão

Carvalho et al. (2002a) acrescentando à sua experiência clínica considerações de Misch & Dietsch (1993) para os tratamentos de diferentes tipos de defeitos ósseos, propuseram que defeitos ósseos de 5 paredes são favoravelmente tratados apenas com a manutenção do coágulo na região, sem a necessidade de enxertos ou materiais substitutos ósseos. No entanto, acrescentaram que um biomaterial de preenchimento estaria indicado para o tratamento desse tipo de defeito ósseo com a finalidade de auxiliar na manutenção do volume e altura óssea (Misch & Dietsch, 1993; Carvalho et al., 2002a).

A idéia da utilização de biomateriais para o tratamento de defeitos ósseos é ampla e engloba não apenas a manutenção ou o ganho de volume ósseo, mas também a restauração funcional e estética, com implantes de titânio, de áreas previamente reparadas por substitutos ósseos. Surgiu então a proposta para a realização desse trabalho, cujos objetivos eram analisar e comparar a qualidade da neoformação óssea em áreas implantadas com vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado com áreas que não receberam substitutos ósseos.

O modelo experimental proposto foi o úmero de cão. Experimentos com biomateriais em cães (Schepers & Ducheyne, 1997; Caplanis et al., 1998; Kohal et al., 1998; Schepers et al., 1998; Hall et al., 1999; Von Arx et al., 2001) estão consagrados no meio científico, principalmente em estudos nos quais se necessita criar defeitos ósseos amplos. A razão para a escolha do úmero foi o tamanho, largura e espessura desse osso, uma vez que planejava-se a confecção de

Discussão

cavidades com 6mm de diâmetro e não se desejava correr o risco de fratura óssea. No entanto, um dos cães fraturou o úmero direito 21 dias após a cirurgia e foi eliminado do trabalho.

Durante a instalação dos implantes de titânio a atenção foi direcionada para que eles não mantivessem qualquer contato com o osso pré-existente na região. A única exceção foi para o grupo no qual o implante de titânio foi inserido diretamente sobre o osso pré-existente (controle positivo), sem a confecção prévia de cavidades. Preocupava-se com a possibilidade de obtenção de um valor falso no teste biomecânico dos implantes de titânio, caso houvesse o reparo nos grupos experimentais e de controle do coágulo, de parte do implante em contato com o osso pré-existente. Por este motivo, os guias cirúrgicos foram idealizados de forma a serem utilizados individualmente.

Sabe-se que o vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado apresentam boa resposta biológica quando implantados em cavidades óssea (Carvalho et al. 2002b; Shimizu et al., 1997; Cancian et al., 1999; Hall et al., 1999; Lindfors & Aho, 2000; Froum et al., 2002). As observações histológicas do presente trabalho após 5 meses de implantação destes biomateriais também ratificam o descrito na literatura em termos de biocompatibilidade.

Na análise histológica das amostras retiradas imediatamente antes da inserção do implante de titânio, verificou-se uma boa reparação em todos os grupos. Remanescentes dos biomateriais ainda estavam presentes em ambos grupos experimentais. No entanto, nas áreas de neoformação óssea mais intensa estes apresentavam-se em

Discussão

tamanho bem menor sugerindo que foram reabsorvidos ou incorporados pelo osso circundante.

Na avaliação microscópica do grupo do vidro bioativo, os grânulos apresentavam fissuras e cavitações e havia uma comunicação do meio interno com o externo. Na maioria deles, havia neoformação óssea em seu interior. Um aspecto curioso nesse grupo foi a observação, ao redor dos grânulos, de um tecido de aspecto fibroso denso e pouco celularizado, em íntimo contado com o material. Um trabalho, ainda não publicado*, indica que este tecido seja o próprio osso em uma fase mais imatura à reconhecida histologicamente. Existem evidências de uma quantidade aumentada de íons cálcio, principalmente, e fosfato em níveis semelhantes ao do osso, neste tecido em áreas próximas aos grânulos de vidro bioativo. Isso foi observado através de análise por dispersão de energia (EDX) e mapeamento elemental. No entanto ainda não se sabe explicar porque após 5 meses da implantação esse tecido não adquiriu o aspecto histológico convencional de tecido ósseo e apresenta-se de forma imatura. Muitos autores (Virolainen et al., 1997; Schepers & Ducheyne, 1997; Tadjoeidin et al., 2000; Norton & Wilson, 2002) observaram esse tecido em seus experimentos e o interpretaram e descreveram de diversas formas.

Virolainen et al. (1997) após a análise histológica aos 14 dias da implantação do vidro bioativo em tíbias de ratos descreveram-no como conjuntivo fibroblástico com aparência semelhante à do periósteo,

* MENDES, V. C., CARVALHO, P. S. P., DAVIES, J. E. Evaluation of the early rapid bone formation around bioactive glass particles – no prelo.

Discussão

orientado paralelo à superfície dos grânulos. Aos 28 dias verificaram a reposição desta estrutura por osso lamelar.

Schepers & Ducheyne (1997) implantaram o vidro bioativo e 2 diferentes tipos de hidroxiapatita em cavidades ósseas na mandíbula de cães. De forma semelhante a Virolainen et al. (1997) relataram, pela análise histológica após 1 mês de implantação, que as partículas do vidro bioativo estavam cercadas por um tecido fibroso que foi substituído por osso com o passar do tempo.

Tadjoedin et al. (2000) analisaram 72 biópsias de pacientes submetidos à levantamento bilateral de seio maxilar. Um lado era experimental, no qual o seio maxilar foi preenchido por osso autógeno de crista ilíaca particulado e vidro bioativo (1:1) e o outro lado o controle, com o preenchimento apenas por osso autógeno de crista ilíaca particulado. Os autores observaram que após 16 meses da cirurgia, a quantidade de tecido ósseo nos dois grupos era semelhante. Com o passar do tempo, o tecido ao redor dos grânulos inicialmente “fibroso e rico em células” foi substituído por tecido ósseo.

Norton & Wilson (2002) também mencionaram um tecido que denominaram “conjuntivo aderente”, intimamente relacionado à superfície de dois diferentes tipos de vidro bioativo, numa análise de microscopia óptica aos 6 meses após implantação dos biomateriais em alvéolos humanos. Relataram que aos 6 meses havia apenas este tecido, sem formação óssea aparente, mas verificaram deposição de tecido ósseo próximo à superfície dos biomateriais a partir do 7º mês de implantação.

Na avaliação microscópica do grupo do osso liofilizado desmineralizado, as partículas do implante foram identificadas pela

Discussão

ausência de osteócitos, assim como também descrito por Xiao et al. (1996). Em algumas amostras havia tecido conjuntivo circundando o biomaterial com características diferentes do observado no grupo do vidro bioativo. Era bastante celularizado e em um maior aumento verificava-se a abundante presença de fibroblastos ao redor dos grânulos. Nesse grupo também foi possível a visualização de células gigantes ao redor dos grânulos.

O teste biomecânico foi realizado para se verificar a qualidade do osso neoformado nos grupos controle, vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado por meio da aplicação de uma força de contra-torque sobre os implantes fixados 8 meses após a confecção das cavidades. O movimento de desrosqueamento foi interrompido logo após o rompimento da interface, pois desejava-se que ela fosse mantida o mais íntegra possível, para posterior análise da região. Pelos valores obtidos com esta análise, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. O grupo no qual os implantes de titânio foram inseridos em osso pré-existente apresentaram os maiores valores de contra-torque, como era de se esperar, seguido do vidro bioativo.

A explicação para os bons resultados e uma uniformidade entre os grupos estaria relacionada com a estabilidade primária e secundária adquiridas pelo implante no momento da inserção e reparação, respectivamente. Este resultado indica que a neoformação óssea dos grupos em que se utilizou o vidro bioativo, o osso liofilizado desmineralizado apresentou qualidade compatível com o grupo do coágulo e do osso pré-existente.

Discussão

Branemark et al. (1997), a partir da experiência com testes biomecânicos em implantes de titânio, mencionaram existir uma correlação entre os testes de torque e a porcentagem de contato ósseo na interface com o implante. Segundo os autores, o tecido ósseo localizado numa área até 50 μ m próxima ao implante pode influenciar nos valores do teste.

De acordo com o observado na literatura, Froum et al. (2002) relataram que as taxas de sucesso de implantes dentários colocados em áreas de osso reparado por biomateriais podem ser equivalentes às de implantes colocados em áreas de osso pré-existente. Isto corrobora o observado nesse trabalho através do teste biomecânico.

Pelos resultados encontrados em um trabalho experimental em defeitos ósseos de cães preenchidos por vidro bioativo e que posteriormente receberam implantes dentários de titânio, Schepers et al. (1998) concluíram que os grânulos de vidro bioativo propiciaram uma melhora na estabilidade primária dos implantes e também na secundária. Os autores acreditam que esses efeitos benéficos são resultantes das propriedades osteocondutoras e “osteoestimulatórias” dos grânulos de vidro bioativo com partículas de 300-355 μ m.

Segundo Boyde & Wolfe (2000) muitas técnicas foram utilizadas para a avaliação da interface osso-implante, uma vez que o entendimento da natureza desta interface, bem como da seqüência dos eventos de reparação que ocorrem nesta região após a colocação dos implantes, em curto e longo prazo, é fundamental para a análise do sucesso e do fracasso dos biomateriais utilizados durante a reabilitação do paciente.

Discussão

Dentre os métodos empregados para essa avaliação, como microscopia óptica e utilização de raios X e de elétrons, Boyde & Wolfe (2000) acreditam que a microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons seja o mais adequado pela sua precisão, pela possibilidade de investigar a área de interesse de forma bastante abrangente, e também por manter a interface intacta durante a fase de preparo laboratorial das peças a serem analisadas.

Na análise de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons no presente estudo verificou-se, no local do defeito ósseo criado, que os grânulos de vidro bioativo foram substituídos por tecido ósseo em grande parte ou ainda estão sendo absorvidos. No entanto, em áreas medulares isoladas, podia-se encontrar grânulos praticamente integros e aglomerados.

A mesma observação foi descrita por Schepers et al. (1998) num experimento semelhante com o vidro bioativo e implantes de titânio em mandíbulas de cães. Os autores acreditam que os grânulos permanecem praticamente intactos nestes locais por se tratarem de áreas com uma atividade limitada de remodelação óssea (Schepers et al. 1998).

Furusawa & Mizunuma (1997) e Furusawa et al. (1998) verificaram em 2 experimentos diferentes, um com humanos e o outro com ratos, que nos estágios mais precoces, partículas localizadas próximas às paredes dos defeitos apresentaram uma característica osteocondutora de formação óssea, iniciando na superfície dos grânulos e depois, espalhando-se para a matriz circundante. No entanto, nos grânulos localizados longe das paredes, ou seja, na região central do

Discussão

defeito, a neoformação óssea parecia iniciar no interior dos grânulos (Furusawa & Mizunuma, 1997; Furusawa et al., 1998). Os autores afirmaram que este processo “duplo” de formação óssea distingue o vidro bioativo dos outros biomateriais. A mesma característica de reparação foi observada no experimento de Schepers & Ducheyne (1997) após 2 meses da implantação do vidro bioativo em mandíbulas de cães.

Relatos na literatura (Xiao et al., 1996; Schepers & Ducheyne, 1997; Ong et al., 1998) consideram, para a reparação de cavidades ósseas implantadas com biomateriais particulados, que um fator importante para a neoformação óssea ideal seria a manutenção de um espaço adequado entre as partículas dos implantes. Isto permitiria a migração celular e a formação óssea. A utilização de partículas com tamanhos que variam em um pequeno intervalo, como por exemplo de 300-350µm para o vidro bioativo e 250µm para o osso liofilizado desmineralizado utilizados no presente trabalho, favorecem essa manutenção do espaço entre elas (Schepers & Ducheyne, 1997; Ong et al., 1998). Quando há um grande intervalo no tamanho das partículas, as de menor tamanho preenchem os espaços entre as maiores, dificultando o crescimento ósseo entre elas (Schepers & Ducheyne, 1997; Ong et al., 1998).

Para a análise histométrica, tentou-se contornar as diferenças anatômicas no próprio úmero alternando-se a distribuição das amostras nas cavidades. No entanto, os problemas encontrados para esta análise foram: a diferença anatômica e de reparação entre os animais e a falta de padronização no corte dos blocos durante o preparo para a

Discussão

análise por microscopia eletrônica, apesar da constante tentativa para que os blocos fossem cortados mantendo-se sempre o mesmo plano.

Outros fatores que contribuíram para a não padronização das amostras analisadas, além do posicionamento dos blocos em relação ao disco de diamante, foram o local de confecção das cavidades durante as cirurgias e a inclinação dos implantes de titânio nas mesmas, devido às diferenças anatômicas entre os animais.

A única forma encontrada para comparação entre os grupos foi através da porcentagem de neoformação óssea nos defeitos criados. O grupo controle positivo foi excluído desta análise por razões óbvias. Inicialmente delimitou-se a área do defeito ósseo e fez-se o cálculo da mesma. Depois, calculou-se a área ocupada pelo implante de titânio no defeito. Da subtração entre a área total do defeito e a área do implante, obteve-se a possível área para neoformação óssea. Calculou-se, então, a porcentagem de neoformação óssea nesta área.

A análise estatística dos resultados histométricos demonstrou uma diferença significativa no grupo do vidro bioativo em relação aos outros grupos. A explicação para isto seria a maior capacidade osteocondutora desse biomaterial em relação aos outros grupos, resultando em um aumento no volume de neoformação óssea.

Os resultados desse estudo não corroboram os encontrados por Hall et al. (1999), em defeitos ósseos peri-implantares em mandíbulas de cão. O osso liofilizado desmineralizado homogêneo foi comparado com 2 tipos de vidro bioativo (um com partículas entre 300-355 μ m e o outro, entre 90-710 μ m). O osso liofilizado desmineralizado apresentou os maiores valores histométricos em porcentagem de contato

Discussão

com o implante de titânio e de altura de neoformação óssea no defeito. Na mensuração da área total de neoformação óssea, o grupo do osso liofilizado desmineralizado apresentou não apenas a maior taxa, como seus valores foram estatisticamente significantes em relação ao vidro bioativo com partículas de 300-355µm.

A explicação para a discrepância entre os resultados descritos por Hall et al. (1999) e os encontrados nesse estudo poderia ser devido à utilização de um osso liofilizado desmineralizado com capacidade osteoindutiva por aqueles autores. Hall et al. (1999) também consideram esta possibilidade, apesar de não afirmarem que o material empregado por eles, especificamente, apresente esta propriedade.

Sabe-se que o osso liofilizado desmineralizado pode ou não apresentar propriedades osteoindutivas, de acordo com o seu processo de fabricação e as características do doador como a idade (Lohmann et al. 2001; Schwartz et al., 1996; Schwartz et al., 1998). O doador do osso liofilizado desmineralizado utilizado no presente estudo, segundo informações do fabricante (Ohio Valley Tissue & Skin Center, EUA), era branco, do gênero masculino, com 50 anos de idade. De acordo Schwartz et al. (1998) esse lote teria mínima ou nenhuma capacidade osteoindutiva, pela idade do paciente, o que foi comprovado posteriormente pela porcentagem neoformação óssea na análise dos resultados de microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons.

Num experimento com implante de vidro bioativo e osso liofilizado desmineralizado em alvéolos humanos, Froum et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo na análise histométrica após 6 a 8 meses de implantação. Após as exodontias, os

Discussão

alvéolos foram curetados e decorticados com uma broca esférica sob irrigação abundante. O grupo do vidro bioativo apresentou a maior taxa de neoformação óssea (59,5%), seguido do osso desmineralizado liofilizado (34,7%) e coágulo (32,4%).

No entanto, um aspecto importante considerado por Froum et al. (2002) é a dificuldade de comparação entre diferentes trabalhos de pesquisa e até mesmo de se chegar a uma conclusão proveniente desta comparação. Isso ocorre devido às inúmeras variáveis, dentre algumas, o tipo e tamanho do defeito ósseo, tipo de retalho utilizado, implantes ou membranas utilizados, tempo de reparação, fechamento do retalho e diferenças na resposta do indivíduo ou animal.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e pelo descrito na literatura, é válido indicar o vidro bioativo ou o osso liofilizado desmineralizado para o preenchimento de defeitos ósseos de 5 paredes e posterior reabilitação com implantes de titânio.

Sugere-se também a necessidade de realização de outros estudos para o entendimento das propriedades biológicas do vidro bioativo e seus mecanismos de ação endósseos.

7 Conclusão

Diante do exposto, foi possível concluir que:

- ❖ Os biomateriais implantados foram biocompatíveis e incorporados pelo organismo,

- ❖ A reparação óssea foi satisfatória nos defeitos criados em todos os grupos, indicando uma adequada qualidade óssea ao redor dos implantes dentários de titânio, como comprovado pelo teste biomecânico. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os valores de contra-torque nos 4 grupos experimentais.

- ❖ O vidro bioativo mostrou os melhores resultados na análise histométrica da neoformação óssea, realizada a partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica por retro-espalhamento de elétrons. Houve uma diferença estatisticamente maior desse material em relação ao osso liofilizado desmineralizado e ao coágulo,

8 Referências Bibliográficas

- AL RUHAIMI, K. A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.16, n.1, p.105-14, 2001.
- BAUER, T. W., MUSCHLER, G. F. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin. Orthop.*, v.371, p.10-27, 2000.
- BOYDE. A., WOLFE. L. A. Spatial and temporal patterns of bone growth around endosseous implants: a critical study of microscopic methods. In: DAVIES, J. E. *Bone engineering*. Toronto: Em Squared, 2000. cap.29. p.321-31.
- BRÅNEMARK, R., ÖHRNELL, L. O., NILSSON, P., THOMSEN, P. Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in vivo study in the rat. *Biomaterials*, v.18, n.14, p.969-78, 1997.
- BRINK, M. *Bioactive glasses with a large working range*. Finlândia, 1997. 48p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Åbo Akademi University.
- CANCIAN, D. C., VIEIRA, E. H., MARCANTONIO, R. A. C., MARCANTONIO JÚNIOR, E. Use of BioGran and Calcitite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, n.6, p.859-64, 1999.
- CAPLANIS, N., LEE, M. B., ZIMMERMAN, G. J., SELVIG, K. A., WIKESJÖ, U. M. Effect of allogenic freeze-dried demineralized bone matrix on guided tissue regeneration in dogs. *J. Periodontol.*, v.69, n.8, p.851-6, 1998.
- CARVALHO, P. S. P., LUPPINO, F., MENDES, V. C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à Implantodontia. In: BEZERRA, F. J. B., LENHARO, A. *Terapia clínica avançada em implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap.2, p.17-30.

Referências Bibliográficas

- CARVALHO, P. S. P., LENHARO, A., MENDES, V. C., BASSI, A. P. F., PONZONI, D. Análise histológica do Bio-Oss® e BioGran® em tibia de rato. *BCI – Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, v.9, n.34, p.117-23, 2002.
- CORDIOLI, G., MAZZOCCO, C., SCHEPERS, E., BRUGNOLO, E., MAJZOUB, Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement: clinical and histological findings. *Clin. Oral Implants Res.*, v.12, n.3, p.270-8, 2001.
- DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. *Int. J. Prosthodont.*, v.11, n.5, p.391-401, 1998.
- DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J. Dent. Educ.*, v.67, n.8, p.932-49, 2003.
- FROUM S., CHO, S. C., ROSENBERG, E., ROHRER, M., TARNOW, D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J. Periodontol.*, v.73, n.1, p.94-102, 2002.
- FURUSAWA, T., MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material. *Implant. Dent.*, v. 6, n. 2, p. 93-101, 1997.
- FURUSAWA, T., MIZUNUMA, K., YAMASHITA, S., TAKAHASHI, T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.13, n.5, p. 672-6, 1998.
- GAO, T. J., LINDHOLM, T. S., KOMMONEN, B., RAGNI, P., PARONZINI, A., LINDHOLM, T. C. Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. *Biomaterials*, v.16, n.15, p.1175-9, 1995.

Referências Bibliográficas

- GARG, A. K. Estrutura óssea, metabolismo e fisiologia: seu impacto na implantologia. *BCI*, v.5, n.3, p.69-80, 1998.
- GARG, A. K. Grafting materials in repair and restoration. In: LYNCH, S. E., GENCO, R. J., MARX, R. E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999. cap.5, p.83-101.
- GOLDMAN, H. M., KNDVATER, J., BROMAGE, T. G. Correlative light and backscattered electron microscopy of bone – Part I: Specimen preparation methods. *Scanning*. v.21, n.1, p.40-3, 1998.
- GOLDMAN, H. M. *Histocomposition and geometry at the human mid-shaft femur*. Nova Iorque, 2001. 362p. Tese (Doutorado em Antropologia) – Graduate Faculty in Anthropology, The City University of New York.
- GORUSTOVICH, A, ROSENBUSCH, M., GUGLIELMOTTI, M.G. Characterization of bone around titanium implants and bioactive glass particles: an experimental study in rats. *Int. J. Oral and Maxillofac. Implants*, v.17, n.5, p.644-50, 2002.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. O osso e suas relações com o cálcio e os fosfatos extracelulares. In: _____. *Tratado de fisiologia médica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.79, p. 898-900.
- HAAS, R., HAIDVOGL, D., DONATH, K., WATZEK, G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I: Histological findings. *Clin. Oral Implants Res.*, v.13, n.4, p.396-404, 2002.
- HAAS, R., HAIDVOGL, D., DÖRTBUDAK, O., MAILATH, G. Freeze-dried bone for maxillary sinus augmentation in sheep. Part II: biomechanical findings. *Clin. Oral Implants Res.*, v.13, n.6, p.581-6, 2002.

Referências Bibliográficas

- HALL, E. E., MEFFERT, R. M., HERMANN, J. S., MELLONIG, J. T., COCHRAN, D. L. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J. Periodontol.*, v.70, n.5, p.526-35, 1999.
- HARDIN, C. K. Banked bone. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, v.27, n.5, p.911-25, 1994.
- HENCH, L. L., POLAK, J. M. Third generation biomedical materials. *Science*, v.295, n.5557, p.1014-7, 2002.
- HENCH, L. L., WILSON, J. Surface-active biomaterials. *Science*, v.226, n.4675, p.630-6, 1984.
- HENCH, L. L., SPLINTER, R. J., ALLEN, W. C., GREENLEE, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* v.2, p.117-41, 1971. Apud BRINK, M. *Bioactive glasses with a large working range*. Finlândia, 1997. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Åbo Akademi University.
- HOLLINGER, J. O., BUCK, D. C., BRUDER, S. P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: LYNCH, S. E., GENCO, R. J., MARX, R. E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999. cap.2, p.17-53.
- JONES, J. R., SEPULVEDA, P., HENCH, L. L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.58, n.6, p.720-6, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. *Histologia básica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. cap.5, p.108-26.

Referências Bibliográficas

- KOHAL, R. J., MELLAS, P., HÜRZELER, M. B., TREJO, P. M., MORRISON, E., CAFFESSE, R. G. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets: an experimental study in dogs. *J. Periodontol.*, v.69, n.8, p.927-37, 1998.
- LAI, W., GARINO, J., DUCHEYNE, P. Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone. *Biomaterials*, v.23, n.1, p.213-7, 2002.
- LINDFORS, N.C., AHO, A. J. Tissue response to bioactive glass and autogenous bone in the rabbit spine. *Eur. Spine J.*, v.9, n.1, p.30-5, 2000.
- LOHMANN, C. H., ANDREACCHIO, D., KOSTER, G., CARNES JUNIOR, D. L., COCHRAN, D. L., DEAN, D. D. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v.121, n.10, p.583-90, 2001.
- LOVELACE, T. B., MELLONIG, J. T., MEFFERT, R. M., JONES, A. A., NUMMIKOSKI, P. V., COCHRAN, D. L. Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J. Periodontol.*, v.69, n.9, p.1027-35, 1998.
- LUDWIG, S. C., KOWALSKI, J. M., BODEN, S. D. Osteoinductive bone graft substitutes. *Eur. Spine J.*, v.9, supl.1, p.119-25, 2000.
- MELLONIG, J. T. Freeze-dried bone allografts in Periodontics. In: LYNCH, S. E., GENCO, R. J., MARX, R. E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999. cap.16, p.259-68.
- MELLONIG, J. T., PREWETT, A. B., MOYER, M. P. HIV inactivation in a bone allograft. *J. Periodontol.*, v.63, n.12, p.979-83, 1992.
- MISCH, C. E., DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.*, v.2, n.3, p.158-67, 1993.

Referências Bibliográficas

- NORTON, M. R., WILSON, J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.17, n.2, p. 249-57, 2002.
- ONG, M. M., EBER, R. M., KORSNES, M. I., MACNEIL, R. L., GLICKMAN, G. N., SHYR, Y., WANG, H. L. Evaluation of a bioactive glass alloplast in treating periodontal intrabony defects. *J. Periodontol.*, v.69, n.12, p.1346-54, 1998.
- OONISHI H., KUSHITANI, S., YASUKAWA, E., IWAKI, H., HENCH, L. L., WILSON, J., TSUJI, E., SUGIHARA, T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin. Orthop.*, v.334, p.316-25, 1997.
- ORTHOVITA & IMPLANT INNOVATIONS, Inc. *BioGran[®] Material sintético reabsorbible para relleno oseo*. Florida: Implant Innovations, 1998.
- PAUL, B. F., HORNING, G. M., HELLSTEIN, J. W., SCHAFER, D. R. The osteoinductive potential of demineralized freeze-dried bone allograft in human non-orthotopic sites: a pilot study. *J. Periodontol.*, v.72, n.8, p.1064-8, 2001.
- PIATTELLI, A., SCARANO, A., CORIGLIANO, M., PIATTELLI, M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials*, v.17, n.11, p.1127-31, 1996.
- RADIN, S., DUCHEYNE, P., FALAIZE, S., HAMMOND, A. In vitro transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.49, n.2, p.264-72, 2000.
- RADIN, S., DUCHEYNE, P., ROTHMAN, B., CONTI, A. The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.37, n.3, p.363-75, 1997.

Referências Bibliográficas

- SCHEPERS, E. J., DUCHEYNE, P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J. Oral Rehabil.*, v.24, n.3, p.171-81, 1997.
- SCHEPERS, E., BARBIER, L., DUCHEYNE, P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.13, n.5, p.655-65, 1998.
- SCHEPERS, E., DE CLERCQ, M., DUCHEYNE, P., KEMPENEERS, R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J. Oral Rehabil.*, v.18, n.5, p.439-52, 1991.
- SCHMITT, J. M., BUCK, D. C., JOH, S. P., LYNCH, S. E., HOLLINGER, J. O. Comparison of porous bone mineral in biologically active glass in critical-sized defects. *J. Periodontol.*, v.68, n.11, p.1043-53, 1997.
- SCHWARTZ, Z., MELLONIG, J. T., CARNES JUNIOR, D. L., DE LA FONTAINE, J., COCHRAN, D. L., DEAN, D. D., BOYAN, B. D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J. Periodontol.*, v.67, n.9, p.918-26, 1996.
- SCHWARTZ, Z., SOMERS, A., MELLONIG, J. T., CARNES JR., D. L., DEAN, D. D., COCHRAN, D. L., BOYAN, B. D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J. Periodontol.*, v.69, n.4, p.470-8, 1998.
- SHAPIRO, S. S., WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, v.52, p.3-4, 1965.
- SHAPOFF, C. A., ALEXANDER, D. C., CLARK, A. E. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, v.18, n.4, p.352-63, 1997.

Referências Bibliográficas

- SHIMIZU, Y.; SUGAWARA, H.; FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K.; INADA, K.; YAMASHITA, S. Bone remodeling with resorbable bioactive glass and hydroxyapatite. *Implant. Dent.*, v.6, n.4, p.269-74, 1997.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica*, para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.
- SPECTOR, M. Basic principles of tissue engineering. In: LYNCH, S. E., GENCO, R. J., MARX, R. E. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999. cap.1, p.3-16.
- TADJOEDIN, E. S., DE LANGE, G. L., HOLZMANN, P. J., KULPER, L., BURGER, E. H. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin. Oral Implant Res.*, v.11, n.4, p.334-44, 2000.
- TEN CATE, A. R. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 395p.
- VIROLAINEN, P., HEIKKILÄ, J., YLI-URPO, A., VUORIO, E., ARO, H. T. Histomorphometric and molecular biologic comparison of bioactive glass granules and autogenous bone grafts in augmentation of bone defect healing. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.35, n.1, p.9-17, 1997.
- VON ARX, T., COCHRAN, D. L., HERMANN, J., S., SCHENK, R. K., BUSER, D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application: a histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin. Oral Implants Res.*, v.12, n.3, p.260-9, 2001.
- WOZNEY, J. M., ROSEN, V., CELESTE, A. J., MITSOCK, L. M., WHITTERS, M. J., KRIZ, R. W., HEWICK, R. M., WANG, E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, v.242, n.4885, p.1528-34, 1988.

Referências Bibliográficas

- XIAO, Y., PARRY, D. A., LI, H., ARNOLD, R., JACKSON, W. J., BARTOLD, P. M.
Expression of extracellular matrix macromolecules around demineralized
freeze-dried bone allografts. *J. Periodontol.*, v.67, n.11, p.1233-44, 1996.
- XYNOS, I. D., EDGAR, A. J., BUTTERY, L. D., HENCH L. L., POLAK, J. M. Ionic
products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human
osteoblast and induce insulin-like growth facto II mRNA expression and
protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.276, n.2, p.461-5,
2000.

MENDES, V. C. *Evaluation of bone repair in cavities filled in by bioactive glass or DFDBA: biomechanical, microscopic and histometric analysis in dogs*. Araçatuba, 2004, 139p. Tese (Doutorado em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

The objectives of the present study were to analyze and compare, in dogs, the bone healing in large areas grafted with bioactive glass and DFDBA to areas without any grafting, before and after the insertion of titanium dental implants.

Cavities (6mm diameter) were drilled in both humeri of 6 healthy male dogs. The cavities were filled in with bioactive glass, DFDBA and clot. After 5 months, bone was removed from the centre of the cavities and processed for light microscopy analysis. Titanium dental implants were placed in these sites and in areas not previously drilled. Three months later, a biomechanical test was performed and the force necessary to unscrew the titanium implants was measured. Dogs were sacrificed and the bone removed. After embedding in PMMA, calcified samples were cut in half and polished for back-scattering SEM analysis.

No statistically significant differences were observed among the 4 groups concerning the biomechanical test, according to the test U of Mann-Whitney. Light microscopy analysis showed the presence of both biomaterials among the regenerated bone. In the back-scattering analysis, regenerated bone was seen in all groups, and DFDBA presented the least volume. Remnants of granules of bioactive glass were still

present, but in a smaller size. Because granules of DFDBA have the same image density of bone, if present, they couldn't be identified. According to the test U of Mann-Whitney, the amount of bone formation in the bioactive glass group was statistically higher compared to the other groups.

Based on the findings of this study, it was concluded that the bioactive glass showed best results in terms of bone volume. However, a satisfactory regeneration of bone in large defects with adequate bone quality was observed around dental implants in all groups.

Keywords: endosseous dental implant, biocompatible materials