



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Avaliação da interface osso/implante
após o uso do copolímero de PLA/PGA associado a
osso autógeno em coelhos.
Estudo biomecânico e imunohistoquímico**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba – UNESP”, como parte do programa para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial)

Araçatuba – SP

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Avaliação da interface osso/implante
após o uso do copolímero de PLA/PGA associado a
osso autógeno em coelhos.**

Estudo biomecânico e imunohistoquímico

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba – UNESP”, como parte do programa para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

Orientada:

Liliane Scheidegger da Silva Zanetti

Orientador:

Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba – SP

2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Z28a

Zanetti, Liliane Scheidegger da Silva

Avaliação da interface osso/implante após o uso do copolímero de PLA/PGA associado a osso autógeno em coelhos :
Estudo biomecânico e imuno- histoquímico
/Liliane Scheidegger da Silva Zanetti. - Araçatuba :
[s.n.], 2008

83 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Implante dentário osseointegrado 2. Enxerto ósseo 3. Ácido poliglicólico.

Black D7
CDD 617.64

DADOS CURRICULARES

LILIANE SCHEIDEGGER DA SILVA ZANETTI

Nascimento: 05/03/74 - Vitória – ES

Filiação: Ivonete Scheidegger da Silva
Joel Henrique da Silva

1993/1997: **Graduação:**
Curso de Odontologia da
Universidade do Federal do Espírito
Santo- UFES

1999/2001: **Pós-graduação:**
Mestrado em Clínica Odontológica
Área de Concentração em Cirurgia -
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba – Unicamp/SP.

2005/2008: **Pós-graduação:**
Doutorado em Odontologia- Área de
Concentração em Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial –
Faculdade de Odontologia de
Araçatuba – Unesp/SP.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS QUERIDOS **JOEL, IVONETE E GLAUCO** PELO AMOR

DEDICADO SEMPRE.

AGRADECIMENTO ESSENCIAL

A DEUS AUTOR E CONSUMADOR DA MINHA FÉ.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR**, meu orientador, pelos ensinamentos prestados, pela sua paciência, tranquilidade e liderança com que rege todo este sistema de ensino e atenção à saúde, com tanto entusiasmo, excelência e dedicação. Seu exemplo de profissionalismo é, sem dúvida para nós, modelo singular.

A **Profa. Dra. IVETTE BECCALI**, responsável pela minha formação básica na Cirurgia na UFES e minha iniciação na docência. Seu exemplo de vida e profissionalismo me incentivou a seguir o caminho da área de Cirurgia BMF. Agradeço imensamente pela confiança que sempre me dedicou, pelo seu exemplo de vida e acima de tudo pela fiel amizade.

Ao **Prof. Dr. JOSÉ RENATO COSTA**, por me acompanhar desde a minha iniciação na Cirurgia na UFES, pelos ensinamentos e incentivo. Meus sinceros agradecimentos pelo apoio na realização do Mestrado e incentivo a completar minha formação docente.

Aos Professores da Área de Cirurgia e Traumatologia BMF da F. O. de Piracicaba/Unicamp, **Prof. Dr. MÁRCIO DE MORAES**, **Prof. Dr. ROGER WILLIAM FERNANDES MOREIRA**, **Prof. Dr. RENATO MAZZONETTO**, **Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PASSERI** e **Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA**, responsáveis pela minha formação no Mestrado. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos que fundamentaram minha formação clínica e docente.

Ao **Prof. Dr. RICARDO LUIZ CARVALHO GOTTARDI** agradeço pela confiança depositada em mim na disciplina de Cirurgia BMF II da UFES, sempre

com igualdade e respeito profissional, agradeço pelo apoio e incentivo dado na realização do doutorado.

À **Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO**, agradeço pela orientação e participação direta nas fases da realização deste trabalho, pela competência e paciência nos seus ensinamentos e extrema delicadeza e humanidade prestados aos alunos da pós-graduação da FOA-Unesp.

Ao **Prof. Dr. OSWALDO MAGRO FILHO** pelos ensinamentos e dedicação permitindo sempre um convívio agradável nas atividades do curso, estreitando os laços de proximidade com os alunos da pós-graduação.

Aos colegas da Pós-graduação: **JÉSSICA GULNELI, LEANDRO DE CARVALHO CARDOSO, MARCELO KAIATT, PAULO DOMINGOS, FLÁVIA PEREIRA, MARCOS HEDY e ALBANIR BORRASCA**, pela convivência agradável durante o período que estive em Araçatuba. Agradeço pelo apoio em diversos momentos que precisei.

Em especial aos amigos **FRANCISLEY SOUZA e THALLITA QUEIROZ**, agradeço pelo profundo respeito, profissionalismo e dedicação demonstrados na realização dos experimentos, tendo sido fundamentais e verdadeiros companheiros em todos os momentos.

À **THAÍS RODRIGUES**, por ter me acolhido em sua casa, tendo convivido de maneira cordial e alegre sempre. Agradeço pela confiança e hospitalidade que sempre demonstrou.

À amiga **CAMILA BENEZ RICIERI**, agradeço por permitir uma amizade que a distância não apagará, tenho certeza será duradoura. Agradeço pelos momentos alegres, e desejo que tenhamos muitos outros.

A **ESFA-Santa Tereza/ES** pela compreensão e confiança durante os períodos de minha ausência, pela cordialidade e respeito demonstrados pelos diretores, coordenadores, professores e funcionários. Em especial ao **Prof. Dr.**

CARLOS ROBERTO ROLDI agradeço pela confiança e por todo apoio dado sempre. Tenho orgulho em fazer parte desta instituição!

Aos colegas Professores **Dr. ANDRÉ ALBERTO CÂMARA PUPPIN**, **Dr. AGUIMAR BOURGUIGNON**, **Dr. CARLOS TIMÓTEO** e **Dr. FABIANO GIESEN** minha gratidão pelo respeito e profissionalismo, e por tomarem agradáveis o ambiente de trabalho.

Aos meus queridos amigos e colegas: **BRUNO CARVALHO**, **PATRÍCIA BIANCHI**, **LIJANA P. BARROS**, **CAROLINA B. CARVALHO**, **GABRIELA DUARTE** e **RENATO MARANO**, agradeço o convívio agradável, amizade e tempo dedicados, tendo sido fundamentais no cumprimento de mais essa etapa profissional.

A amiga do coração **DIANA ARANTES SAD RAMALHO**, pela amizade sincera em todas as circunstâncias e pelos momentos alegres vividos. Meu desejo é tê-la sempre perto.

A grande amiga **MARTHA SALIM** pela lealdade e companheirismo, sem a qual chegar até aqui não teria sido possível, estando sempre disposta a ajudar. Minha retribuição sempre será o meu maior agradecimento.

Ao **Prof. Dr. ÉLCIO MARCANTÔNIO JÚNIOR** agradeço a disponibilidade em permitir a utilização do Laboratório EXAKT® da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp, e ao **RAFAEL FAEDA** pelo tempo dispensado.

À **CONEXÃO® SISTEMAS DE PRÓTESES**, pela disponibilidade em colaborar com este trabalho cedendo os implantes e chaves utilizadas na fase experimental, contribuindo na formação de profissionais e para o avanço nas pesquisas nacionais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **GLAUCO**, meu sincero e profundo agradecimento pelo amor, paciência, serenidade, confiança e apoio prestados em todos os momentos. Obrigada por insistir em fazer parte da minha vida, e por permitir estar ao seu lado sempre. Agradeço por ter permitido a realização de um sonho!!!

Aos meus queridos e amados pais **JOEL** e **IVONETE**, por me apoiarem em todos os momentos, mesmo tendo que estar distante por tantas vezes. Obrigada pelos ensinamentos fundamentados numa vida cristã. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los presentes em minha vida!

Aos meus amados irmãos **LARISSA**, **FLIPE** e **ANDRÉ**, pelo amor e carinho de sempre, pelo enorme prazer da convivência em família e por fazerem existir **VITOR** e **HENRIQUE**, nossas maiores alegrias. Obrigada por existirem em minha vida.

Aos queridos e amados tios **MARLI** e **NEVALDO SCHEDEGGER**, pela dedicação e carinho prestados no dia a dia. Agradeço pela convivência, paciência e por servirem de exemplo de família e vida espiritual.

Aos meus cunhados amados: **AGNES**, **ADRIANA**, **ALINE**, **CRISTIANE**, **ELIANE**, **ALDARI**, **CLETO**, **CLEBER** e **VLADIMIR**, pela alegria e convivência fraternal. Obrigada por me acolherem como família, vocês são muito especiais.

EPÍGRAFE

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do universo se manifesta um espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	6
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
Referências bibliográficas	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. PROPOSIÇÃO	22
3. MATERIAL E MÉTODO	23
3.1 Copolímero PLA/PGA	24
3.2 Procedimento Cirúrgico	24
3.3 Eutanásia e preparo das amostras para análise microscópica	26
3.3.1 Imunohistoquímica	26
3.3.1.1 Histologia	28
3.4 Preparo da amostra para análise biomecânica	29
4. RESULTADOS	31

4.1 Análise Macroscópica	31
4.2 Análise Biomecânica	31
4.2.1 Análise Morfométrica por MEV	32
4.3 Análise Imunohistoquímica	32
4.3.1 Análise Histológica qualitativa	34
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO 1: NORMAS DE PUBLICAÇÃO	48
ANEXO 2: TABELAS, GRAFICOS E ILUSTRAÇÕES	53
ANEXO 3: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	71

RESUMO

ZANETTI, LSS. Avaliação da interface osso/implante após o uso do copolímero de PLA/PGA associado a osso autógeno em coelhos. Estudo biomecânico e imunohistoquímico [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2008.

(1) Proposição: Este estudo avaliou o uso do copolímero de ácido poliláctico e poliglicólico (PLA/PGA) associado ao osso autógeno raspado, no reparo ósseo ocorrido ao redor de implantes inseridos em leitões sobrefresados, em tíbias de coelhos. (2) Material e métodos: Foram incluídos no estudo 20 coelhos e inseridos 40 implantes, divididos em dois grupos: Controle (C) e PLA/PGA adicionado a osso autógeno (G). Após fresagem controlada para simular a perda da estabilidade primária, cada implante foi inserido no leito preparado, tendo sido adicionado a sua superfície o copolímero PLA/PGA associado a osso autógeno raspado obtido manualmente. O grupo controle consistiu do implante com o espaço do leito preenchido por coágulo sanguíneo. Os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 40 e 60 dias pós-operatórios, e foram realizadas as análises biomecânica e Imunoistoquímica. As tíbias onde estavam inseridos os implantes foram removidas, descalcificadas, crioprotetidas e obtidos cortes que foram submetidos à reação

imunoistoquímica mediante a utilização de anticorpos primários para RANK L, OPG e OC. No período de 60 dias pós-operatórios a análise biomecânica de torque-reverso foi realizada antes da descalcificação. (3) Resultados: Os resultados obtidos demonstraram que o copolímero PLA/PGA misturado ao osso autógeno apresentou-se biocompatível, bioabsorvível e permitiu a neoformação óssea em contato com o implante, revelada pela análise da expressão das proteínas que regulam o ganho e a perda de massa óssea. E, houve predominância significativa de deposição óssea e estabilidade revelada pela análise de torque-reverso ($\alpha = 0,05$). (4) Conclusões: O copolímero de PLA/PGA pode ser utilizado no preenchimento de defeitos sobrefresados ao redor de implantes em tíbias de coelhos quando adicionado ao osso autógeno raspado, pois apresenta características de biocompatibilidade e biodegradação, sendo totalmente reabsorvido e substituído por osso, permitindo a formação de osso de qualidade na interface osso/implante.

Palavras-chave: implante dentário osseointegrado, enxerto ósseo, ácido poliglicólico.

ABSTRACT

ZANETTI, LSS. Evaluation of the bone/implant interface after use of the polylactic and polyglycolic acid copolymer (PLA/PGA) associated to the bone harvest in rabbits. Biomechanical and imunohistochemistry study. [Thesis]. Araçatuba: São Paulo State University; 2008.

(1) Purpose: This study evaluated the polylactic and polyglycolic acid copolymer (PLA/PGA) with scraped bone harvest in the bone repair occurrence of implants placed in large stream beds, in rabbit tibia. (2) Materials and Methods: Twenty rabbits had been enclosed in the study and 40 implants, in two groups: Control (C), PLA/PGA with the autologous bone scraped (G). After controlled drilled to simulate the loss of the primary stability, each implant was placed in the prepared stream bed, having been added to its surface the PLA/PGA copolymer with autologous bone scraped manually (G). The control group consisted of the implant placed in the space filled by blood. The animals had been sacrificed in the periods 15, 40 and 60 postoperative days, where the analyses had been carried through biomechanics and imunohistochemistry. The tibias where the implants were inserted had been removed, decalcified, frozen and getting cuts that had been submitted the imunoistochemistry reaction by means of the use of primary antibodies for RANK L, OPG and OC. In the 60 days

period postoperative the against-torque biomechanics was carried through before the decalcified. (3) Results: The gotten results had disclosed that the copolymer PLA/PGA with bone graft showed biocompatibility, bioabsorption and allowed bone growing in contact with the implant, disclosed by expression of the proteins that regulate the profit and mass bone loss. And, had significant predominance of bone deposition and stability disclosed by against-torque ($\alpha = 0,05$). (4) Conclusions: The PLA/PGA copolymer can be used filling defects drilled around implants in tibia of rabbits, when added bone harvest scraped, therefore it presents characteristics like biocompatibility and biodegradation, being totally resorpted and substituted by bone, allowing the bone formation with quality in the interface bone/implant.

Key-words: osseointegrated dental implant, bone graft, polyglycolic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS = Azul de Stevenel

C = Grupo controle

CEEA = Comissão de Ética em Experimentação Animal

DAB = Diaminobenzidina

EDTA = Ácido etileno-diamino-tetracético

G = Grupo tratado

GMC = Programa para análise estatística

HA = Hidroxiapatita

HE = Hematoxilina e eosina

Kg = Kilogramas

mm = milímetros

mL = mililitros

MEV = Microscopia eletrônica de varredura

MMA = Metil metacrilato

OC = Osteocalcina

OPG = Osteoprotegerina

PBS = Tampão fosfato de sódio

PGA = Ácido Poliglicólico

PLA = Ácido Polilático

PLA/PGA = Copolímero de ácido polilático e poliglicólico

PMMAL = Polimetil–metacrilato lento

PVP-I = Polivinil pirrolidona iodo

RANKL = Receptor Ativador Nuclear Kappa-B Ligante

VA = Vermelho de Alizarina

VA/AS = Vermelho de Alizarina e Azul de Stevenel

µm = Micrometros

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anti-sepsia.

Figura 2: Incisão.

Figura 3: Retalho cirúrgico descolado.

Figura 4: Fresagem do leito receptor.

Figura 5: Leito receptor.

Figura 6: Coleta de osso raspado (G).

Figura 7: Polímero PLA/PGA adicionado à superfície do implante (G).

Figura 8: Implante instalado após adição do polímero misturado ao osso autógeno raspado (G).

Figura 9: Implante após 60 dias de instalação (G).

Figura 10: Preparo do tecido ósseo para encaixe de chave para torquímetro manual (G).

Figura 11: Remoção do implante por torque reverso (G).

Figura 12: Negativo da área onde foi instalado o implante após sua remoção (G).

Figura 13: Soro de burro para o processamento imunohistoquímico.

Figura 14: Soro Dunkey

Figura 15: Coloração das lâminas por DAB.

Figura 16: Álcoois e corantes para coloração HE.

Figura 17: Bloco ósseo (tíbia) contendo o implante incluído em resina Metil Metacrilato.

Figura 18: Desgaste da peça incluída em resina em aparelho abrasivo Exakt®.

Figura 19: Adesão do corpo de prova na lâmina no aparelho do Sistema Exakt®.

Figura 20: Corte da peça em aparelho do Sistema Exakt®.

Figura 21: Corantes VA/AS utilizados na coloração das lâminas cortadas pelo Sistema Exakt®.

Figura 22: Microscópio acoplado ao computador onde foram capturadas as imagens de todas as lâminas obtidas das amostras.

Figura 23: Tecido ósseo neoformado celularizado acompanhando toda a interface. HE, 40X, 40 dias (G).

Figura 24: Nota-se a presença de tecido ósseo em neoformação, além de restos do biomaterial (PLA/PGA) visualizado no canto superior direito da lâmina. HE, 400X, 15 dias (G).

Figura 25: Aspecto da interface no grupo controle apresentando-se com tecido ósseo apenas na cortical superior e tecido conjuntivo adjacente à interface. HE, 40X, 15 dias (C).

Figura 26: Aspecto da interface no grupo controle. Tecido ósseo apenas na cortical inferior e tecido imaturo preenchendo a interface. HE, 40X, 15 dias (C).

Figura 27: Tecido ósseo neoformado na interface óssea. HE, original 100X, 40 dias (G).

Figura 28: Tecido ósseo neoformado e tecido imaturo (conjuntivo) entre a interface e o osso. HE, 40X, 40 dias (C).

Figura 29: Camada de tecido ósseo na interface próxima a cortical superior no grupo controle. HE, 40X, 40 dias (C).

Figura 30: Tecido ósseo na região ocupada pelo pico e vale do implante no grupo tratado. Nota-se as áreas de osso compacto acompanhando a interface e ausência do biomaterial. HE, original 400X, 60 dias (G).

Figura 31: Tecido ósseo neoformado, celularizado, corado pelo VA, em contato com a superfície do implante na área da cortical superior. VA/AS, 400X, 60 dias (G).

Figura 32: Tecido ósseo neoformado, celularizado, corado pelo VA, em contato com a superfície do implante na área das espiras do implante. VA/AS, 100X, 60 dias (G).

Figura 33: Tecido ósseo em neoformação celularizado, corado pelo VA e áreas de tecido conjuntivo coradas pelo AS em contato com a superfície do implante. VA/AS, 400X, 60 dias Grupo Controle (C).

Figura 34: Tecido ósseo corado pelo VA contendo inúmeros osteócitos. VA/AS, 400X, 60 dias Grupo Controle (C).

Figura 35: Quadro contendo as imagens das lâminas do grupo tratado (G) para análise qualitativa das imunomarcações.

Figura 36: Quadro contendo as imagens das lâminas do grupo controle

(C) para análise qualitativa das imunomarcações.

Figura 37: MEV. Grupo controle (C). Período 60 dias. Observa-se algumas áreas contendo osso aderido à superfície do implante. (originais de 56X).

Figura 38: MEV. Grupo controle (C). Período 60 dias. Observa-se a presença de algum tecido ósseo aderido à superfície do implante. (originais de 200X).

Figura 39: MEV. Grupo tratado (G2). Período 60 dias. Observa-se a presença de osso em contato em toda a superfície do implante. (originais de 56X).

Figura 40: MEV. Grupo tratado (G2). Período 60 dias. Numa vista mais aproximada observa-se a presença de tecido ósseo em íntimo contato com as espiras do implante. (originais de 500X).

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Dados dos valores obtidos na análise de torque-reverso nos grupos controle (C) e tratado (G) no período de 60 dias.

Tabela 2: Teste estatístico paramétrico utilizando amostras independentes para análise de torque-reverso nos grupos controle (C) e tratado (G).

Tabela 3: Análise semi-quantitativa. Médias percentuais das imunomarcações obtidas nas diferentes regiões nos períodos de 15 e 40 dias nos grupos C e G.

Gráfico 1: Média das amostras de torque reverso dos grupos C e G no período de 60 dias ($\alpha = 0,05$).

Gráfico 2: Somas percentuais dos valores das imunomarcações das regiões analisadas no grupo controle (C). Período de 15 e 40 dias.

Gráfico 3: Somas percentuais dos valores das imunomarcações das regiões analisadas no grupo tratado (G). Período de 15 e 40 dias.

Gráfico 4: Somas percentuais dos valores obtidos das imunomarcações nas diferentes regiões analisadas nos períodos de 15 e 40 dias.

INTRODUÇÃO GERAL

A previsibilidade dos resultados encontrados nos estudos relacionados à osseointegração desde as pesquisas iniciadas na década de 60, tem permitido o desenvolvimento de novas técnicas que visam o aperfeiçoamento da reabilitação com implantes osseointegrados ¹. Resultados positivos em relação a esses estudos como índices de sucesso superiores a 90% sendo utilizados na reabilitação com implantes levaram a obtenção do conceito definido como osseointegração, a conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo normal viável e o implante em função ². Microscopicamente a osseointegração representa o contato direto entre o tecido ósseo e a superfície do implante, sem interposição de tecido mole. Achados de microscopia eletrônica revelaram que existe uma fina camada de fibras colágenas organizadas entre o tecido ósseo e a superfície de titânio ^{3, 4}. Os conceitos atuais revelam que a osseointegração vai existir quando ocorrer fixação do implante de forma que ele permaneça imóvel e assintomático clinicamente após a incidência de carga mastigatória. Segundo os autores que iniciaram os estudos na implantodontia os fatores que determinam a osseointegração podem ser a biocompatibilidade do material, o desenho do implante, o tipo de superfície do implante, a qualidade do leito ósseo receptor, a realização de uma técnica cirúrgica criteriosa e a ausência da incidência

de forças durante o período pós-operatório ^{1, 2, 4, 5}. Segundo o protocolo proposto para a utilização de implantes a incidência de força foi preconizada ser instituída após um período de 3 a 6 meses ⁶. Embora, estudos posteriores concluíssem que pode haver osseointegração quando se utiliza carga mastigatória sobre o implante recém instalado ^{7, 8, 9}.

A estabilidade primária após o procedimento da colocação de implantes é um dos fatores responsáveis pela osseointegração dos implantes dentários. Altos índices de fracasso e perda de implantes têm sido atribuídos a achados associados a implantes em osso de qualidade ruim e conseqüentemente estabilidade primária diminuída ^{10, 11, 12}. A estabilidade primária ocorre no momento da instalação do implante e está relacionada ao nível de contato ósseo primário ¹³, que é influenciado principalmente pela qualidade do trabeculado, além do comprimento, geometria e superfície do implante ¹⁴.

Os métodos existentes para aumentos ósseos dos rebordos alveolares antes da instalação de implantes dentários podem ser: os implantes ou enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos/biomateriais; a aplicação de fatores de crescimento; a regeneração óssea guiada; a distração osteogênica; e as combinações entre essas técnicas.

Osteogênese é definida como células ósseas vivas transplantadas e com capacidade de formar novo tecido ósseo no leito hospedeiro, ex: Osso autógeno.

Osseoindução é a habilidade em induzir o osso do hospedeiro a produzir novo tecido ósseo. Ex: Osso autógeno e fatores de crescimento.

Osseocondução guia e conduz o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte (arcabouço). Ex: Osso autógeno e materiais aloplásticos/Biomateriais.

O enxerto autógeno é retirado do próprio paciente. É altamente osteogênico, osseoadutor e osseocondutor. Tem menor reabsorção e morbidade. Os tipos existentes são os intra-orais ou extra-orais. As áreas doadoras intra-orais mais comuns são retro-molar, tuberosidade, ramo ascendente, sínfise mandibular, processo coronóide e tórus. Os enxertos extra-orais podem ser retirados da crista ilíaca, calota craniana, tibia e outras ¹⁵.

Os enxertos alógenos formam osso por osseoindução ou osseocondução, é obtido de cadáveres e armazenado em bancos de ossos. Podem ser mineralizados ou desmineralizados. A desmineralização renova a fase mineral e expõe o colágeno e os fatores de crescimento do osso ^{16, 17}.

O enxerto xenógeno é o obtido de outra espécie animal, geralmente bovina, e têm sido largamente utilizado em implantodontia. A sua preparação envolve procedimentos de desmineralização, congelamento e secagem. Pode ser utilizado puro ou associado aos enxertos ósseos autógenos ¹⁸.

Os enxertos aloplásticos/biomateriais são feitos de material sintético ou natural, sendo apenas osseocondutores, funcionando como um material de preenchimento. Um exemplo são as cerâmicas como a HA, são seguras e bem toleradas, mas tem pouco potencial para formar novas inserções, diminuindo as chances de incorporação óssea. Podem ser sintéticas como o fosfato de cálcio e naturais como o coral.

Os fatores de crescimento ósseo são substâncias osseopromotoras utilizadas para estimular a formação óssea e acelerar o processo de integração entre osso e implante. As proteínas morfogenéticas, por exemplo, têm sido utilizadas para estimular a proliferação e especialização de células-tronco na reconstituição do tecido ósseo bucal.

A regeneração óssea guiada é um recurso cirúrgico realizado pela aplicação de barreiras físicas como membranas no tratamento de defeitos ósseos periodontais ou periimplantares, com o objetivo de possibilitar a neoformação óssea dentro do defeito.

A distração osteogênica é um processo biológico que desencadeia a neoformação óssea resultante da ação do deslocamento gradual e controlado de duas extremidades ósseas criadas por meio de uma fratura de baixa energia realizada por uma osteotomia subperiosteal¹⁹. Esse deslocamento é realizado por um fixador externo que cria mecanicamente um espaço onde o novo osso se regenera entre as duas margens. À medida que o osso é alongado, o tecido conjuntivo associado é estirado, acompanhando o alongamento ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. intra-osseous anchorage of dental prostheses. i. Experimental Studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969; 3:81-100.
2. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg. 1981; 10:387-416.
3. Albrektsson T, Lekholm U. Osseointegration: Current state of the art. Dent Clin North Am. Review. 1989; 33:537-54.
4. Albrektsson T, Zarb G. A current interpretations of the osseointegrated response: Clinical significance. Int J Prosthodont. 1993; 6:95-105.
5. Branemark Pi, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 1977; 16:1-132.
6. Branemark PI Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent. 1983; 50:399-410.
7. Schnitman PA, Wohrle PS, Rubenstein JE. Immediate fixed interim prostheses supported by two-stage threaded implants: methodology and results. J Oral Implantol. 1990;16:96-105
8. Sagara M, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. The effects of early occlusal loading on one-stage titanium alloy implants in beagle dogs: a pilot study. J Prosthet Dent. 1993; 69:281-8.
9. Schnitman PA, Wöhrlé PS, Rubenstein JE, DaSilva JD, Wang NH. Ten-year results for Brånemark implants immediately loaded with fixed prostheses at implant placement. Int J Oral Maxillofac Implants. 1997; 12:495-503.
10. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson ar. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. Int J Oral Maxillofac Implants. 1986; 1:11-25.
11. Buser D, Weber Hp, Bragger U, Balsiger C. tissue integration of one-stage ITI implants: 3-year results of a longitudinal study with hollow-cylinder and hollow-screw implants. Int J Oral Maxillofac Implants.

1991;6:405-12.

12. Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Pharoah M, Smith DC, Chipman M, Locker D, Rydall A. A prospective clinical study in humans of an endosseous dental implant partially covered with a powder-sintered porous coating: 3- to 4-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11:87-95.
13. Cochran DL, Senk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40:1-11.
14. Meredith.1998 Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont.* 1998; 11:491-501.
15. Garg AK. The use of a bone harvest system for autogenous bone grafts during implant procedures. *Dent Implantol Update.* 1998; 9:81-3.
16. Petrunaro PS, Amar S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Implant Dent.* 2005;14:139-48.
17. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M. Microscopic and histochemical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in association with implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998;18:355-61.
18. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:72-6.
19. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 1997; 15:221-6.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade e quantidade ósseas insuficientes nos rebordos alveolares é uma das principais causas de falha na instalação de implantes dentários. Atualmente as dificuldades em se obter osso para reconstruir rebordos têm intensificado a procura por soluções que venham melhorar o prognóstico desses implantes. Diversas formas que venham melhorar a qualidade e a quantidade ósseas, para suportar os implantes de maneira satisfatória têm sido propostas ^{1, 2, 3}.

As deficiências intra-ósseas como as deixadas por periimplantites, alvéolos recém extraídos ou as relacionadas ao procedimento de instalação de implantes, algumas vezes vão requerer tratamento utilizando um substituto ósseo. A necessidade de reconstrução desses defeitos levou ao desenvolvimento de diferentes técnicas de obtenção e a diversos tipos de substitutos ósseos, dentre eles os enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos ^{3, 4, 5, 6}. O principal objetivo desses materiais é atuar como osseoindutor ou osseocondutor, e na prevenção mecânica da invasão de células de tecido conjuntivo no meio do defeito ósseo interferindo no processo de reparo ⁷.

Os materiais aloplásticos têm sido largamente utilizados no tratamento desses tipos de defeitos, em função da facilidade em sua

obtenção. Atualmente, o fosfato de cálcio e a hidroxiapatita (HA) são os substitutos ósseos aloplásticos mais frequentemente utilizados. Esses materiais apresentam vantagens e desvantagens. Materiais bioabsorvíveis como o fosfato de cálcio, normalmente tem altas propriedades osseocondutoras, embora o período de sua biodegradação possa ser mais rápido do que a possibilidade de aposição óssea dentro do defeito ⁸. Por outro lado, a implantação de materiais não absorvíveis como a HA apresenta baixa atividade osseocondutora, embora esses materiais permaneçam no meio do defeito criando uma base de sustentação para neoformação óssea ⁹. Entretanto, a invasão de tecido conjuntivo que frequentemente ocorre ao redor dos grânulos de HA interfere na neoformação óssea, podendo se tornar uma dificuldade de difícil resolução.

Sendo assim, a maior parte dos estudos nas áreas de biomateriais que possam ser substitutos ósseos está voltada para a descoberta de um material que apresente um bom potencial osseoindutor ou osseocondutor e que sofra bioabsorção em um curto período de tempo. Os polímeros sintéticos reabsorvíveis desenvolvidos durante as últimas décadas tem sido largamente utilizados como materiais aloplásticos em diversas áreas da medicina e da odontologia. Entre eles, destacamos os do ácido láctico e do ácido glicólico que são utilizados isoladamente ou, mais frequentemente, associados para constituir copolímeros, como os de ácido poliláctico-poliglicólico (PLA/PGA). Estas substâncias são muito

utilizadas na composição de dispositivos cirúrgicos destinados à cirurgia bucomaxilofacial e ortopédica ^{10, 11, 12}. Suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação fazem com que a sua aplicação seja bem tolerada, não sendo necessária a sua remoção ^{24, 25}. Estudos experimentais demonstraram que, o período da degradação destes dispositivos cirúrgicos poliméricos como mini-placas, parafusos, fios de sutura ou malhas de osteosíntese, está correlacionado com os fatores locais e com a densidade específica do material, que é dependente do seu grau de polimerização e peso molecular ^{13, 24}.

Fatores como a baixa densidade do copolímero de PLA/PGA, fazem com que a sua biodegradação ocorra de forma lenta, podendo ocorrer deposição óssea simultânea ²⁵. A biodegradação de alguns desses copolímeros ocorre por hidrólise e o período de tempo que isto ocorre é dependente de sua densidade, podendo deixar no seu lugar uma porcentagem elevada de tecido ¹⁴. Desta forma, justifica-se o uso de materiais constituídos por estas substâncias para a sutura dos tecidos, a construção de dispositivos para a fixação de fraturas ósseas e para materiais de reparação dos tecidos moles ^{15, 16}.

Além da ação mecânica de barreira, a aplicação de copolímeros do ácido poliláctico-poliglicólico demonstrou, em casos de descontinuidade da parede óssea de diferentes partes do esqueleto, uma ação favorável à regeneração de novo tecido ósseo, sugerindo ser um biomaterial osseocondutor ^{17, 18, 19, 20, 21}.

Em odontologia, o copolímero de PLA/PGA tem sido utilizado em diferentes formulações (esponja, pó e gel), como mantenedor de espaço, individualmente ou como suporte de membranas reabsorvíveis ou não. Relatos da literatura afirmam que a total reabsorção dessas formulações ocorre em curto espaço de tempo, porém o suficiente para permanecer nos tecidos e ser substituído por tecido ósseo ²⁵. Esse período de tempo está na dependência da densidade do material, da quantidade implantada, do metabolismo individual e da circulação sanguínea na zona de aplicação, não se constituindo um obstáculo aos processos regenerativos dos tecidos circundantes ²².

2. PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou o uso do copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) associado ao osso autógeno raspado no reparo ósseo ocorrido ao redor de implantes inseridos em leitossobrefresados, em tíbias de coelhos. Foram realizadas as análises biomecânica e imunohistoquímica.

3. MATERIAL E MÉTODO

Este protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) dos Cursos de Odontologia e Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba (UNESP) (ANEXO 1).

A amostra foi constituída de 20 coelhos machos brancos da raça *Nova Zelândia*, todos apresentando aproximadamente 5 meses de idade e peso corporal variando entre 3 a 4 Kg, procedentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas unitárias, sob temperatura ambiente, alimentados com ração sólida e água à vontade. Todos os coelhos receberam 2 implantes na metáfise tibial de um dos lados, direito e esquerdo escolhidos aleatoriamente em cada animal. Os grupos foram constituídos da seguinte forma: grupo controle onde o defeito ósseo foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo (C); grupo tratado onde o defeito ósseo foi preenchido com copolímero de PLA/PGA misturado a osso autógeno raspado manualmente (G). Foram instalados 40 implantes de titânio comercialmente puro, de superfície lisa com altura de 6 mm e diâmetro de 2,6mm, esterilizados por radiações gama (CONEXÃO - Sistemas de Prótese®). Vinte implantes constituíram o grupo controle (C) e 20 o grupo tratado (G).

3.1 Copolímero PLA-PGA

O copolímero consistiu em uma mistura de ácido láctico e ácido glicólico (PLA/PGA) na proporção de 50:50. Controlamos o pH da solução adicionando hidróxido de sódio. Foi utilizado o método dos precursores poliméricos ou mais conhecido como método Pechini, que é uma técnica que pode ser aplicada no desenvolvimento de materiais avançados. O processo é baseado na capacidade que certos ácidos orgânicos, tais como os ácidos cítrico, láctico e o glicólico, possuem de formarem quelatos. Estes quelatos podem esterificar quando aquecidos com um polialcool e polimerizar a temperaturas mais elevadas formando uma resina.

3.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram mantidos em jejum 8h antes do procedimento cirúrgico quando foram anestesiados via parenteral. A medicação consistiu de injeção intramuscular de 3mg/Kg de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e 0,22ml de cloridrato de tiazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Como complementação anestésica e hemostática foi utilizada infiltração de Hidroclorito de Mepivacaína (0,3mL/Kg, Scandicaíne 2%) c/ Adrenalina (1:100.000).

Durante todo procedimento cirúrgico foram respeitados as normas de biossegurança para o controle de infecções, estando todo o

instrumental e materiais esterilizados. Após tricotomia e anti-sepsia da região anterior da tíbia utilizando PVP-I 10% degermante, foi realizada infiltração do anestésico local e uma incisão dermo-periosteal de aproximadamente 6cm de comprimento, com lâmina nº15 montada em cabo nº3, seguida de divulsão do tecido mole com descolador de periósteo (Molt nº9) e exposição óssea (Fig. 1- 3).

Cada animal recebeu 2 implantes, na porção medial do osso de uma das tíbias, para tanto, foi utilizado um motor elétrico para confecção dos defeitos ósseos que receberam os implantes (Fig.4-5). Um contra-ângulo redutor de 1:20 foi utilizado, sob irrigação intensa com solução salina, iniciando-se o preparo do leito receptor do implante com uma fresa lança, delimitando-se a localização dos implantes respeitando-se uma distância de 5mm entre os mesmos. Em seguida foram utilizadas as fresas de diâmetros 2 e 3mm, seqüencialmente, na velocidade máxima de perfuração de 1200 rpm, com irrigação por meio de solução salina durante toda a preparação do leito receptor. Feito isto foram instalados os 2 implantes de diâmetro e comprimento iguais (2,6 x 6 mm), que instalados no defeitos de 3mm fresados, permaneceram sem estabilidade inicial. Os implantes instalados constituíram os grupos: C e G. Portanto, o primeiro defeito ósseo sendo preenchido apenas por coágulo sanguíneo (C); e o segundo defeito ósseo preenchido com PLA/PGA misturado a osso autógeno raspado manualmente (G), obtido da região próxima às perfurações (Fig. 6, 7 e 8).

Os tecidos foram reposicionados e suturados por planos empregando-se fio reabsorvível (poliglactina 910 – Vycril 4.0) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon, Mononylon) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato os animais receberam administração subcutânea de 100mg de Ampicilina Benzatina (30mg/kg), com a finalidade de prevenir infecção pós-operatória e administração intramuscular de 0,1ml de Dipirona Sódica a cada 6 horas durante 3 dias.

3.3 Eutanásia e preparo das amostras para análise microscópica

3.3.1 Imunoistoquímica:

Os 20 animais foram anestesiados e eutanasiados nos períodos pós-operatórios de 15, 40 e 60 dias. Sendo 5 coelhos no período de 15 dias, 5 no período de 40 dias e 10 no período de 60 dias pós-operatórios. A técnica de eutanásia consistiu da perfusão no ventrículo esquerdo com solução salina tamponada por 5 minutos, e em seguida com formaldeído 4% (Acros Organics) durante 40 minutos utilizando bomba perfusora Masterflex® LS (Cole-Parmer Instrument Company). Finalizada a perfusão, a tibia onde foram instalados os implantes foi removida e pré-fixada em formaldeído 4% durante 6 horas a temperatura de 4°C (Celsius), lavadas em solução tampão (PBS) e imersas em solução descalcificadora (EDTA).

Após fixação das peças, o tecido ósseo ao redor do leito receptor foi reduzido com margens de 0,5cm ao redor de todo o negativo

do implante. As amostras teciduais foram descalcificadas em EDTA na concentração de 5%, pH 7,0, dissolvido em água MilliQ, por aproximadamente 60 a 80 dias. Em seguida, as seções teciduais foram crioprotetidas com sacarose a 30% (Merck), para posterior corte em criostato, a 14µm de espessura, montadas em lâminas previamente gelatinizadas.

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio, e em seguida realizado o bloqueio das reações inespecíficas utilizando o soro da espécie hospedeira onde foi produzido o anticorpo secundário (Fig. 13). Os anticorpos primários utilizados eram contra a osteoprotegerina (OPG), RANK L e osteocalcina (OC) (Santa Cruz Biotechnology®). Foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase e a reação foi revelada utilizando a 3,3 diaminobenzidina (DAB-Sigma) como cromógeno (Fig. 14). Procedimentos de controle sem anticorpos primários (controle negativo) e de controle positivo foram realizados, para avaliar a especificidade e a reatividade das reações. As células positivas para seus respectivos anticorpos foram coradas em marrom. A porcentagem de células positivas para as proteínas analisadas foram avaliadas por meio de um microscópio óptico, pela contagem manual das células marcadas em áreas previamente determinadas. Os dados foram tabulados para posterior análise estatística. A coloração em hematoxilina e eosina também foi realizada para dar referência para a citoarquitetura dos cortes analisados. As análises foram realizadas qualitativamente e

semi-quantitativamente em microscópico óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha), acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica Microsystems, Heerburgg, Switzerland) (Fig. 22).

3.3.1.1 Histologia:

As tíbias de 5 animais do período de 60 dias foram removidas e após a fixação foram levadas direto a uma seqüência de álcoois de concentração crescente com troca de solução a cada 24 horas, seguido de um banho de acetona por 24 horas. Após o banho de acetona as peças foram emersas em polimetil metacrilato lento (PMMAL) com trocas diárias durante 3 dias. A seguir, as peças receberam 2 banhos de Metil Metacrilato (MMA). Na seqüência do processamento, foi realizada a inclusão das peças em MMA associado ao catalisador, Peróxido de Benzoíla 1%, aguardando-se o período de polimerização da resina (Fig. 17). Após obtenção dos blocos em resina acrílica contendo as peças, estas foram levadas ao micrótomo (Exakt® Cutting System Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) e obtidos assim cortes com espessura em média de 50µm (Fig. 17 a 20). As lâminas foram coradas usando os corantes vermelho de alizarina (VA) e azul de Stevenel (AS) (Fig. 21).

3.4 Preparo da amostra para análise biomecânica

Os 5 coelhos restantes do período de 60 dias foram submetidos ao teste mecânico de torque-reverso antes da perfusão. As tíbias foram

expostas, e os implantes reabertos para realização da análise biomecânica. Neste procedimento o tecido mole e ósseo que se encontrava sobre a cabeça dos implantes foi cuidadosamente removido (Fig. 9 e 10). Em seguida utilizando-se de uma chave de encaixe ao implante, estes foram conectados a montadores para que um aparelho de torque-reverso (15-BTG, Tonich, Japan) fosse utilizado (Fig.11). Os implantes foram submetidos à força gradual do aparelho registrados em Ncm, e foram anotados os valores de força do momento da ruptura da interface do implante com o osso (Fig.12).

Os implantes removidos nesta etapa, foram submetidos à avaliação em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM – T220A, Peabody, USA). Fotomicrografias para análise foram obtidas do corpo dos implantes nos aumentos de 60X, 100X, 200X, 500X e 1000X.

4. RESULTADOS

4.1. Análise macroscópica

Aos 60 dias após a reabertura das tíbias para a realização do teste biomecânico, foi observado que os implantes apresentaram-se estáveis e recobertos com osso neoformado em ambos os grupos. No grupo tratado (G) os implantes apresentaram-se numa posição tridimensional mais próxima da posição de instalação. Entretanto, alguns implantes do grupo controle (C) apresentaram-se inclinados em relação à superfície óssea.

4.2. Análise biomecânica

Para a análise biomecânica foram considerados os valores de torque-reverso obtidos dos grupos controle (C) e tratado (G), dos 5 animais do período de 60 dias (Tabela 1). Os valores dos grupos avaliados foram levados à análise estatística por meio de teste paramétrico utilizando amostras independentes para os grupos avaliados, e para tanto foi utilizado o programa estatístico GMC (Tabela 2). Podemos observar que houve uma predominância de estabilidade nas amostras do grupo tratado (G) em relação ao grupo controle (C) apresentando diferença estatística entre os grupos ($> 0,05$) (Gráfico 1).

4.2.1. Análise morfométrica por microscopia eletrônica por varredura (MEV)

Após 60 dias foram observadas de forma qualitativa as áreas de tecido ósseo aderidas à superfície dos implantes removidos, em ambos os grupos, por vezes isoladas ou recobrimdo boa parte dos mesmos ou quase totalmente recobertas por tecido ósseo em toda a sua extensão (Fig.37-40).

4.3. Análise imunohistoquímica

Foram realizadas reações imunohistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas RANK L, Osteoprotegerina (OPG) e Osteocalcina (OC), com o objetivo de obter marcações para análise qualitativa e semi-quantitativa que representariam a expressão dessas proteínas caracterizando reabsorção e neoformação óssea nos diferentes períodos e grupos estudados. Essas expressões foram obtidas em porcentagens para os grupos analisados, cruzando-se as variáveis proteínas e períodos de avaliação. Na tabela 3 estão representadas as médias percentuais de expressão de proteínas de acordo com o período de avaliação para os grupos analisados nas áreas da cortical superior, medular e cortical inferior. Foram obtidos quadros contendo as imagens obtidas das lâminas de cada

proteína e períodos, individualmente para cada grupo, onde a análise semi-quantitativa foi realizada por 3 avaliadores distintos. Os avaliadores anotavam os escores padronizados em 20, 30, 60 e 90% de acordo com a quantidade de imunomarcações visualizadas. Os escores foram tabulados e submetidos à análise estatística pelo programa GMC. Os resultados obtidos podem ser visualizados pelos Gráficos 2, 3 e 4.

A análise qualitativa das marcações imunohistoquímicas para identificação da proteína RANK L indicou marcações específicas nos grupos analisados, onde foram observadas células com citoarquitetura da linhagem de osteoblastos nas corticais superior e inferior em grande expressão aos 40 dias. Podemos observar que neste período as marcações da OPG, entre os grupos analisados está predominante no grupo tratado, isto pode ser por encontrar-se solúvel na matriz óssea indicando que o metabolismo nesta fase estava ativado. A RANKL assim como a OPG apresentou-se bem marcada neste período em ambos os grupos já que esta proteína é responsável pelo início da remodelação óssea. Entretanto, no período de 15 dias podemos encontrar marcações celulares mais em lamina coradas para RANKL do que para OPG no grupo tratado, já que aquela proteína está presente mais nas células do que na matriz. A osteocalcina (OC) é responsável por indicar o índice de maturação do osso, podendo se expressar após a mineralização óssea, sinalizando a maturação, tanto na matriz quanto na célula. Podemos observar que a expressão da OC, no período de 40 dias, em todos os grupos analisados,

observado na soma das médias percentuais das regiões analisadas, o que se torna um indicativo de que o tecido ósseo sofreu deposição de cálcio, ocorrendo sua mineralização (Gráfico 4).

4.3.1. Análise histológica qualitativa

Foram analisadas de forma qualitativa as áreas de contato entre tecido ósseo e implante e entre pré-osso e implante, nas lâminas coradas com HE e VA/AS para observação da citoarquitetura dos tecidos. As lâminas foram levadas à microscopia óptica convencional, onde foi realizada uma análise histológica qualitativa. A área de osso calcificado e de tecido conjuntivo (pré-osso) foi identificado utilizando-se de um microscópio óptico com objetiva de aumento de 10/0,25 (Axiolab, ZEISS) e câmera de vídeo (JVC, RGB color vídeo – TK1270) acoplada a esse microscópio e conectada a um microcomputador com um software digitalizador de imagens (Fig. 22). Foram avaliadas as áreas de tecido ósseo presentes correspondentes às regiões das roscas, ao módulo de rebordo e ao ápice dos implantes, para todos os grupos. No período de 60 dias não foram observados remanescentes do biomaterial implantado, indicando a total bioabsorção do mesmo. Em determinadas áreas adjacentes ao implante foi observado tecido conjuntivo celularizado em contato direto com o osso formado, sugerindo sua posterior maturação em tecido ósseo. O tecido ósseo neoformado em contato com a superfície do

implante apresentou-se bastante celularizado com a presença de osteócitos em grande número.

Aos 15 dias nota-se a presença de tecido ósseo em neoformação na área correspondente às espiras do implante no grupo tratado em toda a extensão da interface (G)(Fig. 23) além de restos do biomaterial (PLA/PGA) (Fig. 24), e no grupo controle aspecto da interface apresentando-se com tecido ósseo em formação predominantemente na cortical superior e tecido conjuntivo adjacente à interface (Fig. 25-26). Aos 40 dias no grupo tratado (G) nota-se a presença de osteócitos e osteoblastos bem marcados na região ocupada pelo pico e vale do implante (Fig. 27), e no grupo controle (C) presença de tecido ósseo predominantemente na cortical superior e tecido compatível com conjuntivo preenchendo a interface (Fig. 28-29). Aos 60 dias no grupo tratado (G) foi observada ausência do biomaterial além de áreas de osso maduro acompanhando o formato das espiras do implante (Fig. 30).

Observamos na área medular, neoformação óssea na região dos picos e vales das roscas dos implantes, pela presença de tecido conjuntivo (corado pelo AS) em contato com a superfície, preenchendo a região dos vales das roscas em determinadas áreas no grupo controle (C) (Fig. 31-32). No período de 60 dias no grupo tratado (G) as interfaces revelaram a presença de tecido ósseo neoformado celularizado (corado pelo VA) em contato com a superfície do implante, principalmente na área de

assentamento da cabeça do implante (módulo de rebordo), em função de sua localização em osso cortical (Fig. 33-34).

5. DISCUSSÃO

O que se tem esperado como resultado da utilização de um biomaterial que será utilizado como substituto ósseo é que o mesmo apresente características como biocompatibilidade, bioabsorção e principalmente potencial de osseointegração ou osseointegração. Entretanto, as pesquisas nas áreas de biomateriais têm demonstrado as dificuldades em se obter todas essas características em um único material, indicando que os melhores resultados são encontrados quando se utilizam os enxertos ósseos autógenos, em função de se apresentar como um substituto ósseo completo sendo além de tudo osseointegrador, osseointegrador e osteogênico²³.

Entretanto, as dificuldades encontradas na obtenção desses tipos de enxerto têm estimulado os pesquisadores em busca de alternativas como os materiais aloplásticos. Neste grupo de materiais encontra-se o copolímero de PLA/PGA, biomaterial utilizado no presente estudo. Este copolímero foi manipulado para apresentar propriedades como o baixo peso molecular, que permite ser totalmente degradado em um curto período de tempo, dependendo da quantidade de material empregado e da reatividade do organismo. O processo de absorção e biodegradação desse biomaterial se dá no ciclo de Krebs, por meio de reações bioquímicas, que resultam na formação de água (H₂O) e dióxido

de carbono (CO₂) como produtos finais do metabolismo do ácido poliláctico, e etileno glicol da degradação enzimática do ácido poliglicólico¹⁶. Isso indica que esses materiais podem sofrer biodegradação sem causar transtornos ao organismo ao gerarem seus produtos finais de metabolismo. Os produtos da degradação desses copolímeros apresentam baixa toxicidade. Em virtude da reduzida massa dos polímeros implantados e à lentidão do processo de degradação ou transformação dos polímeros em monômeros, estes encontram-se em quantidades toxicologicamente insignificantes no organismo. Além disso, tratam-se de substâncias que podem ser normalmente encontradas no organismo humano e animal, que são degradadas mediante mecanismos fisiológicos de controle metabólico. A implantação do copolímero não desequilibra o organismo porque os seus componentes já estão fisiologicamente presentes no mesmo²⁴.

As análises empregadas no presente estudo revelaram que a degradação e reabsorção do copolímero, permitiram uma progressiva e ordenada reconstrução do tecido ósseo. Este processo de regeneração óssea apresenta-se especialmente importante podendo ser empregado na reparação de defeitos sobre fresados ao redor de implantes ou quando é necessário obter um aumento ósseo na zona ao redor da implantação. Uma boa regeneração de tecido ósseo na interface osso/implante é de fato a condição indispensável para a duração e, portanto, para o sucesso na instalação de implantes dentais.

Encontramos na literatura o copolímero de PLA/PGA sendo utilizado na forma gel para preenchimento de defeitos periodontais, em procedimentos endodônticos periapicais e até em levantamento de seio maxilar prévio à instalação de implantes dentais^{1,7}. Isto em função de sua consistência e plasticidade semelhante à de um silicone de uso hidráulico. Portanto, pode ser introduzido na cavidade alveolar e agir na membrana do seio levantando-a de modo atraumático, reduzindo o risco de laceração na membrana, risco associado às manobras de levantamento com instrumentos metálicos. Após elevada a membrana, é possível introduzir junto com o gel, outros materiais que sejam considerados necessários como osso autógeno. Contudo, o gel, mesmo individualmente, estabiliza a membrana depois de elevada, pois logo que entra em contato com o sangue, que apresenta solubilidade aquosa, sofre hidrólise, e assume o aspecto e a consistência de um gesso macio e poroso, que constitui estrutura ideal para a estabilização de um coágulo, o qual originado do periósteo fica isolado entre o assoalho do seio e a membrana, posteriormente transformando-se em osso¹.

Em relação ao comportamento do copolímero neste estudo, este demonstrou ser biocompatível, bioabsorvível e apresentou características de osseocondução, atuando como um arcabouço para neoformação óssea na interface osso/implante. Um estudo preliminar foi realizado utilizando a mesma metodologia empregada nesta pesquisa, onde o copolímero de PLA/PGA foi utilizado puro nos defeitos sobre fresados em

tíbias de coelho, sem qualquer estabilidade primária ²⁵. Foi observada deposição óssea na interface/osso implante no grupo tratado com o PLA/PGA, indicando que o biomaterial pode ser utilizado como preenchimento de espaços entre as espiras de um implante instalado sem estabilidade primária em tíbias de coelho. Isso pode ser em função da simples permanência do biomaterial impedindo a invasão de tecido conjuntivo na superfície do implante durante um tempo suficiente para ocorrer deposição óssea culminando com uma interface óssea intimamente aderida à superfície do implante.

A análise da expressão das proteínas nos grupos analisados contribuiu para a avaliação principalmente qualitativa dos mecanismos de reabsorção e neoformação óssea nos períodos estudados. Embora, para obtermos resultados conclusivos do experimento, a união de todas as análises tenha sido de fundamental importância, dentre as formas de análise existentes utilizadas para avaliação da osseointegração, a análise imunistoquímica vem ganhando credibilidade há algum tempo em virtude das descobertas na área da biologia óssea ^{26, 27}. A identificação de mecanismos de regulação e do crescimento celular de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, dentre outras células envolvidas no processo de remodelação óssea, tomou de grande importância a utilização dessas técnicas para avaliação de eventos ocorridos durante o processo de reparo ²⁸.

Outro fator importante a ser evidenciado é a influência da densidade óssea, ou seja, da qualidade do trabeculado disponível em um sítio edêntulo. A densidade óssea é o parâmetro mais importante para a estabilidade inicial do implante permitindo a ausência de movimento durante o primeiro estágio de cicatrização cirúrgica. A quantidade óssea disponível descrita como a arquitetura externa ou volume da área edêntula considerada para os implantes, vai influenciar no resultado final da estabilidade primária. Além disso, considerando a espessura, largura, comprimento e angulação da área edêntula, uma quantidade óssea suficiente é a condição primária para a colocação do implante no correto posicionamento ósseo. Os resultados favoráveis obtidos neste estudo na análise de torque reverso revelaram estabilidade nos implantes mesmo em um leito sobre fresado. Alguns fatores podem ter contribuído para esses resultados como o biomaterial ou a presença de osso autógeno associado ao copolímero, já que quando utilizamos essas associações os resultados obtidos são favoráveis. Entretanto, devemos salientar que, o tratamento de superfície que também pode influenciar e acelerar o processo de deposição óssea na interface ^{29, 30}, neste estudo não exerceu influência, em função de o implante utilizado ter sido de superfície usinada.

Como vantagens da utilização do polímero PLA/PGA na forma empregada associado a osso autógeno, podemos incluir, a mínima invasão de células do tecido conjuntivo que poderiam interferir na osseointegração, além da utilização de um substituto ósseo com

propriedades osseoindutoras, osseocondutoras e osteogênicas, que não exige área doadora localizada fora da área receptora, sendo possível a remoção de pequena quantidade de osso raspado da própria região. Isso diminui a morbidade dos procedimentos, conseqüentemente reduz o desconforto trans e pós-operatório do paciente. A técnica consistiu-se de um procedimento simples e com boa previsibilidade.

6. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos pudemos concluir que, o copolímero de PLA/PGA adicionado ao osso autógeno raspado pode ser utilizado no preenchimento de defeitos sobrefresados ao redor de implantes em tíbias de coelhos, pois apresenta características de biocompatibilidade, biodegradação e osseocondução, sendo totalmente substituído por osso de qualidade e estabilidade na interface osso/implante.

7. REFERÊNCIAS

1. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent.* 2006; 15:197-207.
2. Aguirre Zorzano LA, Rodríguez Tojo MJ, Aguirre Urizar JM. Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and B-tricalcium phosphate: histological and histomorphometric clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007, 12:E532-6.
3. Abushahba F, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:329-34.
4. Raghoobar GM, Batenburg RH, Vissink A, Reintsema H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996, 54:1180-5; discussion 1185-6.
5. Terheyden H, Jepsen S, Möller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999,10:510-21.
6. Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JI, Van Steenberghe D. Bone Formation Following Implantation Of Bone Biomaterials Into Extraction Sites. *J periodontol.* 2008, 79:1108-15.
7. Katanec D, Pavelic B, Ivasovic Z. Efficiency of polylactide/polyglycolide copolymers bone replacements in bone defects healing measured by densitometry. *Coll Antropol.* 2004, 28:331-6.
8. Hara K, Shimizu M. Reconstruction for vertical bone defects by Synthograft application. *J Oral Implantol.* 1985;12:68-79.
9. Barkhordar RA, Meyer JR. Histologic evaluation of a human periapical defect after implantation with tricalcium phosphate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986 Feb;6:201-6.

10. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):93-102.
11. Nordström P, Pihlajamäki H, Toivonen T, Törmälä P, Rokkanen P. Tissue response to polyglycolide and polylactide pins in cancellous bone. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1998;117(4-5):197-204.
12. Waris E, Ashammakhi N, Happonen H, Raatikainen T, Kaarela O, Törmälä P, Santavirta S, Konttinen YT. Bioabsorbable miniplating versus metallic fixation for metacarpal fractures. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 May;(410):310-9.
13. Heidemann W, Fischer JH, Koebeke J, Bussmann C, Gerlach KL [In vivo study of degradation of poly-(D,L-) lactide and poly-(L-lactide-co-glycolide) osteosynthesis material] *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2003, 7:283-8.
14. Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piattelli A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2003,14:651-8.
15. Päivärinta U, Böstman O, Majola A, Toivonen T, Törmälä P, Rokkanen P. Intraosseous cellular response to biodegradable fracture fixation screws made of polyglycolide or polylactide. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1993, 112:71-4.
16. Suuronen R. Biodegradable fracture-fixation devices in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993 Feb;22(1):50-7.
17. Hollinger JO. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res*. 1983, 17:71-82.
18. Lundgren B, Holst A, Tärholm A, Rolfsen W. Cellular reaction following cataract surgery with implantation of the heparin-surface-modified intraocular lens in rabbits with experimental uveitis. *J Cataract Refract Surg*. 1992,18:602-6.
19. Meikle MC, Papaioannou S, Ratledge TJ, Speight PM, Watt-Smith SR, Hill PA, Reynolds JJ. Effect of poly DL-lactide-co-glycolide implants and xenogeneic bone matrix-derived growth factors on

- calvarial bone repair in the rabbit. *Biomaterials*. 1994, 15:513-21.
20. Miyamoto S, Takaoka K. Bone induction and bone repair by composites of bone morphogenetic protein and biodegradable synthetic polymers. *Ann Chir Gynaecol Suppl*. 1993, 207:69-75.
 21. Winet H, Hollinger JO. Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: neoosteogenesis in a bone chamber. *J Biomed Mater Res*. 1993, 27:667-76.
 22. Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005, 99:148-54.
 23. Rissolo AR, Bennett J. Bone grafting and its essential role in implant dentistry. *Dent Clin North Am*. 1998, 42:91-116.
 24. Vert M, Mauduit J, Li S. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials*. 1994 Dec, 15:1209-13.
 25. Queiroz TP, Vieira, EH, Okamoto, R, Garcia Jr, IR. Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico ao redor de implantes osseointegráveis sem estabilidade primária. Análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos. [Dissertação]. Araçatuba: Unesp/SP, 2008; 119 p.
 26. Smonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 89:309-19.
 27. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 200,142:5050-5.
 28. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003 May;82(5):372-6.
 29. Cochran DL, Senk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a

sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res.* 40(1):1-11, 1998.

30. Cordioli G, Majzoud Z, Piatelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac implants.* 15(5):668-674, 2000.

ANEXO 1: NORMAS DE PUBLICAÇÃO

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

Author Guidelines

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:
www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. *No paper version is required.*

Acceptable material

Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors

Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts

Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines

Manuscripts that are not prepared according to these guidelines will be returned to the author before review.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See www.icmje.org.
- **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
- **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- **Abstract/key words.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.
- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
- **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid

claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.

- **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.

- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.*

Black & white—Submit three sets of high-quality glossy prints. Should the quality prove inadequate, negatives will be requested as well. Photographs should be unmounted and untrimmed.

Radiographs—Submit the original radiograph as well as two sets of prints.

Color—Color is used at the discretion of the publisher. No charge is made for such illustrations. Original slides (35-mm transparencies) must be submitted, plus two sets of prints made from them. When a series of clinical images is submitted, tonal values must be uniform. When instruments and appliances are photographed, a neutral background is best.

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

Electronic Files—May be accepted if original figures (as specified above) are unavailable. Resolution must be at least 300 dpi; files saved in .tiff or .eps format are preferred.

Legends—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (published in issues 1 and 4 and accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634)

PERMISSIONS AND WAIVERS

- [Permission of author and publisher](#) must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.

- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

ANEXO 2: TABELAS, GRÁFICOS E ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Dados dos valores obtidos na análise de torque-reverso nos grupos controle (C) e tratado (G) no período de 60 dias.

AMOSTRAS	Período 60 dias	
	C(controle)	G(PLA-PGA + OSSO)
Amostra 1	22	15
Amostra 2	16	21
Amostra 3	10	22
Amostra 4	8	20
Amostra 5	10	30
Média	13,2	21,6
Desvio padrão	5,8	5,4

Tabela 2: Teste estatístico paramétrico utilizando amostras independentes para análise de torque-reverso nos grupos controle (C) e tratado (G).

GMC	C e G
Valor Calculado de T	2,38
Graus de Liberdade	8,00
Media de amostra (1)	13,20
Media de amostra (2)	21,60
Probabilidade de Igualdade	4,32*

*Significante ao nível de 5% < α = 0,05 >

Tabela 3: Análise semi-quantitativa. Médias percentuais das imunomarcações obtidas nas diferentes regiões nos períodos de 15 e 40 dias nos grupos C e G.

Período	Proteína	C (Controle)			G (Tratado)		
		Cortical Superior	Medular	Cortical Inferior	Cortical Superior	Medular	Cortical Inferior
15 dias	OPG	20%	6,6%	20%	20%	33,3%	46,6%
	RANKL	26,6%	6,6%	46,6%	56,6%	20%	20%
	Osteocalcina	6,6%	6,6%	13,3%	46,6%	20%	60%
40 dias	OPG	43,3%	46,6%	33,3%	20%	20%	20%
	RANKL	6,6%	20%	60%	56,6%	33,3%	46,6%
	Osteocalcina	26,6%	40%	46,6%	56,6%	56,6%	66,6%

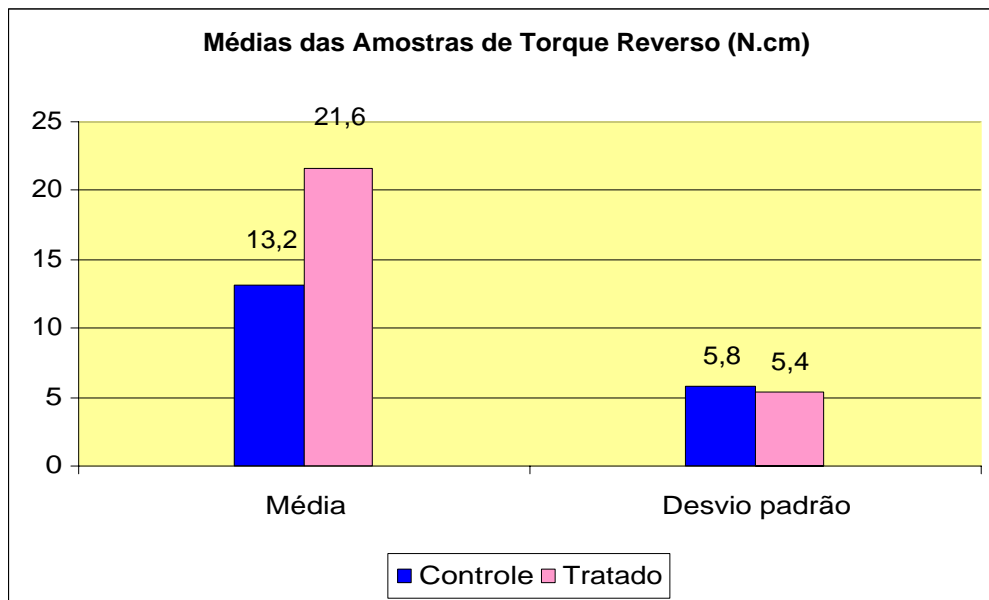


Gráfico 1: Média das amostras de torque reverso dos grupos C e G no período de 60 dias ($a = 0,05$).

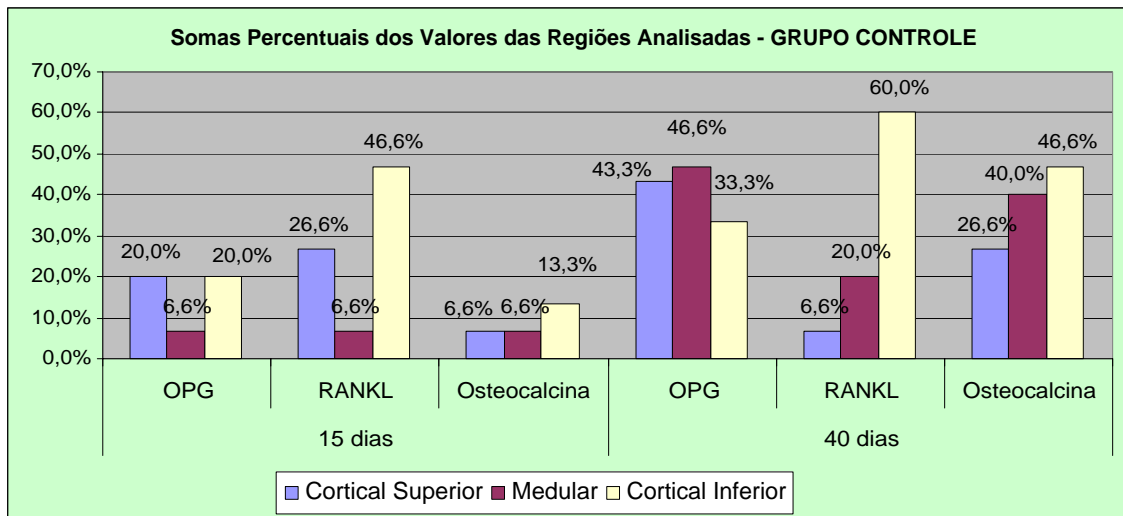


Gráfico 2: Somas percentuais dos valores das imunomarcações das regiões analisadas no grupo controle (C). Período de 15 e 40 dias.

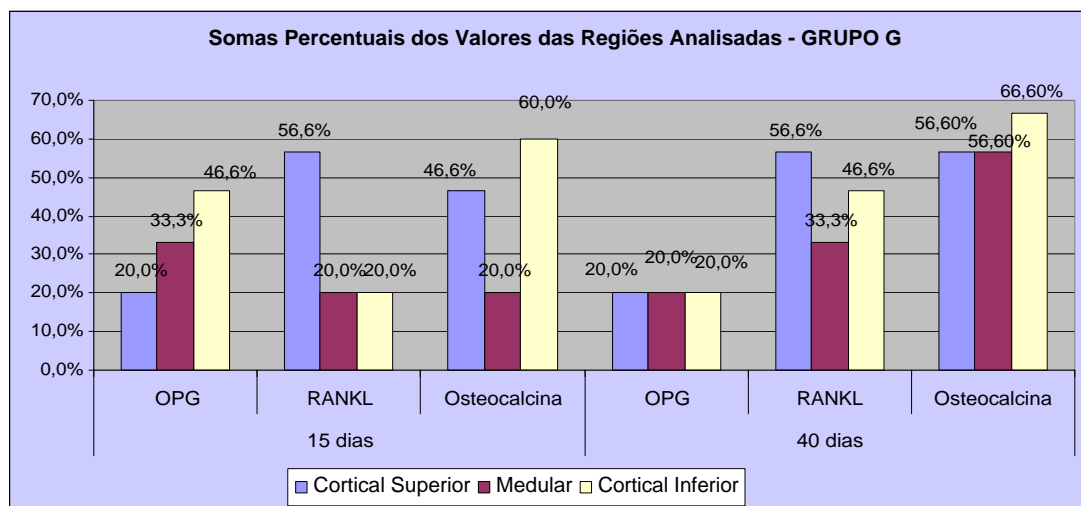


Gráfico 3: Somas percentuais dos valores das imunomarcações das regiões analisadas no grupo tratado (G). Período de 15 e 40 dias.

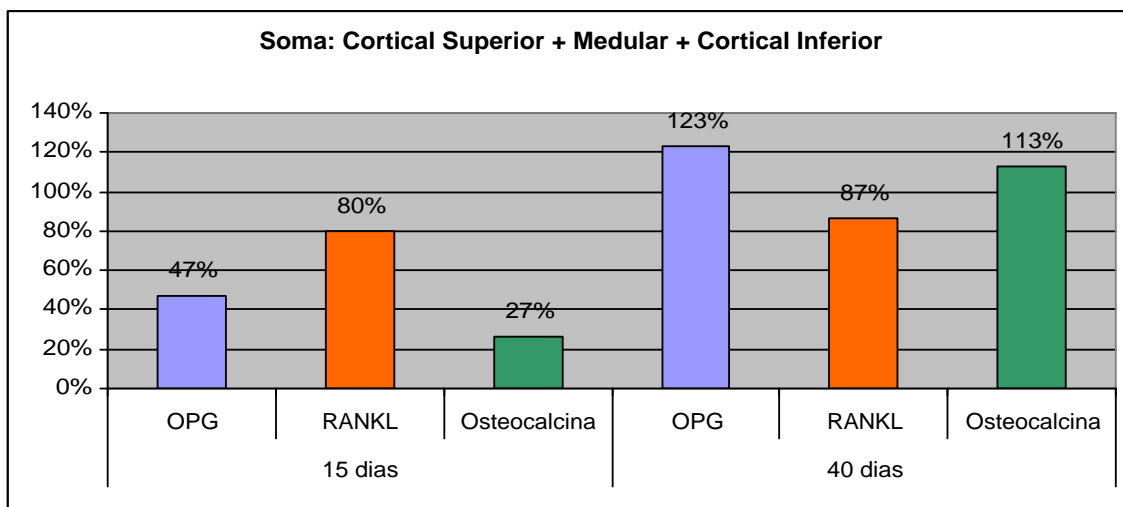


Gráfico 4: Somas percentuais dos valores obtidos das imunomarcações nas diferentes regiões analisadas nos períodos de 15 e 40 dias no grupo tratado (G).



Fig. 1 – Anti-sepsia.

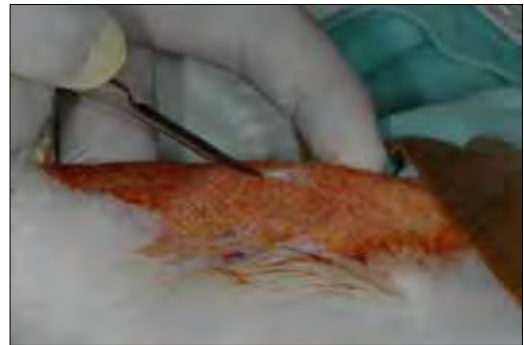


Fig. 2 – Incisão.



Fig. 3 - Retalho cirúrgico descolado.



Fig. 4 – Fresagem do leito receptor.



Fig. 5 – Leito receptor.



Fig. 6 - Coleta de osso raspado (G).



Fig. 7 – Polímero PLA/PGA adicionado à superfície do implante (G).



Fig. 8 – Implante instalado após adição do polímero misturado ao osso autógeno raspado (G).



Fig. 9 – Implante após 60 dias de instalação (G).



Fig. 10 - Preparo do tecido ósseo para encaixe de chave para torquímetro manual (G).

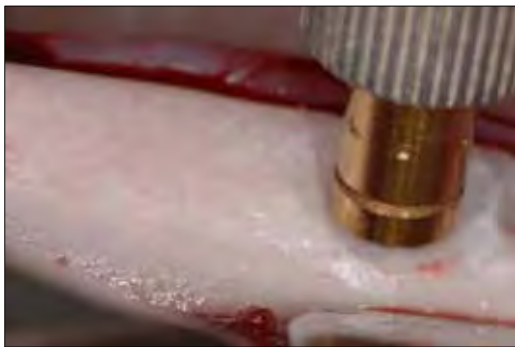


Fig. 11 - Remoção do implante por torque reverso (G).



Fig. 12 - Negativo da área onde foi instalado o implante após sua remoção (G).



Fig. 13 – Soro de burro para o processamento imunohistoquímico.

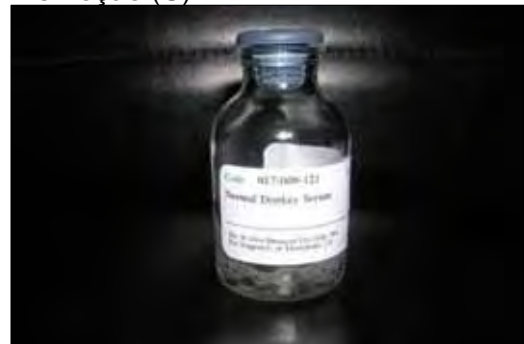


Fig. 14 – Soro Donkey.



Fig. 15 – Coloração das lâminas por DAB.



Fig. 16 – Álcoois e corantes para coloração HE.



Fig. 17 – Bloco ósseo (tibia) contendo o implante incluído em resina Metil Metacrilato.



Fig. 18 – Desgaste da peça incluída em resina em aparelho abrasivo Exakt®.



Fig. 19 – Adesão do corpo de prova na lâmina no aparelho do Sistema Exakt®.



Fig. 20 – Corte da peça em aparelho do Sistema Exakt®.



Fig. 21 – Corantes VA/AS utilizados na coloração das lâminas cortadas pelo Sistema Exakt®.



Fig. 22 – Microscópio acoplado ao computador onde foram capturadas as imagens de todas as lâminas obtidas das amostras.

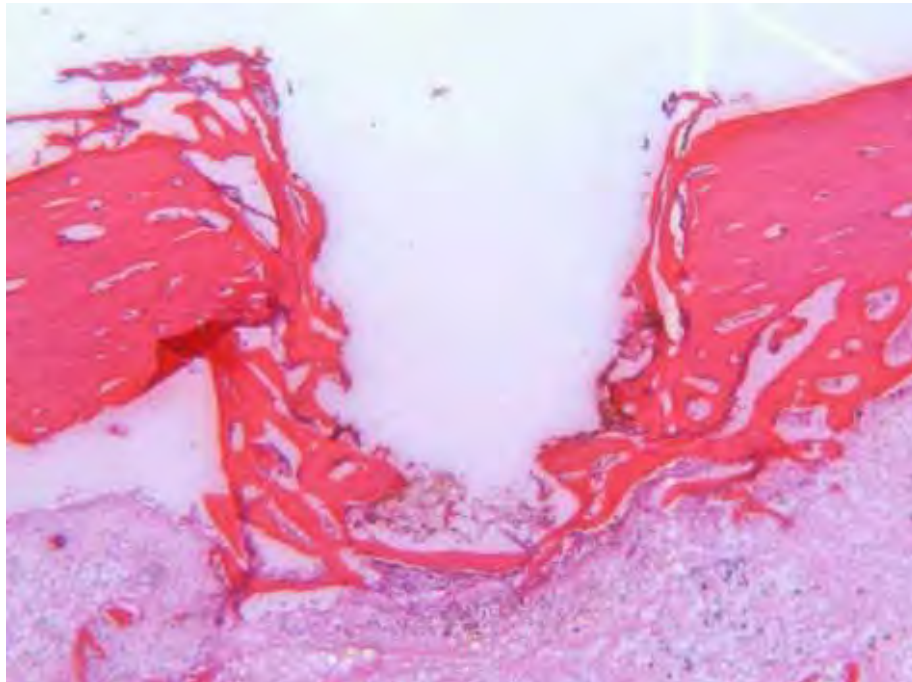


Fig. 23: Tecido ósseo neoformado celularizado acompanhando toda a interface. HE, 40X, 40 dias (G).

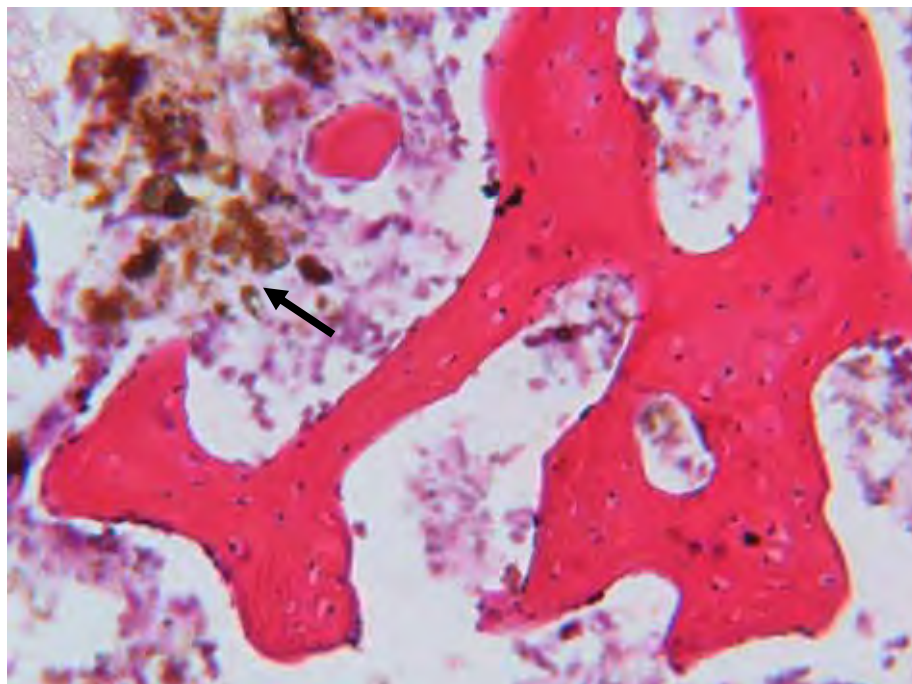


Fig. 24: Nota-se a presença de tecido ósseo em neoformação, além de restos do biomaterial (PLA/PGA) visualizado no canto superior direito da lâmina. HE, 400X, 15 dias (G).



Fig. 25: Aspecto da interface no grupo controle apresentando-se com tecido ósseo apenas na cortical superior e tecido conjuntivo adjacente à interface. HE, 40X, 15 dias (C).

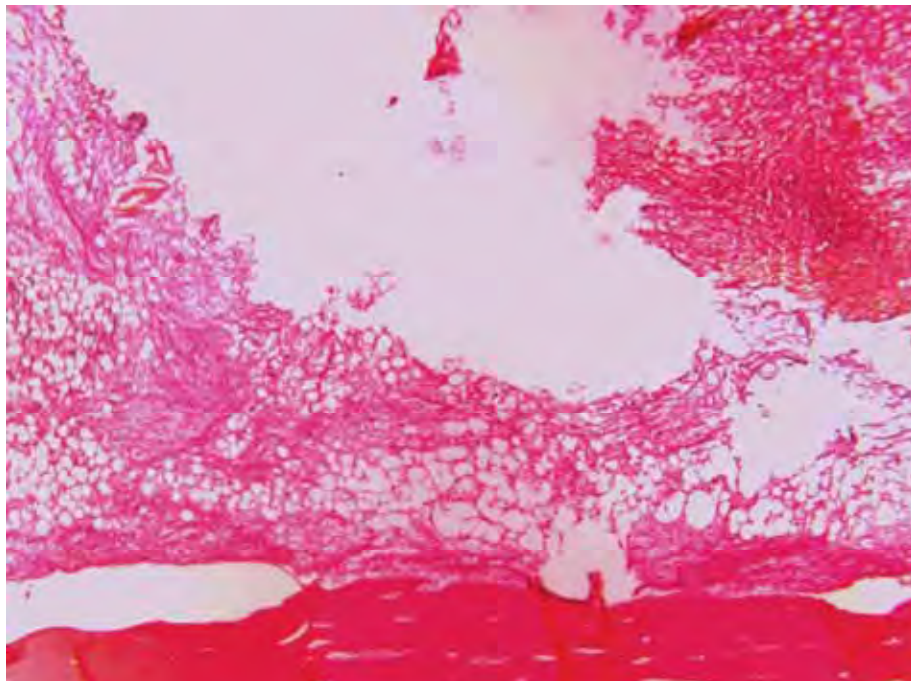


Fig. 26: Aspecto da interface no grupo controle. Tecido ósseo apenas na cortical inferior e tecido imaturo preenchendo a interface. HE, 40X, 15 dias (C).

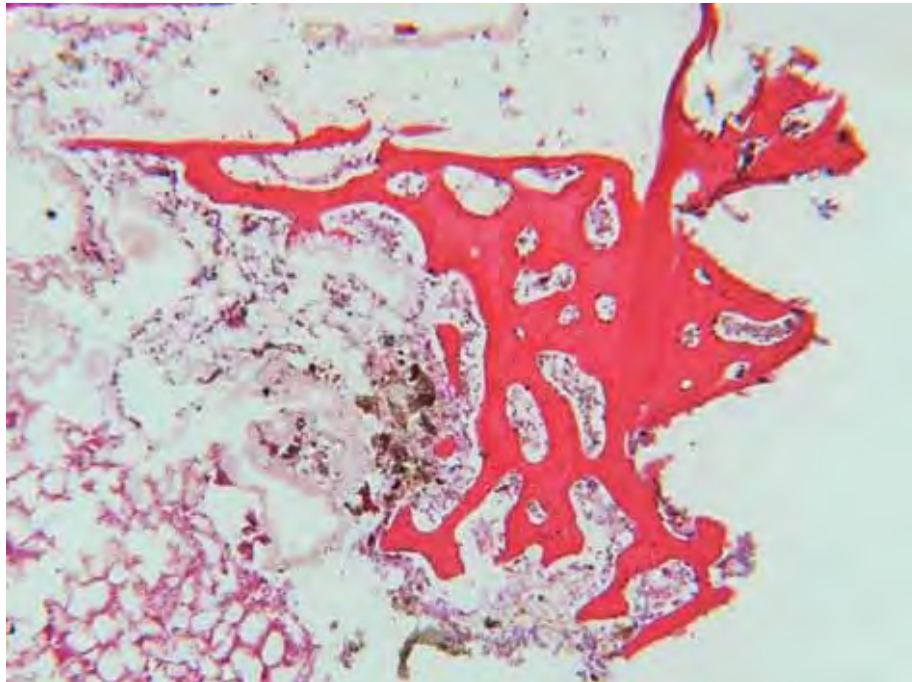


Fig. 27: Tecido ósseo neoformado na interface óssea. HE, original 100X, 40 dias (G).

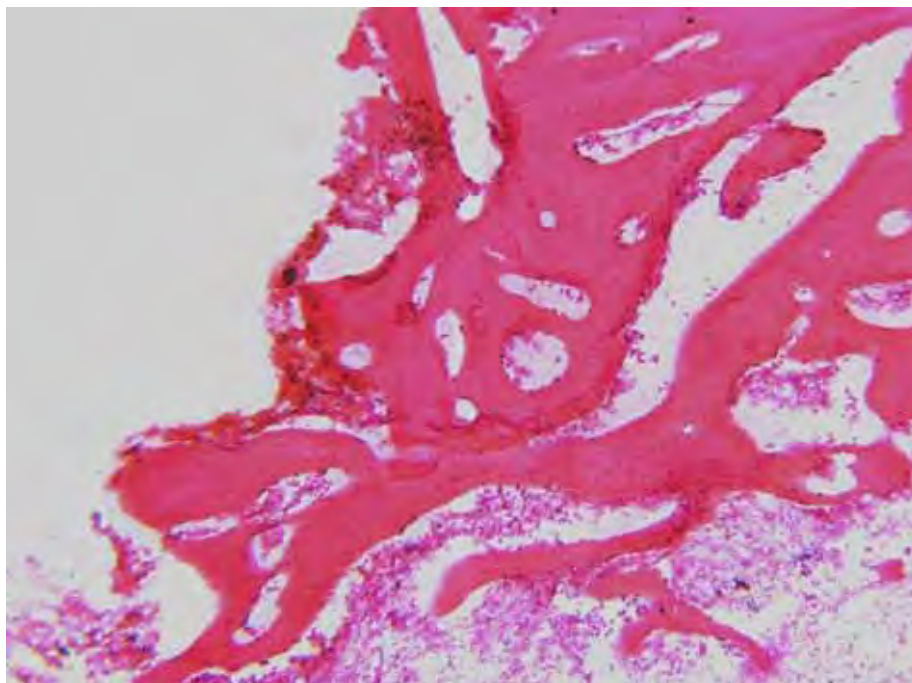


Fig. 28: Tecido ósseo neoformado e tecido imaturo (conjuntivo) entre a interface e o osso. HE, 40X, 40 dias (C).

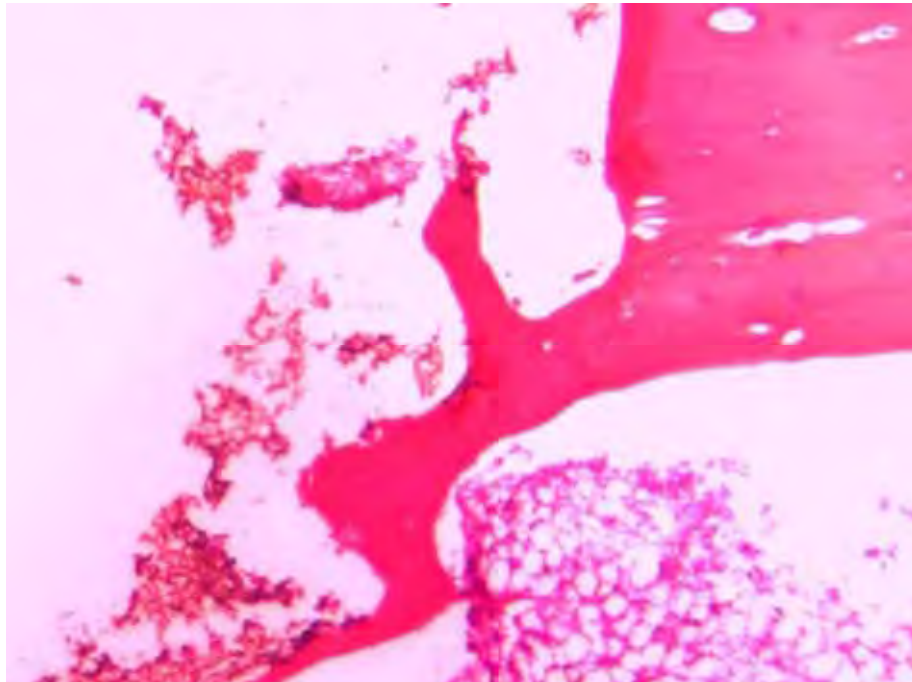


Fig. 29: Camada estreita de tecido ósseo na interface próxima a cortical superior no grupo controle. HE, 40X, 40 dias (C).

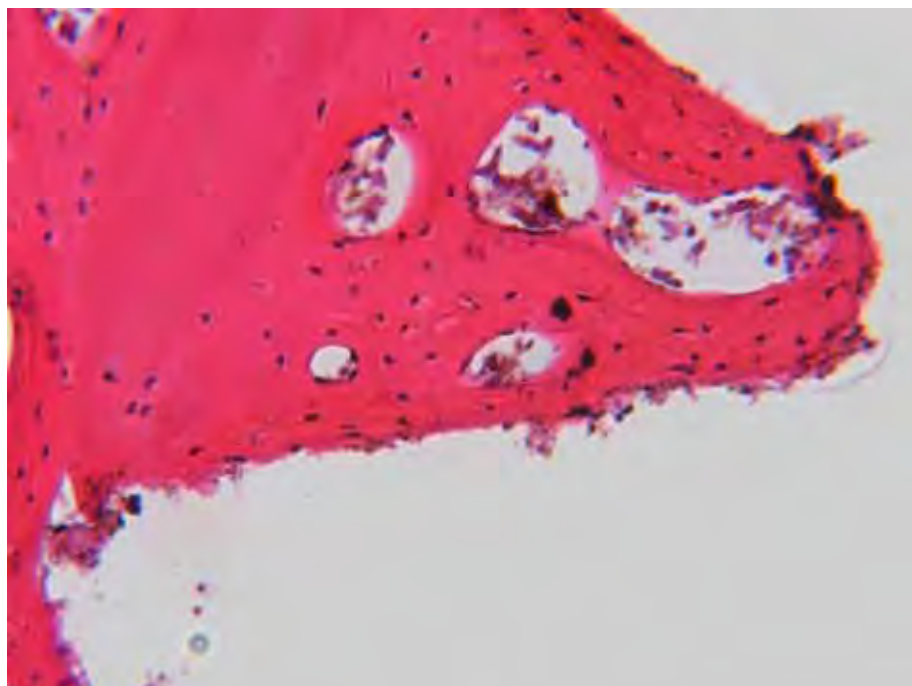


Fig. 30: Tecido ósseo na região ocupada pelo pico e vale do implante no grupo tratado. Nota-se as áreas de osso compacto acompanhando a interface e a ausência do biomaterial. HE, original 400X, 60 dias (G).

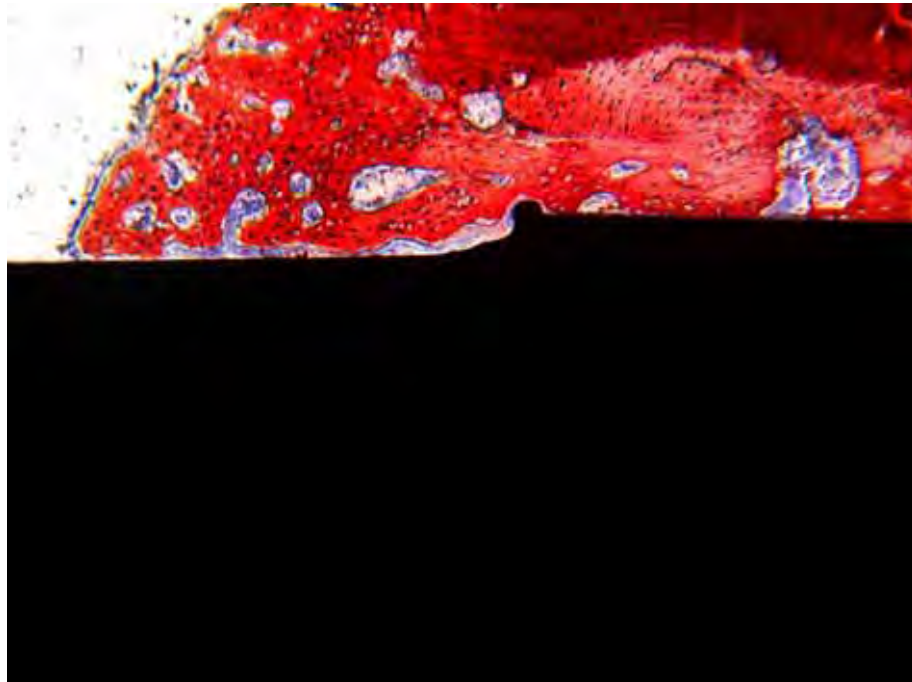


Fig. 31: Tecido ósseo neoformado, celularizado, corado pelo VA, em contato com a superfície do implante na área da cortical superior. VA/AS, 400X, 60 dias (G).

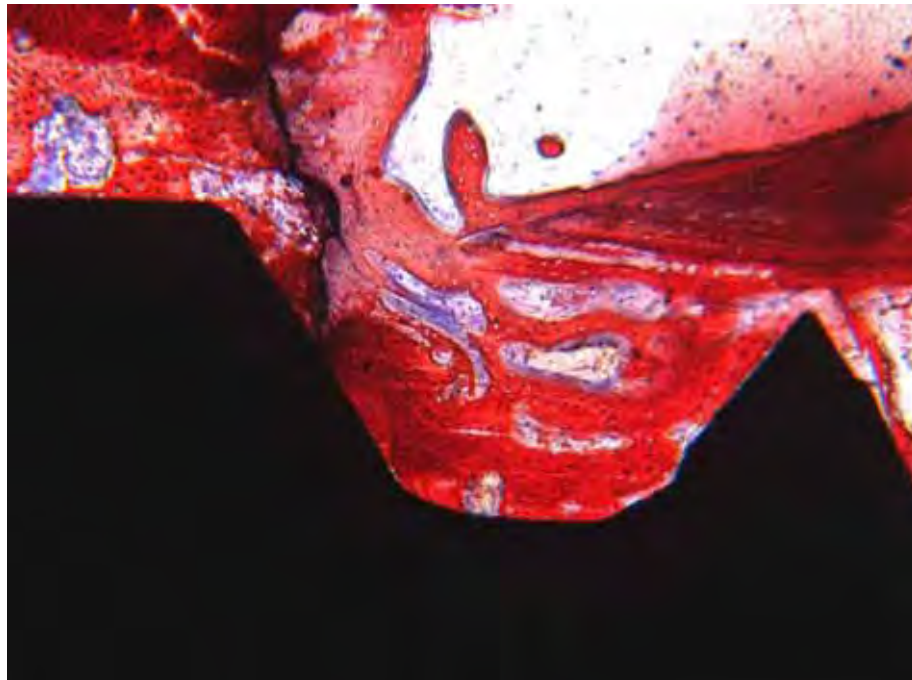


Fig. 32: Tecido ósseo neoformado, celularizado, corado pelo VA, em contato com a superfície do implante na área das espiras do implante. VA/AS, 100X, 60 dias (G).

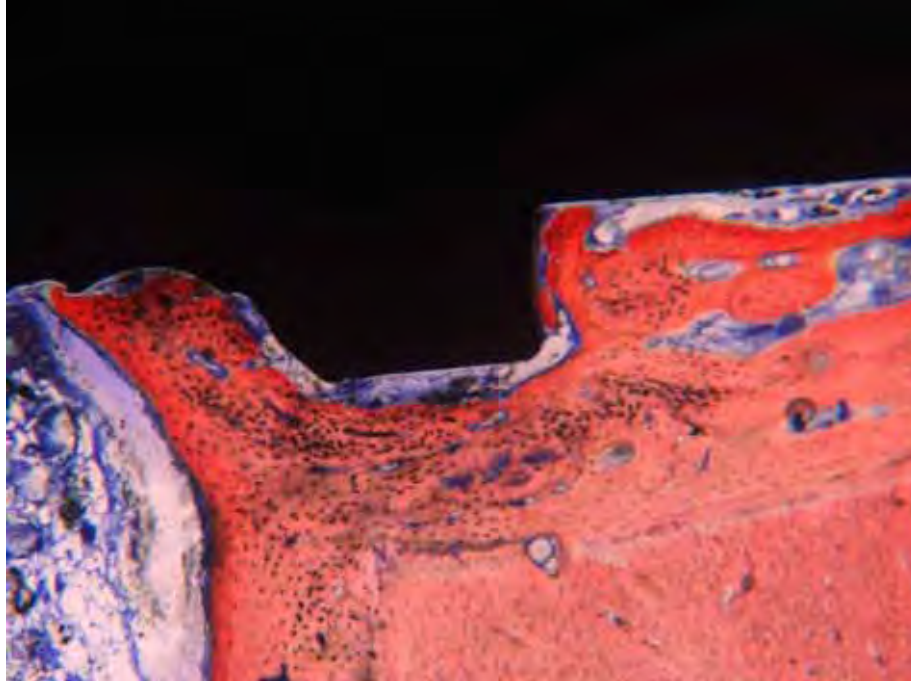


Fig. 33: Tecido ósseo em neoformação celularizado, corado pelo VA e áreas de tecido conjuntivo coradas pelo AS em contato com a superfície do implante. VA/AS, 400X, 60 dias Grupo Controle (C).

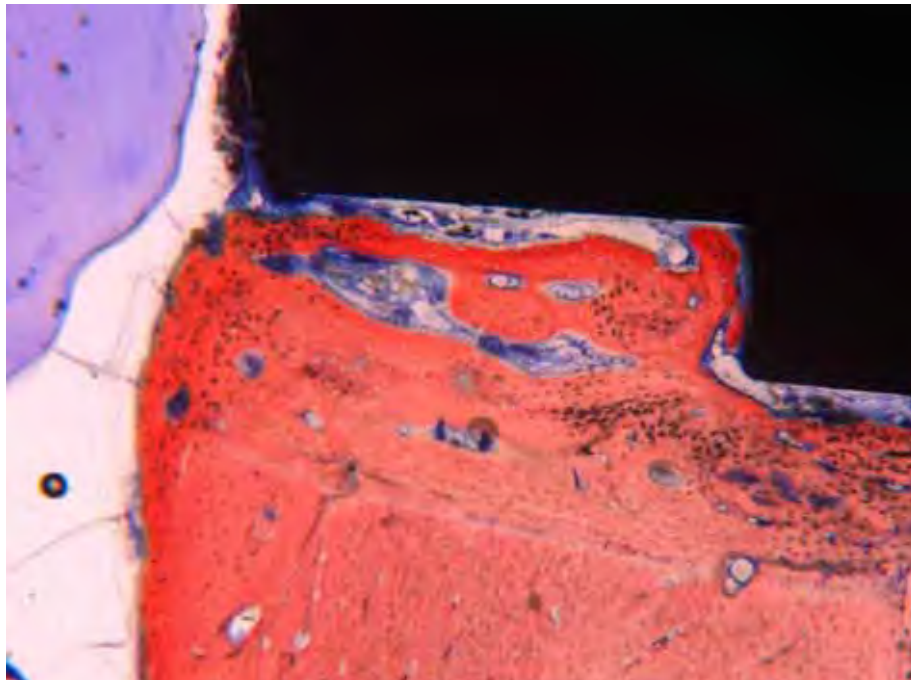


Fig. 34: Tecido ósseo corado pelo VA contendo inúmeros osteócitos. VA/AS, 400X, 60 dias Grupo Controle (C).

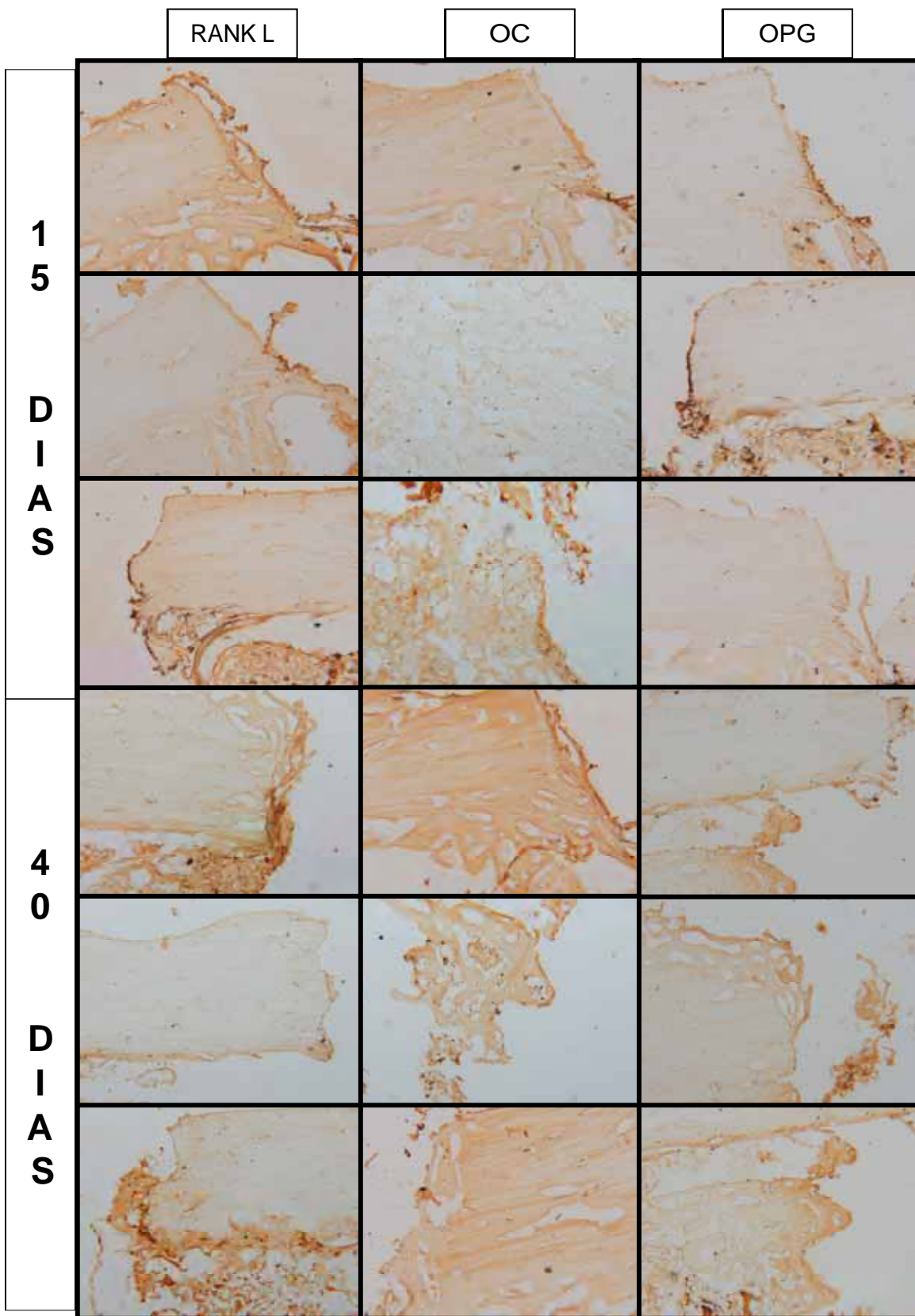


Fig. 35: Quadro contendo as imagens das lâminas do grupo tratado (G) para análise qualitativa das imunomarcações.

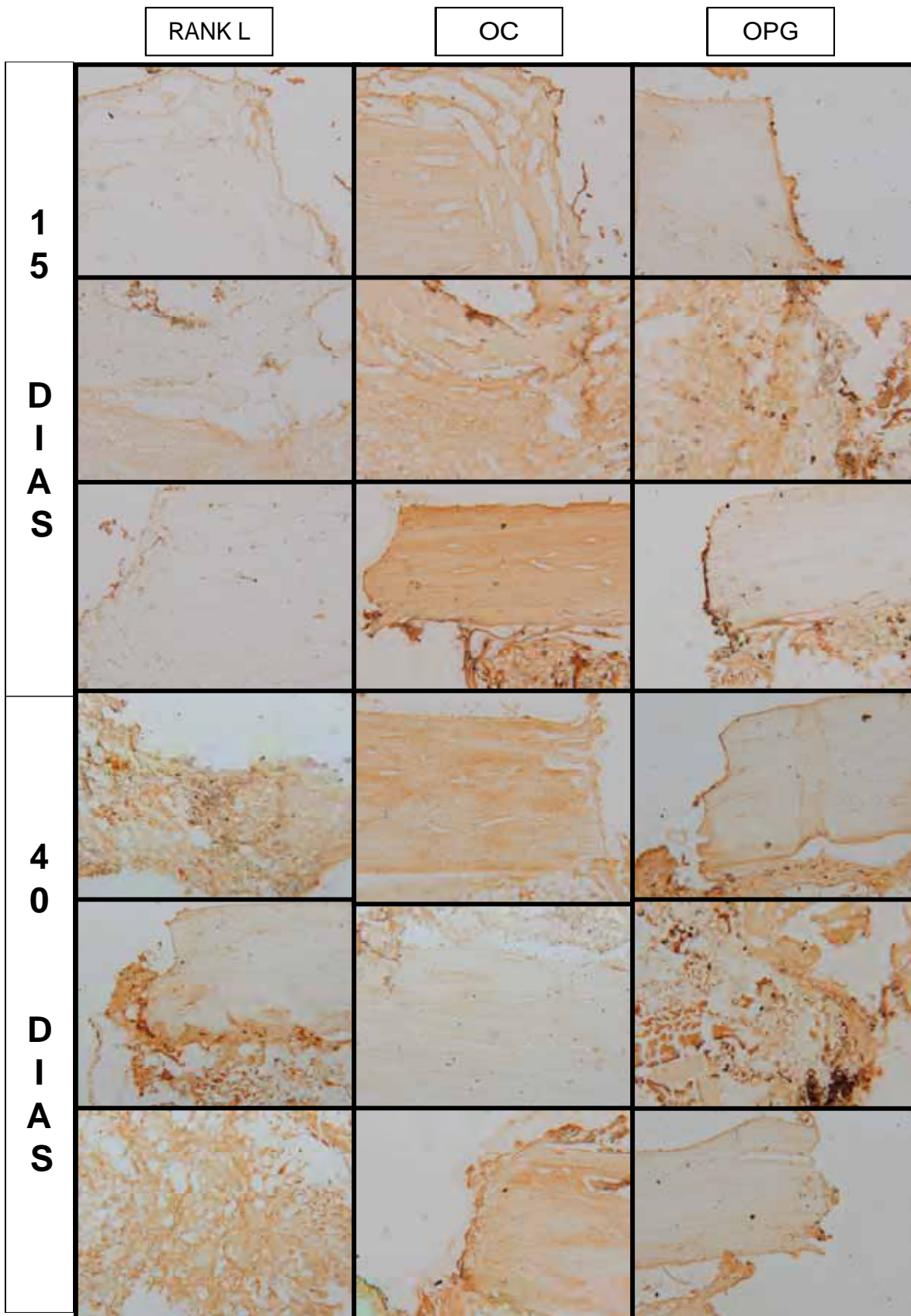


Fig. 36: Quadro contendo as imagens das lâminas do grupo controle (C) para análise qualitativa das imunomarcações.

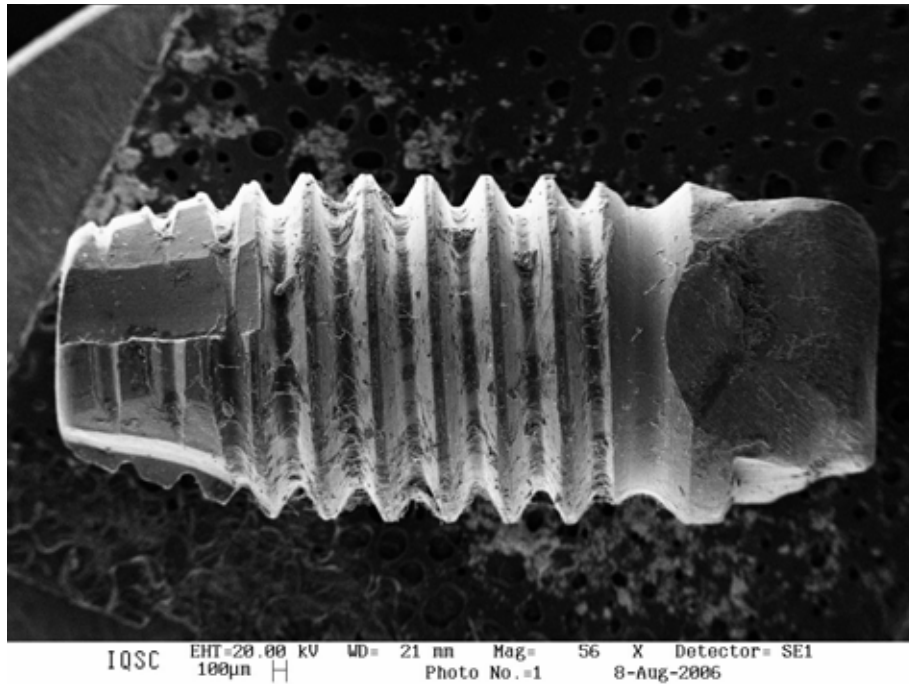


Fig. 37: MEV. Grupo controle (C). Período 60 dias. Observa-se algumas áreas contendo osso aderido à superfície do implante. (originais de 56X).

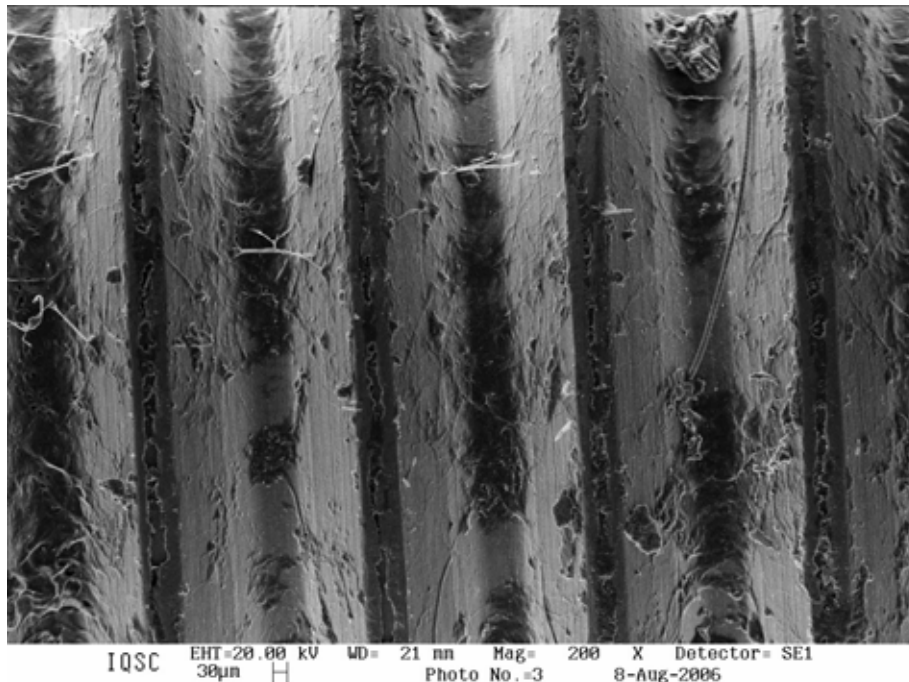


Fig. 38: MEV. Grupo controle (C). Período 60 dias. Observa-se a presença de algum tecido ósseo aderido à superfície do implante. (originais de 200X).

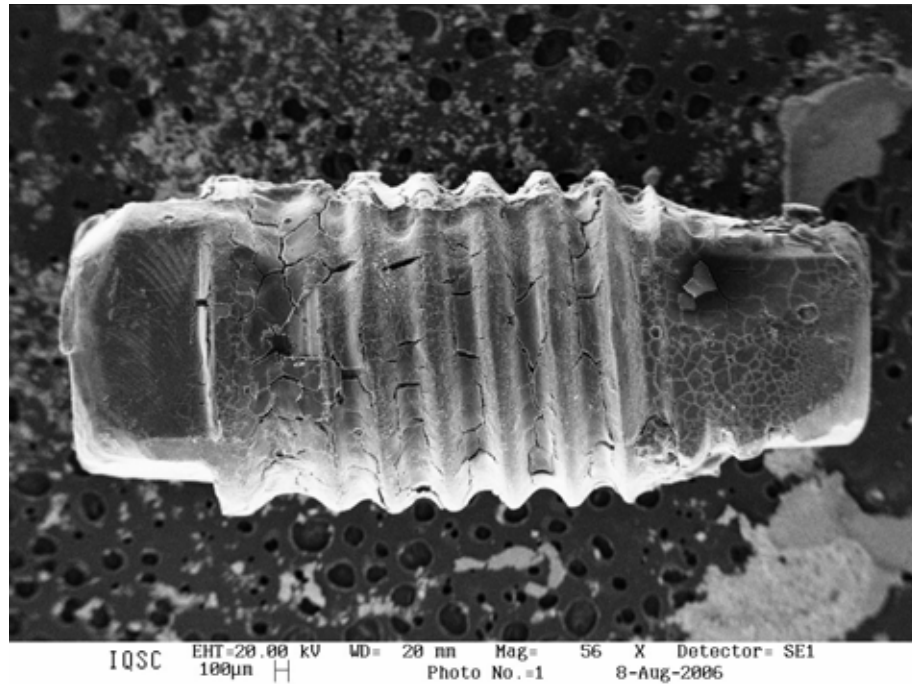


Fig. 39: MEV. Grupo tratado (G2). Período 60 dias. Observa-se a presença de osso em contato em toda a superfície do implante. (originais de 56X).

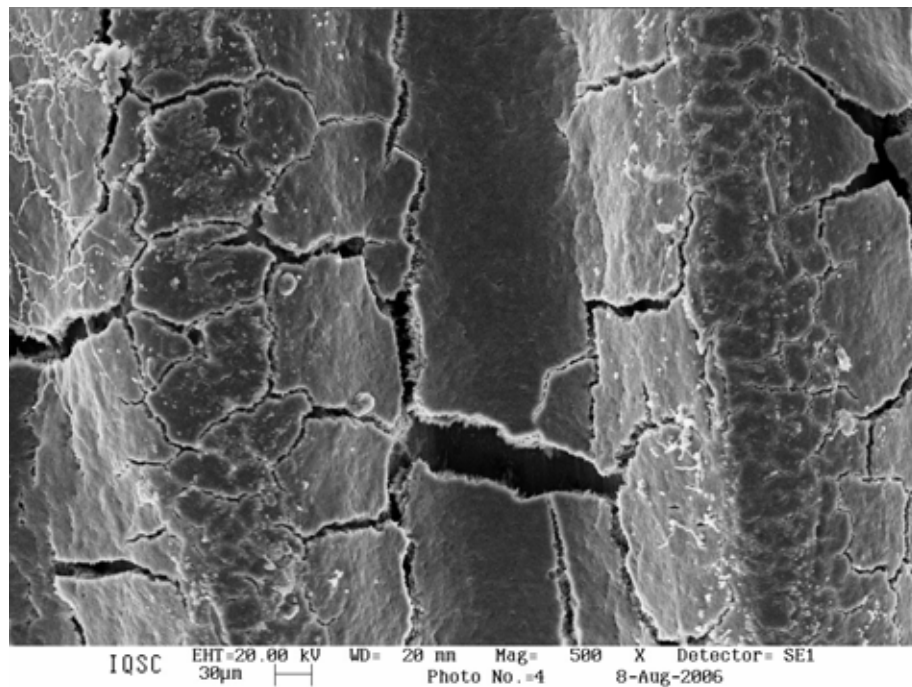


Fig. 40: MEV. Grupo tratado (G2). Período 60 dias. Numa vista mais aproximada observa-se a presença de tecido ósseo em íntimo contato com as espiras do implante. (originais de 500X).

ANEXO 4: CERTIFICADO DO CEP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba




COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OSTEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES APÓS PERDA DE ANCORAGEM PRIMÁRIA. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO, IMUNOHISTOQUÍMICO E MECÂNICO APÓS ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM COELHOS" sob responsabilidade de IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR e LILIANE SCHEIDEGGER DA SILVA ZANETTI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 23 de agosto de 2005, de acordo com o protocolo nº 84/05.

Araçatuba, 23 de agosto de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente