

*Thallita Pereira Queiroz*

Avaliação do copolímero de ácido polilático  
e poliglicólico ao redor de implantes  
osseointegráveis sem estabilidade primária.  
Análise biomecânica, histométrica e  
imunoistoquímica em coelhos

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia do campus de Araçatuba - UNESP,  
para obtenção do Título de "Mestre em  
Odontologia" - Área de concentração em Cirurgia  
e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba, SP  
2006



# *Dedico este trabalho...*

## *A Deus*

Desde o primeiro instante que comecei o Senhor se fez presente em todos os momentos, firmes ou trêmulos. E, passo a passo, posso sentir a tua mão transmitindo-me por meio de sua luz a segurança necessária para enfrentar meu caminho e seguir. Grandes foram as lutas, maiores as vitórias. Sempre estiveste comigo! Muitas vezes pensei que este momento não chegaria, tive vontade de recuar. No entanto, Tu sempre estiveste presente, fazendo da derrota uma vitória e da fraqueza uma força. Com Tua ajuda e por Tua misericórdia me encorajei nos momentos de dificuldade. Sei que não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada. Senhor, agradeço por ter me dado condições, apoio e força para que percorresse essa jornada. A Sua grandiosidade me fez substituir as incertezas pela segurança e o medo pela vitória.

## *Aos meus pais, Tadeu e Sírlane,*

meus amigos verdadeiros, pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por todas as vezes em que abdicaram de seus sonhos para a realização dos meus. Admiro muito vocês e agradeço a Deus diariamente por ter me dado pais tão maravilhosos, que souberam me educar com amor, fé, compreensão, apoio e com grandes atitudes. Vocês são exemplos de vida para mim e espero que eu possa retribuir pelo menos parte de todo o amor que dedicaram e que continuam dedicando a mim e ao meu irmão. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês! Amo muito vocês!

## *Ao meu irmão, Thales,*

pelo carinho, amizade, compreensão e apoio durante toda a vida. Apesar de ser mais novo e de estarmos distantes, aprendo muito com você, principalmente com sua alegria constante, perseverança, dedicação a tudo que faz, esforço e competência. Você me surpreende a cada dia! Amo muito você!

## *Ao Rogério,*

pela paciência, carinho, companheirismo e incansável ajuda na realização deste trabalho. Por sua compreensão diante da minha ausência em diversos momentos importantes e por seu incentivo, que me impulsionou e me motivou a lutar por meus objetivos. Você é muito especial!



# Agradecimentos Especiais...

Ao meu orientador, *Professor Dr. Eduardo Hochuli Vieira*, grande exemplo de competência e dedicação. Obrigada pela oportunidade oferecida desde a graduação, pelos preciosos ensinamentos, pela paciência, carinho, pelo incentivo constante, por ter acreditado em mim e ter me proporcionado a realização de um grande sonho. Você foi o responsável pelo interesse e amor que sinto pela cirurgia. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora, *Professora Dra. Roberta Okamoto*, pela amizade, carinho, compreensão e ajuda incansável. Exemplo de determinação, competência, dedicação e amor à pesquisa. Muito obrigada pelo conhecimento transmitido e por me aceitar como aprendiz. Prossiga sempre abrindo as portas para aqueles que a procuram. Você foi além de grande mestre, minha amiga e conselheira em todos os momentos. Obrigada pela paciência e incentivo constantes! Você é muito especial! Obrigada por tudo!

Ao *Professor Dr. Idélmo Rangel Garcia Júnior*, não só pelo profissional dedicado, seguro e competente que é, mas, principalmente pelo ser humano que me compreendeu, ensinou e incentivou em todos os momentos. Que Deus continue abençoando-o e iluminando-o para que outras pessoas possam passar pela experiência pela qual passei, de tê-lo como mestre e amigo. Você é e será sempre um grande exemplo de competência, amor e dedicação à profissão. Obrigada pela

paciência que sempre demonstrou diante de minhas indagações, questionamentos e “teimosia”. Admiro muito você!

Ao *Professor Osvaldo Magro Filho*, pela competência e pelos preciosos conhecimentos transmitidos. Obrigada pela amizade, confiança, carinho, incentivo e por considerar os alunos da pós-graduação seus verdadeiros amigos, sempre se preocupando conosco e dividindo inúmeros momentos de alegria. Obrigada!

Ao *Professor Dr. Michel Saad Neto* pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência. O senhor é um exemplo concreto e marcante do que é “ser professor”.

À *Professora Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah* e à *Professora Dra. Alessandra Marcondes Aranega*, pelo carinho, dedicação, companheirismo, paciência, confiabilidade e disponibilidade em ajudar sempre. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo e por torcerem sempre pelo sucesso dos alunos da pós-graduação.

Ao *Professor Dr. Tetuo Okamoto*, pelo exemplo de caráter, humildade e dedicação. O curso de pós-graduação e respectivos alunos devem muito ao senhor. Obrigada pelo carinho, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao *Professor Dr. Wilson Roberto Poí*, pelo carinho com que recebe os alunos da pós-graduação e pelo exemplo de competência, caráter e extrema dedicação.

Obrigada pelas inúmeras palavras de carinho e incentivo, pela preocupação constante, pela amizade, pelo afeto e por sempre atenuar os problemas com simplicidade e tornar os obstáculos transponíveis. Você possui uma capacidade incrível de identificar os conflitos, preocupações e aflições de seus alunos e ajudá-los de maneira carinhosa e intensa. Obrigada por ser *PROFESSOR!*

À secretária da cirurgia e grande amiga *Cleíde Lemes da Silva*, pelo carinho, doação, amizade, respeito, ajuda e preocupação constante. Agradeço a Deus pela oportunidade de conhecer uma pessoa tão especial como você. Obrigada pelos momentos compartilhados, pela ajuda incansável, pela torcida, pensamentos positivos e estímulo constante. Você é exemplo de que o amor e a dedicação à profissão tornam a vida mais alegre, atenuam os problemas e conduzem ao sucesso. Obrigada por me considerar como uma filha e saiba que você será eternamente minha “mãe” de Araçatuba. Você é muito especial!

À minha grande amiga e companheira de todos os momentos da pós-graduação *Érica Alves Gomes*, pelo carinho, por ouvir com paciência meus incansáveis desabafos, pela compreensão, pelo incentivo constante, pela torcida por minha vitória, pela preocupação comigo e por compartilhar inúmeros momentos de alegria e tristeza, sempre ao meu lado e disposta a me ajudar no que fosse necessário. Admiro muito sua dedicação e competência!

Ao meu colega de mestrado e grande amigo *Francísley Ávila Souza* pela paciência, dedicação, competência, prestatividade e caráter. Apesar dos inúmeros momentos de dificuldades por nós enfrentados, você sempre se manteve otimista e

paciente, não me deixando perder o entusiasmo e a motivação. Obrigada pelos preciosos conhecimentos transmitidos e pela incansável ajuda em todas as etapas da pós-graduação.

À minha colega de pós-graduação e grande amiga *Jéssica Lemos Gulinelli*, pela cumplicidade tanto na vida profissional quanto na vida pessoal. Sempre disposta a ajudar! Sua alegria e energia contagiam a todos, sua dedicação e vontade de trabalhar me incentivaram e sua tranqüilidade me ajudou em muitos momentos de “estresse”. Obrigada por tudo!

À minha colega de mestrado e amiga *Camíla Benez Rícieri*, pelo carinho, compreensão, incentivo e estímulo constante. Obrigada pelos momentos agradáveis compartilhados!

Aos amigos da graduação: *Ellen Cristina Gaetti Jardim e Leonardo Perez Faverani* pelo auxílio nas pesquisas, nas clínicas de graduação e pós-graduação, pela amizade, pelo carinho e incentivo. Parabéns pela dedicação, vontade de vencer, garra e determinação. Torço muito por vocês!

À minha família, em especial às minhas avós *Ana e Luzia* e à minha madrinha *Jussara* pelas incansáveis orações, pelo amor, carinho, pela preocupação e torcida.

À *família do Rogério*, pelo carinho, compreensão e incentivo.



# *Agradecimentos...*

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, sob direção do Professor Dr. Paulo Botacin e vice-direção do Professor Dr. Célio Percinoto pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Aos *amigos do curso de Doutorado em Cirurgia*: André Dotto Sottovia, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Eleonor Álvaro Garbin, Leandro de Carvalho Cardoso, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Natasha Magro Érnica, Thais da Silveira Rodrigues e Walter Betoni Júnior pelos ensinamentos e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos *amigos do curso de Mestrado em Cirurgia*: Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Francisley Ávila Souza, Flávia Priscila Pereira, Jéssica Lemos Gulinelli e Marcos Heidy Guskuma. Aprendi muito com cada um de vocês. Obrigada pelos momentos compartilhados, pela ajuda, carinho e amizade.

Aos *amigos da pós-graduação em Odontologia*: Cláudia Letícia, Daniel, Edmar, Ellen, Eloá, Érica, Fernanda, Francisco (Quico), João, Lilian, Luciana, Marceli, Márcia, Patrícia, Ronan, Sheila, Thaís Mara e Túlio, pela agradável convivência e momentos compartilhados.

Aos amigos e estagiários da Disciplina de Cirurgia, *Heloísa, Pedro e Renan*, pelo carinho, respeito e agradável convivência.



À mestranda em Clínica Integrada *Eloá Rodrigues Luvizutto*, pela ajuda na parte experimental da dissertação, pela amizade, paciência e carinho.

À aluna do curso de Graduação *Thalyta Ribeiro Neves da Cruz* (Thalytinha) pela valiosa ajuda na realização do processamento imunoistoquímico e pelo carinho de sempre.

Ao doutorando da área de Prótese, *Lucas Fernando Tabata*, pela amizade, incentivo, torcida e principalmente pela alegria contagiante.

Aos *alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, pelo respeito, credibilidade e confiança depositados aos alunos da pós-graduação, permitindo-nos realizar nosso grande sonho de atividade acadêmica. Aprendemos muito com vocês!

Ao aluno de Doutorado em Periodontia da UNESP – Araraquara, *Rafael Silveira Faeda*, pela amizade, paciência, disponibilidade e grande ajuda na utilização do Exakt para o corte das peças deste experimento.

Ao *Fabrcio Xavier de Oliveira e à Lelaine de Oliveira Nicoletti* toda a colaboração e prestatividade no cuidado aos animais utilizados neste experimento, bem como pela valiosa e eficiente ajuda durante a parte experimental deste trabalho.

Aos *Docentes da Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP*: Professores Doutores Eduardo Hochuli Vieira, Mário Francisco Real Gabrielli, Roberto Henrique Barbeiro e Valfrido Antônio Pereira Filho e Professora Doutora Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli, pelo exemplo de competência e dedicação. Obrigada por minha formação, pela credibilidade e pelo carinho.

Aos *Docentes da Disciplina de Clínica Integrada*: Professores (as) Doutores (as) Celso, Daniela, Denise, José Carlos, Poi e Sônia Regina pelo carinho e atenção constantes.

Aos *Docentes da Disciplina de Histologia*: Professores (a) Doutores (a) Edílson Ervolino, Roelf Justino Cruz Rizzolo e Alaíde, pela disponibilidade e auxílio na utilização do microscópio de captura de imagens.

Ao *Professor Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada*, pela gentileza de ceder o Biotério do Curso de Medicina Veterinária da UNESP para que pudéssemos manter os animais utilizados em nosso experimento, pela torcida e incentivo constantes e principalmente pelo carinho e atenção com que sempre nos recebeu.

Ao *Professor Dr. Élcio Marcantonio* pelo exemplo de competência, humildade e dedicação à cirurgia. Obrigada pela ajuda, carinho, incentivo e preciosa contribuição ao crescimento da Disciplina de Cirurgia.

Ao *Professor Dr. Élcio Marcantonio Júnior* pela confiança, credibilidade, pelo incentivo e pela gentileza em permitir a utilização do Laboratório do Exakt da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Ao *Professor Dr. José Sílvio Govone*, do Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computacional, IGCE e Centro de Estudos Ambientais da UNESP – Rio Claro, pela valiosa ajuda na compreensão estatística de parte deste trabalho.

Ao *Professor Dr. Romeu Magnani*, pela realização dos testes estatísticos deste trabalho e auxílio precioso em sua compreensão.

Ao *Professor Dr. Anselmo Colombo de Alencar* pela ajuda no desenvolvimento do biomaterial e na realização da microscopia eletrônica de varredura, além do incentivo constante ao nosso desenvolvimento.

Aos *funcionários do Laboratório de Cirurgia e amigos*: Bernadete Maria Nunes Kimura, Maria Dirce Colli Boatto e Gilmar Martins de Oliveira pela ajuda em diversas etapas da dissertação, pelo carinho, paciência, compreensão e agradáveis momentos compartilhados.

Aos *funcionários da Biblioteca*: Cláudio, Fernando, Ivone, Izamar, Júnior, Luzia, Maria Cláudia pela disponibilidade e carinho.

À funcionária da Biblioteca *Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti*, pela valiosa ajuda na correção da Dissertação e pela atenção e carinho sempre dispensados.

Aos *funcionários da Pós-graduação*: Diogo, Marina e Valéria, pela paciência, disponibilidade, alegria e admirável interesse em nos ajudar sempre.

À *Conexão – Sistema de Próteses*, em nome do Dr. Rodolfo Cândida Alba Júnior pela gentileza e disponibilidade em ceder os implantes e chaves utilizadas no experimento deste trabalho, bem como pela confiança em nós depositada.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela concessão da Bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro, indispensáveis para a realização deste trabalho.



# *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*



À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa.

Processo 05/53706-1



# *Resumo*

Queiroz TP. Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA) ao redor de implantes osseointegráveis sem estabilidade primária. Análise biomecânica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos (dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2006.

A proposta deste estudo foi avaliar a associação do PLA/PGA ao redor de implantes osseointegráveis instalados sem estabilidade primária, por meio da análise biomecânica, histométrica e da expressão das proteínas OPG, RANKL, OC e COL-I. Vinte e cinco coelhos receberam 2 implantes de 2,6/ 6,0mm na tíbia direita em leitões receptores preparados com 3,0mm. Um defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo e o outro com o PLA/PGA previamente à instalação dos implantes. A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos de 5, 15, 40 e 60 dias pós-operatórios e o teste biomecânico foi realizado nos períodos de 40 e 60 dias. As peças foram submetidas ao processamento imunoistoquímico e coradas por HE. As peças de 5 animais do período de 60 dias foram desgastadas e coradas com vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Não houve diferenças nos valores de torque-reverso na comparação entre os grupos e os períodos avaliados. A análise das imunomarcações não evidenciou diferença estatística entre os grupos para cada período. Houve evidência estatística de maior expressão de RANKL no período de 15 dias no grupo tratado em relação à expressão de colágeno I. A proteína RANKL apresentou mais percentuais de marcações celulares acima de 50% quando comparada às outras proteínas. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à extensão linear de contato entre tecido ósseo e implante. Conclui-se que o

copolímero apresentou biocompatibilidade e permitiu neoformação óssea em contato com o implante. Além disso, ocorreu o processo de osseointegração em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária dos implantes.

Palavras-chave: Implante dentário. Substitutos ósseos. Imunohistoquímica. Biomecânica.





# *Abstract*

Queiroz TP. Evaluation of the polylactic and polyglycolic acid copolymer (PLA/PGA) around of osseointegrated implants without primary stability. Biomechanics, histometric and immunoistochemistry analysis in rabbits [dissertation]. Araçatuba: São Paulo State University; 2006.

The purpose of this study was to evaluate the association of the PLA/PGA around of osseointegrated implants installed without primary stability, through the biomechanics, histometric analysis and of the OPG, RANKL, OC and COL-I proteins expression. Twenty-five rabbits received 2 implants of 2.6 / 6.0mm in the right tibia in receptor beds prepared with 3,0mm. A defect was fulfilled with blood clot and the other with the PLA/PGA, previously to the implants installation. The euthanasia of 25 animals was performed at 5, 15, 40 and 60 days and the biomechanical test was performed at 40 and 60 days. The samples followed immunoistochemistry processing and were stained with HE. The pieces of 5 animals of 60 days were trimmed and stained with alizarin red and Stevenel's blue. There were not differences in the torque-reverse between the groups and periods. The analysis of the immunolabelings did not evidence statistic difference between the groups for each period. There was statistics evidence of increase in the RANKL expression in the 15 days period, in the treated group, when compared to the COL-I. The RANKL protein presented more percentiles of immunolabelings above 50% when compared to the other proteins. There was no statistics difference between the groups regarding contact linear extension between bone tissue and implant. It can be concluded that the copolymer

presented biocompatibility and it allowed bone neoformation in contact with the implant. Besides, the osseointegration process happened in both groups, even in the absence of primary stability of the implants.

Keywords: Dental implants. Bone substitutes. Immunohistochemistry. Biomechanics.



# *Lista de Figuras*

- Figura 1- Grupo controle. Instalação do implante de 2,6mm/3,0mm, sem 78  
estabilidade primária no leito receptor, preenchido com o coágulo  
sanguíneo.
- Figura 2- Grupo tratado. Instalação do implante de 2,6mm/3,0mm, sem 78  
estabilidade primária no leito receptor, preenchido com o PLA/PGA.
- Figura 3- Tibia direita. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado 78  
recobrando o módulo de rebordo dos implantes durante a reabertura.
- Figura 4- Período de 40 dias após a reabertura da tibia direita. Verifica-se 78  
menor inclinação do implante do grupo tratado (seta) quando  
comparado ao controle.
- Figura 5- Representação gráfica de médias de torque reverso (colunas), em 79  
N.cm, e de intervalos de 95% de confiança para as médias  
populacionais (barras verticais).
- Figura 6- Representação gráfica de % de ocorrências de médias percentuais 79  
de marcações celulares para as proteínas analisadas,  
independentemente do período de avaliação, para ambos os grupos.
- Figura 7- OPG – Grupo controle. Período de 5 dias. Imunomarcações 80  
positivas para osteócitos presentes na cortical superior (setas)  
(DAB, original de 160X).
- Figura 8: OPG – Grupo controle. Período de 40 dias. Imunomarcações desta 80  
proteína na cortical superior (setas). Nota-se discreta redução na  
expressão proteica (DAB, original de 63X).

- Figura 9- RANKL – Grupo controle. Período de 40 dias. 80  
Imunomarcações positivas para osteócitos (setas) na cortical superior, em maior quantidade quando comparada à OPG. (DAB, original de 160X).
- Figura 10- RANKL – Grupo tratado. Período de 5 dias. Imunomarcações 80  
positivas para linfócitos (setas) na área medular (DAB, original de 160X).
- Figura 11- RANKL - Grupo controle. Período de 40 dias. Redução na 81  
imunomarcação desta proteína na área medular (setas) (DAB, original de 63X).
- Figura 12- OC – Grupo controle. Período de 60 dias. Imunomarcação 81  
desta proteína em osteócitos da cortical superior (setas). Nota-se a marcação de fundo (\*) (DAB, original de 200X).
- Figura 13 – COL-I – Grupo controle. Período de 15 dias. Imunomarcação 81  
significativa desta proteína na área medular (DAB, original 160X).
- Figura 14 - COL-I – Grupo controle. Período 60 dias. Redução na 81  
imunomarcação (setas) desta proteína na área medular (DAB, original de 200X).
- Figura 15- Corte evidenciando a ausência de marcações inespecíficas 81  
na cortical superior (controle negativo) (DAB, original de 200X).
- Figura 16 - RANKL – Grupo controle. Período de 5 dias. 81  
Imunomarcações positivas para osteócitos na cortical inferior (controle positivo) (DAB, original de 200X).
- Figura 17- Grupo controle. Período de 5 dias. Presença de osteócitos 82

(setas) bem marcados na cortical superior (HE, original de 200X).

- Figura 18- Grupo tratado. Período de 15 dias. Presença de osteócitos (setas) bem marcados na cortical inferior (HE, original de 200X). 82
- Figura 19- Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea acompanhando o formato das espiras (setas) do implante. Nota-se a presença de inúmeros osteócitos nas corticais (HE, original de 100X). 82
- Figura 20 – MEV. Grupo tratado. Período de 60 dias. Implantes recobertos por tecido ósseo neoformado (original de 1000X). 83
- Figura 21 - Grupo controle. Período de 60 dias. Implantes recobertos por tecido ósseo neoformado. (original de 1000X).
- Figura 22 - Grupo controle. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado celularizado (setas) em contato com a superfície do implante na área do módulo de rebordo (vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X). 84
- Figura 23 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea no pico e vale da rosca do implante (setas). Destaca-se a presença de tecido conjuntivo, corado pelo azul de Stevenel, em contato com a superfície do implante (vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X). 84
- Figura 24 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea em contato com a superfície do implante no módulo de rebordo e presença de osteócitos (setas). Nota-se presença de tecido 85

conjuntivo nessa interface (vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X).

- Figura 25 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Presença de tecido conjuntivo com inúmeros osteoblastos (setas) na área medular, envolto pelo remanescente do PLA/PGA (\*) (vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X). 85
- Figura 26 – Medidas de torque-reverso para os grupos controle e tratado, nos períodos de 40 e 60 dias. Não houve correlação entre os grupos analisados. 104
- Figura 27 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína OPG. 104
- Figura 28 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína RANKL. 105
- Figura 29 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína OC. 105
- Figura 30 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os 106

períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína COL-I.

- Figura 31 - Incisão nos planos dérmico e muscular de aproximadamente 3 cm de comprimento, na porção medial da tíbia direita. 111
- Figura 32 - Incisão periosteal na porção medial da tíbia direita. 111
- Figura 33 – Leito receptor dos implantes, após descolamento em espessura total. 111
- Figura 34 – Fresas utilizadas na confecção dos defeitos ósseos (Conexão, SP, Brasil). 111
- Figura 35 – Início do preparo do leito receptor do implante com a fresa lança. Primeiro defeito. 111
- Figura 36 –. Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa helicoidal de 2,0mm. Primeiro defeito 111
- Figura 37 – Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa piloto de 2,0mm/3,0mm. Primeiro defeito. 112
- Figura 38 - Finalização do preparo do leito receptor com a fresa helicoidal de 3,0mm. Primeiro defeito. 112
- Figura 39 - Início do preparo do leito receptor do implante com a fresa lança. Segundo defeito. 112
- Figura 40 - Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa helicoidal de 2,0mm. Segundo defeito. 112
- Figura 41 - Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa piloto de 2,0mm/3,0mm. Segundo defeito. 112
- Figura 42 - Finalização do preparo do leito receptor com a fresa helicoidal de 3,0mm. Segundo defeito. 112

Figura 43 –	Leito receptor dos implantes após a confecção dos dois defeitos ósseos.	113
Figura 44 –	Instalação do implante sem estabilidade primária. Defeito preenchido com o coágulo sanguíneo.	113
Figura 45 –	Leito receptor após a instalação do implante do grupo controle.	113
Figura 46 –	Preenchimento do segundo defeito com PLA/PGA, previamente à instalação do implante.	113
Figura 47 -	Instalação do implante envolto com PLA/PGA, sem estabilidade primária.	113
Figura 48 –	Leito receptor após a instalação dos implantes.	113
Figura 49 -	Período de 15 dias. Leito receptor dos implantes, após reabertura. O módulo de rebordo dos implantes encontra-se parcialmente coberto por tecido ósseo.	114
Figura 50 -	Período de 60 dias. Leito receptor dos implantes, após reabertura. O módulo de rebordo encontra-se parcial ou totalmente coberto por tecido ósseo neformado.	114
Figura 51 -	Ostectomia realizada para exposição do módulo de rebordo do implante, durante a análise biomecânica.	114
Figura 52 -	Adaptação da chave intermediária ao módulo de rebordo do implante, para a realização do teste biomecânico.	114
Figura 53 -	Torquímetro analógico utilizado para os testes biomecânicos.	114
Figura 54 -	Cortes longitudinais obtidos em criostato e montados em lâminas gelatinizadas para o processamento imunoistoquímico.	115
Figura 55 -	Incubação do anticorpo primário, pipetando-o sobre os cortes.	115



Figura 56 -	Colocação do Paraffilm sobre os cortes para garantir um adequado contato do anticorpo com os tecidos, durante a incubação.	115
Figura 57 -	Revelação da reação imunoistoquímica utilizando-se a DAB como cromógeno. Detalhe do controle macroscópico realizado.	115
Figura 58 -	Extensão longitudinal do defeito ósseo, dividido em 3 partes. Exemplo da expressão de RANKL no grupo tratado, aos 5 dias (DAB, original de 4X).	116
Figura 59 -	Microscópio óptico acoplado à câmera de captação de imagens e conectado ao computador.	116
Figura 60 -	Software analisador de imagens IM50 exemplificando captura no aumento de 40X.	116
Figura 61 -	Grupo controle. Período de 5 dias. Observa-se a presença de células inflamatórias (setas) e a formação de tecido mesenquimal (*) (HE, original de 20X).	117
Figura 62 -	Grupo tratado. Período de 15 dias. Medular celularizada, com áreas sugestivas da presença do copolímero (*) e de formação de tecido mesenquimal (HE, original de 160x).	117
Figura 63 -	Grupo controle. Período de 15 dias. Nota-se início de formação de tecido ósseo, caminhando da cortical em direção à medular (HE, original de 63X).	117
Figura 64 -	Grupo controle. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado acompanhando o negativo da rosca do implante. Nota-se a presença de inúmeros osteócitos (setas) (HE,	117

original de 400X).

Figuras 65 – 67 –	MEV – Grupo tratado. Período de 40 dias. Observa-se osso neoformado em contato com a superfície do implante (originais de 60X, 200X e 1000X, respectivamente).	118
Figuras 68 – 71 –	MEV – Grupo tratado. Período de 60 dias. Observa-se osso neoformado em contato com a superfície do implante em maior quantidade quando comparado ao período de 40 dias (originais de 60X, 200X e 500X, respectivamente).	118
Figuras 72 – 73 -	Grupo tratado. Período de 60 dias. Mensuração do perímetro total do vale do implante por meio do Programa Imagelab 2000 e cálculo do perímetro utilizando a ferramenta “cálculo de regiões”.	119
Figuras 74 – 75 -	Grupo tratado. Período de 60 dias. Mensuração do perímetro de tecido ósseo neoformado (corado pelo vermelho de alizarina) em contato com a superfície do implante, na área do vale, por meio do Programa Imagelab 2000 e cálculo do perímetro utilizando a ferramenta “cálculo de regiões”.	119



# *Lista de Tabelas*

- Tabela 1 – Valores, médias e desvios-padrão de torque-reverso, em N.cm, 87  
para os grupos em estudo de acordo com o período de  
avaliação.
- Tabela 2 – Valores p do teste de Wilcoxon para a comparação entre os 87  
grupos controle e tratado nos períodos de avaliação para cada  
proteína.
- Tabela 3 - Freqüências de médias percentuais de expressão das 88  
proteínas, de acordo com o período de avaliação para os  
grupos: controle e tratado.
- Tabela 4 – Valores dos postos médios do teste de Kruskal-Wallis para as 88  
proteínas analisadas no período de 15 dias, para o grupo  
tratado.
- Tabela 5 - Valores dos postos médios do teste de Kruskal-Wallis para as 89  
proteínas analisadas no período de 15 dias, para o grupo  
controle.
- Tabela 6 – Valores percentuais das médias de extensão linear de contato 89  
entre tecido ósseo/implante e entre tecido conjuntivo/implante  
para os grupos controle e tratado.
- Tabela 7 - Análise de Variância dos valores de torque-reverso aplicada 103  
para a comparação das médias, com a estatística de Welch.
- Tabela 8 - Freqüências absolutas e freqüências percentuais (entre 106

parênteses) de médias (%) de imunomarcações celulares para cada proteína, independentemente do período de avaliação, para os grupos: controle e tratado.

- Tabela 9 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 107 entre as proteínas analisadas, para o período de 5 dias, no grupo controle.
- Tabela 10 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 107 entre as proteínas analisadas, para o período de 15 dias, no grupo controle.
- Tabela 11 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 108 entre as proteínas analisadas, para o período de 40 dias, no grupo controle.
- Tabela 12 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 108 entre as proteínas analisadas, para o período de 60 dias, no grupo controle.
- Tabela 13 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 109 entre as proteínas analisadas, para o período de 5 dias, no grupo tratado.
- Tabela 14 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 109 entre as proteínas analisadas, para o período de 15 dias, no grupo tratado. Note a diferença estatisticamente significativa entre as proteínas RANKL e COL-I, no teste de comparações múltiplas.
- Tabela 15 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 110 entre as proteínas analisadas, para o período de 40 dias, no grupo tratado.

Tabela 16 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas 110  
entre as proteínas analisadas, para o período de 60 dias, no  
grupo tratado.



# *Lista de Abreviaturas*

COL-I -	Colágeno tipo I, Collagen type I
DAB -	diaminobenzidina
EDTA -	Ácido etileno-diamino-tetracético
HE -	Hematoxilina e eosina, hematoxilin and eosin
MEV -	Microscopia eletrônica de varredura
OC -	Osteocalcina, osteocalcin
OPG -	Osteoprotegerina, osteoprotegerin
PBS -	Tampão fosfato salina
PGA -	Ácido Poliglicólico
PLA -	Ácido Polilático
PLA/PGA -	Copolímero de ácido polilático e poliglicólico, polylactic and polyglycolic acid copolymer
PMMAL -	Polimetil metacrilato lento
PVPI -	Polivinil Pirrolidona Iodo
RANKL -	Receptor Ativador Nuclear Kappa-B Ligante, Receptor Activator Nuclear Kappa-B Ligand
TNF -	Fator de Necrose Tumoral



# *Sumário*

1 Introdução	36
2 Material e Método	42
3 Resultados	51
4 Discussão	58
Referências	66
Figuras	78
Tabelas	87
Anexos	90
Anexo A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	91
Anexo B - Normas da Revista <b>Clinical Oral Implants Research</b> , selecionada para a publicação do artigo	92
Anexo C - Protocolo de reação imunoistoquímica em tecido ósseo	101
Anexo D – Complementação das tabelas e gráficos das análises estatísticas	103
Análise Biomecânica	103
Análise Imunoistoquímica	104
Anexo E – Ilustração do procedimento cirúrgico	111
Anexo F – Ilustração da Análise Biomecânica	114
Anexo G – Ilustração do Processamento Imunoistoquímico	115
Anexo H – Ilustração da Análise imunoistoquímica	116

Anexo I – Ilustração da Análise Histológica	117
Anexo J – Ilustração da MEV	118
Anexo L – Ilustração da Análise Histométrica	119





# 1 Introdução\*

Os implantes dentários osseointegráveis representam uma excelente alternativa na reabilitação bucal e nas reconstruções maxilofaciais, entretanto, o sucesso a longo prazo depende de um íntimo contato do tecido ósseo com o implante, pela osseointegração (Olsen et al. 2005).

A presença de alterações ósseas como fenestrações, defeitos residuais, alvéolos pós-exodônticos, diástases entre osso/implante por sobrefresagem e de tecido ósseo de baixa qualidade podem afetar o prognóstico desta modalidade de tratamento (Gotfredsen et al. 1991; Piattelli et al. 1997).

Os enxertos autógenos são considerados os mais indicados para o preenchimento de defeitos ósseos (Lekholm et al. 1999), no entanto, sua utilização nem sempre é viável devido à necessidade de segunda cirurgia para sua remoção, à morbidade do sítio doador e à limitada disponibilidade em casos de grandes reconstruções (Becker et al. 1994, 1998; Trejo et al. 2000; Raghoobar et al. 2001). Buscando evitar ou minimizar os inconvenientes dos enxertos autógenos, perspectivas favoráveis têm sido descritas quanto à associação dos enxertos autógenos com os biomateriais (Mellonig & Bowers 1990) ou somente com o uso de substitutos ósseos (Rutherford et al. 1992).

O desenvolvimento de substitutos ósseos sintéticos como os biomateriais são de considerável importância, pois evitam complicações potencialmente imunogênicas relacionadas aos derivados de fontes biológicas (Quattlebaum et al. 1988). Dentre esses materiais destacamos os poliméricos bioabsorvíveis, compostos por macromoléculas de alto peso molecular, que têm recebido atenção especial por

---

\* Normas da revista *Clinical Oral Implants Research*. (Anexo B).

sua biocompatibilidade, boas propriedades biomecânicas e fácil manuseio (Pietrzak et al. 1997).

Os polímeros degradáveis mais comuns são os poli  $\alpha$  hidroxí-ésteres, dentre os quais destacam-se os ácidos polilático, poliglicólico e seus copolímeros (PLA/PGA), amplamente utilizados em engenharia tecidual (Lo et al. 1996; Ishaug-Riley et al. 1998; Hasegawa et al. 2002; Lu et al. 2003; Luciano et al. 2003) e que têm como uma das principais vantagens a não necessidade de remoção dos materiais implantados, evitando a segunda cirurgia (Matsumoto et al. 2005).

Esse material é produzido de diferentes maneiras para cirurgias ósseas, tais como dispositivos de fixação (Ferretti & Reyneke 2002; Peltoniemi et al. 2002), membranas (Crump et al. 1996; Hämmerle & Lang 2001), substitutos ósseos, carregadores para alterar fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas ou proteínas de adesão (El-amin et al. 2003; Saito et al. 2003). Vários estudos têm mostrado efeitos benéficos desses copolímeros em animais e humanos (Holy et al. 2003; Serino et al. 2003; Nair & Schug 2004), destacando sua biocompatibilidade, biodegradação e suas propriedades osteocondutoras, pois funcionam como arcabouço para a substituição da matriz extracelular (Imbronito et al. 2005; Rimondini et al. 2005).

Dentro desse contexto é que a utilização de biomateriais em implantodontia, principalmente em casos em que o leito receptor do implante apresenta quantidade e qualidade óssea inadequadas, se torna importante.

Vários fatores interferem na formação tecidual peri-implantar e subsequente mineralização, destacando-se o envolvimento mecânico local na interface entre o osso e o implante (Szmukler-Moncler et al. 1998; Olsen et al. 2005). Portanto, a estabilidade primária do implante tem sido destacada como pré-requisito para obtenção da osseointegração (Bischof et al. 2004).

A densidade óssea, a proporção de osso cortical e medular, a qualidade do tecido ósseo, a presença de alvéolos pós-exodônticos e de preparos inadequados do leito receptor (sobrefresagem) devem ser avaliados devido à influência dos mesmos sobre a estabilidade primária do implante (Nkenke et al. 2003).

A estabilidade resulta do contato direto entre o osso ao redor do implante e a sua superfície, podendo ser dividida em primária e secundária, sendo a primeira determinada pelo modelo do implante, técnica cirúrgica, qualidade óssea e por defeitos anatômicos do leito receptor. Já a estabilidade secundária é dependente da resposta tecidual ao implante e à cirurgia e do reparo ósseo. Experimentalmente tem sido mostrado que o crescimento ósseo pode ocorrer na presença de uma micromovimentação relativa entre o implante e o osso hospedeiro, entretanto em casos onde ela é excessiva, pode ocorrer a formação de uma camada fibrosa ao redor do implante (Pilliar et al. 1986; Soballe et al. 1992).

A interface implante/enxerto ósseo constitui uma situação de reparo complexa, pois envolve a revascularização, a incorporação do enxerto e a integração dos implantes (Sjöström et al. 2005).

O osso é um tecido complexo composto de células, matriz colagenosa e elementos inorgânicos. Seu crescimento, desenvolvimento e manutenção são processos altamente regulados (Nijweide et al. 1986). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (Ducy et al. 2000).

A adsorção de proteínas, incluindo componentes da matriz extracelular na superfície do metal é o primeiro passo da interação tecido ósseo/implante. Essas proteínas formam a matriz óssea e são conhecidas por exercerem um importante papel no processo de ossificação, contribuindo com o aumento da atividade celular

ao redor de implantes e conseqüente osseointegração (Ohsawa et al. 2000; Nagai et al. 2002; Rammelt et al. 2004).

Dentre essas proteínas destaca-se a OPG, também conhecida como fator inibitório de osteoclastogênese. A OPG é considerada um receptor solúvel secretado e é produzida por diferentes tecidos e tipos celulares, incluindo osteoblastos, células do estroma medular ósseo, fibroblastos e linfócitos T. Ela atua como um receptor decodificador por ligação e neutralização da RANKL, inibindo a maturação e a reabsorção óssea osteoclástica e, portanto, regulando a densidade óssea (Simonet et al. 1997; Kong et al. 1999; Woo et al. 2002; Crotti et al. 2004; Rogers & Eastell 2005).

A proteína RANKL foi descoberta durante pesquisas para o ligante da OPG, sendo constituinte da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Alguns tipos celulares expressam esta proteína, incluindo osteoblastos, células do estroma ósseo, células endoteliais e linfócitos T ativados (Khosla 2001; Rogers & Eastell 2005). A expressão relativa de OPG e RANKL é crítica na regulação da atividade osteoclástica e na perpetuação do ciclo de remodelação óssea (Suda et al. 1999).

Outra importante proteína no processo de ossificação é a OC, a mais abundante proteína não-colagenosa no osso, que indica o processo de mineralização na formação óssea, implementada pela calcificação dos osteócitos na camada de colágeno. Sua concentração sérica é um marcador sensível da formação óssea, correlacionada com índices histomorfométricos (Lieberman et al. 2002; Thorwarth et al. 2005).

O COL-I é a principal proteína estrutural componente do tecido conjuntivo e constitui a proteína inicial básica no processo de formação óssea. Ela forma um arcabouço para migração e inserção de células nos tecidos, modulando a diferenciação celular e a morfogênese (Bhatnagar et al. 1999; Gungormus 2004).

Tendo em vista a importância da estabilidade primária do implante na biomecânica e conseqüente osseointegração, bem como da expressão de proteínas da matriz óssea durante esse processo, e considerando as alterações anatômicas naturais ou induzidas no tecido ósseo, a associação de biomateriais reabsorvíveis ao sítio de instalação dos implantes se torna importante. Dentre os quais destacamos o PLA/PGA, que poderia contribuir com a estabilidade temporária dos implantes pela modificação biomecânica da interface osso/implante, além de favorecer a osteocondução.

Portanto, a proposta deste estudo foi avaliar a associação do PLA/PGA ao redor de implantes osseointegráveis instalados sem estabilidade primária, por meio da análise biomecânica, histométrica e da expressão das proteínas OPG, RANKL, OC e COL-I no processo de ossificação.



## 2 Material e Métodos

Foram utilizados 25 coelhos machos brancos (Nova Zelândia), variação *albinus*, com idade de aproximadamente 5 meses e peso corporal de 3 a 4 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho, Primor) e água “*ad libitum*”, em condições climatizadas e água canalizada, no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob o protocolo número 70/05 (anexo A).

### **Cirurgia Experimental**

Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico.

Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 3 cm de comprimento na porção medial

da tíbia direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Foi utilizado um motor elétrico com velocidade final de 1600 r.p.m. para confecção dos defeitos ósseos e um contra-ângulo redutor de 16:1 (Kavo, Santa Catarina, Brasil), O preparo dos leitos receptores foi iniciado com uma fresa lança para delimitar a localização dos implantes e romper a cortical óssea. Em seguida foi utilizada a fresa helicoidal de 2,0mm, a piloto de 2,0mm/3,0mm e finalmente a fresa helicoidal de 3,0mm (Conexão, São Paulo, Brasil), seqüencialmente, com irrigação por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) durante toda a preparação. Os defeitos confeccionados envolveram somente a cortical óssea superior (monocorticais).

Foram instalados 50 implantes de titânio comercialmente puro, de superfície usinada (Conexão, São Paulo, Brasil), com diâmetro de 2,6 mm e altura de 6,0 mm, esterilizados por raios gama. Estes implantes apresentam o módulo de rebordo quadrado para encaixe da chave de adaptação do torquímetro (Conexão, São Paulo, Brasil).

Cada animal recebeu dois implantes na face lateral da porção medial da tíbia direita, respeitando-se uma distância de aproximadamente 5 mm entre os mesmos, constituindo dois grupos experimentais:

**Grupo Controle** – Foi instalado um implante de titânio comercialmente puro, de superfície usinada (Conexão, São Paulo, Brasil) na porção medial da tíbia direita após osteotomia de 3,0 mm de diâmetro e 6,0 mm de profundidade. O implante foi inserido no local da osteotomia preenchido apenas com coágulo sanguíneo, sem estabilidade primária (figura 1).

**Grupo Tratado** – Foi instalado um implante na porção medial da tíbia direita, associado ao copolímero de PLA (70%) PGA (30%) na proporção de 1:1 (VETEC Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) aquecido entre 100 e 150°C, na consistência de gel, após osteotomia de 3,0 mm de diâmetro e 6,0mm de profundidade (figura 2).

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses. A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos de 5, 15, 40 e 60 dias pós-operatórios, com 5 animais em cada período de 5, 15 e 40 dias e 10 animais no período correspondente a 60 dias.

### **Análise Biomecânica**

Nos períodos correspondentes à eutanásia dos animais dos grupos de 40 e 60 dias foram realizadas as análises de torque reverso dos implantes instalados na tíbia dos coelhos.

Os animais foram sedados seguindo protocolo descrito anteriormente e foi realizada uma nova incisão na porção medial da tíbia direita para exposição dos implantes instalados. Nos períodos de 40 e 60 dias, os implantes apresentaram-se parcial ou totalmente cobertos por tecido ósseo, portanto foi realizada a ostectomia com o auxílio de uma fresa esférica número 2, sob irrigação abundante com soro



fisiológico, para permitir a exposição do módulo de rebordo quadrado do implante e conseqüente adaptação da chave intermediária e do torquímetro.

Em seguida, o torquímetro analógico (ATG24CN, Tohnichi, Tokyo, Japan/[www.tohnichi.co.jp](http://www.tohnichi.co.jp)) com escala graduada de 3N.cm à 24N.cm foi acoplado à chave adaptadora intermediária, e foi aplicada a força de torque reverso para remoção dos implantes. O teste foi realizado aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou a força necessária para esse rompimento. Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise de variância com a correção de Welch. Nos testes estatísticos empregou-se o nível usual de significância de 5%.

### **Análise Imunoistoquímica**

Após a remoção dos implantes foi realizada a eutanásia dos animais por meio da perfusão no ventrículo esquerdo com 150 ml de solução salina fisiológica tamponada (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos e em seguida com 1800 ml de formaldeído a 4% (Paraformaldeído, Acros Organics) durante 40 minutos, utilizando bomba perfusora peristáltica Masterflex® Ls (Cole-Parmer Instrument Company), na velocidade de 45ml/min.

Após a perfusão, a tíbia direita de 20 animais foi removida e o tecido mole excedente eliminado. As peças foram reduzidas respeitando-se uma distância de aproximadamente 10 mm das bordas das cavidades e receberam pós-fixação em solução de formaldeído 4%, a 4°C, durante um período de 6 horas.

Em seguida, as peças foram lavadas em PBS (pH 7,4) por 60 minutos com trocas a cada 10 minutos e imersas em solução descalcificadora (EDTA 5%- Merck - Ácido Etileno Diamino Tetracético), dissolvido em água MiliQ, por um período de 3 meses, à temperatura ambiente. Após a descalcificação as peças foram lavadas por

24 horas em solução tampão (PBS) e crioprotelidas utilizando sacarose 30% (Merck) por 48 horas à temperatura de 4° C, para impedir a formação de bolhas de ar no interior dos tecidos.

Para realização dos cortes congelados, as peças foram fixadas em um suporte metálico utilizando Tissue Tek® O.C.T. Compound (Sakura), possibilitando a obtenção de cortes longitudinais com 14µm de espessura em criostato (Micron, Zeiss), e posteriormente foram montadas em lâminas gelatinizadas, com dois cortes de cada grupo por lâmina.

Para o processamento imunoistoquímico, foram utilizados como anticorpos primários OPG (OPG, Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627), OC (OC, Goat anti-oc - Santa Cruz Biotechnology, SC18319) e COL-I (Goat anti-COL-I - Santa Cruz Biotechnology, SC8788). O anticorpo secundário biotilado foi anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin-SP-AffiniPure, donkey anti-goat IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories, 705065147). O método de detecção foi por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi utilizada como cromógeno.

Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações. A cortical inferior da tíbia dos coelhos foi avaliada como sendo o controle positivo.

Foi realizada uma análise qualitativa ordinal da expressão proteica, dividindo-se a extensão longitudinal do negativo do implante em três partes: cortical superior adjacente à área osteotomizada, espaço medular na área do defeito ósseo e cortical inferior, linearmente abaixo do espaço medular. Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan

Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica<sup>®</sup> DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). A análise foi realizada considerando-se os seguintes escores: marcações negativas (-), positivas (+), super-positivas (++) e hiperpositivas (+++) das células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de 0%, 20% (10% à 30%), 60% (50 à 70%) e 90% (80% à 100%), de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos. O avaliador desconhecia o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise. Os resultados foram tabulados e submetidos ao teste não-paramétrico de Wilcoxon para duas amostras de dados pareados e de Kruskal-Wallis para mais de duas amostras de dados independentes, com o cruzamento das variáveis proteínas e períodos. Empregou-se nestes testes o nível de significância de 5%.

Parte das amostras teciduais seccionadas foi corada com Hematoxilina e Eosina (HE Merck & Co., Inc.), servindo como referência para a citoarquitetura dos cortes processados pela imunistoquímica.

### **Análise por MEV**

Dez implantes removidos por torque-reverso nos períodos de 40 e 60 dias (5 de cada período) foram submetidos à avaliação em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM – T220A, Peabody, USA). Fotomicrografias foram obtidas do corpo dos implantes nos aumentos de 60X, 100X, 200X, 500X e 1000X.

### **Análise Histológica/Histométrica**

Os outros 5 animais utilizados no experimento foram eutanasiados no período de 60 dias por meio de sobredose anestésica. As peças obtidas da tíbia direita desses animais foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos<sup>®</sup>, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da seqüência crescente de álcoois 70, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150<sup>®</sup>, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas.

Ao término da desidratação, as peças foram imersas em acetona (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil) por 24 horas, a seguir em solução de acetona e polimetil metacrilato lento (PMMAL) (Classico<sup>®</sup>, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) na proporção de 1:1. Na seqüência, recebeu 3 banhos de PMMAL, sendo que no último banho, foi acrescentado o catalisador peróxido de benzoíla a 1% (Riedel<sup>®</sup> – De Haën AG, Seelze – Hannover, Germany).

O último banho (PMMAL e catalizador) foi realizado com as peças colocadas em frascos de vidro com tampa, mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 1 semana, para que a resina polimerizasse. O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 70 µm de espessura.

Como corantes foram utilizados o vermelho de alizarina e o azul de Stevenel. As imagens obtidas foram capturadas pelo mesmo sistema destacado anteriormente e submetidas à análise histométrica. Com o auxílio do programa ImageLab 2000, versão 2.4, foi calculada a extensão linear de contato entre tecido conjuntivo (corado

com azul de Stevenel) e implante e entre tecido ósseo (corado com vermelho de alizarina) e implante, de 12 regiões pré-selecionadas, correspondentes às regiões das roscas, ao módulo de rebordo e ao ápice dos implantes, para ambos os grupos. Os valores de extensão linear obtidos para tecido conjuntivo e tecido ósseo nos grupos controle e tratado foram convertidos em valores percentuais e comparados por meio do teste pareado "t" de Student ( $p=0.05$ ).



## 3 Resultados

### **Análise Clínica**

Após a reabertura das tíbias para a realização do torque-reverso, observou-se aos 40 e 60 dias que os implantes apresentaram-se estáveis, com osso neoformado cobrindo o módulo de rebordo dos mesmos (figura 3). Os implantes em todos os períodos do grupo tratado apresentaram-se numa posição tridimensional mais próxima da posição de instalação, já os implantes do grupo controle apresentaram-se numa posição mais inclinada (figura 4), quando comparada à posição inicial de instalação.

### **Análise Biomecânica**

Foram considerados os valores de torque-reverso obtidos para os grupos controle e tratado, nos períodos de 40 e 60 dias. Na tabela 1 são dados os valores de torque-reverso, em N.cm, para ambos os grupos, de acordo com o período de avaliação, destacando-se as médias e desvios-padrão de torque-reverso. Nota-se que a dispersão dos valores na avaliação de torque-reverso aos 40 dias é menor do que a dispersão na avaliação de 60 dias (desvio-padrão no período de 60 dias é 3 vezes maior do que no período de 40 dias), indicando resultados mais homogêneos no período mais curto. Embora as medidas tenham sido obtidas aos pares em cada período, não se observa correlação significativa entre elas, principalmente para o período de 60 dias.

A análise de variância foi aplicada para a comparação das médias, com a estatística de Welch. Obteve-se  $p = 0,153$  e, portanto, não houve evidência de diferenças significativas entre médias para ambos os grupos (figura 5).

### **Análise Imunoistoquímica**

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas OPG, RANKL, OC e COL-I, analisadas durante o processo de reparo na interação tecido ósseo/implante.

Inicialmente, considerando-se cada proteína isoladamente, os grupos controle e tratado foram comparados pelo teste de Wilcoxon em cada período de avaliação, já que os resultados foram obtidos aos pares em cada animal. Não se observou qualquer diferença significativa nesta avaliação (tabela 2).

Em seguida, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para a comparação de médias percentuais de marcações celulares entre os grupos controle e tratado, cruzando-se as variáveis proteínas e períodos de avaliação. Na tabela 3 são mostradas as freqüências de médias percentuais (0, 20, 60 e 90) das imunomarcações celulares para as proteínas OPG, RANKL, OC e COL-I, de acordo com os períodos de avaliação, separadamente para ambos os grupos.

Tendo em vista os resultados obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis, foi realizada a união dos valores de expressão protéica dos 4 períodos de avaliação, verificando-se diferença estatística entre as proteínas RANKL e COL-I para o grupo tratado ( $p= 0,001$ ). Para o grupo controle o resultado foi marginal ( $p=0,085$ ). Entretanto, os postos médios utilizados pelo teste de Kruskal-Wallis foram muito semelhantes, revelando valores mais baixos para a proteína COL-I e valores mais altos para a RANKL, em ambos os grupos (tabelas 4 e 5).

As porcentagens das médias de imunomarcações dos 4 períodos de avaliação para cada proteína sugerem que a proteína RANKL apresenta mais percentuais de marcações celulares acima de 50% do que as outras proteínas, em que predominam percentuais abaixo de 30%, principalmente para o COL-I (figura 6).

Os seguintes resultados qualitativos foram observados:

OPG: notou-se imunomarcações positivas para osteócitos, presentes nas corticais superior e inferior, nos grupos controle e tratado (figura 7). Entretanto, na porção medular, foram observados poucas marcações imunopositivas para esta proteína em ambos os grupos aos 5 dias, enquanto aos 15 dias no grupo controle nota-se maior presença de células positivas para a OPG. Aos 40 dias observa-se redução na imunomarcaçãõ desta proteína em ambos os grupos (figura 8), como destacado na tabela 3 pela significância do teste de Kruskal-Wallis ( $p=0,05$ ).

RANKL: imunomarcações positivas foram observadas em osteócitos nas corticais superior e inferior, em ambos os grupos e períodos analisados. Foi observado um aumento de células imunopositivas para a RANKL (figura 9) quando comparada à OPG. A medular apresentou grande quantidade de células imunopositivas no período de 5 dias, caracterizadas como células do tipo linfócitos (figura 10). Aos 15 dias foi observado aumento na quantidade de células imunopositivas para a RANKL na mesma área. Os postos médios do teste de Kruskal-Wallis também sugerem esse resultado. Aos 40 e 60 dias, observa-se menor imunomarcaçãõ desta proteína, principalmente na região medular, entretanto nota-se maior equilíbrio na expressão de RANKL e OPG em ambos os grupos, com discreta predominância de RANKL (figura 11).

OC: em ambos os grupos foram observados osteócitos marcados positivamente para a OC nas corticais analisadas, de maneira equilibrada em todos os períodos. Vale destacar a presença de marcação de fundo nas corticais superior e inferior, fato não observado nas demais proteínas. A medular apresentou-se com marcação discreta, caracterizando poucas células da linhagem osteoblástica imunopositivas. Aos 60 dias observou-se aumento na expressão de OC, principalmente na cortical superior, em ambos os grupos (figura 12).



COL-I: imunomarcações positivas foram observadas nas corticais superiores e inferiores em ambos os grupos e períodos analisados. A medular apresentou poucas células imunopositivas ao COL-I aos 5 dias, entretanto aos 15 dias, em ambos os grupos foi observado aumento nas imunomarcações positivas (figura 13) em células com aspecto de fibroblastos. Nos períodos de 40 e 60 dias observa-se pouca expressão de COL-I (figura 14). em ambos os grupos, principalmente na região medular.

Reações de controle no processamento imunoistoquímico foram realizadas rotineiramente. Nos controles negativos foram observados cortes isentos de marcações, comprovando a especificidade das reações (figura 15). Nos controles positivos, realizados na cortical inferior intacta, foram observadas marcações celulares para cada proteína avaliada, comprovando a efetividade dos anticorpos estudados (figura 16).

A comparação da citoarquitetura das células ósseas, como um auxílio na análise da morfologia celular na expressão protéica, mostrou aos 5 e 15 dias poucos sinais de formação óssea e as corticais apresentaram um aspecto de normalidade. É possível observar a presença de osteócitos, bem corados pela hematoxilina, ao longo das corticais superiores e inferiores (figuras 17 e 18). A medular apresenta-se celularizada e contém algumas áreas sugestivas da presença do polímero no grupo tratado. Aos 5 dias no grupo controle observa-se a presença de células inflamatórias na área medular. Em alguns espécimes, aos 15 dias, é possível observar o início de formação de tecido ósseo da cortical superior em direção à medular. Neste período, no grupo tratado, observa-se a formação de tecido mesenquimal na área medular com remanescentes do polímero.

No período de 40 dias observam-se áreas de neoformação óssea adjacentes à cortical e na região medular, bastante celularizadas, com aspecto de tecido ósseo

imaturo. Já aos 60 dias foi observada maior neoformação óssea em toda a extensão do defeito, com tecido ósseo imaturo acompanhando o formato das espiras do implante e presença de inúmeros osteócitos nas corticais superiores e inferiores (figura 19). Observam-se neste período poucas áreas com remanescentes do polímero no grupo tratado.

### **Análise por MEV**

Nos implantes removidos no período de 40 dias observam-se áreas de tecido ósseo aderidas à superfície do metal, em ambos os grupos. Já aos 60 dias pós-operatórios os implantes encontram-se quase totalmente cobertos por tecido ósseo neoformado, em toda a extensão, tanto no grupo tratado quanto no grupo controle (figuras 20 e 21).

### **Análise Histológica e Histométrica da interface osso/implante**

Foram analisadas as porcentagens de extensão linear de contato entre tecido ósseo/implante e entre pré-osso/implante. O teste pareado “t” de Student não revelou evidência de diferença estatística entre os grupos controle e tratado ( $p=1,55$ ). A tabela 6 destaca as médias percentuais da extensão linear de contato tecido ósseo/implante para ambos os grupos e interfaces analisadas.

A análise qualitativa do grupo controle, aos 60 dias, revelou a presença de tecido ósseo neoformado celularizado (corado pelo vermelho de alizarina) em contato com a superfície do implante, principalmente na área do módulo de rebordo, tendo em vista sua localização em osso cortical (figura 22). Na área medular, é possível notar neoformação óssea na região dos picos e vales das roscas dos implantes, bem como a presença tecido conjuntivo (corado pelo azul de Stevenel) em contato com a superfície dos implantes e preenchendo a região dos vales das roscas (figura 23).

No grupo tratado, aos 60 dias, também observa-se a presença de áreas de neoformação óssea em contato com a superfície do implante, na área do módulo de rebordo e algumas áreas de tecido conjuntivo nessa interface (figura 24). Na área medular é possível notar a presença de tecido conjuntivo bastante celularizado com presença de inúmeros osteoblastos envolvidos pelo remanescente do polímero que está sendo degradado e substituído pela matriz colagenosa adjacente (figura 25). Esta por sua vez, está sendo substituída por tecido ósseo neoformado, que caminha em direção à superfície do implante. Áreas de interface entre tecido ósseo e implante também podem ser observadas na região dos vales de algumas roscas presentes na área medular. Em algumas áreas adjacentes ao implante observou-se tecido conjuntivo celularizado em contato direto com o osso neoformado.



## 4 *Discussão*

A literatura tem utilizado como modelo ósseo a tíbia de coelhos para avaliar a osseointegração de diferentes tipos de implantes, com variações quanto à área receptora, incluindo instalação na articulação do joelho e metáfise tibial (Sennerby et al. 1992), na porção medial-proximal da tíbia (Kong et al. 2002), na metáfise tibial (Cordioli et al. 2000; Margonar et al. 2003), dentre outros trabalhos, que avaliaram a osseointegração de diferentes tipos de implantes. Foi definida a utilização da porção medial da tíbia direita do coelho como área receptora, considerando-se o fato dessa área estar distante do centro de crescimento ósseo (localizado na metáfise tibial, próximo à articulação tíbio-femural), região de maior atividade osteogênica, para evitar qualquer influência sobre o processo de reparo ósseo e conseqüente expressão proteica.

A estabilidade primária em implantodontia é um dos principais fatores que influenciam as taxas de sobrevivência do implante. É considerada um pré-requisito para estabelecer suporte mecânico, sendo este essencial para o processo de osseointegração (Ivanoff et al. 1996; Nkenke et al. 2003), já que implantes instáveis resultaram em encapsulação fibrosa (Lioubavina-Hack et al. 2006). Em nosso estudo verificamos a presença de neoformação óssea ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária, confirmado pela análise biomecânica, histométrica e pela MEV. Entretanto os diferentes resultados encontrados podem estar relacionados às inúmeras variáveis, destacando-se como fator fundamental a ausência de leito receptor intra-ósseo para os implantes instalados sem estabilidade primária em que ocorreu formação fibrosa ao redor dos mesmos, no trabalho citado anteriormente.

Embora altas taxas de sucesso tenham sido relatadas com a utilização de implantes osseointegráveis (Doring et al. 2004), falhas podem ser observadas em ossos de baixa qualidade e/ou em situações de volume ósseo reduzido (Jaffin & Berman 1991). Além disso, após a extração dentária, o alvéolo frequentemente apresenta dimensões maiores que o diâmetro de um implante convencional, formando um “gap” que compromete o aceitável contato osso/implante. Além disso, a largura do defeito ósseo influencia diretamente a porcentagem desse contato (Akimoto et al. 1999). Portanto, neste contexto destaca-se a importância da utilização dos biomateriais para o preenchimento desses defeitos.

No protocolo experimental utilizado neste estudo os defeitos confeccionados apresentaram dimensão de aproximadamente 0,4 mm além do diâmetro do implante. Foi observada a presença de neoformação óssea em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária. Botticelli et al. (2003, 2004, 2005, 2006) demonstraram que amplos defeitos periimplantares confeccionados em cães, de 1,0 mm até 2,25 mm, associados ou não à remoção intencional da parede vestibular podem ser preenchidos com tecido ósseo neoformado, fornecendo alto grau de osseointegração. Além disso, estes autores concluíram que este reparo é influenciado pelas características de superfície do implante. Contudo, em todos os estudos realizados por estes autores os implantes apresentavam-se travados na porção apical, e, portanto com estabilidade primária.

Já as condições desenvolvidas neste trabalho propuseram situações experimentais diferentes, destacando-se o modelo animal utilizado, o comprimento e diâmetro dos implantes, as diferentes superfícies dos mesmos, o(s) período(s) de sacrifício, as distintas formas de análises empregadas, a associação do PLA/PGA, bem como a ausência de estabilidade primária. Portanto, houve neoformação óssea em ambos os grupos, justificada, dentre outros fatores, pela formação de uma

interface entre tecido ósseo e implante, mesmo na ausência de estabilidade primária.

O PLA/PGA tem sido utilizado como mini-parafusos, membranas, mini-placas e substitutos ósseos (Leenslag et al. 1987, Holy et al. 2003), demonstrando bons resultados, relacionados à sua biocompatibilidade, fácil degradação e propriedades osteocondutoras (Imbronito et al. 2005). Ele é utilizado em diferentes consistências para cirurgia, sendo que na forma gelificada, como empregada neste estudo, apresenta inúmeros poros pequenos, em torno de 3 $\mu$ m (Luciano et al. 2003) que contribuem com a neoformação óssea por osteocondução. Em nosso estudo foi possível observar que o PLA/PGA se mostrou biocompatível, já que não alterou as respostas celulares durante a expressão das proteínas da matriz óssea, não impediu a neoformação óssea e apresentou resultados biomecânicos e imunoistoquímicos bastante semelhantes ao grupo controle.

### **Análise Biomecânica**

As forças de torque reverso são comumente utilizadas como medidas biomecânicas da ancoragem ou osseointegração, sendo que o aumento da força requerida para a remoção dos implantes possui correlação positiva com o grau de contato entre tecido ósseo e implante (Klokkevold et al. 2001; Moriya et al. 2006).

Nos períodos de 40 e 60 dias foi possível obter valores da força de ruptura da interface osso-implante. Isto se deve ao fato de que nesse período ocorre uma compactação lamelar no processo de reparo, com maturação do calo ósseo e resistência suficiente para suportar cargas (Roberts et al. 1996, Davies 2003), comprovando, portanto, o processo de osseointegração ocorrido em ambos os grupos e períodos analisados, considerando a metodologia empregada.

A análise dos valores de torque-reverso demonstrou que não houve diferenças nos resultados entre ambos os grupos. Vários trabalhos têm sido

realizados para avaliar a osseointegração por meio de análises biomecânicas (Cordioli et al. 2000; Klokkevold et al. 2001; Kong et al. 2002; Margonar et al. 2003). Contudo, as médias de valores de torque-reverso obtidas nesses estudos, considerando tempos de reparo semelhantes e o mesmo modelo animal (coelhos), diferem entre os mesmos. Variáveis como padrão, tamanho e distribuição de picos e vales das diferentes superfícies de implantes analisadas, bem como as diferentes condições experimentais podem contribuir com a variação dos resultados, impedindo, portanto, comparações diretas entre esses tipos de estudo.

Neste trabalho os valores obtidos apresentam uma aparente proximidade com os valores de torque-reverso encontrados na literatura para implantes de superfície usinada (Klokkevold et al. 2001). É necessário considerar que em nosso estudo os implantes não apresentaram estabilidade primária e, portanto, as condições experimentais foram distintas. Entretanto pode-se observar que o torque partiu de um valor zero e alcançou valores semelhantes em ambos os grupos e períodos, demonstrando que houve neoformação óssea e, portanto, osseointegração dos implantes. Porém durante a análise clínica na fase de eutanásia dos animais foi observado que os implantes do grupo tratado permaneceram em uma posição tridimensional mais adequada, semelhante à posição inicial de instalação. Este fato pode ser explicado pela manutenção do posicionamento do implante proporcionada pelo copolímero no ato de instalação dos mesmos devido à consistência de gel.

### **Análise Imunoistoquímica**

A análise imunoistoquímica fornece importantes informações a respeito do comportamento celular, de acordo com a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo ósseo durante o processo de osseointegração. As proteínas analisadas neste estudo foram OPG, RANKL, OC e COL-I.

O PLA/PGA demonstrou ser um material biocompatível, tendo em vista a ausência de alterações na funcionalidade e resposta celulares, comprovada pela dinâmica da expressão protéica observada em todos os períodos, de maneira semelhante ao grupo controle. Bostman & Pihlajamaki (2000), observaram alterações desfavoráveis resultantes da degradação do polímero em aplicações ortopédicas, com formação de áreas osteolíticas próximas ao material, sem conseqüências relevantes. Entretanto, outros trabalhos não destacaram a ocorrência deste tipo de reação tecidual (Matsumoto et al. 2005). Essas variações podem estar relacionadas às diferentes técnicas cirúrgicas, à anatomia óssea, às diferentes formas de utilização do polímero, suas formulações, bem como às finalidades de seu emprego. Em nosso trabalho foram utilizados implantes sem estabilidade primária, associados ao PLA/PGA na consistência de gel. Portanto a expressão proteica foi analisada em condições especiais, não relatadas na literatura até o presente momento.

A OPG sinaliza o preparo tecidual para a formação óssea (Suda et al. 1999). O anticorpo contra a OPG utilizado marca osteoblastos, osteócitos, fibroblastos, além de outros tecidos de origem mesenquimal (Stejskal et al. 2001 a). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, já que mostram a imunomarcaçã da OPG em células da linhagem osteoblástica (Simonet et al. 1997; Woo et al. 2002; Rogers & Eastell 2005).

Considerando a expressão da proteína RANKL, foram observadas marcações em osteócitos na cortical e linfócitos na medular, como observados em outros trabalhos (Khosla et al. 2001; Stejskal et al. 2001 b; Hasegawa et al. 2002).

A expressão de RANKL e OPG foi examinada durante o reparo de fraturas de tíbia de ratos (Kon et al. 2001). Picos de expressão de OPG foram vistos 24 horas e 7 dias após a fratura, coincidindo com o pico de formação de cartilagem. A



expressão da RANKL apresentou pico aos 3 e 14 dias, quando houve um decréscimo na expressão da OPG. Nossos resultados demonstraram que essas duas proteínas se expressaram nos períodos de 5 e 15 dias, com um predomínio de RANKL tanto na cortical quanto na medular, sendo a marcação desta última relacionada a células de natureza linfóide. A predominância de RANKL, quando comparada à OPG, pode significar uma tendência de preparação tecidual para a reabsorção óssea. Este resultado pode estar relacionado a uma resposta tecidual ao trauma cirúrgico induzido aos tecidos periimplantares em ambos os grupos. No grupo tratado essa resposta inicial pode também estar associada à presença do PLA/PGA, e foi evidenciada pela análise estatística. Além disso, foi observado maior equilíbrio na imunomarcação destas proteínas, nos períodos de 40 e 60 dias, sugerindo uma dinâmica óssea mais equilibrada (Ducy et al. 2000).

Outra proteína analisada no estudo foi a OC, expressa em osteoblastos e também em osteócitos (Thorwarth et al. 2005). As imunomarcações observadas para esta proteína nas corticais foram semelhantes em ambos os grupos, com a presença de marcação de fundo característica. A expressão equilibrada de OC confirma a viabilidade celular e, portanto sua capacidade funcional. A OC está relacionada ao estágio de mineralização óssea e é capaz de acelerar tanto a ativação de osteoblastos quanto a de osteoclastos nesse processo (Rammelt et al. 2005).

O COL-I é a proteína inicial da matriz no processo de formação óssea, modulando a diferenciação celular e a morfogênese por mediação do fluxo de estimuladores químicos e mecânicos (Bhatnagar et al. 1999). Portanto, o COL-I representa um índice para avaliação da matriz de colágeno, predominante na parte orgânica do tecido ósseo. Aos 15 dias foram observadas marcações para o COL-I na área medular em células semelhantes a fibroblastos sugerindo a possibilidade de haver formação de matriz orgânica colagenosa e conseqüente formação óssea. Este

fato foi comprovado pela neoformação óssea observada nos períodos finais, principalmente aos 60 dias, na análise histológica e histométrica da interface osso/implante, com conseqüente redução nas médias percentuais de marcação desta proteína, evidenciada pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis (valores abaixo de 50%). A expressão de COL-I é considerada como o primeiro indicador de neoformação óssea, entretanto essa relação é inespecífica (Thorwarth et al. 2005). Além disso, a MEV dos implantes removidos no período de 60 dias confirmou a presença de tecido ósseo neoformado em contato com toda a superfície dos mesmos.

Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar o processo de reparo ósseo na interface osso/implante para verificar a possível influência do PLA/PGA na aceleração ou retardo do processo de neoformação óssea. Além disso, sugere-se a análise de períodos de reparo mais longos e de defeitos ósseos maiores, bem como a avaliação da viabilidade tecidual em receber cargas funcionais após o reparo, considerando-se a ausência de estabilidade inicial ou a presença de uma estabilidade mínima dos implantes, pela associação ao biomaterial.

Portanto, considerando a dinâmica da expressão das proteínas OPG, RANKL, OC e COL-I em ambos os grupos, a neoformação óssea observada principalmente no período de 60 dias, bem como a semelhança da análise biomecânica nos grupos e períodos analisados, é possível inferir que o PLA/PGA apresentou biocompatibilidade e permitiu neoformação óssea em contato com o implante em defeitos ósseos de aproximadamente 0,4mm além do seu diâmetro. Além disso, ocorreu o processo de osseointegração em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária dos implantes.



# Referências\*\*

- Akimoto, K., Becker, W., Persson, R., Baker, D.A., Rohrer, M.D. & O'Neal, R.B. (1999) Evaluation of titanium implants placed into simulated extraction sockets: a study in dogs. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **14**: 351-360.
- Becker, W., Becker, B.E. & Caffesse, R. (1994) A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *Journal of Periodontology* **65**: 1128-1133.
- Becker, W., Clokie, C., Sennerby, L., Urist, M.R. & Becker, B.E. (1998) Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. *Journal of Periodontology* **69**: 414-421.
- Bhatnagar, R., Qian, J., Wedrychowska, A., Sadeghi, M., Wu, Y.M. & Smith, N. (1999) Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Engineering* **5**: 53-65.
- Bischof, M., Nedir, R., Szmukler-Moncler, S., Bernard, J.P. & Samson, J. (2004) Implant stability measurement of delayed and immediately loaded implants during healing. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 529-539.
- Böstman, O.M. & Pihlajamaki, H.K. (2000) Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **371**: 216-227.

---

\*\* Normas da revista *Clinical Oral Implants Research*. (Anexo B).

- Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **31**: 309-317.
- Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D. & Lindhe, J. (2003) The jumping distance revisited: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 35-42.
- Botticelli, D., Berglundh, T., Persson, L.G. & Lindhe, J. (2005) Bone regeneration at implants with turned or rough surfaces in self-contained defects. An experimental study in dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**:448-455.
- Botticelli, D., Persson, L.G., Lindhe, J. & Berglundh, T. (2006) Bone tissue formation adjacent to implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 351-358.
- Cordioli, G., Majzoub, Z., Piatelli, A. & Scarano, A. (2000) Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **15**: 668-674.
- Crotti, T.N., Smith, M.D., Findlay, D.M., Zreiqat, H., Ahern, M.J., Weedon, H., Hatzinikolous, G., Capone, M., Holding, C. & Haynes, D.R. (2004) Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF $\kappa$ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* **25**: 565-573.
- Crump, T.B., Rivera-Hidalgo, F., Harrison, J.W., Willians, F.E. & Guo, I.Y. (1996) Influence of three membranes types on healing of bone defects. *Oral*

*Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **82**: 365-374.

- Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education* **67**: 932-949.
- Doring, K., Eisenmann E. & Stiller, M. (2004) Functional and esthetic considerations for single-tooth Ankylos implant-crowns: 8 years of clinical performance. *The Journal of Oral Implantology* **30**: 198-209.
- Ducey, P., Schinke T. & Karsenty, G. (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**: 1501-1504.
- El-Amin, S.F., Lu, H.H., Khan, Y., Burems, S.J., Mitchell, J., Tuan, R.S. & Laurencin, C.T. (2003) Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* **24**: 1213-1221.
- Eppley, B.L. & Reilly, M. (1997) Degradation characteristics of PLLA-PGA bone fixation devices. *The Journal of Craniofacial Surgery* **8**: 116-120.
- Ferretti, C. & Reyneke, J.P. (2002) Mandibular sagittal split osteotomies fixed with biodegradable or titanium screws: a prospective, comparative study of postoperative stability. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **93**: 534-537.
- Gotfredsen, K., Warrer, K., Hjorting-Hansen & Karring, T. (1991) Effect of membranes and hydroxyapatite on healing in bone defects around titanium implants: an experimental study in monkeys. *Clinical Oral Implants Research* **2**: 172-178.
- Gungormus, M. (2004) The effect on osteogenesis of type I collagen applied to experimental bone defects. *Dental Traumatology* **20**: 334-337.

- Hämmerle, C.H. & Lang, N.P. (2001) Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 9-18.
- Hasegawa, Y., Sakano, S., Iwase, T. & Warashina, H. (2002) The long-term behavior of poly-L-lactide screws in a minipig fracture model: preliminary report. *Journal of Biomedical Materials Research* **63**: 679-685.
- Holy, C.E., Fialkov, J.A., Davies, J.E. & Shoichet, M.S. (2003) Use of a biomimetic strategy to engineer bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **65**: 447-453.
- Imbronito, A.V., Scarano, A., Orsini, G., Piatelli, A. & Arana-Chavez, V.E. (2005) Ultrastructure of bone healing in defects grafted with a copolymer of polylactic/polyglycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research* **74A**: 215-221.
- Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J. & Mikos, A.G. (1998) Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* **19**: 1405-1412.
- Ivanoff, C.J., Sennerby, L. & Lekholm, U. (1996) Influence of mono- and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **24**: 229-235.
- Jaffin, R.A. & Berman, C.L. (1991) The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *Journal of Periodontology* **62**: 2-4.
- Khosla, S. (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* **142**: 5050-5055.
- Klokkevold, P.R., Johnson, P., Dadgostari, S., Caputo, A., Davies, J.E. & Nishimura, R.D. (2001) Early endosseous integration enhanced by dual acid

- etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 350-357.
- Kon, T., Cho, T.J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L.C. & Einhorn, T.A. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**: 1004-1014.
  - Kong, Y.M., Kim, D.H., Kim, H.E., Heo, S.J. & Koak, J.Y. (2002) Hydroxyapatite-based composite for dental implants: an in vivo removal torque experiment. *Journal of Biomedical Materials Research* **63**: 714-721.
  - Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. (1999) OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**: 315-323.
  - Leenslag, J.W., Pennings, A.J., Bos, R.R., Rozema, F.R. & Boering, G. (1987) Resorbable materials of poly (L-lactide) VII. In vivo and in vitro degradation. *Biomaterials* **8**: 311-314.
  - Lekholm, U., Wannfors, K., Isaksson, S. & Adielsson, B. (1999) Oral implants in combination with bone grafts. A 3-year retrospective multicenter study using the Branemark implant system. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **28**: 181-187.
  - Lieberman, J.R., Daluiski, A. & Einhorn, T.A. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. The *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume* **84-A**: 1032-1044.

- Lioubavina-Hack, n., Lang, N.P., Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 244-250.
- Lo, H., Kadiyala, S., Guggino, S.E.& Leong, K.W. (1996) Poly (L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity. *Journal of Biomedical Materials Research* **30**: 475-484.
- Lu, H.H., El-Amin, S.F., Scott, K.D. & Laurencin, C.T. (2003) Three dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* **64**: 465-474.
- Luciano, R.M., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. & Alberto-Rincon, M.C. (2003) Synthesis and characterization of poly (L-lactic acid) membranes: studies in vivo and in vitro. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **14**: 87-94.
- Margonar, R., Sakakura, C.E., Holzhausen, M., Pepato, M.T., Alba-Júnior, R.C. & Marcantonio-Júnior, E. (2003) The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dentistry* **12**: 333-339.
- Matsumoto, M.A., Nary-Filho, H., Padovan, L.E., Kawakami, R.Y. & Taveira, L.A. (2005) Tissue response to poly-L-lactide acid-polyglycolic acid absorbable screws in autogenous bone grafts: a histologic morphological analysis. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 112-118.
- Mellonig, J. T.,& Bowers, G. (1990) Regeneration bone in clinical periodontics. *Journal of the American Dental Association* **121**:497-502.



- Moriya, K., Maruo, Y. & Minagi, S. (2006) Does rotational strain at screw tightening affect the attainment or maintenance of osseointegration? *Clinical Oral Implants Research* **17**: 451-458.
- Nagai, M., Hayakawa, T., Fukatsu, A., Yamamoto, M., Fukumoto, M., Nagahama, F., Mishima, H., Yoshinari, M., Nemoto, K. & Kato, T. (2002) In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dental Materials Journal* **21**: 250-260.
- Nair, P.N.R. & Schug, J. (2004) Observations on healing of human tooth extraction sockets implanted with bioabsorbable polylactic-polyglycolic acids (PLGA) copolymer root replicas: a clinical, radiographic, and histologic follow-up report of 8 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **97**: 559-569.
- Nijweide, P.J., Burger, E.H. & Feyen, J.H.M. (1986) Cells of the bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiological Reviews*. **66**: 855-886.
- Nkenke, E., Hahn, M., Weinzierl, K., Radespiel-Troger, M., Neukam, F.W., Engelke, K. (2003) Implant stability and histomorphometry: a correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 601-609.
- Ohsawa, K., Neo, M., Natsuoka, H., Akiyama, H., Ito, H., Kohno, H. & Nakamura, T. (2000) The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**: 460-466.
- Olsen, S., Fergusson, S.J., Sigrist, C., Fritz, W.R., Notte, L.P., Hallermann, W. & Caversaccio, M. (2005) A novel computational method for real-time

preoperative assessment of primary dental implant stability. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 53-59.

- Peltoniemi, H., Ashammakhi, N., Kontio, R., Waris, T., Salo, A., Lindqvist, C., Gratz, K. & Suuronen, R. (2002) The use of bioabsorbable fixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **94**: 5-14.
- Piattelli, A., Podda, G. & Scarano, A. (1997) Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials* **18**: 623-627.
- Pietrzak, W.S., Sarver, D.R. & Verstynen, M.L. (1997) Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *Journal of Craniofacial Surgery* **8**: 87-91.
- Pilliar, R.M., Lee, J.M. & Maniopoulos, C. (1986) Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **208**: 108-113.
- Quattlebaum, J., Mellonig, J.T. & Hansel, N. (1988) Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *Journal of Periodontology* **59**: 394-397.
- Raghoobar, G.M., Timmenga, N.M., Reintsema, H., Stegenga, B. & Vissink, A. (2001) Maxillary bone grafting for insertion of endosseous implants: results after 12-124 months. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 279-286.
- Rammelt, S., Neumann, M., Hanisch, U., Reinstorf, A., Pompe, W., Zwipp, H. & Biewener, A. (2005) Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *Journal Biomedical Material Research* **73A**: 284-294.

- Rammelt, S., Schulze, E., Bernhardt, R., Hanisch, U., Scharnweber, D., Worch, H., Zwipp, H. & Biewener, A. (2004) Coating of titanium implants with type I collagen. *Journal of Orthopaedic Research* **22**: 1025-1034.
- Rimondini, L., Nicoli-Aldini, N., Fini, M., Guzzardella, G., Tschon, M. & Giardino, R. (2005) In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using a injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **99**: 148-154.
- Roberts, W.E., Garetto, L.P. & Brezniak, N. (1996) Fisiologia e metabolismo ósseos. In: Misch, C.E. *Implante odontológico contemporâneo*, p.329-355. São Paulo: Pancast.
- Rogers, A. & Eastell, R. (2005) Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kB ligant: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**: 6323-6331.
- Rutheford, R.B., Samphat, T.K., Rueger, D.C. & Taylor, T.D. (1992) Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **7**: 297-301.
- Saito, N., Okada, T., Horiuchi, H., Ota, H., Takahashi, J., Murakami, N., Nawata, M., Kojima, S., Nozaki, K. & Takaoka, K. (2003) Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* **32**: 381-386.
- Sennerby, L., Thomsen, P. & Ericson, L.E. (1992) A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and

cancellous bone. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **7**: 62-71.

- Serino, G., Biancu, S., Tezzi, G. & Piatelli, A. (2003) Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 651-658.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W.J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309-319.
- Sjöström, M., Lundgren, S., Nilson, H. & Sennerby, L. (2005) Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis. A clinical study from implant placement to 6 months of loading. *The International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **34**: 45-51.
- Soballe, K., Hansen, E.S., B-Rasmussen, H., Jorgensen, P.H. & Bunger, C. (1992) Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *Journal of Orthopaedic Research* **10**: 285-299.
- Stejskal, D., Bartek, J., Pastorkova, R., Ruzicka, V., Oral, I. & Horalik, D. (2001a) Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **145**: 61-64.

- Stejskal, D., Zurek, M., Bartek, J., Jedelsky, L. & Ruzicka, V. (2001b) Osteoprotegerin and bone density. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **145**: 75-76.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**: 345-357
- Szmukler-Moncler, S., Salama, H., Reingewirtz, Y. & Dubruille, J.H. (1998) Timing of loading and effect of micro-motion on bone dental implant interface. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**: 192-203.
- Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, E., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2005) Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) - an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* **26**: 2575-2584.
- Trejo, P.M., Weltman, R. & Cafesse, R. (2000) Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology* **71**: 1852-1861.
- Woo, K.M., Choi, Y., Ko, S.-H., Oh, K.O. & Kim, K.K. (2002) Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Experimental and Molecular Medicine* **34**: 347-352.

# Figuras



Figura 1 - Grupo controle. Instalação do implante de 2,6mm/3,0mm, sem estabilidade primária no leito receptor, preenchido com o coágulo sanguíneo.



Figura 2 - Grupo tratado. Instalação do implante de 2,6mm/3,0mm, sem estabilidade primária no leito receptor, preenchido com o PLA/PGA.



Figura 3 - Tíbia direita. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado recobrendo o módulo de rebordo dos implantes durante a reabertura.



Figura 4 - Período de 40 dias após a reabertura da tíbia direita. Verifica-se menor inclinação do implante do grupo tratado (seta) quando comparado ao controle.

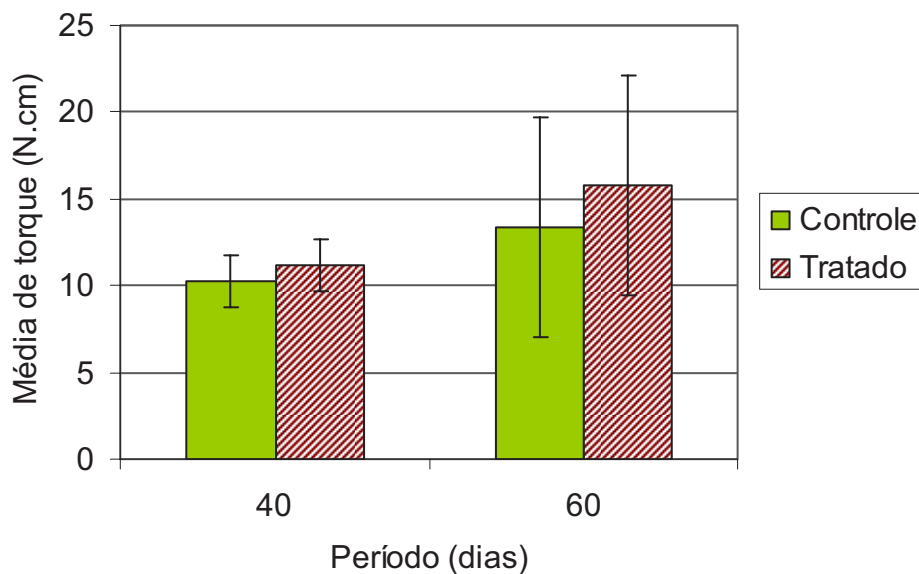


Figura 5 – Representação gráfica de médias de torque reverso (colunas), em N.cm, e de intervalos de 95% de confiança para as médias populacionais (barras verticais).

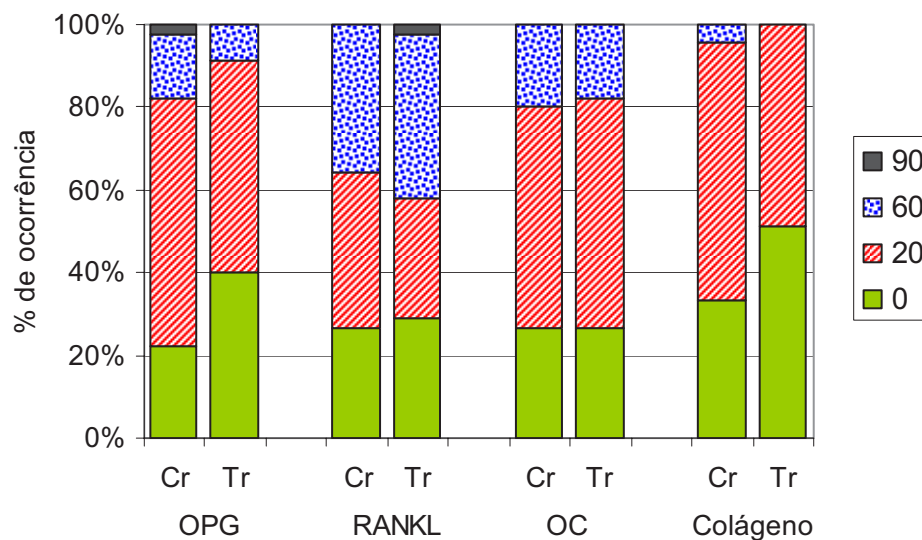


Figura 6 - Representação gráfica de % de ocorrências de médias percentuais de marcações celulares para as proteínas analisadas, independentemente do período de avaliação, para ambos os grupos.





Figura 7 - OPG – Grupo controle. Período de 5 dias. Imunomarcações positivas para osteócitos presentes na cortical superior (setas) (DAB, original de 160X).

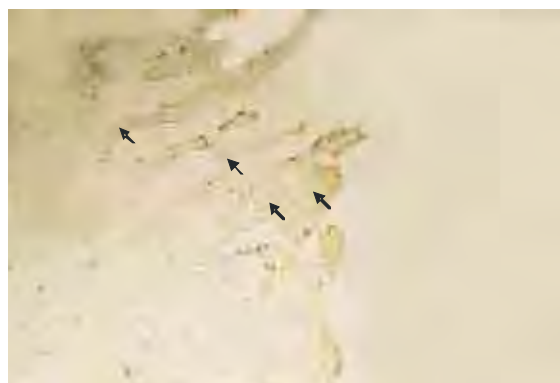


Figura 8 - OPG – Grupo controle. Período de 40 dias. Imunomarcações desta proteína na cortical superior (setas). Nota-se discreta redução na expressão proteica (DAB, original de 63X).



Figura 9 – RANKL – Grupo controle. Período de 40 dias. Imunomarcações positivas para osteócitos (setas) na cortical superior, em maior quantidade quando comparada à OPG (DAB, original de 160X).

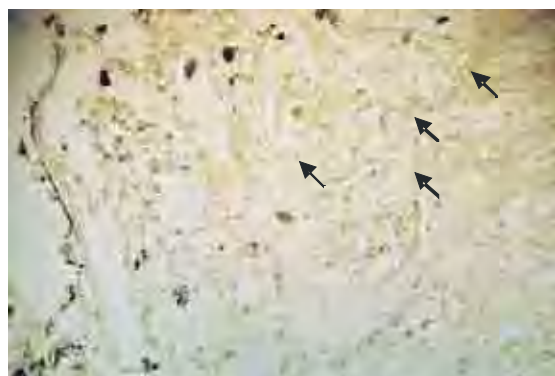


Figura 10 - RANKL – Grupo tratado. Período de 5 dias. Imunomarcações positivas para linfócitos (setas) na área medular (DAB, original de 160X).



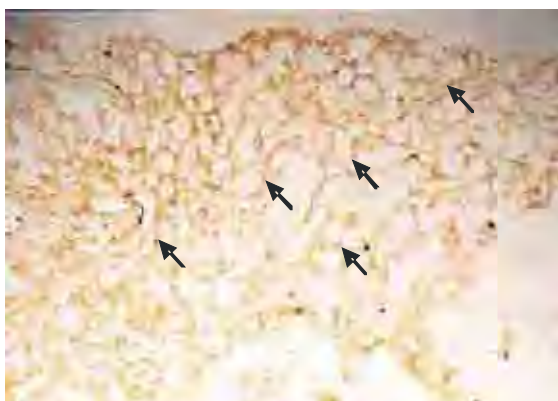


Figura 11 - RANKL – Grupo controle. Período de 40 dias. Redução na imunomarcção desta proteína na área medular (setas) (DAB, original de 63X).

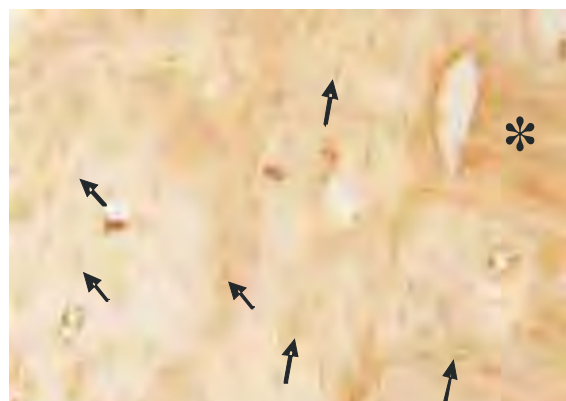


Figura 12 – OC - Grupo controle. Período de 60 dias. Imunomarcção desta proteína em osteócitos da cortical superior (setas). Nota-se a marcação de fundo (\*) (DAB, original de 200X).



Figura 13 - COL-I – Grupo controle. Período de 15 dias. Imunomarcção significativa desta proteína na área medular (original 160X).

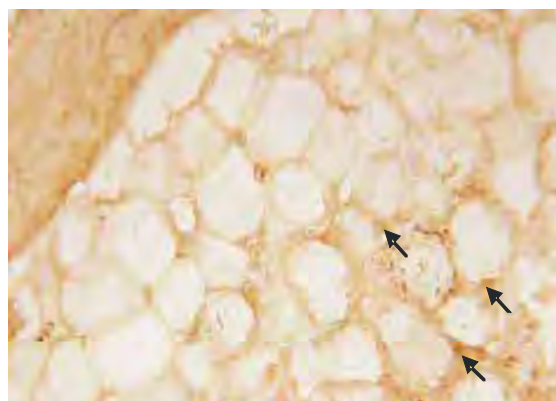


Figura 14 - COL-I – Grupo controle. Período 60 dias. Redução na imunomarcção (setas) desta proteína na área medular (DAB, original de 200X).



Figura 15 – Corte evidenciando a ausência de marcações inespecíficas na cortical superior (controle negativo) (DAB, original de 200X)



Figura 16 – RANKL – Grupo Controle. Período de 5 dias. Imunomarcções positivas para osteócitos na cortical inferior (controle positivo).

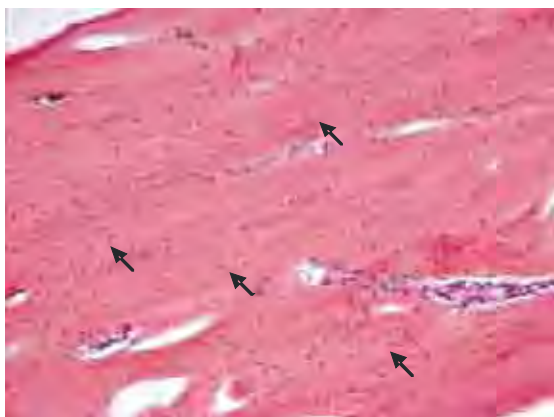


Figura 17 - Grupo controle. Período de 5 dias. Presença de osteócitos (setas) bem marcados na cortical superior (HE, original de 200X).

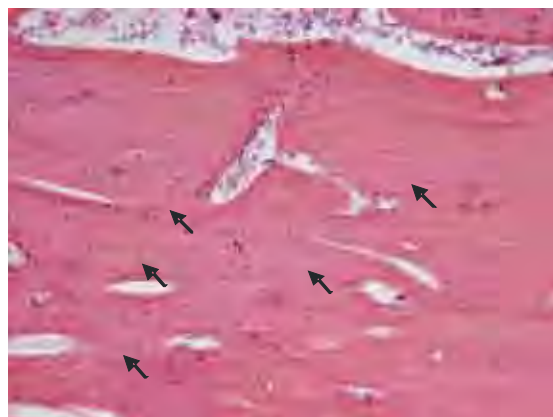


Figura 18 - Grupo tratado. Período de 15 dias. Presença de osteócitos (setas) bem marcados na cortical inferior (HE, original de 200X).

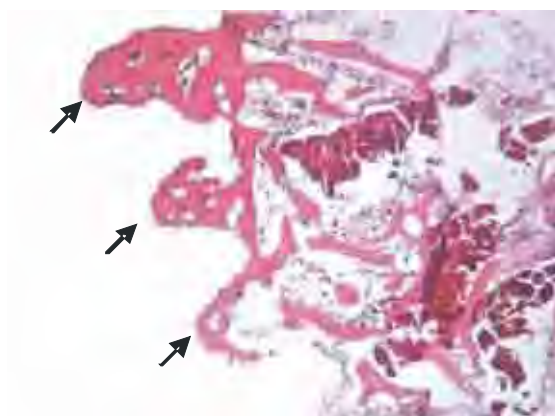


Figura 19 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea acompanhando o formato das espiras (setas) do implante. Notas-se a presença de inúmeros osteócitos nas corticais (HE, original de 100X).



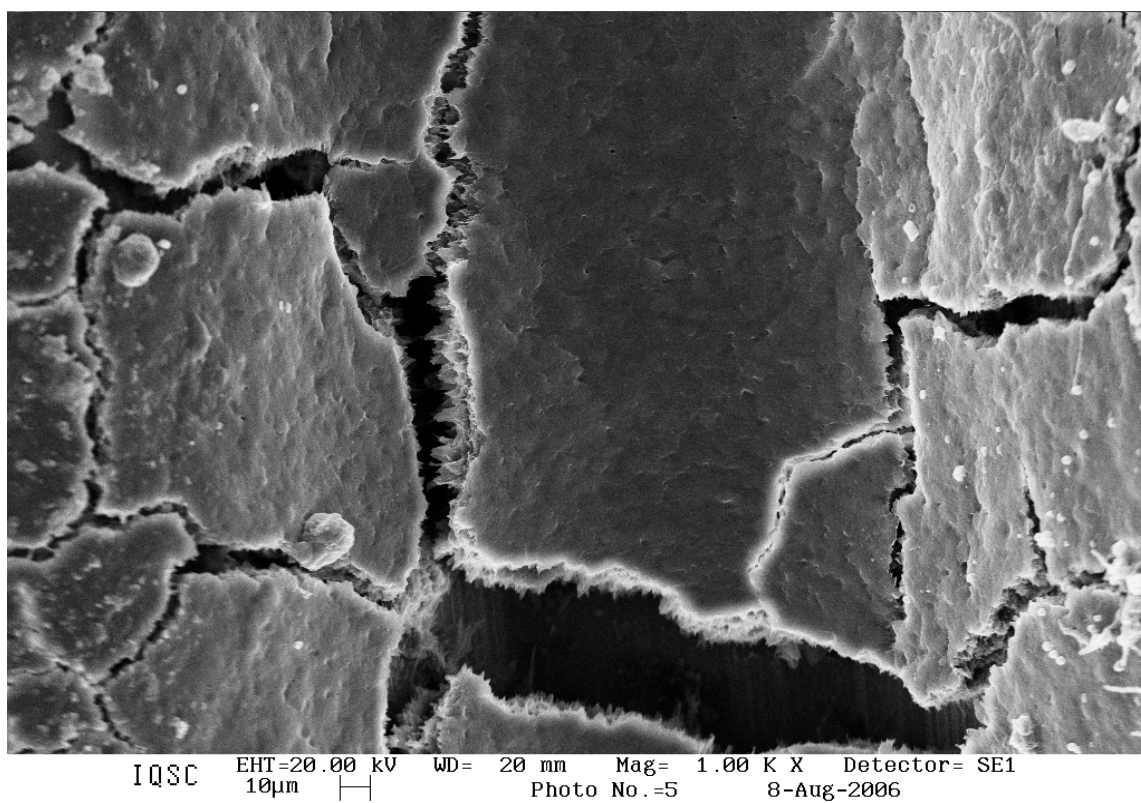


Figura 20 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Implantes recobertos por tecido ósseo neoformado (original de 1000X).

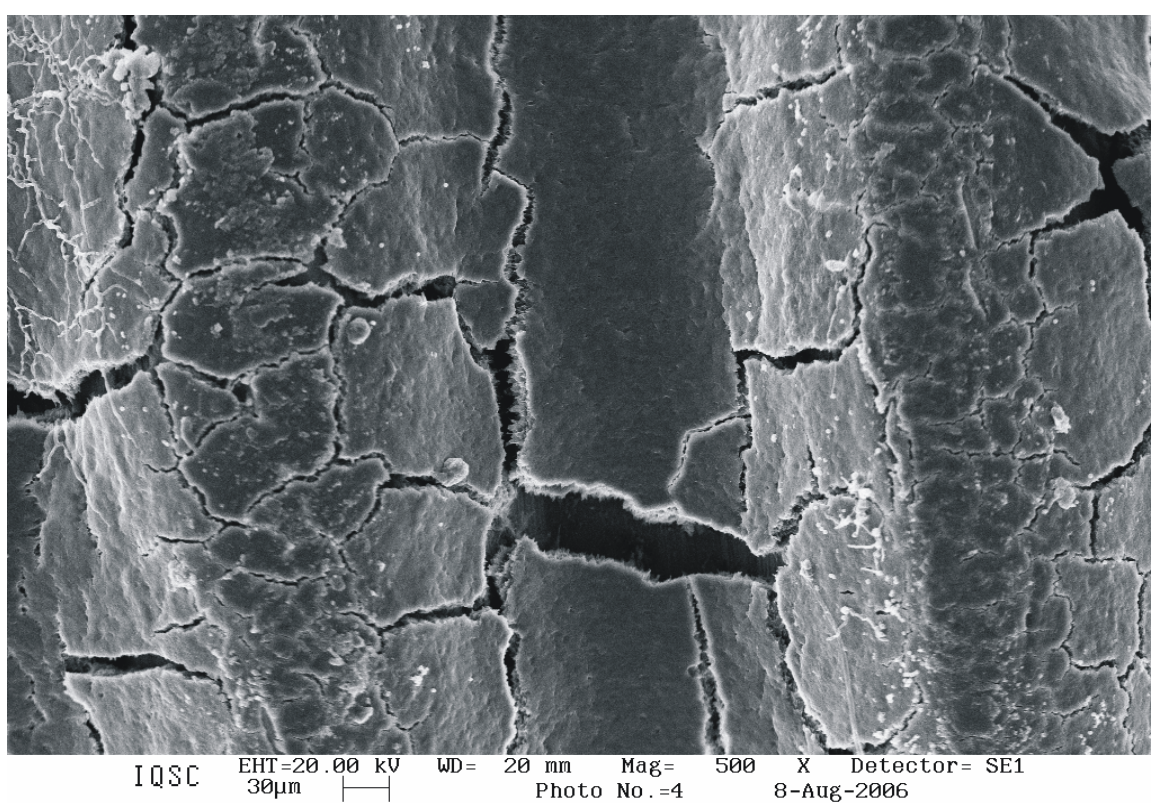


Figura 21 – Grupo controle. Período de 60 dias. Implantes recobertos por tecido ósseo neoformado (original de 1000X).

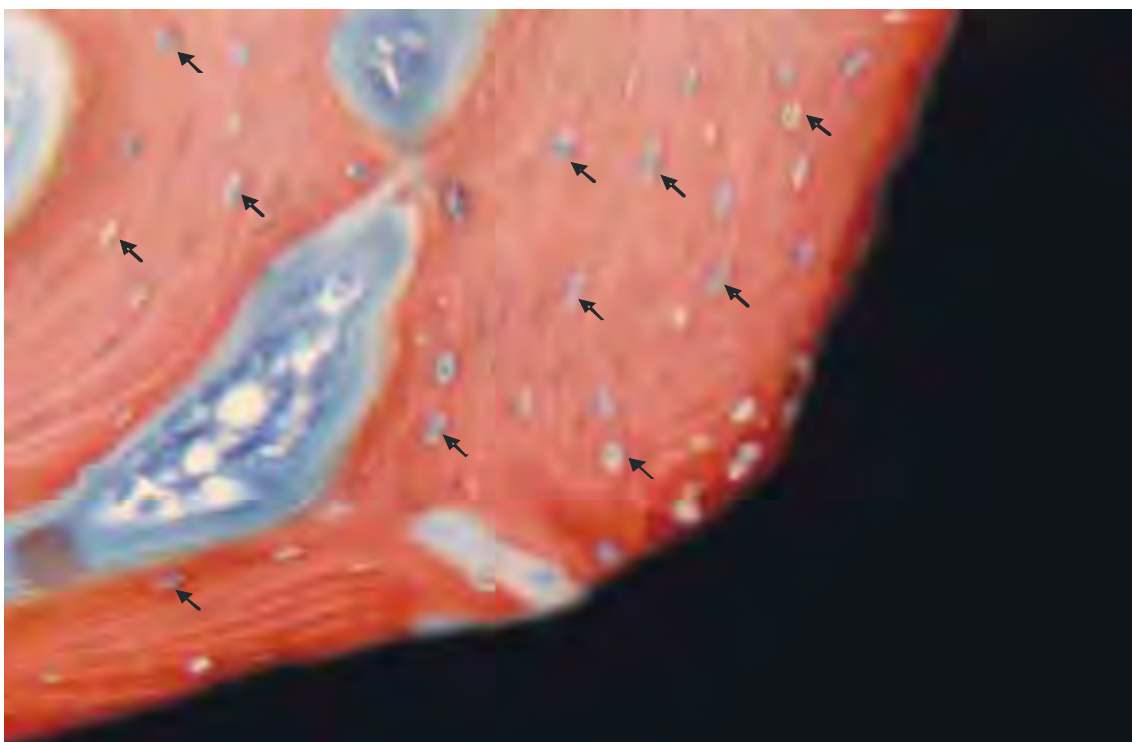


Figura 22 – Grupo controle. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado celularizado (setas), corado pelo vermelho de alizarina, em contato com a superfície do implante na área do módulo de rebordo (Vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X).

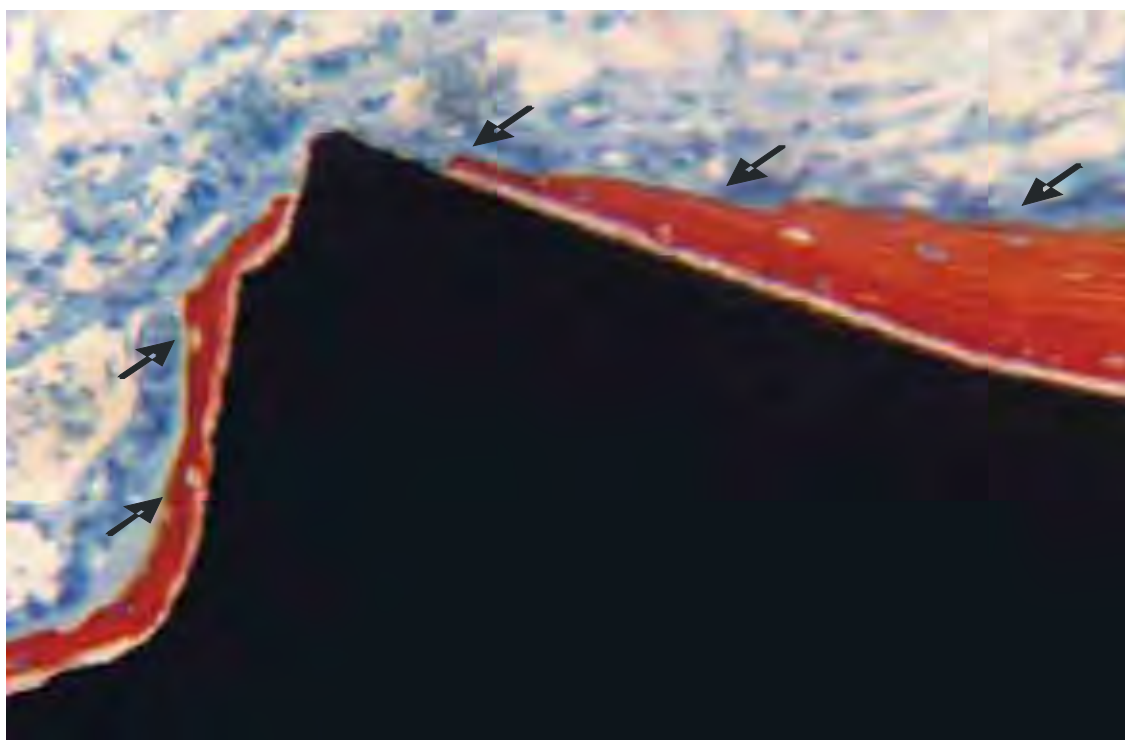


Figura 23 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea no pico e vale da rosca do implante (setas). Destaca-se a presença de tecido conjuntivo, corado pelo azul de Stevenel, em contato com a superfície do implante (Vermelho de alizarina e azul de Stevenel , original de 400X).



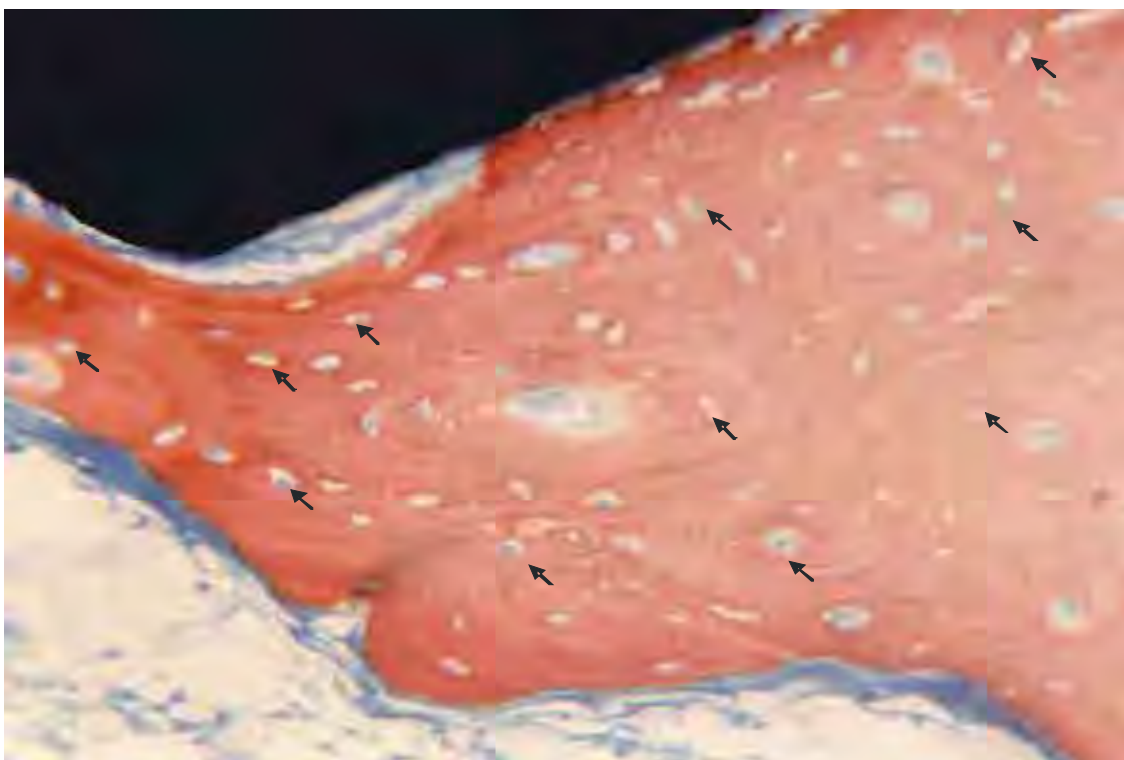


Figura 24 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Neoformação óssea em contato com a superfície do implante no módulo de rebordo e presença de osteócitos (setas). Nota-se presença de tecido conjuntivo nessa interface (Vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X).

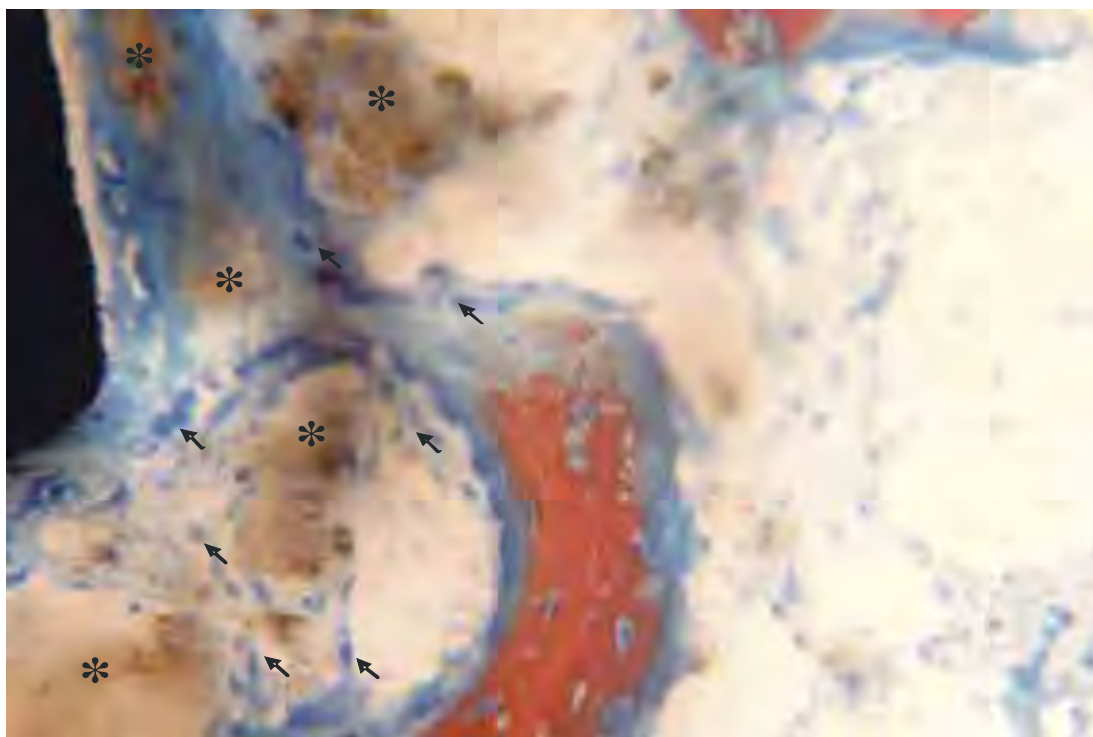


Figura 25 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Presença de tecido conjuntivo com inúmeros osteoblastos (setas) na área medular, envolto pelo remanescente do PLA/PGA (\*) (Vermelho de alizarina e azul de Stevenel, original de 400X).

# Tabelas

Tabela 1 – Valores, médias e desvios-padrão de torque-reverso, em N.cm, para os grupos em estudo de acordo com o período de avaliação.

Estatística	Período (dias)			
	40		60	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	11	10	22	16
2	10	11	11	11
3	8	12	10	22
4	10	12	16	12
5	12	11	8	18
Média	10,2	11,2	13,4	15,8
Desvio padrão	1,5	0,8	5,6	4,5

Tabela 2 - Valores-p do teste de Wilcoxon para a comparação entre os grupos controle e tratado nos períodos de avaliação para cada proteína.

Proteína	Período			
	5	15	40	60
OPG	0,787	0,138	0,068	0,109
RANKL	0,208	0,201	0,593	0,173
OC	0,593	0,138	0,109	1,000
COL-I	0,109	0,178	0,593	0,116

Tabela 3 - Frequências de médias percentuais de expressão das proteínas, de acordo com o período de avaliação para os grupos: controle e tratado.

Proteína	M(%)	Controle				K-W*	Tratado				K-W*
		Período (dias)					Período (dias)				
		5	15	40	60		5	15	40	60	
OPG	0	4	0	4	2		5	1	7	5	
	20	6	5	4	12		5	7	2	9	
	60	2	3	1	1		2	1	0	1	
	90	0	1	0	0		0	0	0	0	
	Total	12	9	9	15	0,05**	12	9	9	15	0,05**
RANKL	0	4	2	3	3		3	1	3	6	
	20	4	4	3	6		3	3	2	5	
	60	4	3	3	6		5	5	4	4	
	90	0	0	0	0		1	0	0	0	
	Total	12	9	9	15	0,91	12	9	9	15	0,38
OC	0	1	1	5	5		1	3	3	5	
	20	9	4	4	7		8	5	5	7	
	60	2	4	0	3		3	1	1	3	
	90	0	0	0	0		0	0	0	0	
	Total	12	9	9	15	0,04**	12	9	9	15	0,46
COL-I	0	3	3	7	2		6	6	6	5	
	20	9	5	2	12		6	3	3	10	
	60	0	1	0	1		0	0	0	0	
	90	0	0	0	0		0	0	0	0	
	Total	12	9	9	15	0,02**	12	9	9	15	0,31
		0,59	0,18	0,15	0,48		0,42	0,02**	0,06	0,89	

\* valores p do teste de Kruskal-Wallis

\*\* significativo ao nível de 5%

Tabela 4 – Valores dos postos médios do teste de Kruskal-Wallis para as proteínas analisadas no período de 15 dias, para o grupo tratado.

Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=36) = 11,37403$   $p = 0,0199$

K-W= **0.020**

	Código	N válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	2	9	182.5	20.3
RANKL	6	9	232.5	<b>25.8</b>
OC	10	9	153.5	17.1
COL-I	14	9	97.5	<b>10.8</b>

Tabela 5 - Valores dos postos médios do teste de Kruskal-Wallis para as proteínas analisadas no período de 15 dias, para o grupo controle.

Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=36) = 4,917252$   $p = ,1780$

K-W= 0.178				
	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	2	9	203.5	22.6
RANKL	6	9	159.0	<b>17.7</b>
OC	10	9	185.5	20.6
COL-I	14	9	118.0	<b>13.1</b>

Tabela 6 – Valores percentuais das médias de extensão linear de contato entre tecido ósseo/implante e entre pré-osso/implante para os grupos controle e tratado.

Grupos	Médias	
	Tecido ósseo	Pré-osso
Controle	35,14%	64,86%
Tratado	20,66%	79.34%



# Anexo A

Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO COPOLÍMERO DE ÁCIDO POLILÁCTICO E POLIGLICÓLICO NO REPARO ÓSSEO AO REDOR DE IMPLANTES INSTALADOS EM TÍBIA DE COELHO. ANÁLISE BIOMECÂNICA, HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA" sob responsabilidade de IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR THALLITA PEREIRA QUEIROZ, ROBERTA OKAMOTO E EDUARDO HOCHULI VIEIRA 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 de 16 de junho de 2005, de acordo com o protocolo nº 70/05.

Araçatuba, 11 de julho de 2005.



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



# Anexo B

Normas da Revista **Clinical Oral Implants Research**, selecionada para a publicação do artigo.

## **Author Guidelines**

From December 1<sup>st</sup> 2005 all print (hard) copy submissions will be returned to the author and will not be accepted for review. Online Submission is now available and submissions will be welcomed. <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

**Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. The review process is entirely electronic-based.**

Editorial Office:

Clinical Oral Implants Research

Department of Comprehensive Dental Care

University of Berne

School of Dental Medicine

Freiburgstrasse 7

CH-3010 Berne

Switzerland

Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur:

[coir@zmk.unibe.ch](mailto:coir@zmk.unibe.ch)

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. An Exclusive Licence Form has to be returned to the production department signed on behalf of all co-authors. An article will not proceed in production before the Exclusive Licence Form has been received at the production office. **The Exclusive Licence Form can be downloaded at [www.blackwellpublishing.com/clar](http://www.blackwellpublishing.com/clar) or <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> under 'Instructions and Forms'.**

Please send the form to:

Clinical Oral Implants Research

Blackwell Publishing

101 George Street

Edinburgh

EH2 3ES

UK

Fax: +44 (0)131 2263803

The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic databases and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

The instructions to authors will be strictly adhered to by the Editor. Manuscripts otherwise prepared will be returned to the authors for revision prior to review.

**Acceptable material** - Original investigations, reviews, and case reports. The last will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

**Electronic submission:** Authors must submit their manuscripts electronically to the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site.

Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received. If this acknowledgement is not received within a week or so then authors should enquire at the editorial office: Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur: [coir@zmk.unibe.ch](mailto:coir@zmk.unibe.ch)

**Manuscripts** - The author is responsible for all statements made in the work, including changes made by the copy editor, which must be reviewed in proof. Manuscripts must be written in English. Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. One printed page is the equivalent of 3.8 typed double-spaced pages using a 12-pitch font (12 characters per inch). Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of DKK 800 per page. The author must list 5 appropriate key words for indexing purposes. The Online Submission System offers a list of keywords to choose from and additional keywords can be manually added.

The article should be clearly divided as follows:

**Abstract** - An abstract should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives - material and methods - results - conclusions, and no other information.

**Introduction** - Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

**Material and methods** - Material and methods should be presented 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 your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

**Discussion** - Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

**Acknowledgements** - Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

**Short communications** -Short communications, limited to two printed pages including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or has the potential for

great impact. Short communications need not follow the usual division into Material and methods, etc., but should have an abstract.

**References** - in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in *Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors* (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus:

Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

c) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining on typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript), and page numbers.

**Examples** - Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

**Illustrations** - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Line drawings should be professionally drawn; halftones should exhibit high contrast. Colour illustrations in small numbers may be accepted free of charge to the authors at the discretion of the Editor. Otherwise the author must pay for the illustrations at a rate to be quoted by the publisher. To download a Colour Work agreement form, go to: [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_X\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf)

Please find the Electronic Artwork Guidelines on the Blackwell Publishing Author Service website

<http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/author.asp>

**Tables** - Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

**Scientific names** - Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., *Ps. for Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

**Abbreviations and symbols** - The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use *no roman* numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's third new international dictionary* will be adhered to.

**Author material archive policy** - Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any



**material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.**

**Proofs** - The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:  
<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

**Offprints** - The senior authors will receive a PDF offprints of their article. Additional hard copy offprints can be ordered from the publisher by using the offprint order form accompanying the proofs when page proofs are returned.

**NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.**

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [www.blackwellpublishing.com/bauthor](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor) for more details on online production

tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.



# Anexo C

## Protocolo de reação imunoistoquímica em tecido ósseo

Após descalcificação das peças em EDTA à 5% (pH 7,0 por um período de 3 meses) e crioproteção em solução de sacarose 30% (Merck), por 3 dias, mantido em geladeira. Este processo possibilita a penetração homogênea da solução de sacarose nos tecidos, impedindo a formação de bolhas de ar no interior da peça, que causaria danos aos tecidos durante a microtomia.

A microtomia foi realizada em criostato (Mícron, Zeiss). As peças foram fixadas em suporte metálico e incluídas em TissueTek®. Foram obtidos cortes longitudinais com 16µm de espessura.

O protocolo padronizado incluiu as seguintes etapas:

1. Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;
2. Inibição da peroxidase endógena utilizando 500µl de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck) a 30% em 50 ml de PBS, por 30 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente;
3. Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;
4. Bloqueio das reações inespecíficas utilizando soro normal de burro a 5% (017000121) diluído em loaded 0,3% (PBS + Tritton X-100 0,3%), por 60 minutos, em repouso, a temperatura ambiente;
5. Lavagem das lâminas com PBS por 5 minutos;
6. Incubação do anticorpo primário na concentração de 1:100 para OPG, OC, colágeno I e RANKL, por 14 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente (figuras 16 e 17)
7. Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;

8. Incubação do anticorpo secundário Donkey  $\alpha$ -goat na concentração de 1:200, por 60 minutos, em repouso e em meio úmido, à temperatura ambiente ;
9. Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;
10. Incubação do complexo avidina-biotina (Kit ABC- Vectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories) utilizando 10 $\mu$ l da solução A e 10 $\mu$ l da solução B, diluídos em 980  $\mu$ l de PBS, por 60 minutos, em repouso e em meio úmido, à temperatura ambiente, para amplificação do sinal da reação;
11. Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;
12. Revelação da reação utilizando 5mg de Diaminobenzidina (DAB- Sigma, St. Louis, MO, EUA) como cromógeno, diluída em 30 mL de PBS e ativados com 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A revelação é controlada macro (figura 18) e microscopicamente.

Após o término da reação, as lâminas permaneceram à temperatura ambiente e, após secagem completa por aproximadamente 24 horas, os cortes foram imersos em xilol e as lâminas montadas com lamínulas utilizando permount como meio de montagem.

# Anexo D

Complementação das tabelas e gráficos das Análises Estatísticas.

## Análise Biomecânica

Tabela 7 do teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) com a correção de Welch, indicada quando a suposição de homogeneidade de variâncias não se verifica. A normalidade dos resíduos, outra condição da análise, não foi avaliada devido à quantidade pequena de medidas. Entretanto, acompanhou-se a literatura que tem comumente empregado este tipo de análise.

Tabela 7 - Análise de Variância dos valores de torque-reverso aplicada para a comparação das médias, com a estatística de Welch.

	Soma de Quadrados	df	Média de Quadrados	F	p
Entre os Grupos	92.950	3	30.983	2.257	0.121
Dentro de Grupos	219.600	16	13.725		
Total	312.550	19			

	Estatística	df1	df2	p
<b>Welch</b>	2.334	3	7.7	<b>0.153</b>
Brown-Forsythe	2.257	3	8.5	0.155

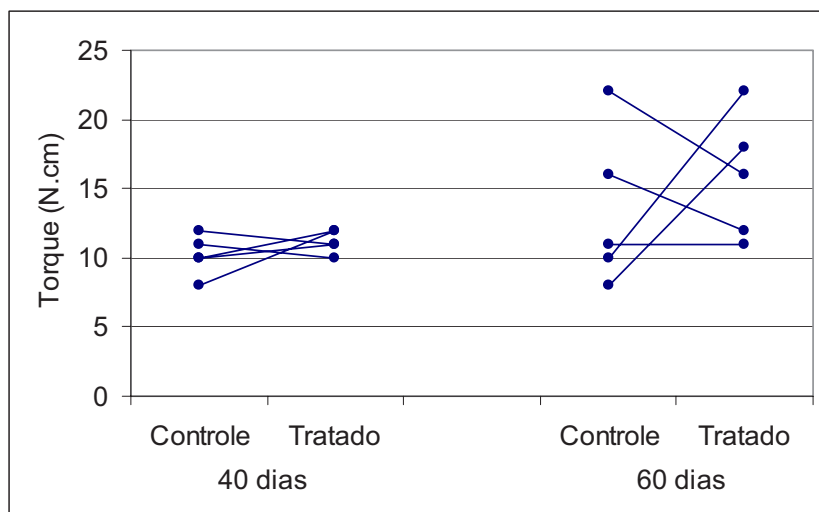


Figura 26 - Medidas de torque-reverso para os grupos controle e tratado, nos períodos de 40 e 60 dias. Não houve correlação entre os grupos analisados.

### Análise Imunoistoquímica

Nas figuras 25 a 28 estão representadas graficamente as % de ocorrências de médias percentuais de imunomarcações celulares para cada proteína, de acordo com o período de avaliação, para os grupos: controle e tratado.

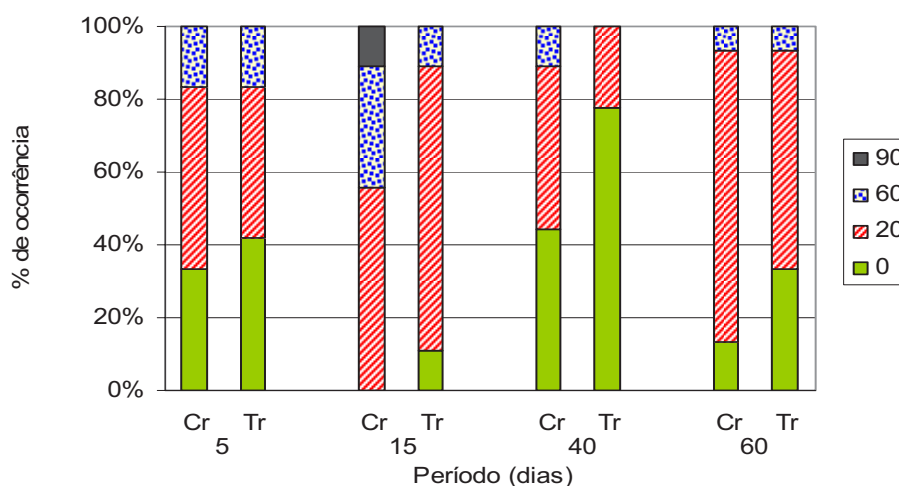


Figura 27 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína OPG.

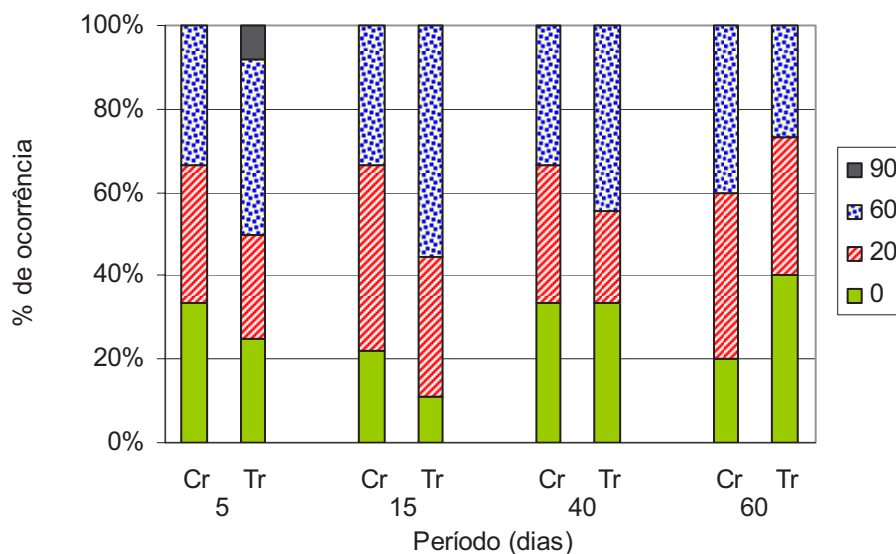


Figura 28 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína RANKL.

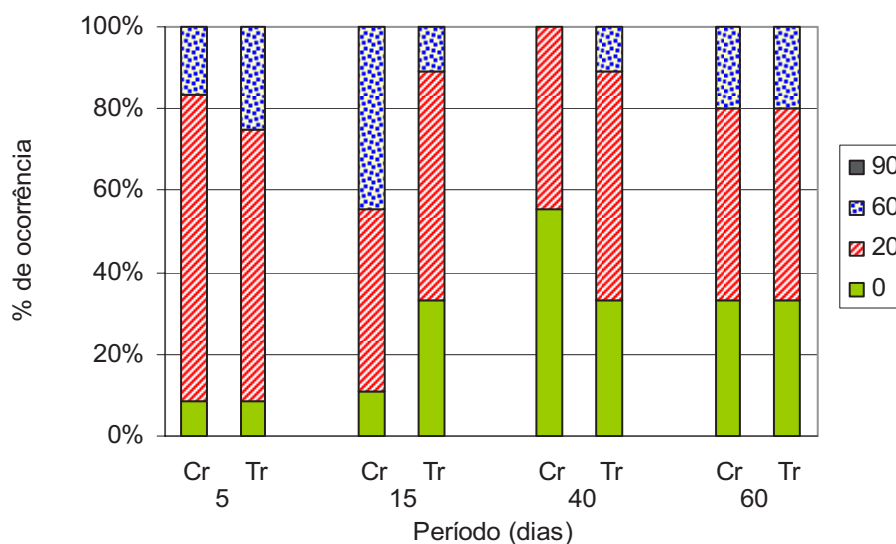


Figura 29 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína OC.

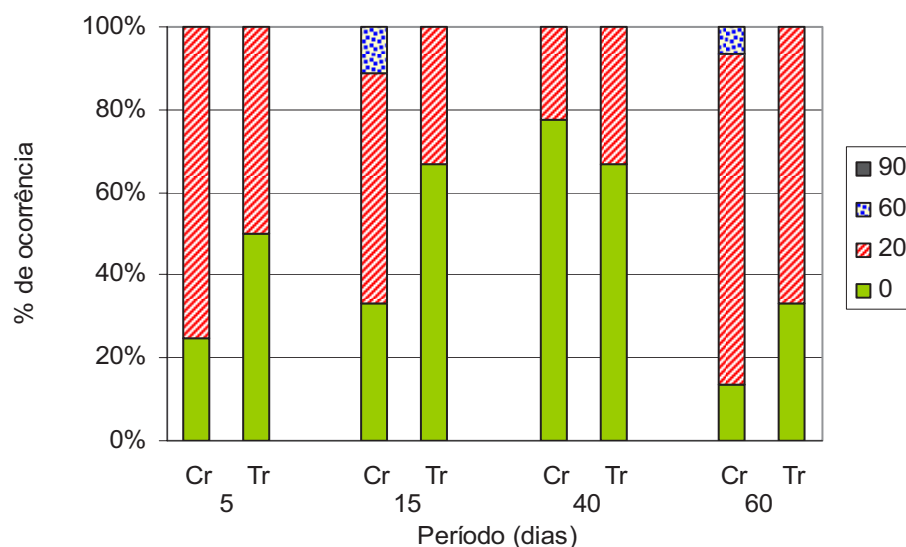


Figura 30 - Representação gráfica da % de ocorrência de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com os períodos de avaliação (5, 15, 40 e 60 dias) e com os grupos experimentais: Controle (Cr) e Tratado (Tr), relativas à proteína COL-I.

Tabela 8 - Freqüências absolutas e freqüências porcentuais (entre parênteses) de médias (%) de imunomarcações celulares para cada proteína, independentemente do período de avaliação, para os grupos: controle e tratado.

OPG	0	10	(22)	18	(40)
	20	27	(60)	23	(51)
	60	7	(16)	4	(9)
	90	1	(2)	0	(0)
RANKL	0	12	(27)	13	(29)
	20	17	(38)	13	(29)
	60	16	(36)	18	(40)
	90	0	(0)	1	(2)
OC	0	12	(27)	12	(27)
	20	24	(53)	25	(56)
	60	9	(20)	8	(18)
	90	0	(0)	0	(0)
Colágeno	0	15	(33)	23	(51)
	20	28	(62)	22	(49)
	60	2	(4)	0	(0)
	90	0	(0)	0	(0)



Tabela 9 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis e compar ações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 5 dias no grupo controle.

#### Entre proteínas no período de 5 dias

Teste de Kruskal-Wallis H ( 3, N= 48) =1,932222 p =,5866

K-W= 0.587

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	1	12	274.0	22.8
RANKL	5	12	310.0	25.8
OC	9	12	334.0	27.8
COL-I	13	12	258.0	21.5

#### Comparações múltiplas

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	1.000
RANKL	1.000		1.000	1.000
OC	1.000	1.000		1.000
COL-I	1.000	1.000	1.000	

Tabela 10 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 15 dias no grupo controle.

#### Entre proteínas no período de 15 dias

Teste de Kruskal-Wallis: H ( 3, N= 36) =4,917252 p =,1780

K-W= 0.178

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	2	9	203.5	22.6
RANKL	6	9	159.0	17.7
OC	10	9	185.5	20.6
COL-I	14	9	118.0	13.1

#### Comparações múltiplas

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	0.335
RANKL	1.000		1.000	1.000
OC	1.000	1.000		0.786
COL-I	0.335	1.000	0.786	

Tabela 11 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 40 dias no grupo controle.

**Entre proteínas no período de 40 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=36) = 5,352817$   $p = ,1477$   
 K-W= 0.148

	Código	N Válido	Soma de Postos	Média dos Postos
OPG	3	9	178.5	19.8
RANKL	7	9	211.5	23.5
OC	11	9	154.0	17.1
COL-I	15	9	122.0	13.6

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	1.000
RANKL	1.000		1.000	0.272
OC	1.000	1.000		1.000
COL-I	1.000	0.272	1.000	

Tabela 12 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 60 dias no grupo controle.

**Entre proteínas no período de 60 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=60) = 2,485382$   $p = ,4779$   
 K-W= 0.478

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	4	15	440.0	29.3
RANKL	8	15	535.5	35.7
OC	12	15	414.5	27.6
COL-I	16	15	440.0	29.3

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	1.000
RANKL	1.000		1.000	1.000
OC	1.000	1.000		1.000
COL-I	1.000	1.000	1.000	

Tabela 13 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas. para o período de 5 dias no grupo tratado.

**Entre proteínas no período de 5 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=48) = 8,195050$   $p = ,0421$   
 K-W= 0.421

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	1	12	257.5	21.5
RANKL	5	12	364.0	30.3
OC	9	12	347.5	29.0
COL-I	13	12	207.0	17.3

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		0.723	1.000	1.000
RANKL	0.723		1.000	0.132
OC	1.000	1.000		0.243
COL-I	1.000	0.132	0.243	

Tabela 14 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 15 dias no grupo tratado. Note a diferença estatisticamente significativa entre as proteínas RANKL e COL-I, no teste de comparações múltiplas.

**Entre proteínas no período de 15 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=36) = 11,37403$   $p = ,0199$   
 K-W= **0.020**

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	2	9	182.5	20.3
RANKL	6	9	232.5	25.8
OC	10	9	153.5	17.1
COL-I	14	9	97.5	10.8

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	0.343
RANKL	1.000		0.463	<b>0.015</b>
OC	1.000	0.463		1.000
COL-I	0.343	<b>0.015</b>	1.000	

Tabela 15 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 40 dias no grupo tratado.

**Entre proteínas no período de 40 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=36) = 7,558244$   $p = ,0561$   
 K-W= 0.056

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	3	9	121.0	13.4
RANKL	7	9	217.0	24.1
OC	11	9	191.5	21.3
COL-I	15	9	136.5	15.2

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		0.190	0.688	1.000
RANKL	0.190		1.000	0.430
OC	0.688	1.000		1.000
COL-I	1.000	0.430	1.000	

Tabela 16 - Teste estatístico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas entre as proteínas analisadas, para o período de 60 dias no grupo tratado.

**Entre proteínas no período de 60 dias**  
 Teste de Kruskal-Wallis:  $H(3, N=60) = ,6103448$   $p = ,8941$   
 K-W= 0.894

	Código	N Válido	Soma dos Postos	Média dos Postos
OPG	4	15	444.5	29.6
RANKL	8	15	477.0	31.8
OC	12	15	483.5	32.2
COL-I	16	15	425.0	28.3

**Comparações múltiplas**

	OPG	RANKL	OC	COL-I
OPG		1.000	1.000	1.000
RANKL	1.000		1.000	1.000
OC	1.000	1.000		1.000
COL-I	1.000	1.000	1.000	



# Anexo E

## Ilustração do Procedimento cirúrgico



Figura 31 – Incisão nos planos dérmico e muscular de aproximadamente 3 cm de comprimento, na porção medial da tíbia direita.



Figura 32 - Incisão periosteal na porção medial da tíbia direita.



Figura 33 – Leito receptor dos implantes, após descolamento em espessura total.



Figura 34 – Fresas utilizadas na confecção dos defeitos ósseos (Conexão, SP, Brasil).



Figura 35 – Início do preparo do leito receptor do implante com a fresa lança. Primeiro defeito.



Figura 36 – Preparo sequencial do leito receptor com a fresa helicoidal de 2,0mm. Primeiro defeito.





Figura 37 – Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa piloto de 2,0mm/3,0mm. Primeiro defeito.



Figura 38 - Finalização do preparo do leito receptor com a fresa helicoidal de 3,0mm. Primeiro defeito.



Figura 39 - Início do preparo do leito receptor do implante com a fresa lança. Segundo defeito.



Figura 40 - Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa helicoidal de 2,0mm. Segundo defeito.

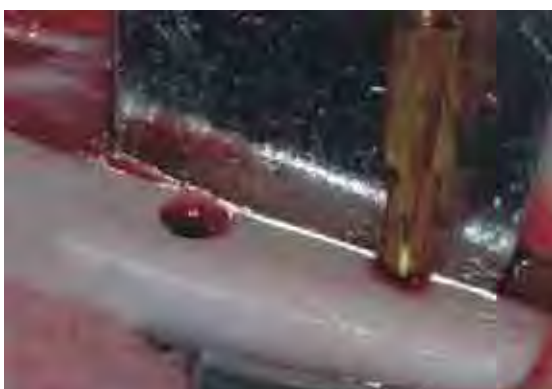


Figura 41 - Preparo seqüencial do leito receptor com a fresa piloto de 2,0mm/3,0mm. Segundo defeito.



Figura 42 - Finalização do preparo do leito receptor com a fresa helicoidal de 3,0mm. Segundo defeito.



Figura 43 – Leito receptor dos implantes após a confecção dos dois defeitos ósseos.



Figura 44 – Instalação do implante sem estabilidade primária. Defeito preenchido com o coágulo sanguíneo.



Figura 45 – Leito receptor após a instalação do implante do grupo controle.



Figura 46 – Preenchimento do segundo defeito com PLA/PGA, previamente à instalação do implante.



Figura 47 - Instalação do implante envolto com PLA/PGA, sem estabilidade primária.



Figura 48 – Leito receptor após a instalação dos implantes.

# Anexo F

## Ilustração da Análise Biomecânica



Figura 49 - Período de 15 dias. Leito receptor dos implantes, após reabertura. O módulo de rebordo dos implantes encontra-se parcialmente coberto por tecido ósseo.



Figura 50 - Período de 60 dias. Leito receptor dos implantes, após reabertura. O módulo de rebordo encontra-se parcial ou totalmente coberto por tecido ósseo neoformado.



Figura 51 - Ostectomia realizada para exposição do módulo de rebordo do implante, durante a análise biomecânica.



Figura 52- Adaptação da chave intermediária ao módulo de rebordo do implante, para a realização do teste biomecânico.



Figura 53 - Torquímetro analógico utilizado para os testes biomecânicos.





## Anexo G

### Ilustração do Processamento Imunoistoquímico



Figura 54 - Cortes longitudinais obtidos em criostato e montados em lâmina gelatinizada para o processamento imunoistoquímico.



Figura 55 - Incubação do anticorpo primário, pipetando-o sobre os cortes.



Figura 56 - Colocação do Paraffilm sobre os cortes para garantir um adequado contato do anticorpo com os tecidos durante a incubação.



Figura 57 - Revelação da reação imunoistoquímica utilizando-se a DAB como cromógeno. Detalhe do controle macroscópico realizado.

# Anexo H

## Ilustração da Análise Imunoistoquímica

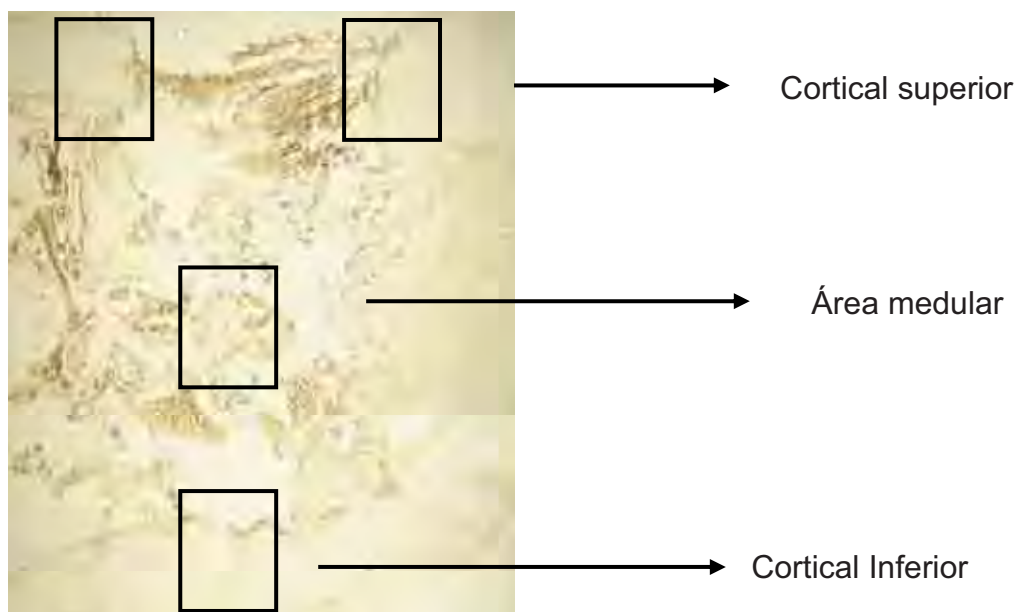


Figura 58 - Extensão longitudinal do defeito ósseo, dividido em 3 partes. Exemplo da expressão de RANKL no grupo tratado, aos 5 dias. (DAB, original de 4X).



Figura 59 - Microscópio óptico acoplado à câmera de captação de imagens e conectado ao computador.



Figura 60 - Software analisador de imagens IM50 exemplificando captura no aumento de 40X.

# Anexo I

## Ilustração da Análise Histológica

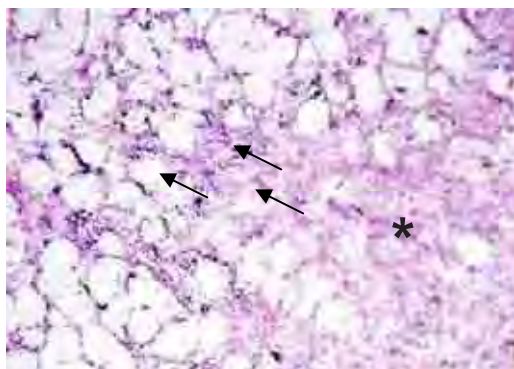


Figura 61 - Grupo controle. Período de 5 dias. Observa-se a presença de células inflamatórias (setas) e a formação de tecido mesenquimal (\*) (HE, original de 20X).

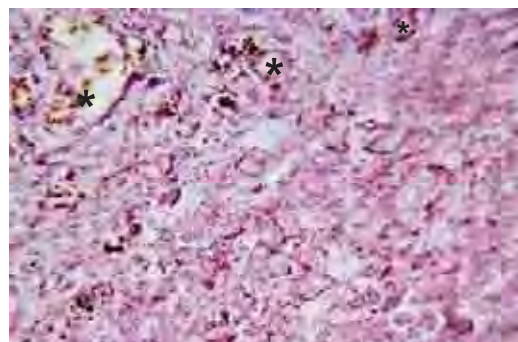


Figura 62 - Grupo tratado. Período de 15 dias. Medular celularizada, com áreas sugestivas da presença do copolímero (\*) e de formação de tecido mesenquimal (HE, original de 160x).



Figura 63 - Grupo controle. Período de 15 dias. Nota-se início de formação de tecido ósseo, caminhando da cortical em direção à medular (HE, original de 63X).

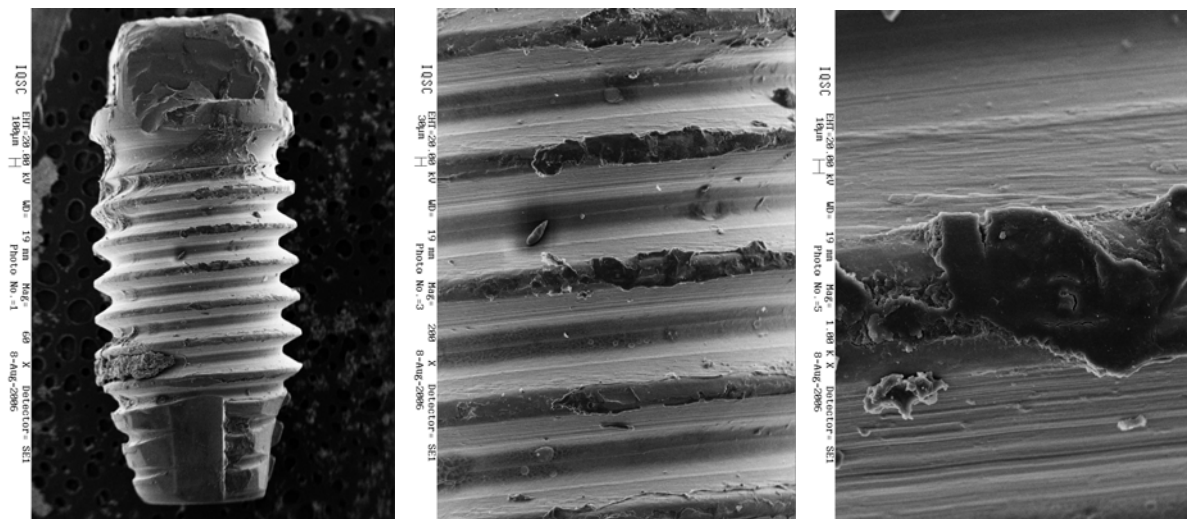


Figura 64 - Grupo controle. Período de 60 dias. Tecido ósseo neoformado acompanhando o negativo da rosca do implante. Nota-se a presença de inúmeros osteócitos (setas) (HE, original de 400X).

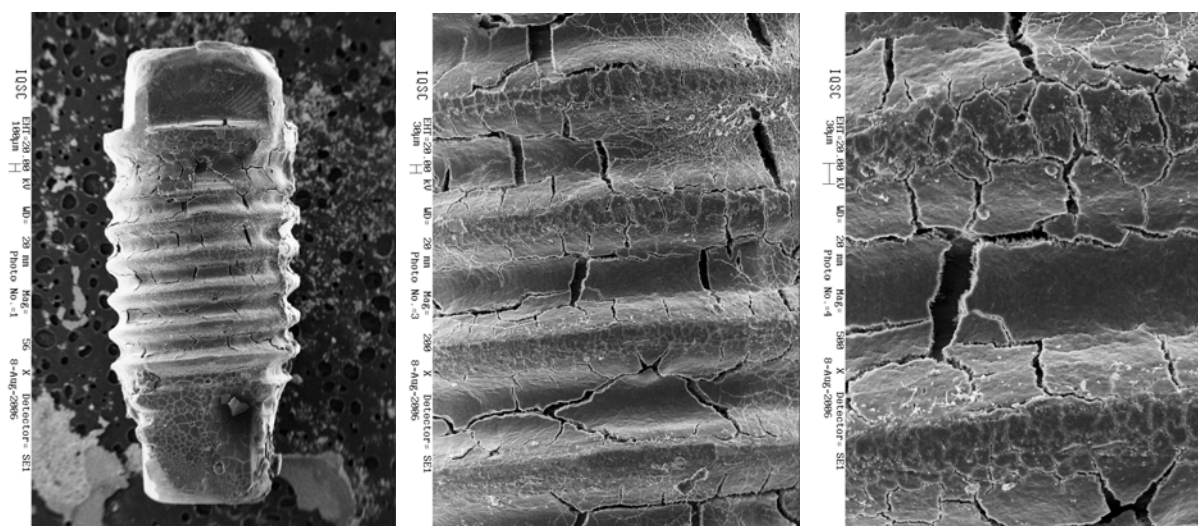


# Anexo J

## Ilustração da MEV



Figuras 65 – 67 – MEV – Grupo tratado. Período de 40 dias. Observa-se osso neoformado em contato com a superfície do implante (originais de 60X, 200X e 1000X, respectivamente).

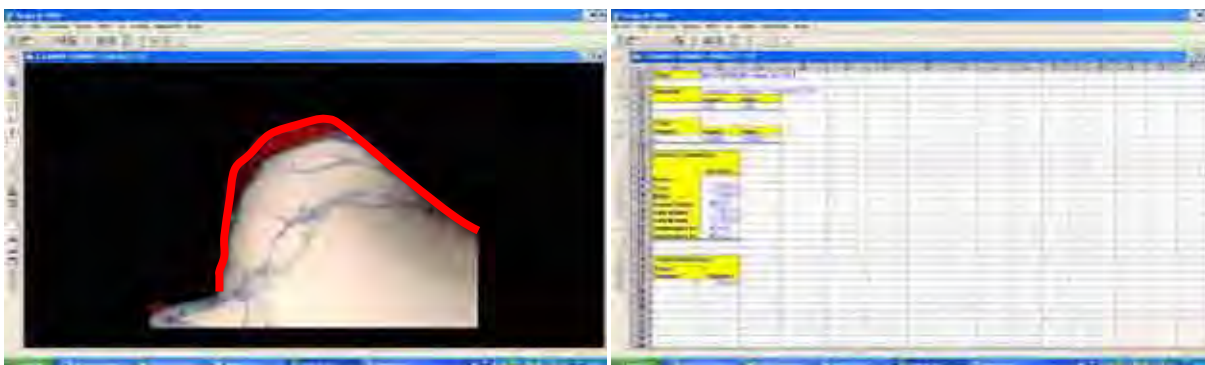


Figuras 68 – 71 – MEV – Grupo tratado. Período de 60 dias. Observa-se osso neoformado em contato com a superfície do implante em maior quantidade quando comparado ao período de 40 dias (originais de 60X, 200X e 500X, respectivamente).

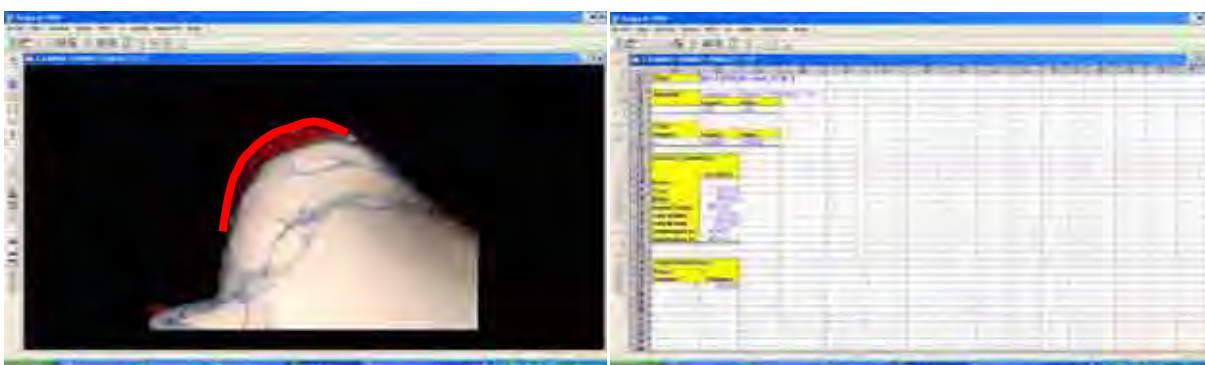


# Anexo L

## Ilustração da Análise Histométrica



Figuras 72 – 73 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Mensuração do perímetro total do vale do implante por meio do Programa Imagelab 2000 e cálculo do perímetro utilizando a ferramenta “cálculo de regiões”.



Figuras 74 – 75 - Grupo tratado. Período de 60 dias. Mensuração do perímetro de tecido ósseo neoformado (corado pelo vermelho de alizarina) em contato com a superfície do implante, na área do vale, por meio do Programa Imagelab 2000 e cálculo do perímetro utilizando a ferramenta “cálculo de regiões”.