



Marcelo Sabbag

Ab la

*Avaliação do Processo de Reparo Ósseo após Enxerto Ósseo Autógeno
tratado com Tetraciclina Hidroclorídrica. Estudo Histomorfológico em
Tíbia de Coelhos.*



M_{arcelo} ***S***_{abbag} ***A***_{bla}

*Avaliação do Processo de Reparo Ósseo após Enxerto Ósseo Autógeno
tratado com Tetraciclina Hidroclorídrica. Estudo Histomorfológico em
Tíbia de Coelhos.*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia do “Campus” de Araçatuba –
UNESP, para obtenção do grau de MESTRE EM
ODONTOLOGIA - Área de Concentração:
Implantodontia.

Orientador: Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba- SP
2005

Dedicatória

A o meu Pai, Migbel Abla, que me educou como filho e sempre me inspirou profissionalmente.

A minha mãe Marlene Sabbag Abla (in memoriam) pela base que me deu, apesar de seu pouco tempo de convívio conosco.

As minhas irmã(o)s, Milene, Maristela, Melissa, Gilberto, Maurizio e Klaus que sempre foram meus alicerces.

A Dorothy Tayar Abla e Flavia Tayar, que se somam à minha vida a cada dia.

A o Tio Felipe e tia Nagila e Omar que transformaram meu mestrado em um Lar.

A meus tios (as), primos (as), pois, minha família é meu maior bem.

A tia Ilda pela correção.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Jr.

Pelos muitos conselhos, que, com sua calma, me orientaram profissional e, talvez sem perceber, pessoalmente. Foi seu exemplo, que me inspirou a continuar este trabalho, apesar de adversidades; exemplo este que procurarei seguir em minha carreira profissional e vida pessoal. Obrigado ao Professor e ser humano Idelmo Rangel Garcia Jr.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho pelo apoio em todos os momentos.

Ao Mestre Luis Antonio Gomes e Yu Li Fan pela iniciação na implantodontia e pelo incentivo que me trouxe até aqui.

Aos colegas Oswaldo Bergamaschi, Marcelo Maia, Mauricio Querido e Cristiane Seignemartin pelo apoio.

Aos colegas Karem Hellen Sisti, Walter Maura Souza e Andrea Achar Cury eternos companheiros.

E, especialmente, a Carlos Alberto Fujiwara, um companheiro inseparável para todos os momentos.

Aos colegas da Pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo companheirismo.

A Claudinha pela especial atenção.

A Marina pela especial atenção.

Aos funcionários do Biotério Odair e Camilo pelo profissionalismo e dedicação a este trabalho.

A minha equipe, Mercedes, Cristina, Geni e Érika.

Aos meus colegas, Rodrigo, Renata, Juca, Amanda, Adriana e Álvaro.

À UNESP pelo apoio e oportunidade.

Epígrafe

“O Homem não é o que tem ou
pode.

É um pouco o que sabe.

Muito o que sonha.

Mas, acima de tudo, o que
faz aos outros “.

Manoel Affonso de Melo,
educador.

Índice

1.	INTRODUÇÃO	13
	RESUMO	16
	ABSTRAT	18
	LISTA DE FIGURAS	20
	LISTA DE TABELAS	22
	LISTA DE GRÁFICOS	24
	LISTA DE ABREVIATURAS	26
2.	REVISÃO DA LITERATURA	
2.1.	TECIDO ÓSSEO	28
2.2.	TETRACICLINA HIDROCLORÍDRICA	45
3.	PROPOSIÇÃO	51
4.	MATERIAL E MÉTODO	53
5.	RESULTADO	63
6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÃO	81
8.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	83

1.Introdução

1. Introdução

As primeiras tetraciclina descobertas foram a clorotetraciclina e a oxitetraciclina, em 1948, a partir de culturas do *Streptomyces aureofaciens* e *S.rimosus*, pelo método de fermentação. Alguns anos mais tarde, outras tetraciclina foram identificadas, sendo estas obtidas naturalmente de microorganismos ou como produtos de processos semi-sintéticos. (Ribeiro, 2004).

São antibióticos de amplo espectro de ação, ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, também são adicionadas em doses sub-terapêuticas na alimentação de animais, como promotores do crescimento (Ribeiro, 2004).

A utilização tópica de antibióticos à base de tetraciclina hidrocloreídrica (TTC) tem sido amplamente discutida sobre superfície radiculares dentais, na área de Periodontia. O propósito do seu uso consiste na ação desmineralizadora sobre a raiz dental, descalcificando o cemento e agindo como detergente de resíduos alimentares

ou sedimentos da placa bacteriana que adere sobre a raiz. (Isik, 1997; Isik, 2000; Babay, 2001).

Considerando as propriedades das tetraciclinas hidroclorídricas sobre a superfície radicular e do seu uso em contato com enxertos ósseos, esperamos uma ação desmateralizante e a mesma ação sobre o cimento, expondo o seu conteúdo orgânico-protêico.

Resumo

Resumo

O presente estudo analisou o processo de reparo ósseo em cavidades ósseas experimentais realizadas em tíbias de coelho, quando implantado partículas de enxerto ósseo homogêneo, tratadas com solução de tetraciclina. Foram realizadas análises histológicas e submetidas a tratamento estatístico após histometria. Os resultados mostraram que não houve, estatisticamente, diferenças significantes entre o grupo controle onde não houve nenhuma implantação, e o grupo tratado utilizando a tetraciclina. O processo de reparo ocorreu de maneira similar em ambos os grupos. Não houve reabsorção completa dos fragmentos ósseos implantados, permanecendo até o período estudado de 30 dias pós-operatórios.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the bone repair process in experimental bone cavities which were realized in rabbit tibias when particles of homogenous bone graft were implanted and treated with tetracycline. Histological analysis were carried out and undergone a statistical treatment after HISTOMETRIA. The results showed that the hydrochloric tetracycline didn't interfered on the bone graft performance, which was used on the treatment of experimental bone defects. There wasn't histological evidence of the decalcifier action of tetracycline; it could be the medicine exposition time of the bone graft. Evaluating the statistical results; it was observed that the tetracycline didn't interfered on bone repair process, moreover its presence doesn't cause delay or any significant interference that changes the healing process.

Lista de Figuras

Figura 1:	Osteotomia obtida após o uso de broca trefina, obtendo duas cavidades experimentais.	54
Figura 2:	Remoção do enxerto ósseo obtido com uso da broca trefina, colocado em soro fisiológico inicialmente.	55
Figura 3:	Aspecto clínico do enxerto ósseo triturado.	55
Figura 4:	Osso triturado colocado em solução de tetraciclina.	56
Figura 5:	Aspecto clínico do enxerto ósseo após preparo com tetraciclina.	56
Figura 6:	Dispositivo elaborado para lavagem do enxerto ósseo após permanência na solução de tetraciclina.	57
Figura 7:	Cavidades experimentais preenchidas com coágulo sanguíneo e enxerto ósseo preparado.	58
Figura 8:	Grade de Merz inserida, no cetro da lâmina.	60
Figura 9:	Grade de Merz deslocado para o lado esquerda da lâmina, para leitura.	60
Figura 10:	Grade de Merz deslocado para o lado direito da lâmina, para leitura.	61
Figura 11:	Grupo Controle 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo sanguíneo (C) junto a parede óssea da cavidade (PO) notar infiltrado conjuntivo em alguma área. HE 160X.	63
Figura 12:	Tetraciclina 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo Sanguíneo(CS) e fragmentos ósseos enxertado(EO). HE 63X.	64
Figura 13:	Tetraciclina 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo sanguíneo (CS) e fragmentos ósseos (EO). HE 63X.	65
Figura 14:	Controle 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). HE 63X.	66
Figura 15:	Controle 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). Notar a incisão com a parede óssea (PO). HE 160X.	67
Figura 16:	Grupo Tetraciclina 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). HE 63X.	68
Figura 17:	Grupo Tetraciclina 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo neoformado (TO) unido a partícula de enxerto ósseo implantado (EO).	69

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Resultados do Grupo Controle obtidos com a grade de Merz.	70
Tabela 2:	Resultados do Grupo Tetraciclina obtidos com a grade de Merz.	71

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Resultados do Grupo Controle.	72
Gráfico 2: Resultados do Grupo Tetraciclina.	72
Gráfico 3: Obtido da comparação com o grupo triturado do estudo de Coradazzi.	78

Lista de Abreviaturas

CS	Coagulo Sangüíneo
IC	Infiltrado Conjuntivo
PO	Parede Óssea
EO	Enxerto Ósseo
TO	Tecido Ósseo

2. Revisão da Literatura

2. Revisão da **Literatura**

Capítulo dividido em tópico:

2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo, segundo Junqueira, é o constituinte principal do esqueleto. Serve de suporte para os tecidos moles, protege órgãos vitais. É promotor de células do tecido hematopoiético. Permite os movimentos, em associação com os músculos. Serve de depósito de cálcio, fosfato e outros íons.

O tecido ósseo é uma especialização do tecido conjuntivo composto pelas seguintes células:

Osteoblastos – produtores da parte orgânica da matriz extracelular são responsáveis pela síntese de fibras colágenas do tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz óssea. Quando em atividade de síntese são cubóides, com citoplasma basófilo, porém, em estado pouco ativo, são achatadas com citoplasma

muito basófilo. Os osteoblastos se tornam osteócitos quando aprisionados pela matriz extracelular recém sintetizada.

Osteoclastos – células gigantes, móveis e multinucleadas; que reabsorvem o tecido ósseo participando do processo de remodelação dos ossos. Localizam-se em depressões conhecidas como lacuna de Howship, agindo através de enzimas.

Osteócitos – que se situam em cavidades ou lacuna no interior da matriz óssea. São células achatadas, em forma de “amêndoa”, que exibem organelas atroficas, como Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático e Núcleo, com cromatina densa. São essenciais para manutenção da matriz.

A porção inorgânica representa 50% do peso da matriz óssea e os íons mais encontrados são fosfato e cálcio, que formam os cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ recoberta por uma zona de hidratação.

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e perióstio, respectivamente.

A nutrição neste tecido ocorre, centralmente, por canais denominados Havers e transversais de Volkmann. Lamelas se dispõem concêntricas ao canal de Havers, dispondo canaliculos que ligam os osteócitos entre si.

Através da observação macroscópica, podemos classificar a estrutura óssea pela presença ou ausência de lacunas. A ausência é característica do osso compacto ou cortical e a presença é característica do osso medular ou esponjoso (Junqueira, 2004).

A remodelação fisiológica do tecido ósseo, difere da reparação por trauma pela presença de sangue extravasado (Schultz, 1990).

Na remodelagem fisiológica, a população de células osteogênicas é derivada de células peri-vasculares, e estas células atingem a superfície óssea remodelada por migração, através do sistema de vascularização óssea (Canais de Havers e Volkmann).

Na reparação da fratura, a população de células osteogênicas é derivada da medula, as células do estroma, as células mesenquimais indiferenciadas e, em menor extensão, os osteócitos e os osteoblastos que podem migrar das superfícies ósseas, recém criadas. Neste caso, a população potencialmente de células osteogênicas migra, através da rede de fibrina fornecida pelo sangue extravasado e coagulado (Cormack, 1987).

A estrutura de osso humano formado, durante a reparação do trauma difere daquela formada, durante a remodelagem. Isto é exemplificado pelas diferenças entre o osso esponjoso e o osso cortical (Vortkamp, 1998).

Um trauma ósseo é definido como uma injúria para o osso, que resulta na perda de continuidade em tecido. Neste caso, os vasos sangüíneos são lesados, e isto resulta em hemorragia. O reparo do trauma é um processo complexo, que envolve uma grande quantidade de eventos celulares e extracelulares. O reparo é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo o tipo de osso (cortical ou medular), a localização do trauma, a severidade do mesmo, as espécies e a idade. Além disso, o resultado da reparação é a reconstituição da continuidade tecidual, com as mesmas características histológicas do tecido original. O tecido ósseo tem como característica a reparação todos os outros tecidos, com a exceção do tecido embriológico, cicatrizam com a formação de um tecido histologicamente diferente.

Portanto, a terminologia mais utilizada é ‘regeneração óssea’, ao invés de ‘reparo’ (Brighton, 1984 e Walter, 1996).O processo de regeneração óssea, após o trauma e durante a regeneração é uma seqüência de estágios sobrepostos, composta das seguintes fases:

Hemostasia

A hemorragia causada pela fratura resulta na formação de um coágulo sangüíneo. O coágulo, geralmente, dura apenas poucos dias (Fallschussel, 1986), mas, pode persistir, se extensivo, por até duas semanas (Cormack, 1987). Em adição à formação do coágulo, dois outros mecanismos contribuem para a hemostasia.

Primeiro, a vasoconstrição temporária nas terminações dos vasos sangüíneos locais interrompidos; limita a quantidade de sangue entrando no tecido injuriado. Segundo, a retração do coágulo condensa o tampão hemostático e reduz o local da ferida. A retração é causada pelo esforço das forças de tração pelas plaquetas ativadas, resultando na condensação dos filamentos de fibrina no coágulo. (Chao, 1976; Colman, 1987; Halkier, 1991).

Como consequência da hemostasia, a circulação do sangue reverte para os feixes mais íntimos, os canais de Volkmann que são distribuídos em pouca quantidade (Ham, 1952; Harris, 1956). O término da circulação nas terminações lesadas causa uma isquemia local e necrose (Ham, 1971).

A necrose é um fenômeno que envolve os mecanismos de feedback, composto por fatores de sinalização: mitógenos e quimiotáticos. É uma mensagem para a metabolização do coágulo pelos leucócitos. A diapedese de leucócitos, no coágulo das vênulas pós-capilares, é causada pelos fatores que acentuam a adesão das células inflamatórias para as células endoteliais (leucotrienos) e para os quimiotáticos, como PDGF e TGF- β (Ganz, 1988; Henson, 1987; Malech, 1992).

Muitos destes fatores são liberados pelas plaquetas ativadas, células endoteliais e também pelos próprios leucócitos. A trombina (Bar-Shavit, 1983) e os produtos da degradação tecidual também servem como fatores quimiotáticos para os leucócitos. Inicialmente, os neutrófilos são os mais numerosos, mas, os macrófagos

rapidamente se tornam predominantes, isto ocorre pela diferença do tempo de vida de cada célula. (Norris, 1982; Postlethwaite, 1976)

Ambos os tipos celulares estão envolvidos no coágulo e na metabolização tecidual necrótica, através dos mecanismos da digestão fagocitária intracelular e extracelular.

Formação do Tecido de Granulação

A formação do tecido de granulação, na regeneração da fratura dura três semanas e é descrita classicamente por cicatrização dérmica da ferida (Braun, 1996). A abundância de vasos, que são responsáveis por até 60% da massa de tecido de granulação, dá a este tecido sua aparência granular. Seguindo a frente de macrófagos que degradam o tecido necrótico e o trombo, há uma zona de fibroblastos migratórios e brotos capilares, que é intimamente acompanhada por uma zona de alças capilares em funcionamento e fibroblastos ativos. A seqüência destas três zonas é referida como o módulo da ferida, que reflete na separação espacial os três fenômenos do metabolismo do coágulo, a proliferação celular ou angiogênese e a síntese precoce de matriz (Hunt, 1979).

Conforme os macrófagos são atraídos para o centro da ferida, os vasos em desenvolvimento atuam na drenagem para os metabólitos e os produtos da degradação. A demanda de oxigênio excede o suprimento, dentro do coágulo, onde nenhum suprimento vascular ainda foi estabelecido, resultando num ambiente de hipóxia (Silver, 1973). O metabolismo anaeróbio resulta num aumento local da concentração de ácido láctico (Hunt, 1979).

A fagocitose do tecido necrótico pelos macrófagos leva a uma liberação tanto de mucopolissacarídeos ácidos da substância base do tecido necrótico quanto de enzimas lisossomiais das células que estão sendo degradadas (Lindner, 1967). Isto, junto com uma grande concentração de ácido láctico, diminui o pH (Silver, 1973). Um gradiente decrescente da concentração de oxigênio, em direção ao centro da ferida fornece o sinal quimiotático para as células endoteliais e mesenquimais (Arnold, 1991).

A angiogênese é iniciada, predominantemente, nas vênulas pós-capilares, onde as células endoteliais degradam a membrana sub-endotelial e migram e proliferam para formar os germes ou brotos capilares. Estes novos capilares migram, ao longo do gradiente quimiotático, em direção ao centro da ferida e também se anastomosam, o que leva ao desenvolvimento de alças capilares (Risau, 1997).

Pettet, 1996 propôs um modelo mecânico de angiogênese, sugerindo propagação da frente vascular, com uma velocidade de onda constante de aproximadamente 80 μ m por dia, que está de acordo com as observações fisiológicas.

Finalmente, as populações de células fibroblásticas secretam matriz reticular para fornecer suporte mecânico para o sistema vascular emergente (Winet, 1990).

A partir da repopulação por fibroblastos, estes começam a secretar fibra colágenas do tipo I, matriz precursora do tecido osteóide que servirá de meio de locomoção para células com potencial osteogênico, que, quando polarizadas, secretam ativamente, serão denominadas osteoblastos (Glowacki, 1991; Einhorn, 1995).

Essa movimentação celular, sob a estrutura orgânica, favorece a contração da ferida, fenômeno subsequente.

O mecanismo de contração da ferida se desenvolve, como um meio geral de acelerar a cicatrização, em qualquer tipo de tecido, por reduzir o tamanho da mesma. A migração de células mesenquimais, com potencial osteogênico exerce tração sobre a matriz extracelular precoce, de uma maneira semelhante às células fibroblásticas, durante o reparo dérmico. (Harris, 1980).

A força aplicada por um simples contato adesivo celular foi estimada aproximadamente em 3nN (Galbraith, 1997). A força de tração exercida pelos

fibroblastos migratórios causa re-organização local e deformação da matriz fibrosa extracelular (Harris, 1981) e, como um fenômeno macroscópico, pode causar contração dos géis de colágeno (Ehrlich, 1990; Eastwood, 1996), géis de fibrina (Tuan, 1996), ou contração da ferida (Rudolph, 1992). Embora internamente unidos, a tração celular e a migração são fenômenos distintos, porque as células móveis, tais como os macrófagos ou os leucócitos polimorfonucleares exercem tração negligenciável, considerando que os fibroblastos menos móveis, ou as plaquetas sésseis, exercem forças de tração muito mais fortes (Harris, 1981). As plaquetas causam retração do coágulo, considerando-se que as forças de tração derivadas dos fibroblastos são suficientes para empurrá-los 100 a 1000 vezes mais rapidamente do que a locomoção das células normais, e podem desenvolver como um meio para as células influenciarem a orientação da matriz extracelular fibrosa porque elas resultam no alinhamento ordenado das fibras de colágeno, ao longo dos centros de tração (Harris, 1981).

Formação Óssea

A formação de osso requer não apenas o recrutamento e/ou migração de uma população de células potencialmente osteogênicas, mas também a diferenciação destas em células secretoras maduras. Na remodelagem cortical ou endóssea, isto

envolverá a migração, através da matriz de tecido conjuntivo primitivo, de células perivasculares, endósseas, ou cambiais (da camada interna do periósteo) para a superfície óssea reabsorvida. A população potencialmente osteogênica migrará, através do coágulo sangüíneo e, assumindo a retenção do coágulo, alcançará a superfície dos fragmentos ósseos, dentro do local da ferida. Em cada um destes casos, as células que alcançam a superfície sólida, fornecida pelo osso velho, iniciarão a síntese da matriz, na superfície sólida ou 'alvo'. Aquelas células que se diferenciam antes de alcançar a superfície alvo, segregam a matriz. Como resultado, elas pararão de migrar e não alcançarão a superfície alvo. Conseqüentemente, a osteocondução resultará numa espícula óssea, avançando em direção à superfície alvo. A progressão de tais espículas ósseas foi observada, nas câmaras ósseas óticas, por ocorrer numa taxa média de 73 μ m a 85 μ m por dia. Os osteoblastos diferenciados ativos ou irão fazer a translocação, como um resultado da secreção da matriz, recuando da superfície, ou eles se tornarão enterrados, como osteócitos, na matriz que eles produzem (Winet, 1990; Winet, 1988).

A translocação dos osteoblastos polarizados ativos, com a concomitante produção da matriz, é chamada de induto ou crescimento aposicional e é, conseqüentemente, fenomenologicamente distinta da osteocondução. Portanto, a formação óssea ou durante a cicatrização ou na fase anabólica de remodelagem

compreende os dois fenômenos distintos: formação óssea De Novo e formação óssea aposicional.

As primeiras bases científicas para estudo dos enxertos ósseos autógenos foram demonstradas por Ollier (1867), ao relatar que o tecido ósseo permanecia vivo, baseado na osteogênese observada no enxerto.

Barth (1893) relatou que, por vários dias, após a transferência de osso autógeno, este se apresentava sem vitalidade e que somente com a invasão gradual de células oriundas do leito receptor, ocorreria o repovoamento, com células vivas, fenômeno este denominado posteriormente de osteocondução.

Phemister (1914) afirmou que algumas células osteogênicas da superfície do enxerto ósseo sobreviviam, por difusão de nutrientes, advindos do leito receptor, e que a grande maioria das células, no centro do enxerto, estavam mortas, mas que as células sobreviventes na superfície desempenhavam importante papel na reabsorção e repovoamento de células ósseas. O autor ainda sugeriu a ocorrência de uma desmineralização, autólise da estrutura de colágeno e, depois, sua revascularização e remineralização, na nova estrutura orgânica.

Mowlen (1944) difundiu a utilização do osso esponjoso e demonstrou a sua superioridade, quando comparado ao osso cortical. Zeiss et al. (1960), verificaram a presença de células sobreviventes no osso cortical, a uma distância de 200 a 300 micrômetros da superfície óssea.

Segundo Boyne (1973), o material de enxerto ideal deve obedecer aos seguintes requisitos: 1) fornecimento ilimitado, sem comprometer a região doadora; 2) promover osteogênese; 3) não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; 4) revascularizar rapidamente; 5) estimular a osteoindução; 6) promover osteocondução; 7) ser substituído completamente por osso, em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro.

O emprego do enxerto ósseo autógeno associado a implantes osseointegrados foi originalmente discutido por Branemark et al (1975).

Preparados ósseos desmineralizados, de origem humana e bovina, foram desenvolvidos e são comercializados, nas formas de partícula, bloco, pó, gel e outros (Feighan et al., 1995).

Alguns exemplos dos substitutos ósseos são as hidroxiapatitas sintéticas e naturais (Carvalho et al., 1993), ionômero de vidro (Salata, 1995), polietileno, poliuretano (Rangel-Garcia Junior, 2000), silicone (Sanches et al., 1982), entre outros.

Sendo assim, o enxerto de osso autógeno pode ser considerado superior, quando comparado aos materiais alógenos e aloplásticos, por não produzir resposta imunológica e por conter componentes osteoindutores (Becker et al., 1995).

Os enxertos ósseos induzem a proliferação angioblástica, no início do processo de reparo, tornando a área hipervascularizada. Esta proliferação é,

relativamente mais rápida, nos enxertos autógenos, se comparados com osso homogêneo, cujo início da hipervascularização tende a ser mais lenta (Stroud et al., 1980).

Nos enxertos alógenos, a matriz orgânica é totalmente desproteinizada, para a eliminação de reações imunológicas associadas ao material, e age como um arcabouço para propiciar a formação óssea ao seu redor, sendo posteriormente substituído(Bemard, 1991).

Sanches et al. (1972) estudaram, em ratos, o processo de reparo em alvéolos preenchidos com osso anorgânico, onde observaram a presença de reação inflamatória, retardo considerável no processo de reparo e ausência de osteogênese, não encontrando vantagens no seu uso para preenchimento de alvéolos dentais ou de lojas cirúrgicas em tecido ósseo.

Rangel-Garcia Jr. (1997) estudou histologicamente o comportamento de uma matriz óssea homogênea desmineralizada, implantada no espaço subcutâneo dorsal e no alvéolo dental de ratos, e concluiu que o material promoveu a osteoindução, sem atrasar o processo de reparo alveolar.

Young et al. (1999) comparou a regeneração óssea em defeitos intra-ósseos na maxila e mandíbula de coelhos, preenchidos com osso xenógeno anorgânico e osso autógeno. Como resultado, houve uma reabsorção e neoformação

óssea ao redor das partículas autógenas, e uma neoformação, em menor escala com ausência de reabsorção das partículas anorgânicas, após um período de 3 meses.

Becker et al. (1994) avaliaram clínica e histologicamente regiões intra-bucais implantadas com enxertos ósseos autógenos e homólogos. Foram utilizados 15 pacientes e realizadas 21 biópsias, nas regiões dos alvéolos de extração dental e na região de implantes osseointegrados preenchidos com osso autógeno, osso liofilizado desmineralizado, osso liofilizado mineralizado, e osso autógeno associado com osso liofilizado desmineralizado, todos utilizando barreiras biológicas. A avaliação histológica foi realizada, nos períodos de 4 a 13 meses, sendo avaliados a presença de partículas inativas, vasos sanguíneos, ilhas de cartilagem, osteoblastos e neoformação óssea. Em uma escala de medida de neoformação óssea, variando de 0 a 4, os valores obtidos foram de 2,33 para o osso autógeno, 0,98 para o osso alógeno desmineralizado e 0,18 para o osso alógeno mineralizado.

Para a obtenção de osso autógeno vários sítios doadores extrabucais são descritos na literatura como a calvária (Harsha et al., 1986), tíbia (Breine & Brånemark, 1980), costela (Listrom & Symington, 1988) e crista ilíaca (Keller et al, 1987; Listrom & Symington, 1988).

Devido a morbidade da cirurgia associada a estes sítios doadores, áreas doadoras alternativas intrabucais, como a tuberosidade maxilar (Moenning & Graham, 1986), palato (Wolford & Cooper, 1985), arco zigomático (Wolford & Cooper, 1985),

processo coronóide da mandíbula (Wood & Moore, 1988) sínfise mandibular (Koole et al, 1989; Misch et al, 1992: Hoppenreijds et al, 1992)e ramo mandibular (Wood & Moore, 1988), podem ser utilizadas.

Os sítios doadores intra-bucais possuem diversas vantagens como a redução do tempo operatório, menor morbidade não sendo necessária hospitalização e ausência de cicatriz cutânea (Marx & Morales, 1988). Sua principal desvantagem é, em alguns casos, a limitação em quantidade, durante sua obtenção (Kainulainen & Olkarinen, 1998).

Misch (1997) realizou estudo comparativo entre as áreas doadoras intra-bucais para enxerto ósseo "onlay" e posterior instalação dos implantes osseointegrados. O enxerto "onlay" mostrou reabsorção mínima e manutenção da qualidade óssea densa. O enxerto da sínfise apresentou maior volume, com morfologia cortico-medular. Já o enxerto ósseo do ramo é essencialmente cortical e era solicitado para reconstrução de defeitos ósseos "veneers".

Lew et al. (1994) comparou, em cães, o uso de osso autógeno particulado e em bloco associados a implantes osseointegrados, obtendo melhores resultados com o uso de blocos cortico-medulares. Esta comparação incluiu o nível do trauma , durante a preparação do enxerto, a interface do osso com o implante e a vascularização final do enxerto.

Baseado no mecanismo de ação, existem 3 classes de materiais de enxerto ósseo: o osso autógeno que é um material orgânico e forma osso por osteogênese; osteoindução e osteocondução. Os materiais alógenos, como o osso liofilizado mineralizado ou desmineralizado (homógeno ou xenógeno) que são osteoindutores e osteocondutores, e os materiais aloplásticos, como a hidroxiapatita e o fosfato tricalcio, que são somente osteocondutores (Misch & Dietrich, 1993).

Os materiais osteoindutores podem determinar a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos para obtenção da formação óssea (Urist, 1965; Piattelli et al, 1998), enquanto que os materiais osteocondutores servem como um arcabouço para que ocorra a vascularização e o crescimento de tecido perivascular e células osteoprogenitoras do sítio receptor permitindo a formação óssea (Burchardt, 1983).

O osso autógeno por ser um material osseointegrador e osseointegrador, além de estimular as células mesenquimais indiferenciadas a formar células ósseas, atuam como um arcabouço para propiciar a neoformação óssea (Burchardt, 1983; Urist, 1965; Rissolo & Bennett, 1998; Piattelli et al 1998).

Atualmente, os ossos de origem endocondral e intramembranosa são utilizados clinicamente para reconstrução de defeitos ósseos. Os enxertos endocondrais são os mais difundidos, apresentando, porém, problemas de reabsorção (Burchardt, 1987).

Evidências experimentais sugerem que os enxertos ósseos de origem intramembranosa demonstram menor reabsorção, em relação aos de origem endocondral. Zins & Whitaker (1983) realizaram, experimentos em animais, com enxertos ósseos autógenos de origem endocondral, os quais apresentaram 65% de reabsorção em volume ósseo.

Em um estudo quantitativo da osteoindutividade dos enxertos ósseos autógenos (Wong & Rabie, 1999), o osso de origem intramembranosa formou 100% mais tecido ósseo que o osso endocondral.

Autores relataram a hipótese de que o osso de origem ectomesenquimal apresenta maior potencial de incorporação, nas regiões maxilofaciais, devido à similaridade bioquímica do protocólágeno ósseo do enxerto com o sitio receptor. Porém, a possibilidade de um maior potencial de incorporação entre enxerto e área receptora de mesma origem embriológica requer mais estudos (Koole et al., 1989).

Coradazzi, em 2003, realizou um estudo histomorfométrico para avaliar o reparo ósseo em cavidades experimentais criadas em tíbia de coelhos, preenchidas com dois tipos de partículas de osso autógeno. Foram utilizados 12 coelhos, nos quais foram realizadas 3 cavidades unicorticais de 7 mm de diâmetro, com uma broca trefina, na face lateral da tíbia direita. Os defeitos foram preenchidos, respectivamente, com partículas de osso autógeno, obtidos com um triturador manual em forma de pilão, com partículas de osso autógeno recolhidas com um coletor ósseo,

durante o preparo de cavidades, com a sequência de brocas e com coágulo sangüíneo, servindo como controle. Os animais foram igualmente distribuídos em 3 grupos e sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias. De acordo com os resultados obtidos, aos 7 dias, todos os grupos apresentaram-se preenchidos por coágulo sangüíneo, sendo observada a presença de partículas ósseas autógenas nos grupos triturado (44,75%) e coletado (24%). No período de 15 dias, notou-se a diferenciação conjuntiva, nos grupos com ausência de neoformação óssea, no grupo controle (0%), presença de partículas ósseas e início de osteogênese, nos grupos coletado (38,88%) e no grupo triturado (46%). No período de 30 dias, observou-se a neoformação óssea, nos grupos controle (50%), coletado (64,36%) e triturado (66%), com a presença de um trabeculado ósseo imaturo. De acordo com a metodologia utilizada, conclui-se que: a neoformação óssea, nas cavidades dos grupos triturado e coletado, não foi estatisticamente significativa, porém, mostrou-se superior à do grupo controle, no aspecto quantitativo e qualitativo. As partículas de osso do grupo triturado não sofreram reabsorção intensa, nos períodos analisados, enquanto que, no grupo coletado, houve uma reabsorção e osteogênese superior aos do grupo triturado.

2.2 Tetraciclina Hidroclorídrica.

Tendo como objetivo avaliar o uso de enxerto ósseo alógeno liofilizado associado com 50mg/ml de hidrocloreto de tetraciclina para o tratamento de defeitos periodontais intraósseos, Masters e colab. (1990) trataram 15 pacientes sistemicamente saudáveis, com periodontite de moderada à avançada. Os resultados mostraram que todos os pacientes apresentaram uma melhora, estatisticamente significativa, na profundidade da sondagem e no nível de aderência, em um ano. Apesar de os grupos enxertados apresentarem maior preenchimento ósseo e resolução do defeito, não houve diferença estatisticamente significativa, em nenhum dos parâmetros clínicos, entre os grupos de tratamento. Este estudo sugere não haver benefício significativo, em se reconstituir o enxerto alógeno com a solução de tetraciclina. Tendo como objetivo melhorar a regeneração e a qualidade do enxerto ósseo humano, através do uso de uma mistura, contendo osso autólogo de calvária triturado, fator tecidual recombinante humano (rhTF), plasma rico em proteína (PRP) e tetraciclina.

O estudo de Trombelli, em 1996, avaliou a eficácia de tetraciclina e o selamento com fibronectina. Onze pacientes, com problemas periodontais bilaterais, foram tratados por debridamento bilateralmente e em associação à tetraciclina, em um lado. Como resultado, o autor não verificou diferença clínica.

No mesmo ano, Ben-Yehouda (1996), relatou o caso de uma paciente do sexo feminino, que havia sido tratada, com sucesso, pelo debridamento, em

associação à tetraciclina, vindo, no futuro, ocorrer reabsorção radicular. O autor questionou a possibilidade da aplicação tópica ter desencadeado o fenômeno.

Em 1997, Isik avaliou, através da microscopia eletrônica de varredura, o efeito dos diferentes métodos de desmineralização, com tetraciclina hidrocloreídrica, em superfícies radiculares. Concluindo que a aplicação tópica, sob a superfície dentária, produz zonas de desmineralização, expondo as fibras colágenas e os túbulos dentinários.

No mesmo ano, Street, avaliou os efeitos da concentração de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/ml, em três diferentes tempos 1, 3 e 5 minutos. Ácido cítrico a 30% foi utilizado como controle positivo. O pH da solução foi avaliado. Após o período de aplicação, o material foi colhido, por meio de um algodão montado em ponta e armazenado em 2,00 ml de 18 M de água para mensuração da concentração de cálcio, através do espectrômetro. Nenhuma significância, na quantidade de cálcio, nos tempos e concentrações citadas, foi mensurada. O ácido cítrico a 30% teve sua mensuração de cálcio 5.5 vezes maior que os grupos de tetraciclina. A concentração e o tempo de aplicação de tetraciclina indicada pelo autor são 75mg/ml por 3 minutos.

Em 1998, Souza avaliou a incorporação e liberação de antibióticos à membrana de colágeno, no caso da TTC a liberação ocorre pelo mecanismo Fick normal, controlado pela porosidade da membrana e as taxas de liberação após 7,5 h

foi de cerca de 14'µg/min e que o método jazida de incorporação foi para valores de liberação muito altos. Afirmando que a tetraciclina inibe os efeitos das metaloproteínas (MMP), essas que são responsáveis pela metabolização da membrana de colágeno, logo objetivo do autor é avaliar *in vitro* a aplicação de TTC em diferentes concentrações, concluindo que imergir uma membrana de colágeno em 50mg/ml de TTC aumenta o tempo de degradação. A modificação química da tetraciclina pode inibir seletivamente a interleucina-6(IL-6) em osteoblasto pela decreção da estabilidade do RNA-m.

Yamamoto, em 1999, em sua avaliação da qualidade de tetraciclina, em preparações farmacêuticas sólidas, com 12 fabricantes e 38 amostras, obteve valores de até 14,2% de variação.

Isik, em 2000, avaliou, por meio da microscopia eletrônica de varredura, diferentes concentrações e tempos de aplicação da tetraciclina. Seguindo as mesmas concentrações e tempos de Street. Concluiu que a aplicação de tetraciclina, sobre superfície radicular, não dependia do tempo e que as concentrações de 50 e 150 mg/ml tiveram os mesmos resultados, nos túbulos dentinários.

Babay, em 2001, no estudo com microscopia eletrônica de varredura, avaliou o efeito de dois métodos diferentes de desmineralização, com tetraciclina hidrocloreídrica saturada em dois tempos de aplicação 1 e 4 min, sob a superfície

radicular. A aplicação se mostrou efetiva para remoção da camada de *smear layer*, não apresentando diferença significativa, de acordo com o tempo de exposição.

Kirkwood, em 2003, conclui que a IL-6, uma citotoxina autocrina e parocrina, podem induzir a formação e ativação de osteoclastos para ajudar mediadores fatores inflamatórios, na reabsorção óssea.

Em uma revisão da literatura, em 2003, Marriot selecionou trabalhos histológicos e clínicos, onde se utilizaram ácido cítrico, tetraciclina e EDTA para descalcificação radicular. Estudos, abordando a matriz extracelular, bem como seus componentes, foram descartados. Avaliações totais dos estudos incorporam 575 pacientes, sendo que 26 utilizaram ácido cítrico, 5 tetraciclina e 3 EDTA. Dos trabalhos, com tetraciclina, somente um apresentava histológico, em humanos, e um relato de caso clínico. O autor conclui que todos produtos promovem alteração, na superfície radicular, sendo que não apresentam significante regeneração sob o aspecto clínico.

Philippart e colab. (2003) submeteram 18 pacientes a cirurgias de aumento de seio maxilar, enxertando a pasta óssea “feita de PRP, rhTF, osso de calvaria e tetraciclina”. Cinco a seis meses após a enxertia, uma amostra de osso foi removida, no momento da colocação dos implantes para análise microscópica. A histologia mostrou tecido conjuntivo vascularizado rico em espículas de osso lamelar, contendo osteócitos e circundado por osteoblastos. Os autores puderam concluir que

o uso generalizado, deste protocolo em implantodontia, cirurgia oral e ortopedia, poderia facilitar o processo de reparação, como também a segurança do paciente e o conforto do cirurgião.

Em contrapartida, Yaffe (2003) associou Alendronate (biofosfato) à tetraciclina hidrocloreídrica 1% e doxiciclina 10%, constatando que doxiciclina, sozinha, foi a mais efetiva, na redução da perda óssea. Alendronate também foi efetivo, na redução. Tetraciclina não reduziu significativamente, quando utilizada sozinha; em combinação com Alendronate, ocorreu um sinergismo efetivo e a combinação de Alendronate com doxiciclina mostrou não adicionar efeito. O autor ainda acredita que a utilização tópica de tetraciclina pode ser muito eficiente, na redução da perda óssea alveolar.

3.Proposição

3. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análise microscópica, a utilização de enxerto ósseo autógeno tratado com tetraciclina hidrocloreídrica, no reparo de defeitos ósseos, em tíbia de coelhos.

4. Material e Método

4. Material e Método

No presente estudo, foram utilizados 8 coelhos (Nova Zelândia), machos, adultos, com peso aproximado de 3,5 a 4,2 Kilos. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu (UNESP) e foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura ambiente, alimentados com ração sólida (Ração Procoelho, Primor) e água à vontade, durante todo o experimento.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram mantidos, em jejum, pelo período de oito horas, antes do procedimento cirúrgico e pré-anestesiados, via-intramuscular, com Acepromazina (0,12ml/kg, Acepran 0,2%, Univet, São Paulo, Brasil) e Hidrocloridato de Ketamina (0,12mg/kg, Ketamina, Brasil) 20 minutos, antes da indução da anestesia geral.

A anestesia geral foi realizada, por via endovenosa, na face interna da orelha direita, com pentobarbital sódico (0,6ml/kg, Hypnol 3%, Fontoveter, Itapira, Brasil).

A região anterior da tíbia direita foi tricomizada e sua antisepsia foi realizada com polivinilpirrolidona-iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil).

Foi realizada infiltração local com de 0,5 ml de solução de mepivacaína 2% com adrenalina 1:1000.000, diluída em 5 ml de água destilada.

O acesso cirúrgico foi executado, através de incisão dermo-periosteal, com lâmina n.º 15 (Feather, Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi n.º três, na margem anterior da tíbia direita, incisão com início um centímetro, abaixo da articulação tíbio-femural, com 6cm de comprimento.

Foi realizada a exposição da face lateral da tíbia direita, onde foram confeccionadas 2 cavidades unicorticais de 6 mm de diâmetro, com distância de 1 cm, a partir da sua borda (Fig 1).

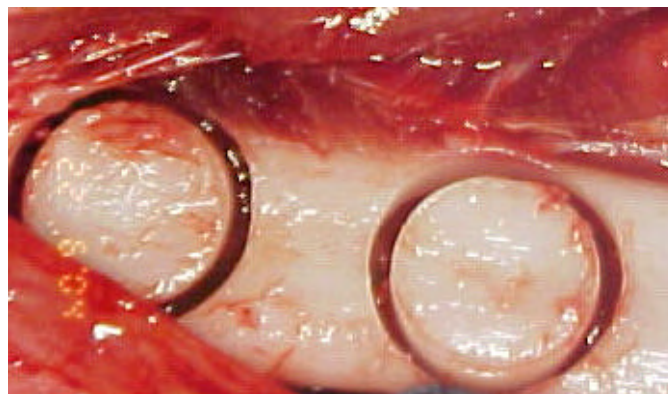


Figura 1: Osteotomia obtida após o uso de broca trefina, obtendo duas cavidades experimentais.

As cavidades experimentais foram realizadas, com uma broca trefina (TER 06; 3i, Palm Beach Gardens, Florida, USA) utilizado motor elétrico BLM 600 (Driller, São Paulo, São Paulo, Brasil) , a uma velocidade de 1700rpm, sob irrigação com solução de cloreto de sódio 0,9% (Aster, Sorocaba, São Paulo, Brasil). Fig 2

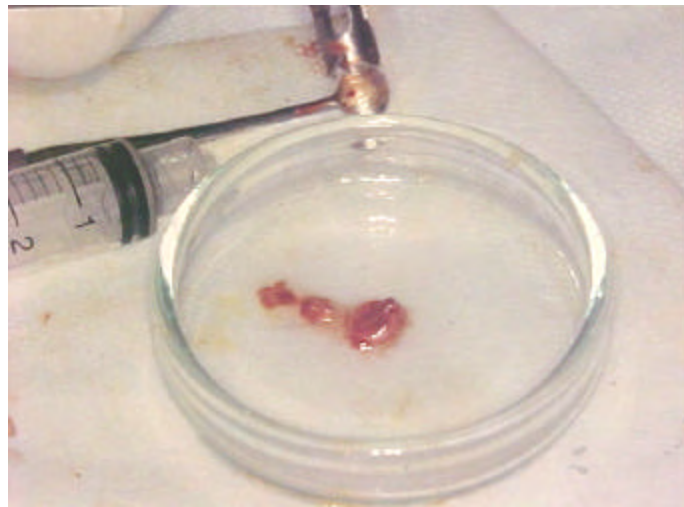


Figura 2: Remoção do enxerto ósseo obtido com uso da broca trefina, colocado em soro fisiológico inicialmente.

O osso obtido, durante a confecção das cavidades experimentais, foi triturado, através do particulador ósseo manual, em forma de pilão (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil) Fig 3.

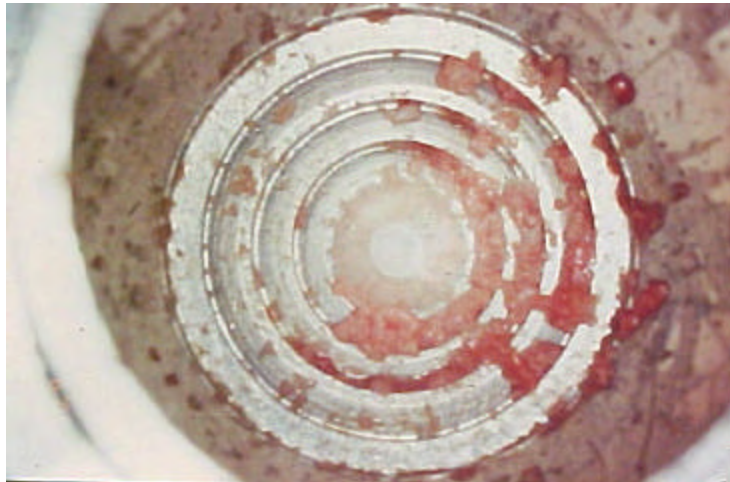


Figura 3: Aspecto clínico do enxerto ósseo triturado.

O tratamento ocorreu, com tetraciclina hidrocloreídrica(Biotrex 500mg, Laboratório Sinterápico, Atibaia, São Paulo, Brasil) , por um período de 10 minutos e lavado, em 100 ml de soro fisiológico corrente. Fig 4,5 e 6.

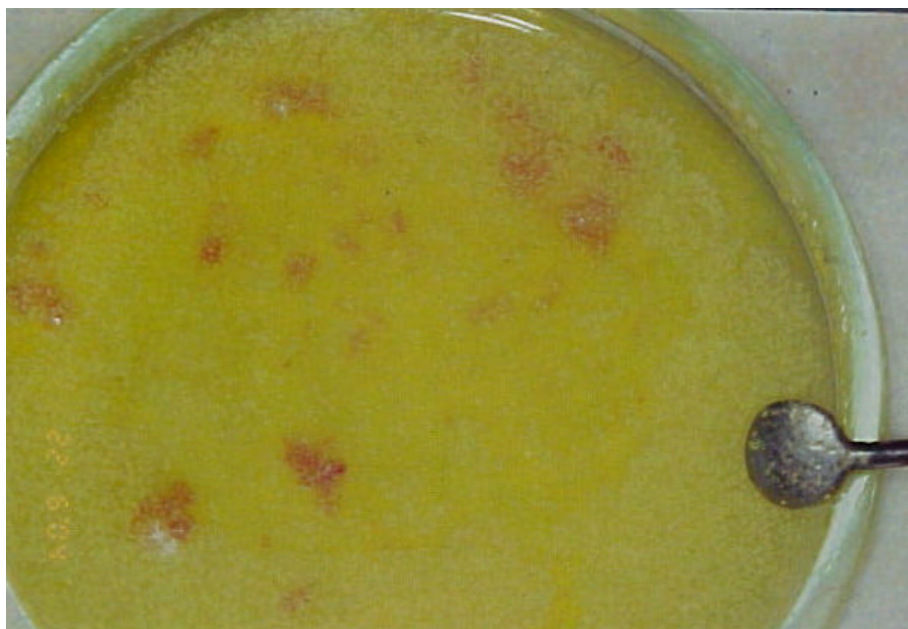


Figura 4: Osso triturado colocado em solução de tetraciclina.

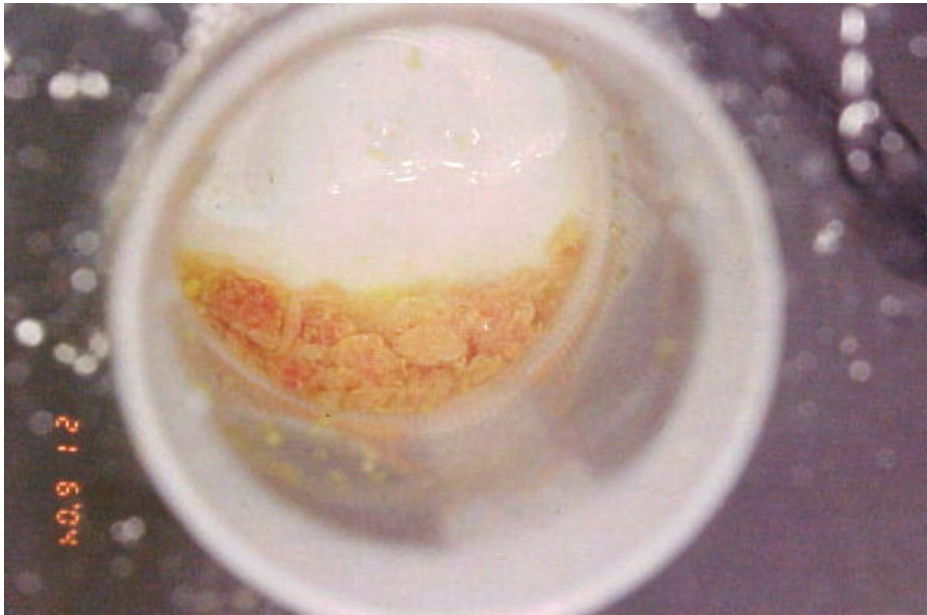


Figura 5: Aspecto clínico do enxerto ósseo após preparo com tetraciclina.

O dispositivo utilizado para lavagem era composto de uma cuba Bauer de 250 ml de capacidade sendo que na parte superior possuía uma tampa acrílica com quatro travas nas laterais de maneira que estabiliza-se a mesma e no centro um orifício onde se acoplava a peneira do coletor ósseo (Neodente, Curitiba, Paraná, Brasil) permitindo a lavagem em soro corrente.



Figura 6: Dispositivo elaborado para lavagem do enxerto ósseo após permanência na solução de tetraciclina.

A cavidade mais proximal, foi preenchida, com coágulo sanguíneo, e passou a ser chamado de Grupo Controle. A cavidade mais distal, foi preenchida, com o osso tratado, e passou a ser chamada de Grupo Tetraciclina. Fig 7

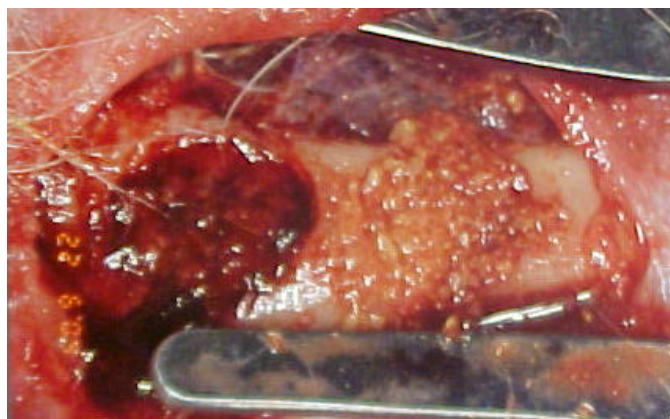


Figura 7: Cavidades experimentais preenchidas com coágulo sanguíneo e enxerto ósseo preparado.

O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos muscular e cutâneo, com fio de nylon 5.0 (Ethicon, São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

No pós-operatório, foram administradas, por via intramuscular, dipirona sódica (1mg/kg/dose única, Ariston, São Paulo, Brasil), diclofenaco sódico (3mg/kg/dose única, Neo Química, Anápolis, Goiás, Brasil) e sulfato de gentamicina (3mg/kg/dose única, Garamicina, Schering-Ploug, USA), em dose única, no pós-operatório imediato.

Processamento laboratorial das peças para análise

Foram sacrificados, em grupo de quatro animais, no primeiro grupo aos 7 dias, e quatro animais no segundo grupo aos 30 dias, através de injeção endovenosa de pentobarbital sódico (1,2mg/kg, Hypnol 3%, Fontoveter, Itapira, Brasil).

A região operada foi dissecada e fixada em Formaldeído 4%, por 24 horas.

Os espécimes foram desmineralizados e desidratados, com solução de EDTA a 18% (50mg de ácido etilenodiaminotetra-cético sal dissódico e 6 mg de hidróxido de sódio dissolvido em 250ml de água destilada), por um período de 60 dias, e incluídos em parafina para realização de secções longitudinais. Foram

realizados cortes semi-seriados, com 6 micrômetros de espessura, que foram corados pelo método da Hematoxilina e Eosina, para análise microscópica histométrica.

Análise Histológica e Histométrica

Para aquisição das imagens para estudo, utilizou-se uma câmara digital (JVC TK-1270 color vídeo Câmera) acoplada a um microscópio binocular (Carl Zeiss), conectado ao computador.

Para análise quantitativa, foi utilizada uma grade idealizada por Merz (1968), impressa em transparência, com 100 pontos equidistantes em 10 mm, realizando a leitura e demarcação do tipo de tecido (osso ou tecido conjuntivo) encontrado sob cada um dos pontos.

A leitura ocorreu, em duas áreas da mesma lâmina, sendo que a grade de Merz foi inserida, no centro da imagem, e deslocada para o lado esquerdo e direito, como mostram as figuras 6, 7 e 8.

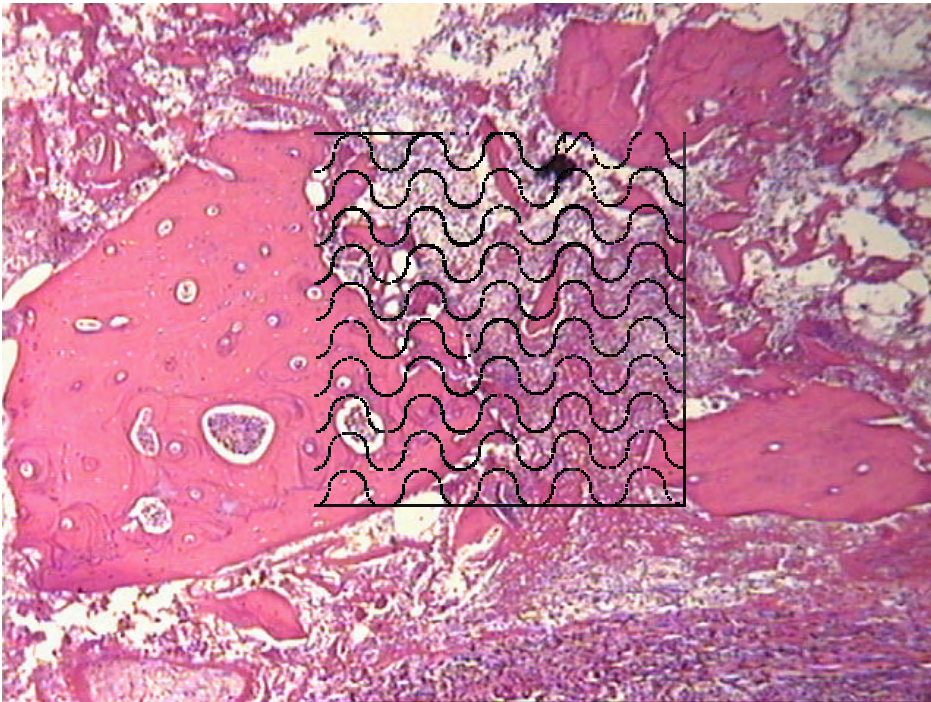


Figura 8: Grade de Merz inserida, no cetro da lâmina

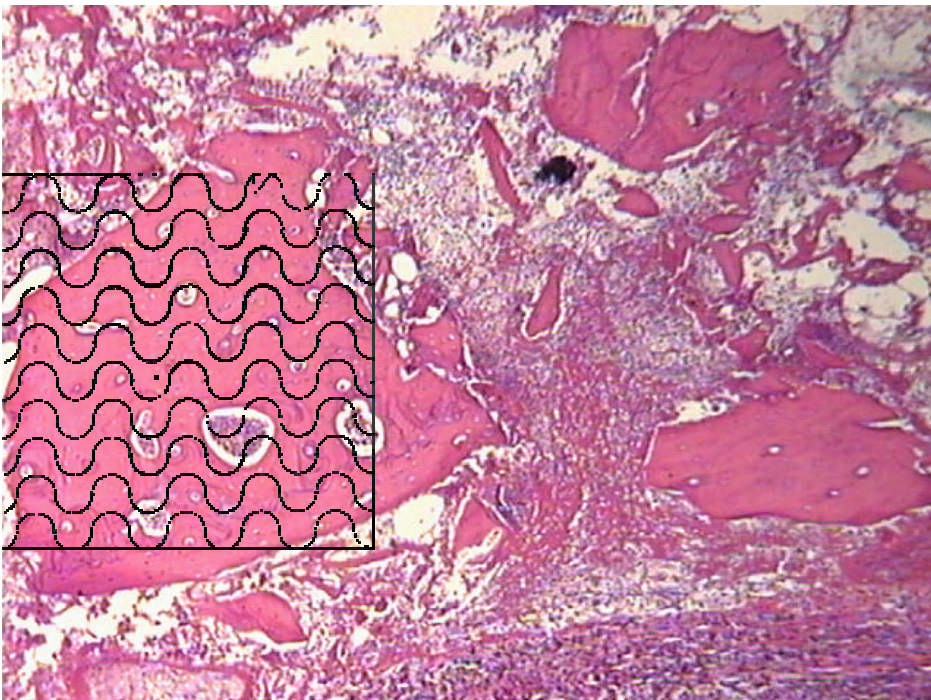


Figura 9: Grade de Merz deslocado para o lado esquerda da lâmina, para leitura

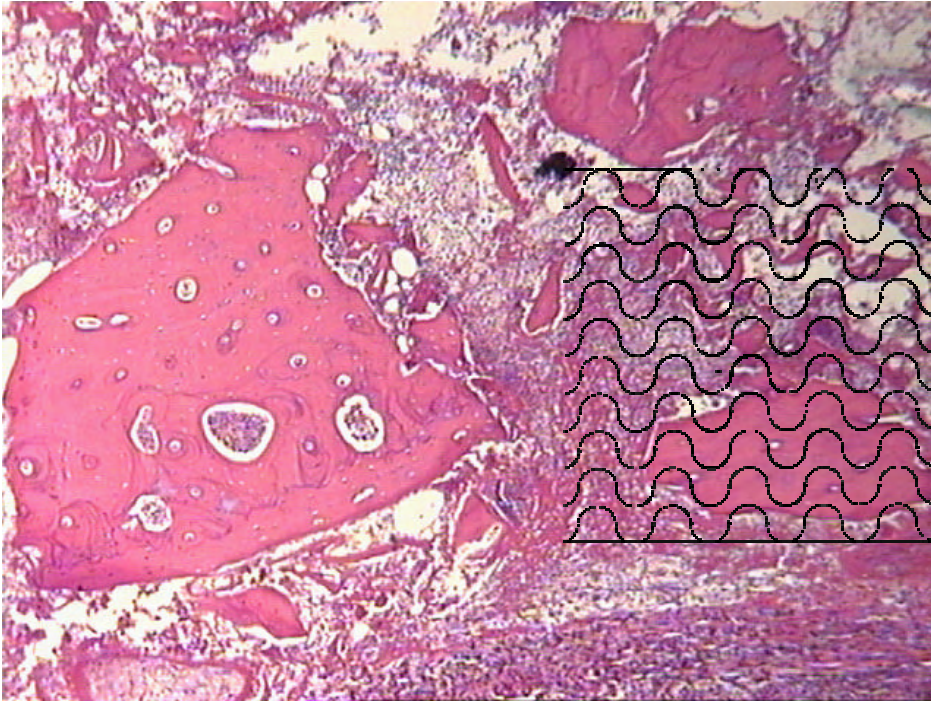


Figura 10: Grade de Merz deslocado para o lado direito da lâmina, para leitura

A análise estatística foi realizada, através do programa computadorizado GMC (versão 8.1, Geraldo maia Campos, Riberão Preto, São Paulo, Brasil), amostras iguais e paramétricas.

5. Resultado

5. Resultado

Resultados Histológicos

Grupo Controle

Aos sete dias pós-operatórios, observamos a presença do coágulo sanguíneo (CS) preenchendo toda a cavidade de cirúrgica, em diferentes fases de maturação. Ocorre áreas de infiltrado conjuntivo (IC), principalmente junto às parede ósseas (PO) experimentais.

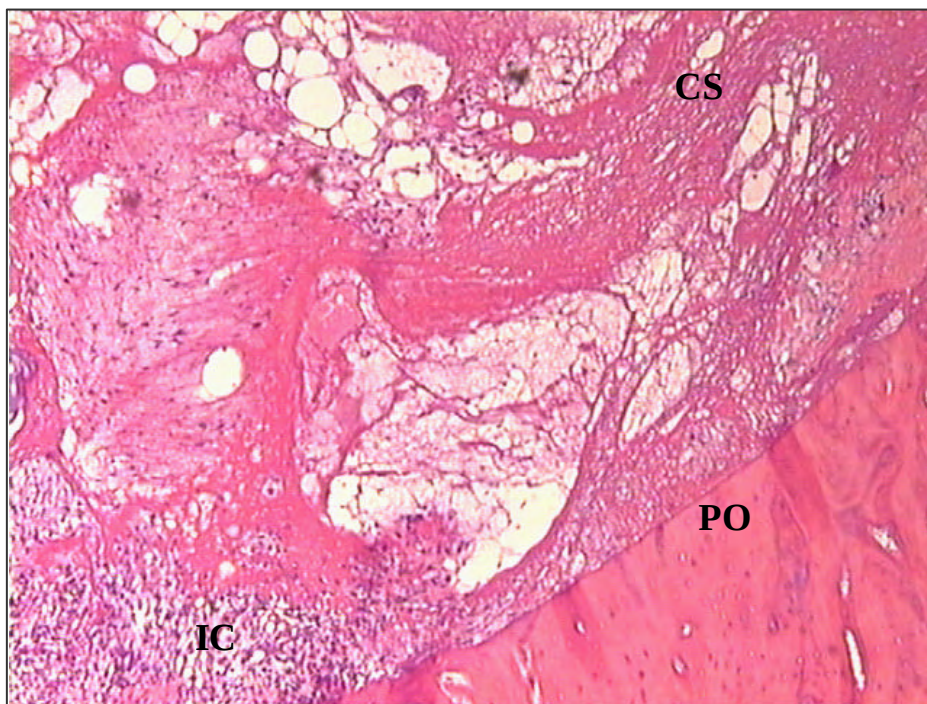


Figura 11. Grupo Controle 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo sanguíneo (C) junto a parede óssea da cavidade (PO) notar infiltrado conjuntivo em alguma área. HE 160X

Grupo Tetraciclina - 7 dias

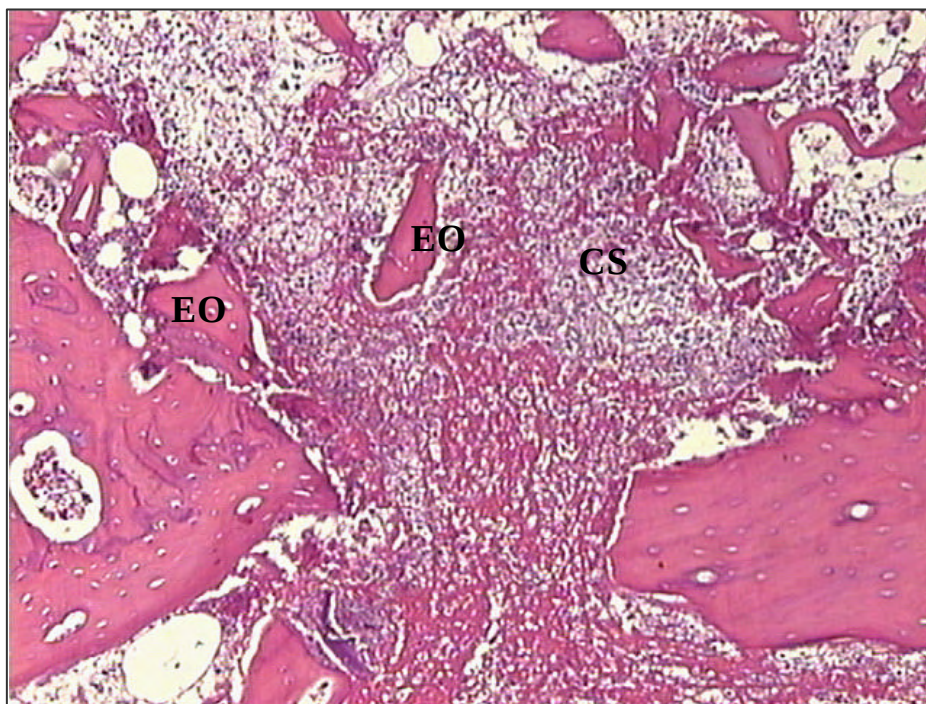


Figura 12: Tetraciclina 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo Sangüíneo(CS) e fragmentos ósseos enxertado(EO). HE 63X

Aos sete dias pós-operatórios, observamos quadro histológico parecido com o grupo controle, a presença de coágulo sanguíneo em fase intermediária de substituição (Fig 12) e, junto aos fragmentos ósseos enxertados o tecido de granulação é mais presente mostrando um intenso infiltrado celular e grande quantidade de fibras colágenas. Não há evidencia de células osteoclásticas no local (Fig 13).



Figura 13: Tetraciclina 7 dias. Cavidade experimental preenchida por coágulo sangüíneo (CS) e fragmentos ósseos (EO). HE 63X

Grupo Controle 30 dias

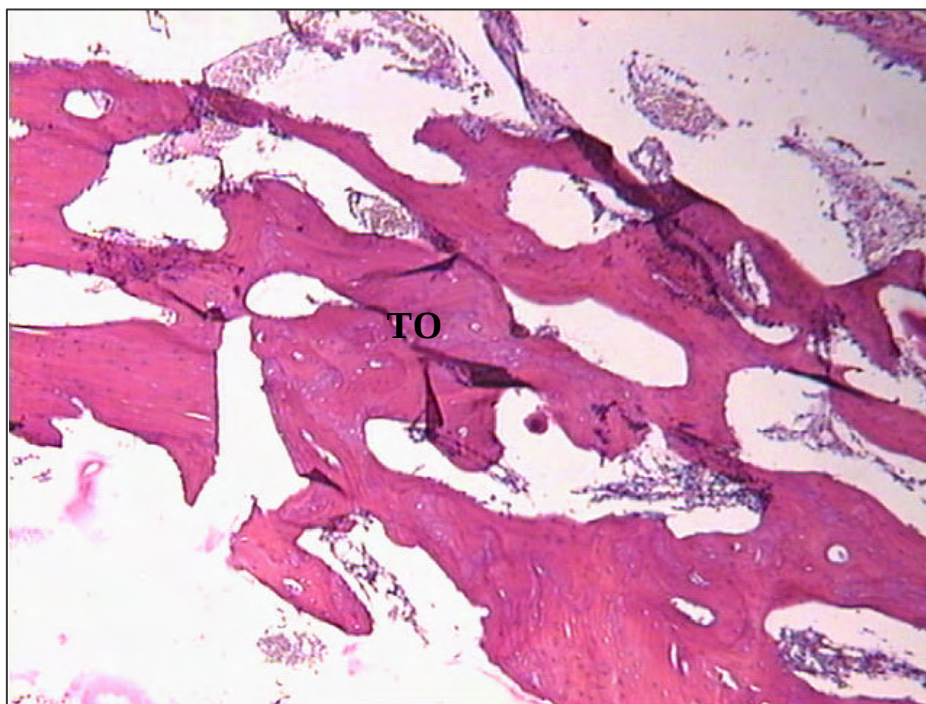


Figura 14: Controle 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). HE 63X

Aos trinta dias pós-operatórios, notamos o preenchimento da cavidade experimental por tecido ósseo exibindo trabéculas delgadas e grandes espaços medulares (Fig 14). Isto mostra que o processo de ossificação continua, pois é possível ainda notarmos células envolvendo estes espaços medulares e grande quantidade de osteócitos envolvidos por osso imaturo. Fica evidente que houve o reparo do defeito ósseo, onde o novo osso se insere nas paredes da cavidade experimental (Fig. 15).

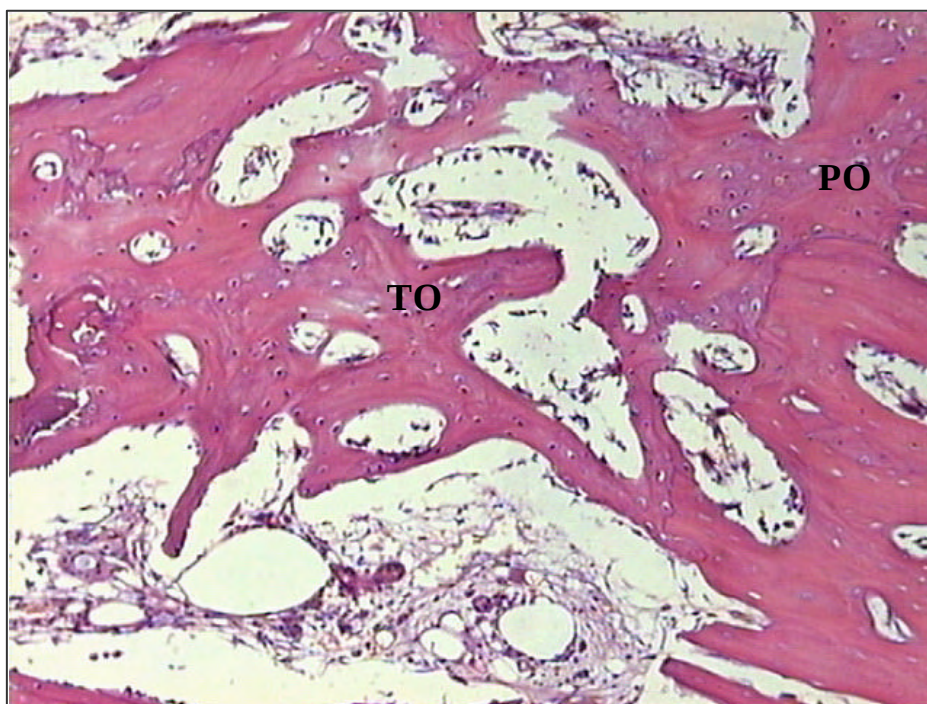


Figura 15: Controle 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). Notar a incisão com a parede óssea (PO). HE 160X

Grupo Tetraciclina 30 dias

Da mesma maneira que ocorreu no grupo controle, a cavidade preenchida por enxerto ósseo homogêneo tratado com tetraciclina está totalmente ossificada com trabéculas delgadas envolvendo os fragmentos ósseos enxertados (Fig.16)

Nota-se que a periferia do enxerto, exibi uma união com o osso neoformado, mostrando sua incorporação. É possível evidenciar que os osteoplastos do osso enxertado não apresentam células como os osteócitos no seu interior, apenas a resvascularização dos canais de nutrição do tecido ósseo (Fig.17)



Figura 16: Grupo Tetraciclina 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo (TO). HE 63X

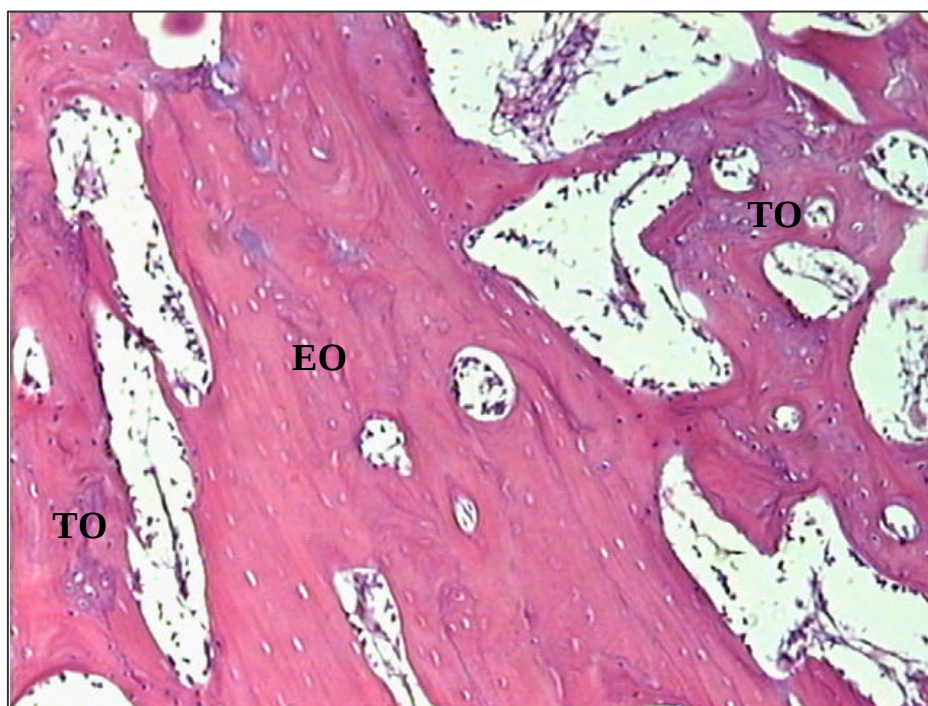


Figura 17: Grupo Tetraciclina 30 dias. Cavidade experimental preenchida por tecido ósseo neoformado (TO) unido a partícula de enxerto ósseo implantado (EO)

Resultados Histométricos

GRUPO CONTROLE %			
7 DIAS		30 DIAS	
OSSO	COÁGULO	OSSO	TECIDO CONJUNTIVO
0	100	40	50
0	100	59	41
0	100	55	45
0	100	57	43
0	100	45	54
0	100	57	43
0	100	37	53
0	100	49	51

Tabela 1. Resultados do Grupo Controle obtidos com a grade de Merz.

GRUPO TETRACICLINA %			
7 DIAS		30 DIAS	
OSSO	COÁGULO	OSSO	TECIDO CONJUNTIVO
44	56	54	46
30	70	62	38
42	56	89	11
24	76	96	4
0	100	80	20
23	77	67	33
76	24	86	14
21	79	85	15
50	50	55	45
31	69	48	52

Tabela 2. Resultados do Grupo Tetraciclina obtidos com a grade de Merz.

As interpretações dos dados contidos na Tabela estão dispostas nos gráficos abaixo:

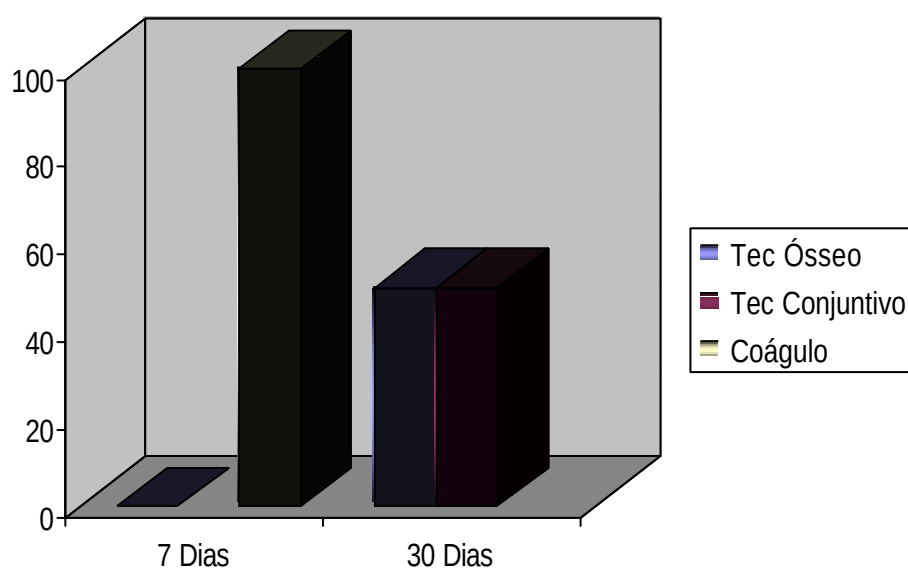


Gráfico 1. Resultados do Grupo Controle.

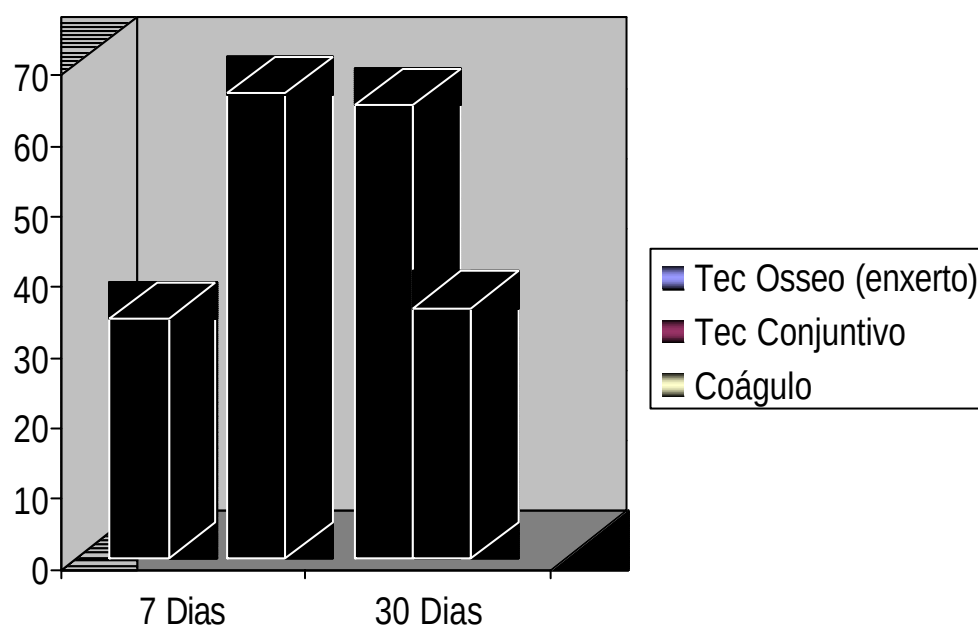


Gráfico 2. Resultados do Grupo Tetraciclina.

Estatística

Nos resultados quantitativos, obtivemos uma incidência de 0% de tecido ósseo, no Grupo controle, com 7 dias, e 50% de tecido ósseo, com 30 dias, no mesmo grupo. No Grupo Tetraciclina obtivemos 32,5% de tecido ósseo, com 7 dias, e 77,37% de tecido ósseo, com 30 dias.

Resultado da estatística de comparação do Grupo Controle, com 7 dias, e Grupo Tetraciclina, com 7 dias. Estudo normal comparativo entre duas amostras, paramétrico e independente.

Resultados do teste	
Amostra A: Gcontrole	(8 dados)
Amostra B: Gtetraciclina	(8 dados)
Valor calculado de t	4.13
Graus de liberdade	14
Média da amostra (1)	0.00
Média da amostra (2)	32.50
Probabilidade de igualdade	0.14 %
Significante ao nível de 1 % ($\alpha = 0.01$)	

6. Discussão

6. Discussão

A metodologia aplicada para avaliação do presente estudo se mostrou adequada, bem como a seleção dos animais, coelhos. Apesar das dificuldades que estes animais apresentam como manipulação, uma vez que são sensíveis e estressam facilmente, e a incidência de fraturas, que ocorreram em virtude das cavidades serem executadas em tamanho que as tornassem críticas. A área selecionada para o presente estudo, face interna da Tíbia, se mostrou ideal, pois, não tivemos intercorrências, sendo que os animais não conseguiam alcançá-la, e a medicação, em dose única, se mostrou satisfatória visto que não tivemos infecções e o nível de stress dos animais foi baixo. O método de lavagem aplicado foi eficiente sendo que, em nenhuma amostra, foi, encontrado resíduo de tetraciclina.

A tetraciclina hidrocloreídrica vem sendo estudada na área de Periodontia, em aplicação tópica sobre superfícies radiculares, há mais de 20 anos, e seus trabalhos mostram diferentes conclusões, em relação ao processo de reparo (Brigton,1984; Walter,1996) . Masters, 1996 conclui que a tetraciclina não traz benefícios, ao ser associada aos enxertos ósseos. Já Ben-Yehouda,(1996) questiona a

possibilidade da aplicação tópica de tetraciclina ter desencadeado um processo de reabsorção. Em contra partida, Philippart, (2003) conclui que seu uso pode facilitar o processo de reparo. Os autores também discordam do método de aplicação e tempo de exposição da tetraciclina, mas, abordam exclusivamente superfície radicular. Isik, em 2000, concluiu que a ação desmineralizadora da tetraciclina não é dependente do tempo, em várias concentrações diferentes. Babay, em 2001, avaliou o tempo e o modo de aplicação da tetraciclina, fricção ou imersão, tendo concluído que, em 4 minutos, sob imersão sua ação era semelhante. Outros trabalhos, como de Sterrett, 1997, definiram que, com 3 minutos de aplicação a uma concentração de 75mg/ml de TTC-HCL, aplicada sob fricção, apresentaram resultados melhores, com ácido cítrico a 30%. Trabalhos com pacientes envolvendo procedimentos cirúrgicos como os de Trombelli, (1996), não verificaram benefícios, no uso de TTC associado ao debridamento a retalho. Há concordância com o levantamento de Mariotti (2003) que também não vê evidências clínicas de benefício. Mas, a aplicação tópica sobre o tecido ósseo, ainda é pouco estudada.

A ação bactericida da tetraciclina e a desmineralizadora são comprovadas, por Babay, (2001) , mostrando efetiva a remoção de *smear layer* e Isik, em 1997, que afirma produzir zonas de desmineralização, expondo as fibras colágenas e os túbulos dentinários, respectivamente. Essas ações, que devem ocorrer pelo presença de HCL em sua composição, deixam o ph da solução ácido, levam à

exposição da porção protéica do tecido cementário, deixando fibras colágenas livres e prontas para novas uniões.

Para se avaliar a ação bactericida deveríamos estudar sua aplicação, com enxertos contaminados e não contaminados, assim avaliando assim sua eficácia, uma vez que a boca é uma das áreas mais contaminadas do corpo humano.

A ação desmineralizadora trouxe-nos a expectativa de acelerar o processo de reparo, como Rangel-Garcia Jr. concluiu, em 1997, uma vez que a fibra colágena exposta traria fatores quimiotáticos (Urist,1965), levando a uma osteoindução (Boyne,1973) e facilitaria o processo de reabsorção pelos osteoclastos (Junqueira,1999; Thomsen,1991) , acelerando o processo de reparo e favorecendo a repopulação da área enxertada (Phemister,1914). Devemos levar em consideração, também que a tetraciclina pode agir, sobre as células com potencial osteogênico do enxerto desfavorecendo-o (Cormack,1987).

A análise estatística, ao se comparar o Grupo Controle com o Grupo Tetraciclina, no período de 7 dias, nos deu, resultado significativo, nível de 1% com probabilidade de igualdade de 0,14%. Na avaliação dos mesmos grupo,s no período de 30 dias, deu resultado significativo, nível de 1% com probabilidade de igualdade de 0,06%. Avaliando ambos períodos do Grupo Tetraciclina, obtivemos resultado significativo, o nível de 1% com probabilidade de igualdade de 0,06%. Ao compararmos nosso estudo com o de Coradazzi, (2003) tomando sua amostra do

Grupo Triturado e a do Grupo Tetraciclina, em ambos períodos, não obtivemos significância, são amostras iguais sendo $>0,05$ e probabilidade de igualdade de 18,14% para 7 dias e 11,4% para 30 dias.

Comparação do grupo tratado com grupo triturado

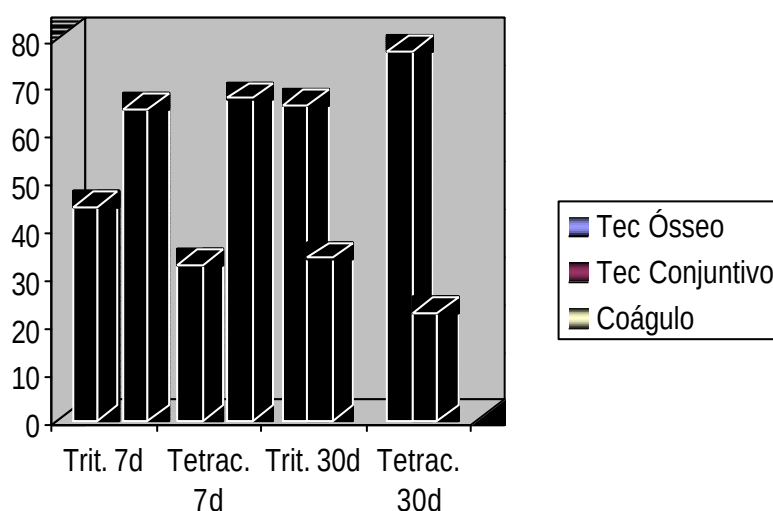


Gráfico 3 Obtido da comparação com o grupo triturado do estudo de Coradazzi.

Os dados do Grupo Triturado foram coletados do estudo de Coradazzi

Resultado da estatística de comparação do Grupo Controle, com 30 dias, e Grupo Tetraciclina, com 30 dias.

Resultados do teste	
Amostra A: Gcontrole	(8 dados)
Amostra B: Gtetraciclina	(8 dados)
Valor calculado de t	4.58
Graus de liberdade	14
Média da amostra (1)	50.00

Média da amostra (2)	77.38
Probabilidade de igualdade	0.06 %
Significante ao nível de 1 % ($\alpha = 0.01$)	

Resultado da estatística de comparação de ambos os Grupos Tetraciclina (7 e 30 dias).

Resultados do teste	
Amostra A: GT5dias	(8 dados)
Amostra B: Gt40dias	(8 dados)
Valor calculado de t	4.76
Graus de liberdade	14
Média da amostra (1)	32.50
Média da amostra (2)	77.38
Probabilidade de igualdade	0.06 %
Significante ao nível de 1 % ($\alpha = 0.01$)	

Avaliando os resultados estatísticos, verificamos que o grupo da tetraciclina e do reparo normal forma semelhantes.

7. Conclusão

7. Conclusão

*D*e acordo com a metodologia utilizada no presente trabalho, podemos concluir que:

?? A tetraciclina hidrocloreídrica não interferiu no processo local e no desempenho do enxerto ósseo utilizado no tratamento dos defeitos ósseos experimentais.

?? Não houve evidência histológica da ação descalcificadora da tetraciclina. Talvez pelo tempo de exposição do enxerto ósseo a medicamento

8. Referência Bibliográfica

8. Referência Bibliográfica

1. Aragones, Liane Cassol Argenta Título Tratamento químico de fragmentos dentários implantados no subcutâneo de ratos: uma análise comparativa entre ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina. Imprensa Bauru, 1993. Descr Fís 208p. Grau Dissertação (Mestrado).
2. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther. 1991; 52: 407-422.
3. Babay N SEM study on the effect of two different demineralization methods with saturated tetracycline hydrochloride on diseased root surfaces. Fonte: J Contemp Dent Pract; 2(2):25-35, 2001 May 15.
4. Bar-Shavit R. Kahn A. Wilner GD, Fenton JW. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. Science. 1983; 220: 728-731.
5. Barth, A. Über histologische befunde nach knochen-implantation. Arch. Klin.Chir., v.43. (suppl.32), p.409-13, 1893.

6. Becker, W., Leckholm, U., Dahlin C., Becker, B.E., Donath, K. The effect of clinical loading on bone regenerated by GTAM barriers: a Study In dogs. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. v.9, p.305-13, 1994.
7. Becker, W., Schenk, R.K., Higuchi, K., Lekholm, U. & Becker, B.E. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. v.10, p.143-54, 1995.
8. Ben-Yehouda A Progressive cervical root resorption related to tetracycline root conditioning. J Periodontol 1997 Aug;68(8):808 J Periodontol; 68(5):432-5, 1997 May.
9. Bernard, G.W. Healing and repair of osseous defects. Dent. Clin. North Am., v.35, p.469, 1991.
10. Boyne, P.J. Induction of bone repair by various bone grafting materials. Hard tissue growth repair and mineralization. Ciba Found. Symp., v.11, p.121-41, 1973.
11. Branemark, P. I., Lindstrom, J., Hallen O., Breine, U., Jeppson, P.H., Ohman, A. Reconstruction of the defective mandible. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. , v. 9, p. 116-128, 1975.
12. Braun W, Rti'ter A. Frakturheilung. Unfallchirurgie. 1996;99: 59-67.

13. Breine, U., Branemark, P-I. – Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and performed autologous bone grafts in combination with osteointegrated implants. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, 14(suppl. 1): 23-48, 1980.
14. Brighton CT. Principles of fracture healing. In: Murry JA, ed. *Instructional course Lectures*. St Luis, Mo: Mosby; 1984:60-82.
15. Burchardt, H. Biology of bone transplantation. *Orthop. Clin. North Am.*, v.18, p.187-9, 1987.
16. Burchardt, H. The biology of the bone graft repair. *Clin. Orthop.*, v.174, p.28-42, 1983.
17. Carvalho, P. S. P., Rangel-Garcia Júnior, I., Sanches, M.G. Estudo comparativo entre as hidroxiapatitas: Osteosynt e HA-40: estudo histomorfométrico em ratos. *R.G.O.*, v.41, n.6, p.330-2, 1993.
18. Chao FC, Schepro D, Tullis JL, Belamarich FA, Curby WA. Similarities between platelet contraction and cellular motility during mitosis: role of platelet microtubules in clot retraction. *J Cell Sci.* 1976; 20: 569-588.
19. Colman RW, Marder VJ, SalEW, HirshJ. Overview of hemostasis. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Trmbosis: BasicPrinciples and Clinical Practice*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott; 1987: 3-17.

20. Coradazzi, L. F. Avaliação dos enxertos autógenos triturados manualmente e coletados durante osteotomia. Análise histológica e histométrica em coelhos. Araçatuba, 2003 114p Tese de Mestrado Faculdade de odontologia Universidade Estadual Paulista.
21. Cormack DH. Bone. In: *Ham's Histology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott; 1987:273-323.
22. Eastwood M, Porter R, Khan U, McGrouther 6, Brown R. Quantitative analysis of collagen gel contractile forces generated by dermal fibroblasts and the relationship to cell morphology. *J Cell Physiol*. 1996; 166: 33-42.
23. Ehrlich HP, Rajaratnam BM. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell*. 1990; 22:407- 417.
24. Fallschussel GKH. Das Lagergewebe dentaler Implantate. In: Fallschussel, ed. *Zahnärztliche Implantologie, Wissenschaft und Praxis*. Berlin, Germany: Quintessence-Verlag; 1986: 34-85.
25. Feighan, J.E., Davy, D., Prewett, A.B., Stevenson, S. Induction of bone by a demineralised bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. *J. Orthop. Res.*, v.13, n.6, p.881-91, 1995.
26. Galbraith CG, Sheetz MP A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9114-9118.

27. Gallie, W. E., Robertson, D. E. Transplantation of bone. *J. Am. Med. Assoc.*, v.70, p.1134-8. 1918.
28. Halkier T. Blood coagulation. In: *Mechanisms in Blood Coagulation, Fibrinolysis and the Complement System*. Cambridge, England: Cambridge University Press; 1991: 1-127.
29. Ham AW. Harris WR. Repair and transplantation of bone. In: Bourne GH. ed. *The Biochemistry and Physiology of Bone*. 2nd ed.. vol.3. New York, NY: Academic Press; 1971:337-399.
30. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. *J Bone Joint Surg Am*. 1952; 34:701.
31. Harris AK, Stopak D, Wild P Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*. 1981; 290: 249-251.
32. Harris AK, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*. 1980;208:177-179.
33. Harris WR. Ham AW. The mechanism of nutrition in bone and how it affects its structure, repair and transplantation. In: *Ciba Fdn Symp on Bone Structure and Metabolism*. London, England: J&A Churchill; 1956:135.
34. Harsha, B.C., Tursey, T.A., Powers, S.K. : Use of autogenous cranial bone grafts in maxillofacial surgery: A preliminary report. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.44, p.11-5, 1986.

35. HOPPENREIJS, T. J. M. et al. The chin as a donor site in early secondary osteoplasty: a retrospective clinical and radiological evaluation. *J. Craniomaxillofac Surg.*, v. 20, p. 119-124, 1992.
36. Hunt TK. van Winkle W Jr. Normal repair. In: Hunt TK, Dunphy JE. eds. *Fundamentals of Wound Management*. New York: Appleton-Century-Crofts; 1979: 2-67.
37. Isik AG; Tarim B; Hafez AA; Yalçın FS; Onan U; Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. *Fonte: J Periodontol*; 71(2):219-25, 2000 Feb.
38. Isik G; Ince S; Saglam F; Onan U Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCl on healthy root surfaces. *Fonte: J Clin Periodontol*; 24(9 Pt 1):589-94, 1997 Sep.
39. Junqueira e Carneiro, *Histologia Básica*, 9th ed, Ed. Guanabara Koogon, 1999.
40. Kainulainen, V., Oikarinen, K. Comparison of four bone collectors designed for oral and maxillofacial surgery: an in vitro study. *Clin. Oral. Implant. Res.*, v.9, p.327-32, 1998.
41. Keller, E. E., Van Roekel, N.B., Desjardins, R.P., Tolman, D.E. Prosthetic-surgical reconstruction of severely resorbed maxilla with iliac bone grafting

- and tissue-integrated prostheses. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 2, n. 3, p. 155-65, 1987.
42. Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. : *Biochem Pharmacol*. 2003 Nov 1;66(9):1809-19.
43. Koole, R., Bosker, H. & Noorman Van Der Dussen, F. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J. Cran. Maxillofac. Surg.*, v.17, p.28-30, 1989.
44. Koole, R., Bosker, H. & Noorman Van Der Dussen, F. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J. Cran. Maxillofac. Surg.*, v.17, p.28-30, 1989.
45. Lew, D., Marino, A.A., Startzell, J.M., Keller, J.C. A comparative study of osseointegration of titanium implants in corticocancellous block and corticocancellous chip grafts in canine ilium. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.52, p.952-8, 1994.
46. Lindner J, Grasedyck K, Beste G, Hoose C, Steinbach S, Gries G. On the temporal course of wound healing with special reference to the synthesis of ground substance and fibrils. *Symp Biol Hung*. 1967; 7: 35-56.

47. Listrom, R.D., Symington, J.S, Osseointegrated dental implants in conjunction with bone grafts. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.17, p.116-8, 1988.
48. Listrom, R.D., Symington, J.S, Osseointegrated dental implants in conjunction with bone grafts. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.17, p.116-8, 1988.
49. Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003 Dec;8(1):205-26. Review.
50. Marx, R., Morales, M. Morbidity from bone harvest in major jaw reconstruction: a randomized trial comparing the lateral and posterior approaches to the ilium. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.48, p.196-203, 1988.
51. Masters LB; Mellonig JT; Brunsvold MA; Nummikoski PV A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. *Fonte: J Periodontol*; 67(8):770-81, 1996 Aug.
52. Misch, C. E., Dietsh, F. Bone grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.*, v.2, p.158-67, 1993.
53. Misch, C. M. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 12, p. 767-76, 1997.

- 54.Misch, C. M. et al . Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural Report. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. V.7, P.360-366,1992.
- 55.Moenning, J.E., Graham, L.L. Elimination of mandibular labial undercut with autogenous bone graft from a maxillary tuberosity. J. Prosthet. Dent ., v.56, p.211-4, 1986.
- 56.Mowlen, R. Cancellous chip bone grafts : report on 75 cases. Lancet., v.2, p.746-52, 1944.
- 57.Norris DA. Clark RAF, Swigart LM, Huff JC, Weston WL, Howell SE. Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes. J Immunol. 1982; 129:1612-1618.
- 58.Ollier, L. Traite experimental et clinique de la regeneration des os et la production artificielle du tissue osseux. Paris: P. Masson et Fils, 1867. 128p.
- 59.Pettet GJ, Byrne HM, McElwain DLS, Norbury J. A model of wound-healing angiogenesis in soft tissue. Mathem Biosci. 1996; 136: 35-63.
- 60.Phemister, D. The fail of trasplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg. Gynecol. Obstet., v.19, p.303-9, 1914.
- 61.Piattelli, A., Scarano, A., Piattelli, M. Microscopic and histochemical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in association with

- implant placement: a case report. *Int. J. Periodont. Res. Dent.*, v.18, p.355-61, 1998.
62. Postlethwaite AE. Kang AH. Collagen and collagen pep-tide-induced chemotaxis of human blood monocytes. *J ExpMed.* 1976; 143:1299-1307.
63. Rangel-Garcia Junior, I. Implante homogêneo de matriz óssea desmineralizada no espaço subcutâneo dorsal e alvéolo dental: estudo histológico em ratos. Araçatuba, 1997. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
64. Rangel-Garcia Junior, I. Utilização dos implantes de polietileno, poliuretano e matriz óssea bovina em defeitos ósseos maxilares. Análise histológica e histométrica em macacos. Araçatuba, 2000. 85p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
65. Ribeiro, M. L., Gerrits, M. M., Benvengo, Y. H. B., Berning, M., Godoy, A. P. O., Kuipers, E. J., Mendonça, S., Vliet, A. H. M. V., Pedrazzoli Jr, J., Kusters, J.G. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *Fems Immunology and Medical Microbiology*. Holanda: , v.40, n.1, p.57 - 61, 2004.
66. Rissolo, A. R., Bennett, J. Bone grafting and its essential role in implant dentistry. *Dent. Clin. North. Am.*, v.42, n.1, p.91-116, 1998.

67. Rudolph R, Vande Berg J, Ehrlich HP Wound contraction and scar contracture. In: Cohen 1K, Diegelmann RF, Lindblad WJ, eds. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*. Philadelphia, Pa: Saunders; 1992: 96-114.
68. Salata, L.A. O uso de ionômero de vidro como material condutor de reparo ósseo: comparação in vivo com hidroxiapatita e com a técnica de regeneração óssea guiada com dois tipos de membranas. Ribeirão Preto, 1995. P.122. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
69. Sanches, M.G., Okamoto, T., Carvalho, A.C.P. Silicone implantation into dental sockets: histological study in rats . J. Nihon Univ. Sch. Dent ., v.24, n.4, p.218-26, 1982.
70. Sanches, M.G., Okamoto, T., Carvalho, A.C.P. Silicone implantation into dental sockets: histological study in rats . J. Nihon Univ. Sch. Dent ., v.24, n.4, p.218-26, 1982.
71. Schultz RJ. *The language of fracture*. 2nd ed. Baltimore: Willians and Wilkins; 1990: 1-33.
72. Silver IA. Local and systemic factors which affect the proliferation of fibroblasts. In: Kulonen E, Pikkarainen J, eds. *Biology of Fibroblast*. London, England: Academic Press; 1973: 507-519.

73. Sterrett JD; Simmons J; Whitford G; Russell CM Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. Fonte: J Clin Periodontol; 24(7): 457-63, 1997 Jul.
74. Stroud, S. W., Fonseca, R.J., Sanders, G.W., Burkes, E.J.Jr. Healing of interpositionnal autogenous bone grafts after total maxillary osteomy. J. Oral Surg., v.38, n. 12, p.878-85, 1980.
75. Thomsen P, Ericson LE. Inflammatory cell response to bone implant surfaces. In: Davies JE, ed. The Bone-Biomaterial Interface. Toronto, Ontario: University of Toronto Press; 1991:153-164.
76. Trombelli L; Scabbia A; Scapoli C; Calura G Clinical effect of tetracycline demineralization and fibrin-fibronectin sealing system application on healing response following flap debridement surgery. Comentários: Erratum In: J Periodontol 1996 Dec; 67(12):1368.
77. Tuan T-L, Song A, Chang S, Younai S, Nimni ME. In vitro fibroplasia: contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res.* 1996;223:127-134.
78. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science*, v.150, 893-99, 1965.
79. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ, Recaptulation of signal regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev.* 1998; 71: 65-76.

80. Walter JB, Talbot IC. Wound Healing. In: *General Pathology*. 7th ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1996:165-180.
81. Winet H, Albrektsson T. Wound healing in the bone chamber: I, neoosteogenesis during transition from the repair to the regenerative phase in the rabbit tibial cortex. *J Orthop Res*. 1988; 6: 531-539.
82. Winet H, Bao JY, Moffat R. Neo-osteogenesis of haversian trabeculae through a bone chamber implanted in a rabbit tibial cortex: a control model. *Calcif Tissue mt*. 1990; 47: 24-34.
83. Winet H, Bao JY, Moffat RA control model for tibial cortex neovascularization in the bone chamber. *J Bone Miner Res*. 1990; 5:19-30.
84. Wong, R.W.K., Rabie, A.B.M. A quantitative assessment of the healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts. *Eur. J. Orthod.*, v.21, p.119-26, 1999.
85. Wood, R.M., Moore, D.L. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.3, p.209-14, 1988.
86. Wood, R.M., Moore, D.L. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.3, p.209-14, 1988.

87. Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. *J Periodontol.* 2003 Jul;74(7):1038-42.
88. Yamamoto, Célia Hitomi Aspectos da qualidade de tetraciclina em preparações farmaceuticas sólidas : correlação entre os métodos de dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência e turbidimétrico. Tese (Doutorado) 255 p FCF – Faculdade de Ciências Farmaceutica São Paulo, 1999.
89. Young, C., Sandstedt, P., Skoglund, A . A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, p.72-6, 1999.
90. Zins, J.E., Whitaker, L.A., Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.72, p.778-84, 1983.

