

Flávia Priscila Pereira

Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico associado ao vidro bioativo no processo de regeneração óssea. Análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratos.

ARAÇATUBA-SP

2007

Flávia Priscila Pereira

Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico associado ao vidro bioativo no processo de regeneração óssea. Análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para obtenção do grau de “MESTRE EM ODONTOLOGIA” – Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA- SP

2007

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436a Pereira, Flávia Priscila
Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico associado ao vidro bioativo no processo de regeneração óssea: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratos / Flávia Priscila Pereira. - Araçatuba: [s.n.], 2007
99 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2007

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

Co-orientador: Profa. Dra Roberta Okamoto

1. Substitutos ósseos 2. Vidro bioativo 3. Regeneração óssea
4. Ácido poliglicólico 5. Imunoistoquímica 6. Polímeros 7. Ratos

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

Flávia Priscila Pereira

Nascimento:	03.03.1981 – PIACATU-SP
Filiação:	JOSÉ VALTER PEREIRA SONIA AP. G. PEREIRA
1999/2002:	Curso de Graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.
2003/2004:	Aluna especial do Programa de Pós- Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP
2006/2007:	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco- Maxilo-Facial, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO A.....

A **DEUS**, que sempre conduziu meus passos, sem o qual nada seria.

“Não te mandei ir? Esforça-te e tenha bom ânimo, não te atemorizes, nem te espantes, porque o senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andem”
(Josué 1:9).

A meus pais **JOSÉ VALTER** e **SONIA** pelo apoio em todos os momentos da minha vida, sendo o meu refúgio e o meu “porto seguro” nos momentos difíceis, nas alegrias, conquistas e desilusões. Vocês foram os responsáveis por fornecer o suporte para eu seguir sozinha e construir minha própria história, com exemplos de caráter e dedicação à família. Sem vocês não teria conseguido atingir meus objetivos e concretizar meus sonhos. Minha eterna e profunda gratidão. Amo muito vocês.

A meus irmãos **MILTON** e **PAULA** que acreditaram na minha garra e vontade de vencer, sempre torcendo por mim incondicionalmente e vibrando a cada conquista. Obrigada pela paciência, compreensão e alegrias que vocês me proporcionam a cada dia.

À minha avó **LEONOR** e **TIOS** que torceram por mim, incentivando-me e orgulhando-se de cada degrau alcançado desta longa escada da minha vida. Esta vitória também é de vocês. Obrigada pela torcida e preocupação.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Prof. Dr. EDUARDO HOCHULI VIEIRA** que possibilitou a liberdade indispensável para o meu crescimento e amadurecimento. Mesmo distante fisicamente, mostrou-se sempre à disposição para me acalmar nas horas de “stress”. Orgulho-me de ser sua orientada e agradeço pela confiança depositada em mim durante estes anos.

À minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. ROBERTA OKAMOTO** pelo seu exemplo de dedicação e amor à pesquisa, tornando-se um modelo desde o início de minha formação acadêmica. Obrigada pela disponibilidade e por estar ao meu lado nos momentos de aflição.

Ao **Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JUNIOR** que além de suas qualidades profissionais, mostra-nos a cada dia os verdadeiros valores do ser humano. O senhor fez parte de minha formação não só profissional, mas humana, tornando-me uma pessoa diferenciada e mais madura. Ao guiar-me durante esta trajetória soube transmitir seus conhecimentos sempre com muita segurança e humildade. Obrigada pela paciência e por nunca ter deixado de acreditar em meu potencial para crescer, mesmo diante de minhas ansiedades e indagações.

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

Bertold Brecht

À **Prof.^a Dr.^a. ALESSANDRA ARANEGA MARCONDES**, exemplo de dedicação profissional e à família. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, amizade, confiança e orientações.

Ao **Prof. Dr. OSVALDO MAGRO FILHO (“Dinho”)**, pela oportunidade de convivência, ensinamentos cirúrgicos e principalmente por nos proporcionar a cada dia uma lição do verdadeiro sentido da vida.

Ao **Prof. Dr. MICHEL SAAD NETO**, por mostrar-me que experiência e juventude podem caminhar juntas. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência.

À **Prof.^a Dr.^a. CRISTIANE MARA RUIZ SOUZA FATTAH**, pelo exemplo de simplicidade, dedicação e amor à vida acadêmica.

Ao **Prof. Dr. WILSON ROBERTO POI**, que de forma sutil plantou a “sementinha” das dúvidas e questionamentos, a qual foi cultivada durante todos estes anos de convívio. Obrigada pela forma como transmitiu seus conhecimentos, sem respostas exatas e finitas, mas sempre com alguma indagação, indispensável para a minha formação. Com você aprendi que “não basta ser professor...”

Ao **Prof. Dr. TETUO OKAMOTO**, ícone da Odontologia, exemplo de caráter, humildade e dedicação. A Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial deve muito ao senhor. Obrigada pelo carinho, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre.

À secretária do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e grande amiga, **CLEIDE LEMES DA SILVA**, pela dedicação, doação, carinho, torcida, alegria e preocupação constante, sempre disposta a oferecer um conselho de mãe ou uma conversa de amiga. Por muitas vezes a sua família tornou-se a minha, preocupando-se conosco como uma mãe preocupa-se com seus filhos. Obrigada pela receptividade e por ter influenciado em minha escolha profissional, ajudando-me a tornar os obstáculos transponíveis. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho. “Cleidinha”, você é simplesmente especial.

Ao meu colega de pós-graduação e amigo **MARCOS HEIDY GUSKUMA** que sempre soube transmitir muita calma e serenidade durante todas as etapas, motivando-me e transmitindo segurança para conseguirmos fazer o melhor. Sem dúvida sem você esta tarefa teria sido árdua e causaria desespero. Obrigada pelo ombro amigo nos momentos difíceis de minha vida e por não deixar que desanimasse diante das dificuldades e frustrações.

À minha grande amiga **ADRIANA DEMATHÉ (“Dri”)**, exemplo de dedicação e coragem. Obrigada pelo carinho, por ouvir com paciência meus incansáveis desabafos, aconselhando e apoiando-me em minhas decisões e atitudes.

Às minhas amigas **ROSSEMARY FALCON ANTENUCCI (“Ross”)**, **YESSELIN MIRANDA ZAMALLOA (“Yess”)** e **PAULA DO PRADO RIBEIRO (“Paulinha”)**, pela convivência, alegrias e por compartilharem minhas inseguranças, medos e alegrias. Com vocês os dias foram mais intensos e divertidos. Obrigada por se tornarem a minha família em Araçatuba.

À minha grande amiga **SILVIA FABIANA MURGO** que esteve ao meu lado em todos os momentos, respeitando o meu jeito de ser e minhas ausências, incentivando-me a prosseguir em busca de meus ideais. Obrigada pelo companheirismo e por sua alegria.

Ao amigo **AUBREY FERNANDO FABRE** por ter sempre acreditado que eu era capaz, motivando e torcendo sempre por mim.

Ao grande amigo **LUIZ FERNANDO DE MENDONÇA PINHEIRO (“Nando”)** pelo carinho, torcida, incentivos e disponibilidade, indispensáveis para eu concluir mais esta etapa da minha vida.

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.”

Vinícius de Moraes

Ao **CLEBER CARRILHO** que me apoiou incondicionalmente durante esta etapa da minha vida, incentivando-me a superar cada obstáculo, em favor de meu crescimento humano e profissional.

À minha família, em especial à minha avó **LEONOR** e tios **VILTER, WONEY, TEREZINHA, WILDA, EDSON, PAULO** e **CÉLIA** por nunca terem deixado de acreditar em minha determinação e força de vontade.

À minha madrinha **DIRCE AKEMI TAKATA** pelo incentivo e torcida constantes durante todas as fases da minha vida acadêmica.

À **Prof^a. Dr^a. ANA MARIA PIRES SOUBHIA** pela preocupação e incentivo à concretização deste sonho.

Ao meu colega de pós-graduação **ALBANIR GABRIEL BORRASCA** que soube ter paciência para compreender meu perfeccionismo. Obrigada pelos momentos agradáveis compartilhados.

À **LUCIANA LEMES CALZADILLA** pela energia contagiante e auxílio indispensável durante a etapa de cirurgia dos animais.

Ao amigo **Prof. Dr. ANSELMO COLOMBO DE ALENCAR** pela disponibilidade em ajudar sempre e por contribuir na realização deste trabalho, durante a preparação do biomaterial.

Aos colegas de mestrado **ABRAHÃO CAVALCANTI GOMES DE SOUZA E RODOLPHO VALENTINE NETO**, exemplo de dedicação e força de vontade. Agradeço os conselhos e a disponibilidade em ajudar sempre.

À pós-graduanda **ELLEN GAETTI JARDIM** pela disponibilidade, garra e determinação que a tornam uma vencedora.

Ao colega **MICHEL REIS MESSORA**, pelo exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa. Obrigada pelo apoio e ajuda em todas as fases deste trabalho.

Aos colegas **HELEN RAMON ESPER** e **CARLOS ALBERTO DE CARVALHO (“Beto”)** pelos conselhos, incentivos e principalmente pelos conhecimentos transmitidos com muita humildade.

Aos amigos e companheiros da Unidade Básica de Saúde de Gabriel Monteiro **ALESSANDRA, EDECILDA, EDNALDO, EDNÉIA, ELIAS, JOCEMARA, JOSÉ ALFREDO, MARTA, MARCOS VENDRAME, MOACIR** e **RENEE** que me apoiaram e esforçaram-se, suprimindo minhas ausências para que eu atingisse meus objetivos. Obrigada pelas conversas e conselhos.

Aos meus colegas e amigos **ELOÁ RODRIGUES LUVIZUTO, THALYTA NEVES DA CRUZ** e **ALEXANDRE RODRIGUES FREIRE** pela ajuda constante nas fases laboratoriais e pelos momentos de convivência. Vocês tiveram papel fundamental para a elaboração deste trabalho.

APRENDI...

Aprendi que não importa o quanto certas coisas sejam importantes para mim, tem gente que não dá à mínima e eu jamais conseguirei convencê-las.

Que posso passar anos construindo uma verdade e destruí-la em apenas alguns segundos.

Que por mais que se corte um pão em fatias, esse pão continua tendo duas faces, e o mesmo vale para tudo o que cortamos em nosso caminho.

Aprendi que por pior que seja um problema ou uma situação, sempre existe uma saída.

Aprendi que é bobagem fugir das dificuldades, mais cedo ou mais tarde, será preciso tirar as pedras do caminho para conseguir avançar.

Aprendi que perdemos tempo nos preocupando com fatos que muitas vezes só existem na nossa mente.

Aprendi que é necessário um dia de chuva para darmos valor ao sol, mas se ficarmos muito tempo expostos, o sol queima.

Aprendi que os heróis não são aqueles que realizaram obras notáveis, mas os que fizeram o que foi necessário e assumiram as conseqüências por seus atos.

Aprendi que ao invés de ficar esperando alguém me trazer flores, é melhor plantar um jardim.

Aprendi que não importa quanta seriedade a vida exija de você. Cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir junto.

Aprendi que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo o que lhe pedimos.

Aprendi que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é cercar-me de gente mais inteligente que eu.

Aprendi que a vida é dura, mas eu sou mais ainda.

Aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorrem quando você está escalando-a.

Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência.

Mas, aprendi também, que posso ir além dos limites que eu própria coloquei.

Aprendi que nos momentos mais difíceis a ajuda veio justamente daquela pessoa que eu achava que iria tentar piorar as coisas.

Aprendi que jamais posso dizer a uma criança que seus sonhos são impossíveis, pois seria uma tragédia para o mundo se eu conseguisse convencê-la disso.

Aprendi que diplomas na parede não me fazem mais respeitável ou mais sábio.

E que amigos não são apenas para guardar no fundo do peito, mas para mostrar que são amigos.

Aprendi que certas pessoas vão embora da nossa vida de qualquer maneira, mesmo que desejemos retê-las para sempre.

Aprendi que toda mudança inicia um ciclo de construção, se você não esquecer de deixar a porta aberta.

Aprendi que o tempo é precioso e não volta atrás. Por isso não vale a pena resgatar o passado ou temer o futuro. O que vale a pena é viver o HOJE.

O meu futuro ainda está por vir. Foi então que aprendi que devemos descruzar os braços, vencer o medo e partir em busca de nossos sonhos...

Agradecimentos

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP**, sob direção do Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e vice direção da Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pires Soubhia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Aos **COORDENADORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JUNIOR** e **WILSON ROBERTO POI** pela oportunidade, empenho, receptividade e orientações prestadas durante esse período.

Aos **AMIGOS DO CURSO DE DOUTORADO EM CIRURGIA**: André Dotto Sotovia, Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho, Eleonor Álvaro Garbin, Francisley Ávila Souza, Jéssica Lemos Gulinelli, Leandro de Carvalho Cardoso, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Paulo Pinto Faria, Thaís da Silveira Rodrigues, Thallita Pereira Queiroz, Walter Bettoni Junior, pelos ensinamentos e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos **AMIGOS DO CURSO DE MESTRADO EM CIRURGIA**: Abrahão Cavalcante Gomes de Souza, Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Marcos Heidy Guskuma e Rodolpho Valentine Neto. Aprendi muito com cada um de vocês. Obrigada pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

Aos **AMIGOS DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**: Adriana, Thiago, Felipe, Carolina, Érica, Rossemary, Amílcar, Ana Kelly, Daniela, Valentim, Leandro, Eloá, Lithiene, Leila, Bruna, Flávia, Carlos, Geraldo, Pedro e Luiz Francisco (“Kiko”) pela agradável convivência e momentos compartilhados.

Aos colegas de plantão e ex-pós-graduandos **Prof. Dr^a. ANA PAULA F. BASSI, Prof^a. Dr^a. DANIELA POZONI, Prof^a. Dr^a. NATASHA MAGRO ÉRNICA** e **JORDAN LIMA DA SILVA** pela oportunidade de convivência e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA CIRURGIA E AMIGOS**: e Antonia Ferreira Artioli, Aparecida Leontina B de Carvalho, Bernadete Maria Nunes Kimura, Gilmar Martins de Oliveira, Maria Dirce Colli Boato e Paulo Roberto Gratão, pela ajuda em diversas etapas da dissertação. Obrigada pela feliz convívio nos últimos anos.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA BIBLIOTECA**: Cláudio, Fernando, Ivone, Junior, Izamar, Luzia, Cláudia e Maria Cláudia pela disponibilidade e carinho.

Aos **DOCENTES DA DISCIPLINA DE CLÍNICA INTEGRADA**: Professores Doutores Celso, Daniela, Denise, José Carlos, Poi e Sônia pela constante disponibilidade, mesmo em momentos inoportunos.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO**: Diogo, Marina e Valéria, pela paciência, disponibilidade, alegria e admirável interesse em nos ajudar sempre.

Aos **FUNCIONÁRIOS DO SETOR DE BIOTÉRIO** pela disponibilidade e ajuda para obtenção dos animais.

À **3i** pela gentileza e disponibilidade em ceder o material vidro bioativo, utilizado no experimento deste trabalho, bem como pela confiança depositada.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (*Processo: 06/54195-3*), pela concessão da bolsa de Mestrado, indispensável para realização de trabalhos de pós-graduação e para o progresso da ciência no Brasil.

A todos os pacientes, pela confiança depositada a cada atendimento.

Aos animais que sublimaram a própria vida por um bem maior.

A **TODOS** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e concretização de um sonho.

Epígrafe

Para os erros há perdão;
para os fracassos, chance;
para os amores impossíveis, tempo...

Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode,
que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e
acredite em você.

Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando
Porque, embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu.

Fernando Pessoa

Resumo

PEREIRA, FP. Avaliação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico associado ao vidro bioativo no processo de regeneração óssea. Análise histomorfométrica e imunistoquímica em ratos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2007.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a interação do copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLGA) associado ou não ao vidro bioativo no processo de regeneração óssea em defeitos criados cirurgicamente. **Materiais e método:** Foram utilizados quarenta ratos (*rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, nos quais foram confeccionados dois defeitos cirúrgicos críticos de 5 mm com broca trefina na região da calota craniana. Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o preenchimento do defeito experimental: Grupo C preenchido por coágulo, grupo VB por vidro bioativo (Biogran 3 i)®, grupo POLI pelo copolímero de PLGA e grupo POLIVB pela associação do copolímero de PLGA ao vidro bioativo. Nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatório os animais foram sacrificados por meio de sobredose anestésica, obtendo-se as peças que receberam o processamento laboratorial de rotina, com cortes de 6µm de espessura, que foram corados em hematoxilina e eosina (H.E.), Tricrômico de Masson e processamento para análise imunistoquímica, através da expressão das proteínas VEGF, BMP2, Cbfa1 e osteocalcina (OC), as quais estão envolvidas nos processos de vascularização, osteoindução e mineralização óssea. **Resultados:** O grupo C apresentou imunomarcações positivas mais expressivas para as proteínas Cbfa1, BMP2 e OC, apresentando o melhor comportamento, seguido pelos Grupos VB, POLIVB e POLI. Aos 7 dias em todos os grupos estudados observou-se a presença de tecido conjuntivo e discreta neoformação óssea restrita às bordas do defeito, estatisticamente insignificante ($p=0,106$). Aos 30 dias os grupo C e VB apresentaram maior neoformação óssea, estatisticamente significativa em relação ao POLI e POLIVB

($p=0,002$), visualizando-se no VB a permanência de grande quantidade de partículas do material, envoltas por tecido ósseo pouco diferenciado.

Conclusões: Conclui-se que o grupo C apresentou melhor comportamento durante o processo de regeneração óssea, todos os materiais testados apresentaram-se biocompatíveis, mas somente o VB apresentou propriedades osteocondutoras.

Palavras-Chave: Regeneração óssea. Substitutos ósseos. Vidro bioativo. Polímeros. Imunoistoquímica.

Abstract

PEREIRA, FP. Evaluation of the polylactic polyglycolic acid copolymer associated to bioactive glass in bone regeneration process. Histomorphometric and immunoistochemistry analysis in rats. [dissertation] Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2007.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the interaction between polylactic polyglycolic acid copolymer (PLGA) associated or not to the bioactive glass in bone regeneration process of surgically created defects. **Material and methods:** Were used 40 male rats (*rattus norvegicus albinus*, Wistar), in which were made two critical-size defects of 5 mm by trephine drill in rat calvaria. Animals were divided in 4 groups according to the experimental defect filled: Group C defect filled with blood clot, group VB defect filled with bioactive glass (Biogran 3 I ®), group POLI defect filled with PLGA copolymer and group POLIVB defect filled with the association of PLGA copolymer and bioactive glass. Rats were euthanized at 7 and 30 post-operative days by anesthetic's overdose. After that, were obtained the pieces that received laboratorial processing routine, sections of 6 µm thickness were stained with hematoxylin-eosin (H.E.), Masson's Trichrome and processed to immunoistochemistry analysis, by means of the expression of proteins VEGF, BMP2, Cbfa1 and osteocalcin, that are involved in vascularization, osteoinduction and bone mineralization process. **Results:** The Group C presented more expressive positive immunostained to proteins Cbfa1, BMP2 and OC, presenting better behavior, followed by groups VB, POLIVB and POLI. At 7 days in all groups were observed the presence of connective tissue and discreet and restricted new bone formation only in the edge of the defect, no statistically significant ($p=0,106$). At 30 days, groups C and VB presented significantly more new bone formation than POLI and POLIVB, statistically significant ($p=0,002$), was observed in group VB the permanence of great amount of materials' particles, involved with not well differentiated bone tissue.

Conclusions: It was concluded that group C showed better behavior during bone regeneration process. However, all tested materials were biocompatible and only the bioactive glass presented bone conductive properties.

Keywords: Bone regeneration. Bone substitutes. Bioactive glass. Polymers. Immunohistochemistry.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AON	=	Área de Osso Neoformado
AVB	=	Área de Vidro Bioativo
AT	=	Área Total
BMP2	=	Proteína Óssea Morfogenética 2, Bone Morphogenetic Protein 2
C	=	Controle
CBFA1/ Runx 2	=	Fator de Transcrição, Transcription Factor
cm	=	Centímetro(s)
DAB	=	Diaminobenzidina
DTC	=	Defeito(s) de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	=	Grama(s)
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
OC	=	Osteocalcina, osteocalcin
PGA	=	Ácido Poliglicólico, polyglycolic acid
PLA	=	Ácido Polilático, polylactic acid
PLGA	=	Copolímero de ácido polilático e poliglicólico, polylactic and polyglycolic acid copolymer
POLI	=	Copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLGA)
POLIVB	=	Copolímero de PLGA e vidro bioativo
PVPI	=	Polivinil Pirrolidona Iodo
VB	=	Vidro bioativo
VEGF	=	Fator de crescimento angiogênico, angiogenic growth factor
µm	=	Micrometros

Lista de Figuras do Procedimento Cirúrgico

Figura 1: Ratos machos, com peso corporal aproximado de 250 g.	81
Figura 2: Ratos (<i>Rattus norvegicus albinus</i> , Wistar) acondicionados em gaiolas no Biotério e Centro Cirúrgico “Ilídio Teodoro” - UNESP.	81
Figura 3: Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Ketamina.	81
Figura 4: Anti-sepsia com polivinilpirrolidona iodada.	81
Figura 5: Incisão sagital mucoperiostal com lâmina nº. 15.	81
Figura 6: Confeção dos defeitos cirúrgicos com auxílio de broca trefina.	81
Figura 7: Região anatômica da calota craniana.	82
Figura 8: Esquema da obtenção de dois defeitos cirúrgicos com 5 mm de diâmetro.	82
Figura 9: Ostectomia para obtenção dos defeitos cirúrgicos.	82
Figura 10: Obtenção de dois defeitos cirúrgicos de tamanho crítico na calota.	82
Figura 11: Material de implante utilizado: Vidro bioativo (Biogran)®.	82
Figura 12: Preparo do vidro bioativo através da mistura com soro fisiológico.	82
Figura 13: Copolímero de PLGA.	83
Figura 14: Copolímero de PLGA associado ao vidro bioativo.	83
Figura 15: Copolímeros reduzidos ao tamanho dos defeitos cirúrgicos.	83
Figura 16: Preenchimento dos defeitos com material de implante (vidro bioativo).	83
Figura 17: Sutura.	83
Figura 18: Antibiótico utilizado.	83

Lista de Figuras da Análise Histométrica

Figura 19: Delimitação da Área Total (AT).	84
Figura 20: Seleção da Área Total (AT).	84
Figura 21: Seleção da Área de Osso Neoformado (AON).	84
Figura 22: Planilha de cálculos e valores.	84
Figura 23: Delimitação da Área de Vidro Bioativo (AVB).	84
Figura 24: Seleção da Área de Vidro Bioativo (AVB).	84

Lista de Figuras dos Resultados

- Figura 25A:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo C: Pequenas espículas ósseas neoformadas e tecido conjuntivo com discretos fibroblastos e linfócitos próximos à borda do defeito (H.E., original de 160 X). 85
- Figura 25B:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo C: Fibroblastos e raros macrófagos e linfócitos, distantes das bordas do defeito (H.E., original de 63 X).
- Figura 25C:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo VB: Tecido conjuntivo entre as partículas do material (H.E.; original de 63X). 85
- Figura 25D:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo VB: Discreta neoformação óssea (H.E., original de 160X). 85
- Figura 25E:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo POLI: Discreta área de neoformação óssea (H.E., original de 63X). 85
- Figura 25F:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo POLI: Tecido conjuntivo com discretos fibroblastos, macrófagos e linfócitos (H.E., original de 160 X). 85
- Figura 25G:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo POLIVB: Material de implante remanescente (H.E., original de 63X). 85
- Figura 25H:** Resultados histológicos no período de 7 dias. Grupo POLIVB: discreta neoformação óssea (H.E., original de 63X). 85
- Figura 26A:** Resultados histológicos no período de 30 dias Grupo C: Neoformação óssea pronunciada recobrando parcialmente o defeito (H.E., original de 63X). 86
- Figura 26B:** Resultados histológicos no período de 30 dias Grupo C: Tecido conjuntivo sem diferenciação óssea com fibroblastos e vasos sanguíneos (H.E., original de 63X). 86

	86
Figura 26C: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo VB: Remanescentes de partículas do material e neoformação óssea discreta junto às bordas (H.E., original de 63X).	
Figura 26D: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo POLI: Extensas áreas ocupadas pelo material (PLGA) (H.E., original de 63X).	86
Figura 26E: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo POLI: Defeito cirúrgico com ausência de neoformação óssea e recoberto por tecido conjuntivo fibroso (H.E., original de 63X).	86
Figura 26F: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo POLIVB: Discreta neoformação óssea próximo às bordas do defeito (H.E., original de 63X).	86
Figura 26G: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo POLIVB: Delgada faixa de tecido conjuntivo fibroso (H.E., original de 63X).	86
Figura 26H: Resultados histológicos no período de 30 dias. Grupo POLIVB: Remanescente do copolímero associado ao vidro bioativo no centro do defeito (H.E., original de 63X).	86
Figura 27A: Imunomarcações positivas para VEGF em células endoteliais distribuídas no centro do defeito cirúrgico. Período de 7dias - Grupo C (DAB, original de 160 X).	87
Figura 27B: Imunomarcações positivas para VEGF em células endoteliais distribuídas no centro do defeito cirúrgico. Período de 7dias - Grupo VB (DAB, original de 160 X).	87
Figura 27C: Imunomarcações positivas para VEGF em células endoteliais distribuídas no centro do defeito cirúrgico. Período de 7dias - Grupo POLI (DAB, original de 160 X).	87

Figura 27D: Imunomarcações positivas para VEGF em células endoteliais distribuídas no centro do defeito cirúrgico. Período de 7 dias - Grupo POLIVB (DAB, original de 160 X).	87
Figura 28A: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 7 dias - Grupo C: Marcações positivas dispersas na matriz óssea (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28B: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 7 dias - Grupo VB: Marcações positivas dispersas ao redor das partículas do material (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28C: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 7 dias. Grupo POLI: Ausência de marcações positivas e presença de um tecido desorganizado (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28D: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 7 dias. Grupo POLIVB: Imunomarcações dispersas no tecido conjuntivo (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28E: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 30 dias. Grupo C: Marcações dispersas pelo defeito (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28F: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 30 dias. Grupo VB: Marcações expressas em pré-osteoblastos (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28G: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 30 dias. Grupo POLI: Ausência de marcações (DAB, original de 160 X).	88
Figura 28H: Imunomarcações positivas para Cbfa1 30 dias. Grupo POLIVB: Ausência de marcações (DAB, original de 160 X).	88
Figura 29A: Imunomarcações positivas para BMP 2 aos 7 dias. Grupo C: Marcações positivas dispersas no centro do defeito (DAB, original de 160 X).	89

Figura 29B: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 7 dias. Grupo VB:	89
Marcações positivas dispersas ao redor das partículas do material, com grande quantidade de marcações inespecíficas (DAB, original de 160 X).	
Figura 29C: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 7 dias. Grupo POLI:	89
Ausência de marcações no centro do defeito (DAB, original de 160 X).	
Figura 29D: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 7 dias. Grupo POLIVB:	89
Imunomarcações em áreas semelhantes a ilhotas dispersas no tecido conjuntivo (DAB, original de 160 X).	
Figura 29E: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 30 dias. Grupo C:	89
Marcações dispersas em áreas da matriz óssea (DAB, original de 160 X).	
Figura 29F: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 30 dias. Grupo VB:	89
Marcações ao redor das partículas do material (DAB, original de 160X).	
Figura 29G: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 30 dias. Grupo POLI:	89
Tecido do centro do defeito apresenta-se com disposição mais organizada e marcações expressas nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	
Figura 29H: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 30 dias. Grupo POLIVB:	90
Marcações expressas nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	
Figura 30A: Imunomarcações positivas para OC aos 7 dias. Grupo C:	90
Marcações positivas expressas em osteoblastos e osteócitos nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	
Figura 30B: Imunomarcações positivas para OC aos 7 dias. Grupo VB:	90
Marcações positivas expressas em pré-osteoblastos nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	
Figura 30C: Imunomarcações positivas para OC aos 7 dias. Grupo POLI:	90
Ausência de marcações (DAB, original de 160 X).	
Figura 30D: Imunomarcações positivas para OC aos 7 dias. Grupo POLIVB:	90
Marcações dispersas nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	

Figura 30E: Imunomarcações positivas para OC aos 30 dias. Grupo C: Marcações positivas em células da linhagem osteoblástica (DAB, original de 160 X).	90
Figura 30F: Imunomarcações positivas para OC aos 30 dias. Grupo VB: Marcações ao redor das partículas do material e no osso pré-existente nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	90
Figura 30G: Imunomarcações positivas para OC aos 30 dias. Grupo POLI: Ausência de marcações positivas (DAB, original de 160 X).	90
Figura 30H: Imunomarcações positivas para OC aos 30 dias. Grupo POLIVB: Ausência de marcações nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).	90

Lista de Tabelas e Gráficos

Tabela 1: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 7 e 30 dias entre os grupos experimentais.	55
Figura 1: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 7 dias entre os grupos.	55
Figura 2: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 30 dias entre os grupos.	56
Figura 3: Média (%) e desvios-padrão dos remanescentes de partículas de VB (AVB) aos 7 e 30 dias.	56
Tabela 2: Escore dos resultados qualitativos da análise imunoistoquímica para os grupos estudados, aos 7 e 30 dias pós-operatório.	92

Lista de Anexos

ANEXOS

- Anexo A – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) 81
- Anexo B – Ilustrações do Procedimento Cirúrgico 82
- Anexo C – Ilustrações da Análise histométrica. 85
- Anexo D – Ilustrações dos Resultados histológicos. 86
- Anexo E – Ilustrações dos Resultados imunoistoquímicos. 88
- Anexo F – Tabela de escore dos resultados imunoistoquímicos. 93
- Anexo G – Normas do periódico **Clinical Oral Implant Research** selecionado para publicação do artigo. 94

Sumário

1	Introdução	37
2	Proposição	42
3	Material e método	44
	3.1 Análise histométrica e estatística	
	3.2 Análise imunoistoquímica	
4	Resultados	51
	4.1 Análise clínica	
	4.2 Resultados histológicos	
	4.3 Resultados histométricos e estatísticos	
	4.4 Resultados imunoistoquímicos	
5	Discussão	61
6	Conclusão	68
	Referências	70
	Anexos	

1 INTRODUÇÃO*

O tecido ósseo tem um grande potencial para regeneração e pode restaurar completamente sua estrutura e funções originais. Porém, freqüentemente os defeitos de grandes proporções não reparam totalmente com tecido ósseo, principalmente quando apresentam grandes proporções. A fim de facilitar e/ou promover a regeneração, diversos tipos de enxertos ou substitutos ósseos devem ser colocados no interior dos defeitos (Lang et al.1999).

Devido às limitações relacionadas aos enxertos biológicos, a engenharia tecidual tem surgido como alternativa para se obter materiais que possuam propriedades capazes de induzir ou auxiliar no processo de neoformação óssea (Yao, et al.2005; Carvalho, et al. 2004). Nesta busca por alternativas ao enxerto autógeno, surgiram materiais de preenchimento, dentre estes os materiais aloplásticos ou sintéticos (Carvalho et al. 2004).

Os materiais aloplásticos têm origem sintética, são biocompatíveis e apresentam-se como alternativas promissoras frente à eminente necessidade de se encontrar um composto com todas as características ideais para um substituto ósseo. Apresentam-se disponíveis em quantidade, além de dispensarem a necessidade de um sítio doador. Dentre estes compostos encontram-se as cerâmicas, os vidros bioativos e os polímeros (Carvalho et al.2004).

*Segundo as normas do periódico "*Clinical Oral Implants Research*" (Anexo G)

O vidro bioativo formulado por Hench (1970), teve seus potenciais de neoformação óssea e resistência mecânica testados em vários estudos animais, comprovando o potencial promissor como substituto ósseo, pelas propriedades bioativas e osteocondutivas (Hench et al. 1971; Schepers et al.1991; Wheeler et al.1997).

Outro substituto ósseo sintético estudado desde o final da década de 70 são os polímeros derivados do ácido polilático (PLA) e poliglicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA), os quais apresentam boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, fácil manipulação, excelente biocompatibilidade e cinética previsível de biodegradação, o que desperta a atenção de vários pesquisadores nas áreas médicas e farmacêuticas (Fialho et al. 2003; Day et al. 2004 b; Ueki et al. 2003; Yao et al. 2005).

A estrutura altamente porosa do copolímero de PLGA permite que desempenhe a função de agir como arcabouço temporário quando utilizado em defeitos ósseos, possibilitando a infiltração de células e vasos ao redor dos tecidos, concomitante ao seu processo de degradação e substituição por tecido regenerado (Day et al. 2004 b; Yao et al. 2005). Devido a este comportamento biológico, pesquisas sugerem que possua propriedades osteocondutivas, funcionando como arcabouço para substituição da matriz extracelular (Rimondini et al. 2005; Imbronito et al. 2005).

Estes materiais podem ser utilizados isoladamente ou em associação na prática clínica, como dispositivos de fixação (Ferreti & Reyneke 2002, Peltoniemi

et al. 2002; Kiely et al. 2006), membranas (Crump et al.1996, Hammerle & Lang 2001), enxerto sólido/poroso, aplicação possível como veículo de drogas, carregadores de fatores de crescimento, proteínas osteomorfogênicas ou proteínas de adesão (El-Amin et al.2003; Saito et al., 2003; Day et al. 2004 a; Imbronito et al.2005; Enislidis, et al.2005; Fialho et al. 2003; Yao et al. 2005; Ueki et al. 2003).

Estudos recentes mostram que a incorporação de vidro bioativo ao copolímero de ácido polilático e poliglicólico (PLGA), poderia resultar na formação de uma estrutura capaz de agir como arcabouço de sustentação para deposição de novo osso e sua vascularização, além de possibilitar a proliferação e diferenciação de osteoblastos e células osteoprogenitoras (Yao et al. 2005; Day et al. 2004a; Boccaccini & Notingher 2003).

A possibilidade de formação de compostos reabsorvíveis com propriedades bioativas, do controle da velocidade de degradação, biocompatibilidade e de melhores propriedades mecânicas e estruturais, são algumas das vantagens que justificam a associação entre o copolímero de PLA/PGA e o vidro bioativo (Day et al. 2004a; Lu et al. 2003; Verrier et al. 2004).

Yao et al. (2005) demonstraram que a incorporação do vidro bioativo ao copolímero aumentou a reatividade da superfície do polímero e promoveu a transformação de sua superfície em uma camada bioativa rica em íons Ca e P (camada de fosfato de cálcio). Após 2 semanas de imersão, as micropartículas de Ca e P foram formadas dentro dos compósitos, facilitando a adesão e diferenciação celular.

O estudo dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos durante o processo de ossificação pode ser melhor compreendido e justificado através de técnicas imunoistoquímicas, que atuam como ferramentas metodológicas, possibilitando a análise da dinâmica do tecido ósseo em defeitos preenchidos com materiais sintéticos, por meio da imunomarcação de proteínas presentes durante o processo de regeneração óssea.

Uma dessas proteínas, presente nos períodos iniciais do processo de ossificação é a VEGF ou fator de crescimento angiogênico expressa em células endoteliais, que indica o aumento da vascularização da área (Day et al. 2004a; Leach et al. 2006). As BMPs representam um grupo de proteínas com características morfológicas próprias e de proliferação celular, expressando-se também no início da regeneração. (Owen et al. 1990; Yamaguchi et al. 2000).

O fator Cbfa1 ou Runx 2 é um fator de transcrição que atua induzindo e modulando a diferenciação de osteoblastos e é observado nas fases de proliferação celular, maturação e mineralização do tecido ósseo (Yamaguchi et al. 2000).

A osteocalcina (OC), destaca-se por ser 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. (Lieberman et al. 2002; Thorwarth et al. 2005).

A busca de biomateriais tem sido alvo de inúmeros estudos, mas é necessário também o conhecimento das respostas celulares que ocorrem durante o processo de regeneração óssea após o implante nos tecidos.

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a resposta tecidual, durante o processo de regeneração óssea, do implante de copolímero de ácido polilático e poliglicólico associado ou não ao vidro bioativo em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente, através da expressão de proteínas (VEGF, Cbfa1, BMP2 e osteocalcina), que podem atuar como marcadores de resposta celulares durante o processo de regeneração óssea.

3 MATERIAL E MÉTODO*

CIRURGIA EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba, com protocolo nº 2007-005223 (Anexo A).

Foram utilizados quarenta ratos (n=10) (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) adultos machos, de aproximadamente 3 a 4 meses de idade e peso corporal variando de 250 a 300 g, em bom estado de saúde, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida e água à vontade, em condições climatizadas no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de oito horas e anestesiados, via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com

*Figuras referentes à metodologia científica experimental são ilustrados no Anexo B.

campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calota craniana, anti-sepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada uma incisão vertical linear sentido occipito-frontal (interparietal) de aproximadamente 2 (dois) cm, na linha média da calota com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento dermoperiosteal. Em seguida com auxílio de broca trefina de 4 mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), confeccionaram-se dois defeitos cirúrgicos críticos de 5 mm de diâmetro (Bosch et al. 1998; Meinel et al. 2005) em cada lado da sutura sagital na região parietal, próximo à sutura posterior, mantendo-se a integridade da dura-máter. De acordo com o preenchimento dos defeitos constituíram-se os grupos de estudo:

Grupo I:

Grupo coágulo (C) – O defeito do lado direito foi preenchido por coágulo sanguíneo, com ausência de material de implante.

Grupo Vidro Bioativo (VB) – O defeito do lado esquerdo foi preenchido por vidro bioativo (Biogran) ®, 3i.

Grupo II:

Grupo Polímero (POLI) – O defeito do lado direito foi preenchido pelo copolímero de PLGA na proporção de 50:50 (VETEC Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) aquecido entre 100 e 150°C.

Grupo Polímero + Vidro Bioativo (POLIVB) – O defeito ósseo foi preenchido com o copolímero de PLGA associado ao vidro bioativo (Biogran 3i) ®, acrescentando-se as partículas de vidro bioativo durante a preparação do material.

Após o preenchimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (poliglactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil), obtendo-se o fechamento primário da ferida. Após a sutura, novamente foi realizada a anti-sepsia da área com Polivinil Pirrolidona, Iodo Tópico.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Nenhuma

restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento.

PROCESSAMENTO TECIDUAL

Os animais (n=10) foram divididos em dois tempos de sacrifício, aos 7 e 30 dias pós-operatórios, por meio de sobredose anestésica, seguida da remoção da calota de cada animal com os dois defeitos cirúrgicos e eliminação do tecido mole excedente. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 16%. Após descalcificação as peças foram reduzidas, separando-se as duas cavidades e em seguida dividindo-as ao meio no sentido transversal, através da mensuração de 2,5mm por meio de um paquímetro, obtendo-se duas peças de cada defeito, as quais passaram pelas etapas de processamento laboratorial, incluindo-se as duas metades de cada defeito em um mesmo bloco de parafina. As peças foram incluídas de maneira que na realização dos cortes estes foram iniciados a partir do centro do defeito. Realizaram-se cortes seriados de 6 μ m de espessura, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE Merck & Co., Inc.) e Tricrômico de Masson. Em alguns cortes de parafina foi realizado o processamento imunoistoquímico, através da expressão das proteínas VEGF, Cbfa1, BMP2 e osteocalcina (OC) para análise qualitativa das reações celulares durante o processo de regeneração óssea.

3.1. ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA**

Foi realizada análise através da quantificação de tecido ósseo neoformado das bordas e do centro do defeito criado cirurgicamente, bem como a quantidade de VB remanescente.

Para análise histomorfométrica utilizou-se o programa ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil), versão 2.4, calibrado em escala métrica (micrometros - μm). A imagem foi capturada através de um microscópio óptico com objetiva de aumento de 2,5x acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica 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). As imagens foram mensuradas através das funções “selecionar região” e “cálculo de regiões”. Delineou-se a área total em mm^2 (AT) a ser analisada, correspondente a 100% da área do defeito cirúrgico original. Em seguida, dentro da AT, foram delineadas a Área de Osso Neoformado (AON), bem como as áreas ocupadas pelos remanescentes do vidro bioativo (AVB) que foram calculadas como porcentagem (Furlaneto et al. 2007). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa Sigma Stat versão 3.0 de acordo com o Teste de Tukey e ANOVA e expressos na forma de gráficos e tabela.

**Figuras referentes à análise histométrica são ilustrados no Anexo C

3.2. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Para o processamento imunoistoquímico, utilizaram-se cortes incluídos em parafina dos mesmos animais que foram realizadas as colorações para análise histológica. Como anticorpos primários, foram utilizados o anticorpo para VEGF (VEGF, Rabbit polyclonal anti-vegf - Santa Cruz Biotechnology, SC7269), anticorpo para Cbfa1 (Goat polyclonal anti-PEBP2a - Santa Cruz Biotechnology, SC8566), anticorpo para BMP (Goat polyclonal anti-BMP – Santa Cruz Biotechnology, SC6895) e anticorpo para OC (OC, Goat polyclonal anti-oc – Santa Cruz Biotechnology, SC18319). O anticorpo secundário biotinilado foi anti-cabra (goat) produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). A Streptavidina Biotina foi utilizada como amplificador do sinal (Dako). O método de detecção foi por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (Dako) foi utilizada como cromógeno, seguida da contra-coloração com hematoxilina. Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), para avaliar a especificidade e efetividade das reações

Para realização da análise qualitativa da expressão das proteínas foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan 47 Microsystems (Leitz, Benshein, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica 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).

4 RESULTADOS *

4.1 ANÁLISE CLÍNICA

*T*odos os animais foram observados clinicamente durante todo o período experimental e as peças analisadas macroscopicamente, nas quais não foram constatadas a presença de inflamação, necrose ou outras lesões atingindo os tecidos moles e ósseos, permanecendo os animais saudáveis durante todo período experimental.

4.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

7 DIAS

GRUPO C (Controle) – Adjacente às bordas do defeito cirúrgico notaram-se em alguns casos, pequenas espículas ósseas neoformadas ao lado de tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos (Fig. 25A). Em outros, evidenciou-se nesta mesma região apenas a presença de tecido conjuntivo com as mesmas características acima. Em áreas mais distantes das bordas do defeito cirúrgico, observou-se também pequeno número de fibroblastos e raros macrófagos e linfócitos (Fig. 25B).

*Figuras ilustrativas dos resultados histológicos e imunoistoquímicos nos Anexos D, E e F.

GRUPO VB (Vidro bioativo) – Em todos os espécimes observou-se a presença de material de implante ocupando extensa área do defeito cirúrgico (Fig. 25C). Em alguns casos notaram-se entre o material, delgadas faixas ocupadas por tecido conjuntivo neoformado. Em outros evidenciou-se maior volume de tecido conjuntivo no espaço acima referido, apresentando moderado número de fibroblastos e alguns linfócitos. Junto às bordas do defeito cirúrgico evidenciou-se, na maioria dos casos discreta neoformação óssea ocupando pequeno espaço (Fig. 25D).

GRUPO POLI (Polímero) – Em todos os espécimes notou-se ausência de neoformação óssea ao nível das bordas do defeito cirúrgico. Em um dos casos, no entanto, evidenciou-se discreta neoformação óssea em área situada lateralmente à borda de tecido ósseo (Fig. 25E). O material de implante encontrou-se ausente em todos os espécimes e o tecido conjuntivo neoformado apresentou discreto número de fibroblastos ao lado de alguns macrófagos e linfócitos (Fig. 25F).

GRUPO POLIVB (polímero + vidro bioativo): Junto às bordas do defeito cirúrgico, com exceção de dois espécimes, notou-se ausência de neoformação óssea. Nas proximidades, observou-se a presença de tecido conjuntivo neoformado exibindo moderado número de fibroblastos e alguns macrófagos e linfócitos. O material de implante, geralmente encontrava-se em pequena quantidade em áreas afastadas das bordas do defeito cirúrgico (Fig. 25G). Em dois casos foram observados juntos às bordas do defeito, discreta neoformação óssea exibindo osteoblastos em número moderado (Fig. 25H).

ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

30 dias

GRUPO C (Controle): Na maioria dos espécimes observou-se neoformação óssea bastante pronunciada, no entanto recobrando parcialmente o defeito cirúrgico (Fig. 26A). O tecido conjuntivo sem diferenciação óssea apresentou discreto número de fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 26B). Alguns macrófagos e linfócitos foram observados nesta região.

GRUPO VB (Vidro bioativo) - Em todos os espécimes o material de implante ocupava extensas áreas do defeito cirúrgico que apresenta a espessura da parede óssea. O tecido conjuntivo entre o material exibiu moderado número de fibroblastos e mostrou-se bem vascularizado. Em um dos casos, notou-se nas proximidades da parede óssea maior quantidade de tecido conjuntivo adjacente ao material. Por outro lado, a neoformação óssea junto às bordas apresentou-se discreta em todos os espécimes (Fig. 26C).

GRUPO POLI (Polímero): Em alguns espécimes notaram-se nas proximidades das bordas do defeito cirúrgico, extensas áreas ocupadas pelo material (Fig. 26D). Recobrando o defeito cirúrgico evidenciou-se tecido conjuntivo exibindo feixes de fibras colágenas. Em outros, o material de implante encontrou-se ausente e o defeito cirúrgico encontrava-se recoberto por delgada faixa de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 26E). Ocasionalmente foram notados pequenos fragmentos do implante na área central do defeito. Em todos os casos, a

neoformação óssea restringiu-se a pequenas áreas junto às bordas do defeito cirúrgico (Fig. 26F).

GRUPO POLIVB (Polímero + Vidro bioativo): Em todos os espécimes observou-se adjacente à borda do defeito cirúrgico discreta neoformação óssea. Recobrando a superfície do defeito notou-se em todos os casos, delgada faixa de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 26G). Em um dos casos, evidenciou-se a presença de material na área central da ferida cirúrgica (Fig. 26H).

4.3 RESULTADOS HISTOMÉTRICOS E ESTATÍSTICOS

As médias e os desvios-padrão de AON de 7 e 30 dias estão apresentados na tabela e gráficos, assim como os resultados da comparação entre os grupos estudados. Na figura 3 observa-se a evolução da reabsorção das partículas de VB nos períodos experimentais estudados. Comparando-se a neoformação óssea (Tabela 1), aos 7 dias não houve diferenças estatisticamente significativas ($p=0,106$) (Figura 1), enquanto aos 30 dias observou-se melhores resultados no Grupo C e VB e que foram considerados estatisticamente significativos em relação aos demais ($p=0,002$) (Figura 2) Em relação à presença de remanescentes de partículas do material no grupo VB aos 7 e 30 dias os resultados não apresentaram significância estatística ($p=0,259$) (Figura 3)

Tabela 1: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 7 e 30 dias entre os grupos experimentais.

Grupo	n	Médias de AON (%) 7 dias*	Desvio-Padrão 7 dias	Médias de AON (%) 30 dias **	Desvio-Padrão 30 dias
C	10	12,10	± 5,16	32,5 a	± 6,51
VB	10	9,46	± 4,06	33,93 a	± 11,44
POLI	10	7,34	±4,71	14,9 b	±4,75
POLIVB	10	4,22	±2,27	18,01 b	±10,79

* estatisticamente não significativo ($p = 0,106$)

**Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,002$)

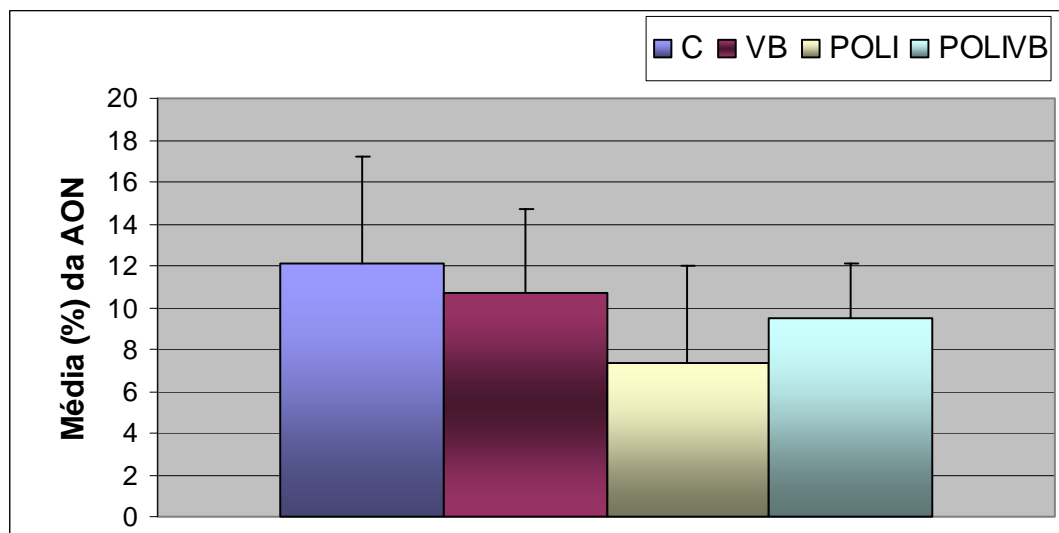


Fig. 1: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 7 dias entre os grupos.

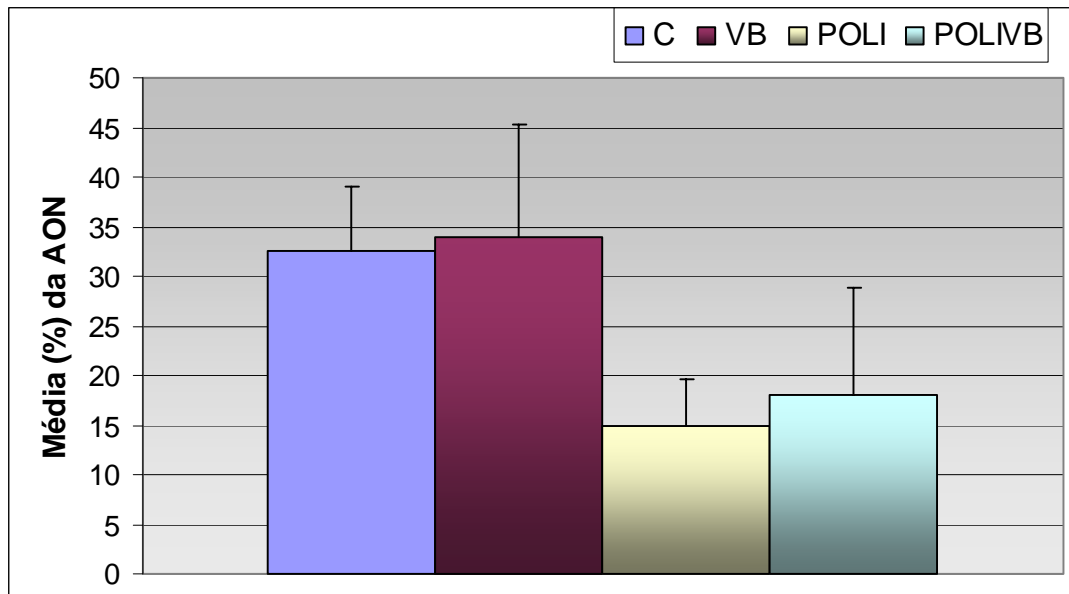


Fig. 2: Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) aos 30 dias entre os grupos.

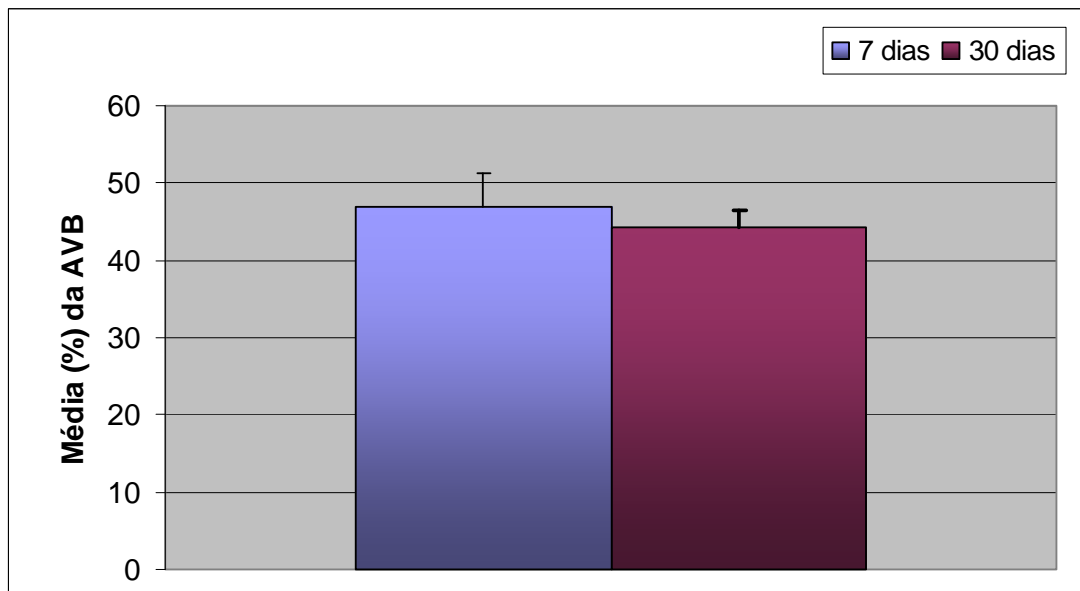


Fig. 3: Média (%) e desvios-padrão dos remanescentes de partículas de VB (AVB) aos 7 e 30 dias

4.4 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas VEGF, BMP2, Cbfa1 e OC, analisadas durante o processo de regeneração óssea de defeitos criados cirurgicamente em calota de ratos.

Observaram-se os seguintes resultados qualitativos:

7 dias

VEGF: Observaram-se marcações positivas em células endoteliais do tecido conjuntivo e nos espaços medulares, tanto nas bordas como no centro do defeito, não havendo diferença na expressão dessa proteína entre os grupos experimentais estudados.

Cbfa1: Observou-se no grupo C maior expressão dessa proteína no tecido conjuntivo subjacente em relação aos demais grupos estudados. No grupo VB foram notadas discretas marcações positivas nas bordas do defeito e ao redor das partículas do material. No grupo POLI observaram-se ausência de marcações e a presença de um tecido desorganizado disforme, com características biológicas alteradas. No grupo POLIVB notaram-se algumas imunomarcações positivas, dispersas no tecido conjuntivo e ao redor de pequenas áreas com características de tecido ósseo imaturo.

BMP2: No grupo C houve imunomarcações positivas discretas espalhadas pelo defeito. No grupo VB observou-se grande quantidade de marcações inespecíficas dispersas no interior e ao redor das partículas do material, com poucas marcações positivas. No grupo POLI as raras marcações permaneceram restritas às bordas do defeito. No grupo POLIVB visualizaram-se marcações positivas no defeito em áreas semelhantes a ilhotas de tecido ósseo neoformado dispersas no tecido conjuntivo. Em todos os grupos experimentais observou-se menor expressão da proteína BMP2 em relação a Cbfa1, uma vez que estudos na literatura relatam que as respostas desencadeadas pela BMP2 envolvem uma via intracelular que atua através da proteína Cbfa1 (Gersbach et al. 2004).

Osteocalcina (OC): Por esta proteína estar expressa em osteoblastos e osteócitos de osso pre-existente, localizados principalmente nas bordas do defeito, as imunomarcações positivas foram mais observadas no grupo C, seguido do POLIVB e do VB respectivamente, estando ausente no grupo POLI.

30 dias

Cbfa1: O Grupo C apresentou intensas marcações em toda a extensão do defeito, principalmente na matriz óssea. No grupo VB visualizaram-se poucas células positivas expressas em pré-osteoblastos e ausência de marcações no grupo POLI e POLIVB.

BMP2: No grupo C e POLIVB notaram-se marcações positivas, sendo estas mais expressivas no grupo C, em áreas da matriz óssea. No grupo VB

visualizaram-se marcações positivas principalmente ao redor das partículas do material. No grupo POLI notou-se uma melhor disposição do tecido conjuntivo na região do defeito, com discretas imunomarcações nas bordas do defeito.

Osteocalcina (OC): No grupo C notaram-se muitas imunomarcações positivas em células da linhagem osteoblástica, tanto na região do defeito cirúrgico, como nas bordas do remanescente ósseo. O grupo VB apresentou discretas marcações positivas no tecido ósseo pré-existente e ao redor das partículas de vidro bioativo. O grupo POLIVB apresentou raras imunomarcações positivas restritas ao centro de defeito, estando estas ausentes no grupo POLI.

Em relação aos grupos experimentais nos diferentes períodos analisados, o grupo C apresentou imunomarcações positivas mais expressivas para as proteínas Cbfa1, BMP2 e OC. Em relação aos demais grupos, o POLIVB apresentou-se mais expressivo, seguido pelo VB, uma vez que o Grupo POLI apresentou um tecido com características biológicas alteradas, e por isso considerado o pior resultado quanto a expressão das proteínas.

5 DISCUSSÃO

O grande desafio da engenharia tecidual é obter um material sintético reabsorvível, com propriedades mecânicas mais próximas do osso cortical e elasticidade suficiente para suportar a transferência das cargas e forças. Por isso, fatores como o método do preparo, composição e tamanho das partículas interferem nas características dos substitutos ósseos sintéticos (Koleganova et al. 2006; Jones et al. 2006).

Neste estudo avaliou-se a influência dos biomateriais em defeitos considerados de tamanho crítico. A pequena e desorganizada formação óssea do Grupo C, em ambos os períodos de análise, confirmaram a natureza crítica dos defeitos de 5 mm de diâmetro criados cirurgicamente em calvária de ratos (Bosch et al. 1998; Furlaneto et al. 2007; Meinel et al 2005). Este tipo de defeito é considerado ideal para avaliação de biomaterias, por não ocorrer a osteogênese espontânea durante toda a vida do animal, exceto seja implantado um material com capacidades osteocondutiva e ostointutivas que possibilite a formação de tecido ósseo, obliterando a área ostectomizada (Schimitz & Hollinger 1986).

Apesar de inúmeras técnicas e concentrações disponíveis para síntese do vidro bioativo (Chen et al., 2006), optou-se pelo da marca comercial Biogran (3i), por apresentar resultados clínicos satisfatórios e ser objeto de estudo de inúmeras pesquisas, testado isoladamente ou em associações (Melo et al. 2005; Furlaneto et al. 2007).

Quando em contato com fluidos tissulares, as partículas de VB desencadeiam uma série de reações químicas resultando na formação de camadas de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície das partículas. Proteínas orgânicas como sulfato de condroitina e glicosaminoglicanas incorporam-se à câmara de hidroxicarbonatoapatita (HCA). Osteoblastos e constituintes orgânicos são atraídos pelas câmaras formando-se um substrato com composição química semelhante ao tecido ósseo, mas com diferenças estruturais (Hench et al., 1971; Huygh et al. 2002).

Como no presente estudo, Vogel et al. (2001) observaram a diferenciação óssea após implante de VB, principalmente ao redor das partículas, de forma centrípeta (da periferia para o centro), significativamente mais expressiva no período final, confirmando a característica osteocondutiva do material (Moreira-Gonzalez et al. 2005; Melo et al. 2005) Contudo, o efeito osteoestimulatório descrito na literatura (Schepers et al. 1991; Schepers & Duckeyne 1997), não foi observado neste estudo nos períodos experimentais analisados.

Com relação ao tempo de reabsorção completa das partículas de VB, não há consenso na literatura, por isso são necessárias pesquisas a longo prazo, a fim de elucidar essa questão e aproveitar melhor as características de degradação, uma vez que a neoformação óssea ocorre concomitante ao processo de reabsorção do material, o qual fornece um arcabouço para a proliferação celular e síntese de matriz orgânica (Nishida et al. 2006; Melo et al. 2005; Furlaneto et al. 2007).

O copolímero de PLGA é considerado um material osteocondutor, biocompatível e reabsorvível (Imbronito et al. 2005; Rimondini, et al.2005), no entanto os resultados deste trabalho mostraram nos períodos analisados, uma quantidade mínima de formação óssea tanto no grupo POLI quanto no POLIVB.

O copolímero de PLGA, implantado em calvária de ratos, não apresentou reações indesejáveis intensas nos períodos analisados, diferente de estudos em subcutâneo que mostraram aos 7 dias, intensa reação inflamatória com ausência de células gigantes de corpo estranho (Fulzele et al. 2003). Sugere-se que esta reação possa ser benéfica por possibilitar a liberação de fatores de crescimento necessários à proliferação tecidual (Day et al. 2004b), visto que, apresentou-se ausente em períodos tardios, comprovando a biocompatibilidade do material (Shi et al. 2002).

Kang et al. (2005) ao testar a biocompatibilidade e a degradação do copolímero de PLGA, denominado comercialmente de InnoPol ® observaram que após 24 semanas o material havia sido completamente degradado, com a presença de células gigantes ao redor da matriz remanescente. Clinicamente o local de implante desse material apresentou reação inflamatória local, com a presença de eritema e formação de cicatriz durante o processo de cicatrização, causada pela diminuição do suprimento sanguíneo da derme e epiderme.

A análise imunoistoquímica possibilitou avaliar as reações celulares que ocorrem durante o processo de regeneração óssea (Owen et al 1990). O grupo C foi o que apresentou melhores resultados, associando-se a expressão das

proteínas Cbfa1, BMP2 e OC com os eventos observados na análise histomorfométrica.

A proteína Cbfa1 é considerada um fator de osteoindução e teve maior expressão aos 7 dias, possivelmente em células mesenquimais que podem diferenciar-se em osteoblastos e/ou condrócitos (Karsenty et al. 1999; Gersbach et al. 2004 Yamaguchi et al. 2000).

A BMP2 é um dos fatores que atua na diferenciação de osteoblastos e no processo de ossificação (Owen et. al 1990; Urist et al. 1983; Yamaguchi et al.2000), predominando aos 7 dias, no entanto, como a Cbfa1, pode apresentar-se expressa também nos estágios mais tardios da regeneração óssea, como marcadores de osteoblastos mais diferenciados (Meinel et al.2005). Estudos mostram que dentre o grupo das BMPs, a BMP2 apresentou maior expressão no osso humano de origem endocondral (Suttapreyasri et al. 2006).

A OC foi observada principalmente aos 30 dias, estágio em que finaliza a proliferação de osteoblastos e inicia a mineralização da matriz óssea (Owen et al. 1990; Wiltfang et al. 2004). Esta proteína é observada em regiões de implantes que possuem células viáveis com capacidade de acelerar tanto a ativação de osteoblastos quanto de osteoclastos nesse processo (Meinel et. al. 2005).

Ao contrário dos resultados deste trabalho, em que não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão de VEGF, estudos *in vitro*, mostraram um aumento significativo da secreção de VEGF em compostos de PGA associados ao VB, observando-se *in vivo* (subcutâneo) o aumento da

vascularização. Isto sugere que a presença do VB pode agir na revascularização dos tecidos ao redor das partículas, ao estimular a secreção de VEGF e fornecer nutrientes e oxigênio para o desenvolvimento dos tecidos neoformados (Day et al.2004a).

Estudos avaliando a bioatividade *in vitro* dos compostos formados à base de PLA e PGA associados ao VB observaram a formação de camadas de fosfato de cálcio (Ca-O) em sua superfície, sugerindo que a maior concentração de VB no polímero foi responsável pela neutralização dos ácidos liberados durante a degradação com a conseqüente alcalinização do meio, o que influenciou diretamente na adesão, crescimento, diferenciação e migração das células (Verrier et al.2004; Yao et al. 2005; Lu et al. 2003, 2005; Yang et al.2006).

Em poucos espécimes foi possível observar nos defeitos criados cirurgicamente, a permanência do copolímero de PLGA ou sua associação ao VB, isto provavelmente ocorreu porque a composição química do composto obtido favoreceu a rápida degradação por hidrólise, imediatamente após o contato com os fluidos tissulares.

A alta absorção de água pelos copolímeros de PLGA pode facilitar a hidrólise do material através da interação entre as moléculas de água e a matriz do polímero, levando a uma degradação mais rápida. Dessa forma, o VB pode agir como uma proteção à hidrólise, retardando o processo de decomposição (Verrier et al. 2004).

A proporção entre o PLA e PGA também pode influenciar na velocidade de degradação do copolímero de PLGA, pois devido ao PLG apresentar-se menos estável que o PLA, quanto maior a sua quantidade, mais rápida a degradação do biomaterial (Rezende & DueK 2003).

A adição do vidro bioativo melhorou as características do biomaterial de PLGA, no entanto, acredita-se que seja necessário aumentar a proporção de vidro bioativo adicionada a este copolímero, para que se atinja a proporção ideal de acordo a área receptora (tecidos moles ou ósseo), aproveitando ao máximo suas vantagens no processo de regeneração e impedindo que concentrações muito altas do VB aumentem a porosidade do composto formado (Yang et al. 2006; Day et al. 2004a).

Apesar do PLGA ser indicado clinicamente como biomaterial na engenharia tecidual, características como a baixa resistência mecânica, porosidade e propriedades hidrofóbicas da superfície podem limitar seu uso, no entanto, o tratamento da superfície com materiais naturais ou associação a outros materiais pode facilitar a capacidade de adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos (Wu et al. 2006).

É necessário que mais pesquisas sejam realizadas testando as características dos novos materiais, tanto *in vitro* como *in vivo*, analisando as respostas teciduais que possibilitem ou não sua indicação clínica.

6 CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada, conclui-se que:

1) A técnica imunoistoquímica, através da expressão das proteínas, apresentou resultados satisfatórios para avaliação das respostas celulares no processo de regeneração óssea em defeitos críticos de calvária de ratos;

2) O vidro bioativo, o copolímero de PLGA e associação do copolímero de PLGA ao vidro bioativo, apresentaram-se biocompatíveis, no entanto somente o vidro bioativo atuou como material osteocondutor.

3) O grupo C e VB apresentaram neoformação óssea mais pronunciada, no entanto, grande quantidade de partículas do VB permaneceu no defeito nos períodos analisados.

4) O grupo C apresentou imunomarcações positivas mais expressivas durante o processo de regeneração óssea de defeitos em calvária nos períodos analisados.

REFERÊNCIAS *

- Boccaccini, A.R., Notingher, I., Maquet, V. & Jerome, R.(2003) Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass particles for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 14: 443-450.
- Bosch, C., Melsen, B. & Vargervik, K.(1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. *Journal of Craniofacial Surgery* 9: 310-316.
- Carvalho, P.S.P., Bassi, A.P.F. & Pereira, L.A.V.D.(2004) Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 1: 255-260.
- Chen, Q.Z., Thompson, I.D. & Boccaccini, A.R.(2006) 45S5 Bioglass – derivated glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 2414-2425.
- Crump, T. B., Riviera-Hidalgo, F., Harrison, J. W., Willians, F. E. & Guo, I.V.(1996) Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 82: 365-374.

*Segundo as normas do periódico “*Clinical Oral Implants Research*” (Anexo G)

-
- Day, R.M., Boccaccini, A.R., Shurey, S., Roether, J.A., Forbes, A., Hench, L.L. & Gabe, S.M.(2004)^a Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 25: 5857-5866
 - Day, R.M.; Boccaccini, A.R., Maquet, V., Shurey, S., Forbes, A., Gabe, S.M. & Jerome, R.(2004)^b In vivo characterization of a novel bioresorbable poly (lactide – co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 15: 729-734.
 - El-Amin, S. F., Lu, H. H., Khan, Y., Burems, 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.
 - Enislidis, G., Lagogiannis, G., Wittwer, G., Glaser, C. & Ewers, R.(2005) Fixation of zygomatic fractures with biodegradable copolymer osteosynthesis system: short and long-term results. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 34: 19-26.
 - Ferreti, 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.
 -

-
- Fialho, S.L., Rego, M.G.B., Cardillo, J.A., Siqueira, R.C., Jorge, R. & Cunha Junior, A.S.(2003) Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 66: 891-896.
 - Fulzele, S.V., Satturwar, P.M. & Dorle, A.K.(2003) Study of the biodegradation and in vivo biocompatibility of novel biomaterials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20: 53-61.
 - Furlaneto F.A., Nagata M.J.H., Fucini S.E., Deliberador T.M., Okamoto, T. & Messoria, M.R.(2007) Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clinical Oral Implants Research* 18: 311-318.
 - Gersbach, C.A., Byers, B., Pavlath, G.K. & García, A.J. (2004) Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Experimental Cell Research* 300: 406-417.
 - Hämmerle, C. H. F. & 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.
 - Hench L.L., Splinter R.J., Wallen W.C. & Greenle T.K. (1971) Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research, Part 1* 2: 117-141.
 -

-
- Huygh, A., Schepers, E.J.G., Barbier, L. & Ducheyne, P. (2002) Microchemical transformation of bioactive glass particles of narrow size range, a 0-24 months study. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 13: 315-320.
 - Imbronito, A.V., Scarano, A., Orsini, G., Piattelli, A. & Arana-Chaves, V.E. (2005) Ultrastructure of bone healing in defects grafted with a copolymer of polylactic/polyglycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 74: 215-221.
 - Jones J.R., Ehrenfried L.M. & Hench L.L. (2006) Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 964-973.
 - Kang, B.C., Kang, K.S. & Lee, Y.S. (2005) Biocompatibility and long-term toxicity of Inno Pol[®] implant, a biodegradable polymer scaffold. *Experimental Animals* 54: 37-52.
 - Karsenty, G., Ducky, P., Starbuck, M., Primiel, M., Shen, J., Geoffroy, V. & Amling, M. (1999) Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* 25: 107-108.
 - Kiely, K.D., Wendfeldt, K.S., Johnson, B.E., Haskell, B.S. & Edwards, R.C. (2006) One-year postoperative stability of LeFort I osteotomies with biodegradable fixation: a retrospective analysis of skeletal relapse. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 130: 310-316.

- Koleganova, V.A., Bernier, S.M., Dixon, S.J. & Rizkalla, A.S. (2006) Bioactive glass/polymer composite materials with mechanical properties matching those of cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 77: 572-579.
- Lang, N.P., Becker, W. & Karring, T. Formação do osso alveolar. In: Lindhe, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*, 3rd ed., P.665-689. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.
- Leach J.K., Kaigler, D., Wang, Z., Krebsbach, P.H. & Mooney, D.J.(2006) Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 27: 3249-3255.
- 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.
- 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. Part A* 64: 465-474.
- Lu, H.H., Tang, A., Oh, S.C., Spalazzi, J.P. & Dionisio, K.(2005) Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 26: 6323-6334.

- Meinel, L., Fajardo, R., Hofmann, S., Langer, R., Chen, J., Snyder, B., Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D.(2005) Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 37: 688-698.
- Melo, L.G.N., Nagata, M.J.H., Bosco, A.F., Ribeiro, L.L.G. & Leite, C.M. (2005) Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clinical Oral Implants Research* 16: 683-691.
- Moreira-Gonzalez, A., Loboeki, C., Barakat, K., Andrus, L., Bradfort, M., Gilsdorf, M. & Jackson, I.T.(2005) Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *The Journal of Craniofacial Surgery* 16: 63-70.
- Nishida, T., Yamada, Y., Murai, M., Shimizu, Y., Oshikawa, M., Ito, K. (2006) Effects of bioactive glass on bone augmentation within a titanium cap in rabbit parietal bone. *Journal of Periodontology* 77: 983 – 989.
- Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilmin, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B. & Stein, G.S. (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* 143: 420-430.

-
- Peltoniemi, H., Ashammakhi, N., Kontio, R., Waris, T., Salo, A., Lindqvist, C., Gratz, K. & Suuronen, R.(2002) The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 94: 5-14.
 - Rezende, C.A. & Duek, E.A.R. (2003) Blendas de poli (ácido lático – co-ácido glicólico) poli (ácido lático): degradação in vitro. *Polímeros* 13: 36-44.
 - 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.
 - 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.
 - Schepers, E.J., de Clercq, M., Ducheyne, P. & Kempe Neers, R.(1991) Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *Journal of Oral Rehabilitation* 18: 439-452.
 - Schepers, E.J. & Ducheyne, P.(1997) Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment

-
- with several materials and particle sizes and size ranges. *Journal of Oral Rehabilitation* 24: 171-181.
- Schmitz, J.P. & Hollinger, J.O.(1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunion. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 205: 299-308.
 - Shi, G., Cai, Q., Wang, C., Lu, N., Wang, S. & Bei, J.(2002) Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly (L-lactic acid) and poly (L-lactic-co-glycolic acid) *Polymers for Advanced Technologic*s 13: 227-232.
 - Suttapreyasri, S., Koontongkaew, A., Phongdara, A. & Leggat, U.(2006) Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 35: 444-452.
 - 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.
 - Ueki, K., Takazakura, D., Marukawa, K., Shimada, M., Nakagawa, K., Takatsuka, S. & Yamamoto, E.(2003) The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein – 2 following condylectomy in rabbits. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 31: 107-114.

-
- Urist, M.R., DeLange, R.J. & Finerman, G.A.(1983) Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-690.
 - Verrier, S., Blaker, J.J., Maquet, V., Hench, L.L. & Boccaccini, A.R.(2004) PDLLA/Bioglass composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials* 25: 3013-3021.
 - Vogel, M., Voigt, C., Gross, U.M. & Muller-Mai, C.M.(2001) In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 22: 357-362.
 - Wheeler, D.L., Stokes, K.E., Park, H.M. & Hollinger, J.O. (1997) Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. *Journal of Biomedical Materials Research* 35: 249-254.
 - Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R. & Schlegel, K.A.(2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clinical Oral Implants Research* 15: 187-193.
 - Wu, Y.C., Shaw, S.Y., Lin, H.R., Lee, T.M. & Yang, C.Y.(2006) Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials* 27: 896-904.
 - Yamaguchi, A., Komori, T. & Suda, T.(2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa1. *Endocrine Reviews* 21: 393-41.

- Yang, X.B., Webb, D., Blaker, J., Boccaccini, A.R., Maquet, V., Cooper, C. & Oreffo, R.O.C.(2006). Evaluation of human bone marrow stromal cell growth on biodegradable polymer/Bioglass composites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 1098-1107.
- Yao, J., Radin, S., Leboy, P.S. & Ducheyne, P.(2005) The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/ bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials* 26: 1935-1943.

Anexo A – Autorização da Comissão 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 POLITÁTICO E POLIGLICÓLICO ASSOCIADO AO VIDRO BIOATIVO NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM RATOS" sob responsabilidade do Prof. Dr. EDUARDO HOCHULI VIEIRA e colaboração de Dra. ROBERTA OKAMOTO e FLÁVIA PRISCILA PEREIRA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 10 de setembro de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007- 005223.

Araçatuba, 28 de setembro de 2007.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FÓA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1160 CEP 13015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3200



Fig. 1- Ratos machos, com peso corporal aproximado de 250 gramas.



Fig. 2- Ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) acondicionados em gaiolas no Biotério e Centro Cirúrgico "Ilídio Teodoro" - UNESP.



Fig. 3- Cloridrato de Xilazina e Ketamina.



Fig. 4 - Anti-sepsia com PVPI.



Fig. 5. Incisão sagital mucoperiosteal com lâmina nº 15.



Fig. 6 - Confeção dos defeitos cirúrgicos com auxílio de broca trefina.



Fig. 7 – Região anatômica da calota craniana.



Fig. 8 - Esquema da obtenção dos defeitos cirúrgicos de 5 mm de diâmetro.

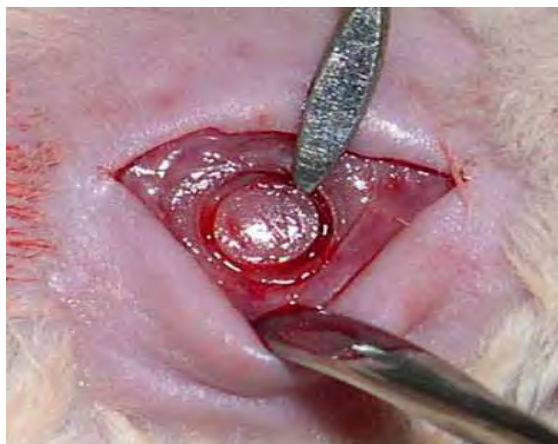


Fig. 9 – Osteotomia para obtenção dos defeitos cirúrgicos.



Fig. 10 – Obtenção de dois defeitos cirúrgicos de tamanho crítico na calota.



Fig. 11 – Material de implante utilizado: vidro Bioativo (Biogran) ®.



Fig. 12 – Preparo do vidro bioativo através da mistura com soro fisiológico.



Fig. 13 – Copolímero de PLGA.



Fig. 14 – Copolímero de PLGA associado ao VB.



Fig. 15– Copolímero reduzido ao tamanho dos defeitos cirúrgicos .



Fig. 16 - Preenchimento dos defeitos com material de implante (vidro bioativo).



Fig. 17 – Sutura.



Fig. 18 – Antibiótico utilizado.

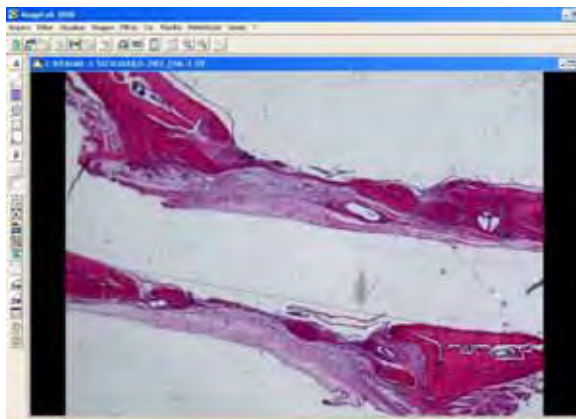


Fig. 19 – Delimitação da Área Total (AT).

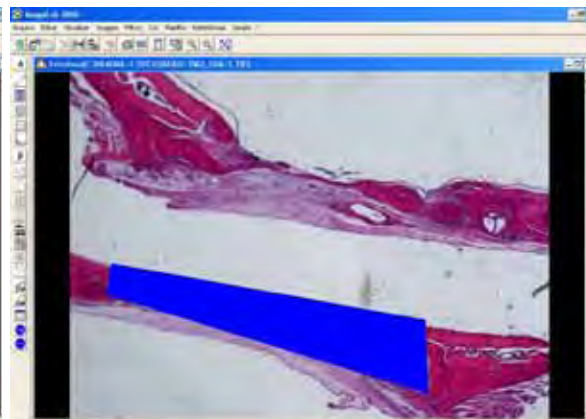


Fig. 20– Seleção da Área Total (AT).

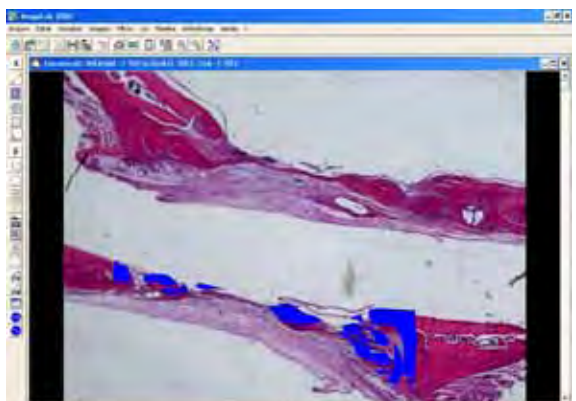


Fig. 21 – Seleção da Área de Osso Neoformado (AON).

A. Estatística (Área: 1.330786000 - 140.307718.171)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	Amostras	Estatística descritiva									
3	4	Largura - Área									
4	5	1037	1934								
5	6	Sub-amostra em relação a área total da amostra									
6	7	Estatística									
7	8	Quantidade	f	f%	f ²	f ³	f ⁴	f ⁵	f ⁶	f ⁷	f ⁸
8	9	1	1	0,000000	1	1	1	1	1	1	1
9	10	2	2	0,000000	4	8	16	32	64	128	256
10	11	3	3	0,000000	9	27	81	243	729	2187	6561
11	12	4	4	0,000000	16	64	256	1024	4096	16384	65536
12	13	5	5	0,000000	25	125	625	3125	15625	78125	390625
13	14	6	6	0,000000	36	216	1296	7776	46656	279936	1679616
14	15	7	7	0,000000	49	343	2401	16807	117649	823543	5801347
15	16	8	8	0,000000	64	512	4096	32768	262144	2097152	16777216
16	17	9	9	0,000000	81	729	6561	59049	531441	4782969	43046721
17	18	10	10	0,000000	100	1000	10000	100000	1000000	10000000	100000000
18	19	11	11	0,000000	121	1331	17715	241671	2675451	29512611	325186131
19	20	12	12	0,000000	144	1728	26208	373248	5198400	70599360	924291840
20	21	13	13	0,000000	169	2851	47149	759517	11054721	157828181	2213814641
21	22	14	14	0,000000	196	2744	48168	774496	12167104	180340096	2684353600
22	23	15	15	0,000000	225	3375	50625	759375	11390625	170859375	2562890625
23	24	16	16	0,000000	256	4096	65536	1048576	16777216	268435360	4194304000
24	25	17	17	0,000000	289	4913	83521	1312241	21842097	371215653	6292120009
25	26	18	18	0,000000	324	5832	95184	1530816	25418880	417538560	6944352000
26	27	19	19	0,000000	361	6859	114249	1819121	30069481	501300053	8125512009
27	28	20	20	0,000000	400	8000	136000	2160000	35340000	566400000	8840000000
28	29	21	21	0,000000	441	9261	141681	2213121	36006921	583214453	8956512009
29	30	22	22	0,000000	484	10648	161056	2421744	39541344	631704000	9724800000
30	31	23	23	0,000000	529	12167	183649	2750041	44126701	709966453	10924800009
31	32	24	24	0,000000	576	13824	212176	3208320	51200000	806400000	12297600000
32	33	25	25	0,000000	625	15625	246063	3703563	56314063	844710625	12670560009
33	34	26	26	0,000000	676	17584	285456	4286816	64532016	967984000	14568960000
34	35	27	27	0,000000	729	19701	337521	5080881	76202801	1131040053	16777216009
35	36	28	28	0,000000	784	21952	403264	6091328	90298400	1348176000	20000000000
36	37	29	29	0,000000	841	24441	481659	7284041	108116041	1609632053	23716800009
37	38	30	30	0,000000	900	27000	576000	8640000	129600000	1944000000	28800000000
38	39	31	31	0,000000	961	29761	688121	1032121	15481801	232704053	3496800009
39	40	32	32	0,000000	1024	32768	812672	1230080	18054400	270832000	40960000000
40	41	33	33	0,000000	1089	35949	960361	1429121	21432081	321600053	4851360009
41	42	34	34	0,000000	1156	39304	1136016	1690496	25212800	378240000	56736000000
42	43	35	35	0,000000	1225	42825	1338063	2011625	30174025	452580053	6812250009
43	44	36	36	0,000000	1296	46536	1564032	2332800	34976000	519648000	78129600000
44	45	37	37	0,000000	1369	50449	1812081	2696801	40464081	600960053	8967360009
45	46	38	38	0,000000	1444	54572	208896	3113600	46704000	690480000	103680000000
46	47	39	39	0,000000	1521	58911	239769	359681	53952081	808176053	12168000009
47	48	40	40	0,000000	1600	63400	280000	4200000	63000000	936000000	140800000000
48	49	41	41	0,000000	1681	68061	327681	491321	73704081	1105440053	16689600009
49	50	42	42	0,000000	1764	72884	384016	562560	84480000	1267200000	190080000000
50	51	43	43	0,000000	1849	77881	443281	645681	96960081	1440960053	21489600009
51	52	44	44	0,000000	1936	83056	506016	742400	111168000	1641600000	242880000000
52	53	45	45	0,000000	2025	88485	57225	854400	128160000	1908000000	284400000000
53	54	46	46	0,000000	2116	94164	642416	964800	144000000	2160000000	330240000000
54	55	47	47	0,000000	2209	100081	715841	1085681	161040081	2390400053	35976000009
55	56	48	48	0,000000	2304	106224	793664	1216320	180000000	2700000000	403200000000
56	57	49	49	0,000000	2401	112609	876081	1356801	201600081	3024000053	44976000009
57	58	50	50	0,000000	2500	119200	963000	1506000	225000000	3375000000	500000000000
58	59	51	51	0,000000	2601	126009	105401	1656001	246000081	3654000053	54936000009
59	60	52	52	0,000000	2704	133024	1150464	1816320	270000000	4032000000	600000000000
60	61	53	53	0,000000	2809	140253	1251841	1982881	295200081	4344000053	65376000009
61	62	54	54	0,000000	2916	147744	1358496	2155200	321000000	4695000000	711360000000
62	63	55	55	0,000000	3025	155485	1470025	2333601	348000081	5088000053	76320000009
63	64	56	56	0,000000	3136	163488	1586624	2517120	376200000	5512000000	819360000000
64	65	57	57	0,000000	3249	171753	1708321	2715841	405600081	5976000053	87984000009
65	66	58	58	0,000000	3364	180284	1835376	2928000	436200000	6480000000	944160000000
66	67	59	59	0,000000	3481	189081	1967641	3152321	468000081	6924000053	101256000009
67	68	60	60	0,000000	3600	198120	2106000	3390000	502400000	7416000000	1084800000000
68	69	61	61	0,000000	3721	207409	2252481	3641601	538400081	7944000053	116136000009
69	70	62	62	0,000000	3844	216944	2402816	3906240	576000000	8556000000	1242240000000
70	71	63	63	0,000000	3969	226725	2556961	4184321	615600081	9240000053	132696000009
71	72	64	64	0,000000	4096	236736	2714400	4475840	657600000	9900000000	1415760000000
72	73	65	65	0,000000	4225	246969	2874825	4780001	702000081	10632000053	150864000009
73	74	66	66	0,000000	4356	257424	3037656	5097600	748800000	11344800000	1605360000000
74	75	67	67	0,000000	4489	268101	3203321	5428801	798000081	12141600053	170640000009
75	76	68	68	0,000000	4624	278992	3372064	5783040	849600000	12924000000	1811040000000
76	77	69	69	0,000000	4761	290109	3544281	6151321	903600081	13794400053	191944000009
77	78	70	70	0,000000	4900	301440	3719200	6544000	960000000	14748000000	2031840000000
78	79	71	71	0,000000	5041	313081	3907241	6951321	1018800081	15787200053	214848000009
79	80	72	72	0,000000	5184	324936	4108320	7373600	1080000000	16904000000	2269440000000
80	81	73	73	0,000000	5329	337009	4322881	7817121	1143600081	18108000053	239424000009
81	82	74	74	0,000000	5476	349304	4550400	8291840	1210800000	19392000000	2523120000000
82	83	75	75	0,000000	5625	361825	4791375	8787841	1282400081	20760000053	265664000009
83	84	76	76	0,000000	5776	374568	5045280	9305280	1357600000	22214400000	2805360000000
84	85	77	77	0,000000	5929	387533	5312641	9845321	1436400081	23748000053	295944000009
85	86	78	78	0,000000	6084	400720	5593760	10418080	1518840000	25364000000	3118320000000
86	87	79	79	0,000000	6241	414133	5888001	11014721	1604960081	26964000053	328224000009
87	88	80	80	0,000000	6400	427760	6195840	11635200	1694640000	28648000000	34516

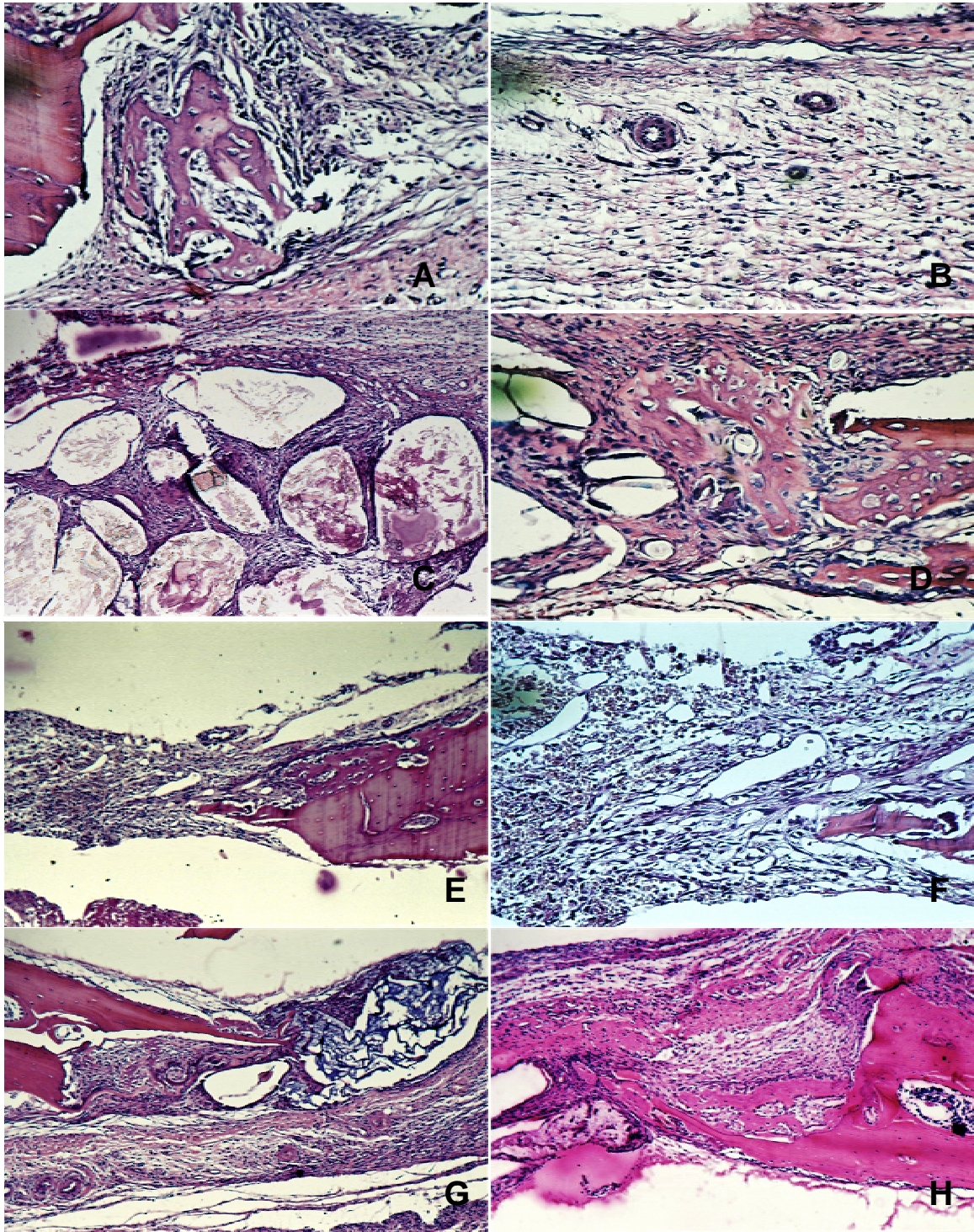


Figura 25: Resultados histológicos no período de 7 dias. **(A)** Grupo C: Pequenas espículas ósseas neoformadas e tecido conjuntivo com discretos fibroblastos e linfócitos próximos à borda do defeito (H.E.; original de 160 X); **(B)** Grupo C: Fibroblastos e raros macrófagos e linfócitos, distantes das bordas do defeito (H.E.; original de 63 X); **(C)** Grupo VB: Tecido conjuntivo entre as partículas do material (H.E.; original de 63X); **(D)** Grupo VB: Discreta neoformação óssea (H.E.; original de 160X) **(E)** Grupo POLI: Discreta área de neoformação óssea (H.E.; original de 63X); **(F)** Grupo POLI: Tecido conjuntivo com discretos fibroblastos, macrófagos e linfócitos (H.E.; original de 160 X); **(G e H)** Grupo POLIVB: Material de implante remanescente e discreta neoformação óssea (H.E., original de 63X).

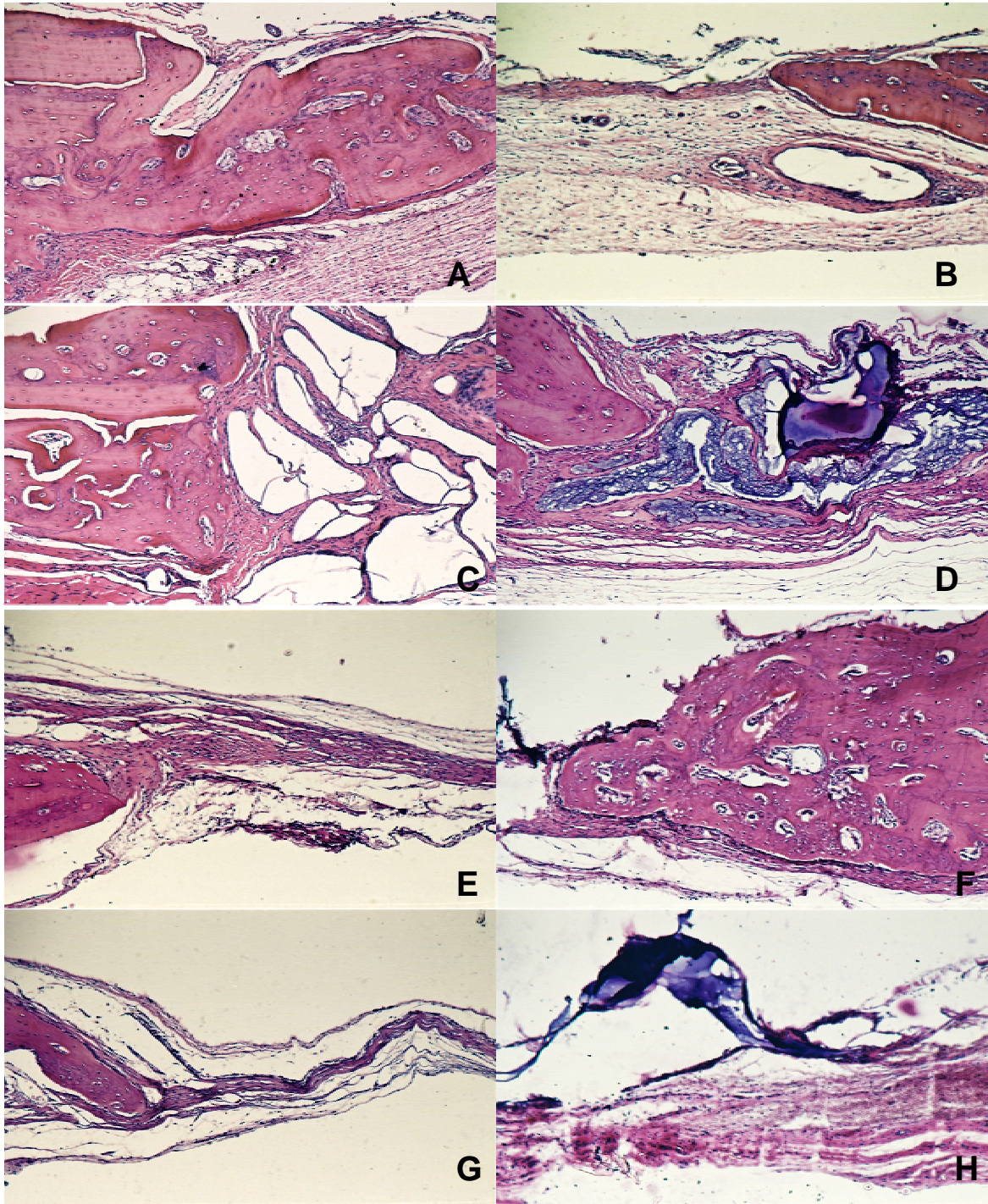


Figura 26: Resultados histológicos no período de 30 dias. **(A)** Grupo C: Neoformação óssea pronunciada recobrimdo parcialmente o defeito; **(B)** Grupo C: Tecido conjuntivo sem diferenciação óssea com fibroblastos e vasos sanguíneos; **(C)** Grupo VB: Remanescentes de partículas do material e neoformação óssea discreta junto às bordas; **(D)** Grupo POLI: Extensas áreas ocupadas pelo material (PLGA); **(E)** Grupo POLI: Defeito cirúrgico com ausência de neoformação óssea e recoberto por tecido conjuntivo fibroso; **(F)** Grupo POLI: Discreta neoformação óssea próximo às bordas do defeito; **(G)** Grupo POLIVB : Delgada faixa de tecido conjuntivo fibroso; **(H)** Grupo POLIVB: Remanescente do copolímero associado ao vidro bioativo no centro do defeito (H.E., original de 63X) .

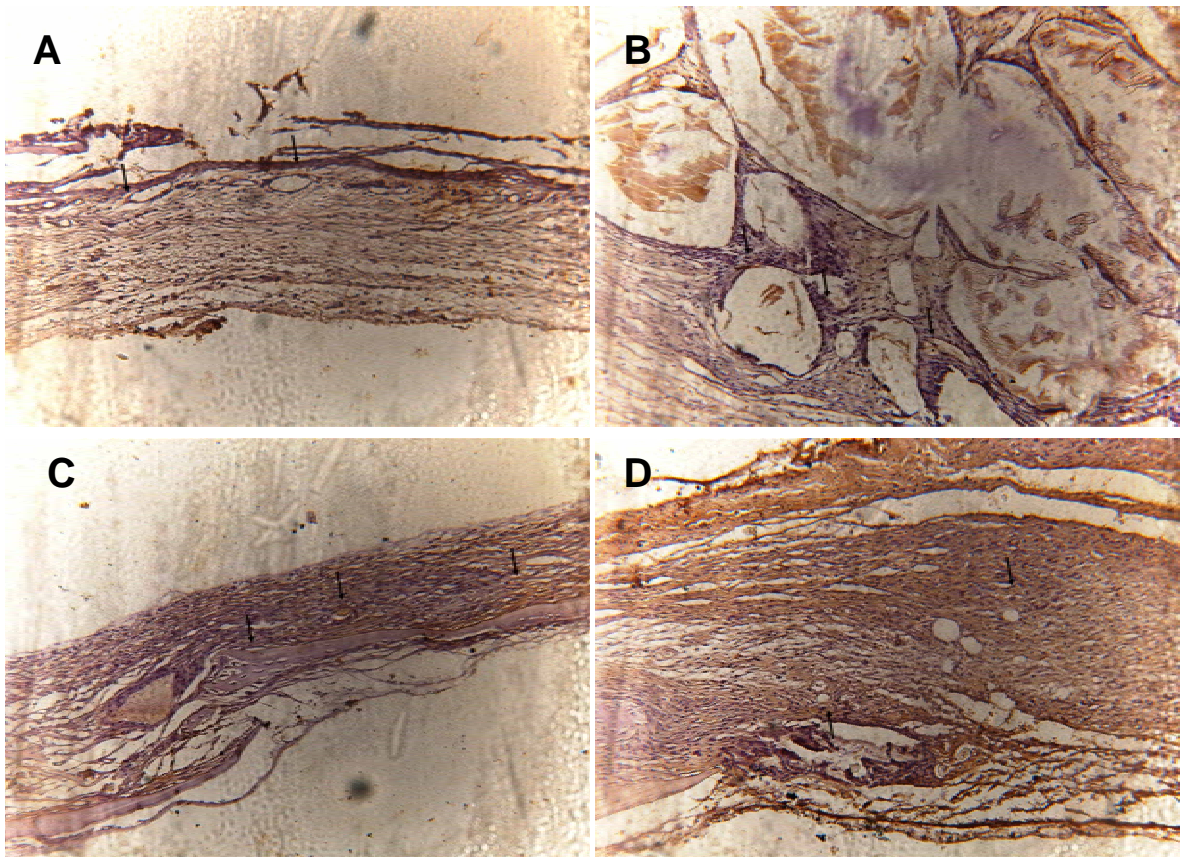


Figura 27: Imunomarcações positivas para VEGF em células endoteliais distribuídas no centro do defeito cirúrgico. Período de 7 dias. **(A)** Grupo C; **(B)** Grupo VB; **(C)** Grupo POLI; **(D)** Grupo POLIVB (DAB, original de 160 X).

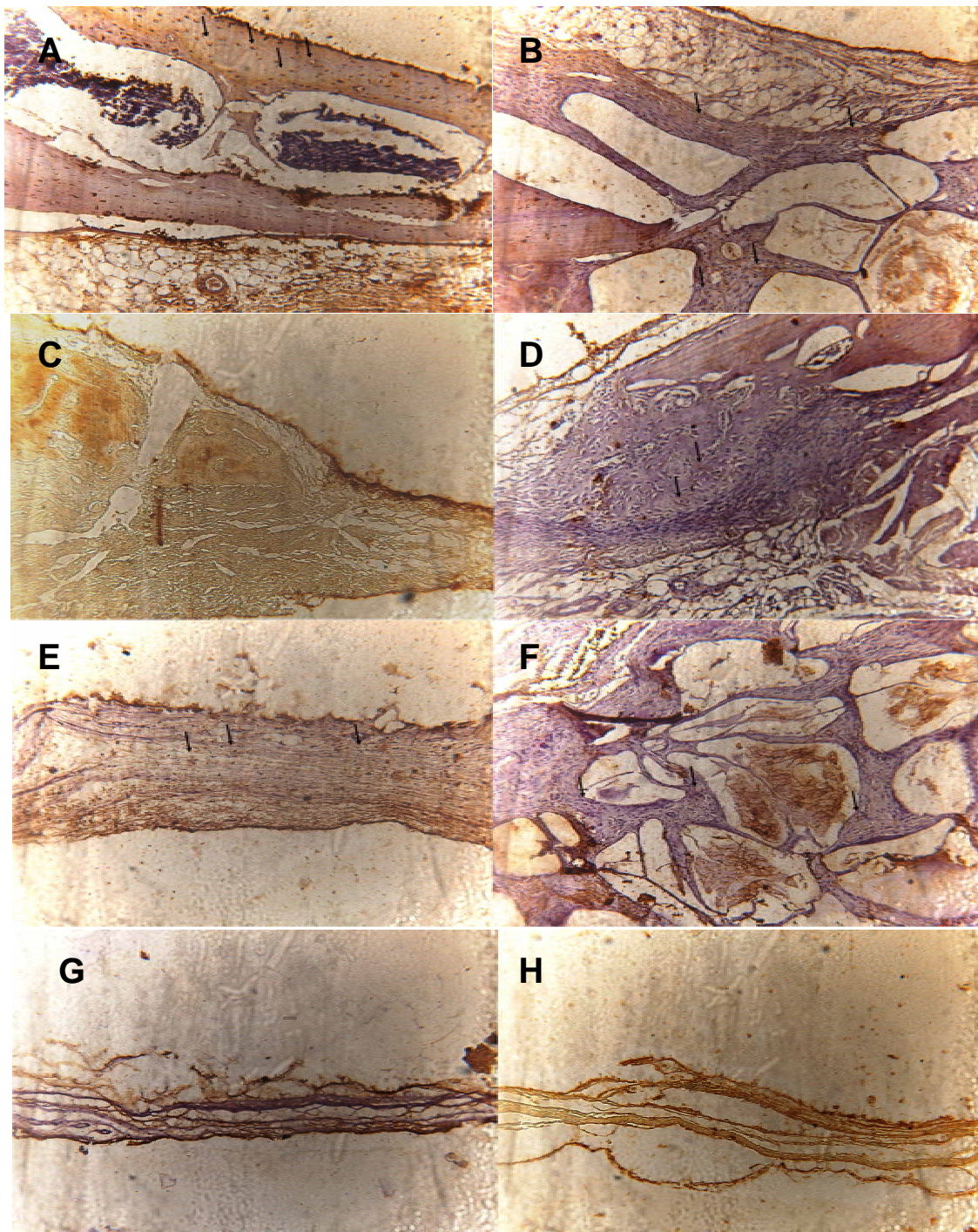


Figura 28: Imunomarcações positivas para Cbfa1 aos 7 e 30 dias **(A)** Grupo C - 7 d: Marcações positivas dispersas na matriz óssea **(B)** Grupo VB - 7 d: Marcações positivas dispersas ao redor das partículas do material; **(C)** Grupo POLI - 7d: Ausência de marcações positivas e presença de um tecido desorganizado; **(D)** Grupo POLIVB - 7 d: Imunomarcações dispersas no tecido conjuntivo; **(E)** Grupo C - 30 d: Marcações dispersas pelo defeito; **(F)** Grupo VB - 30 d: Marcações expressas em pré-osteoblastos; **(G)** Grupo POLI - 30 d: Ausência de marcações; **(H)** Grupo POLIVB - 30 d: Ausência de marcações (DAB, original de 160 X).

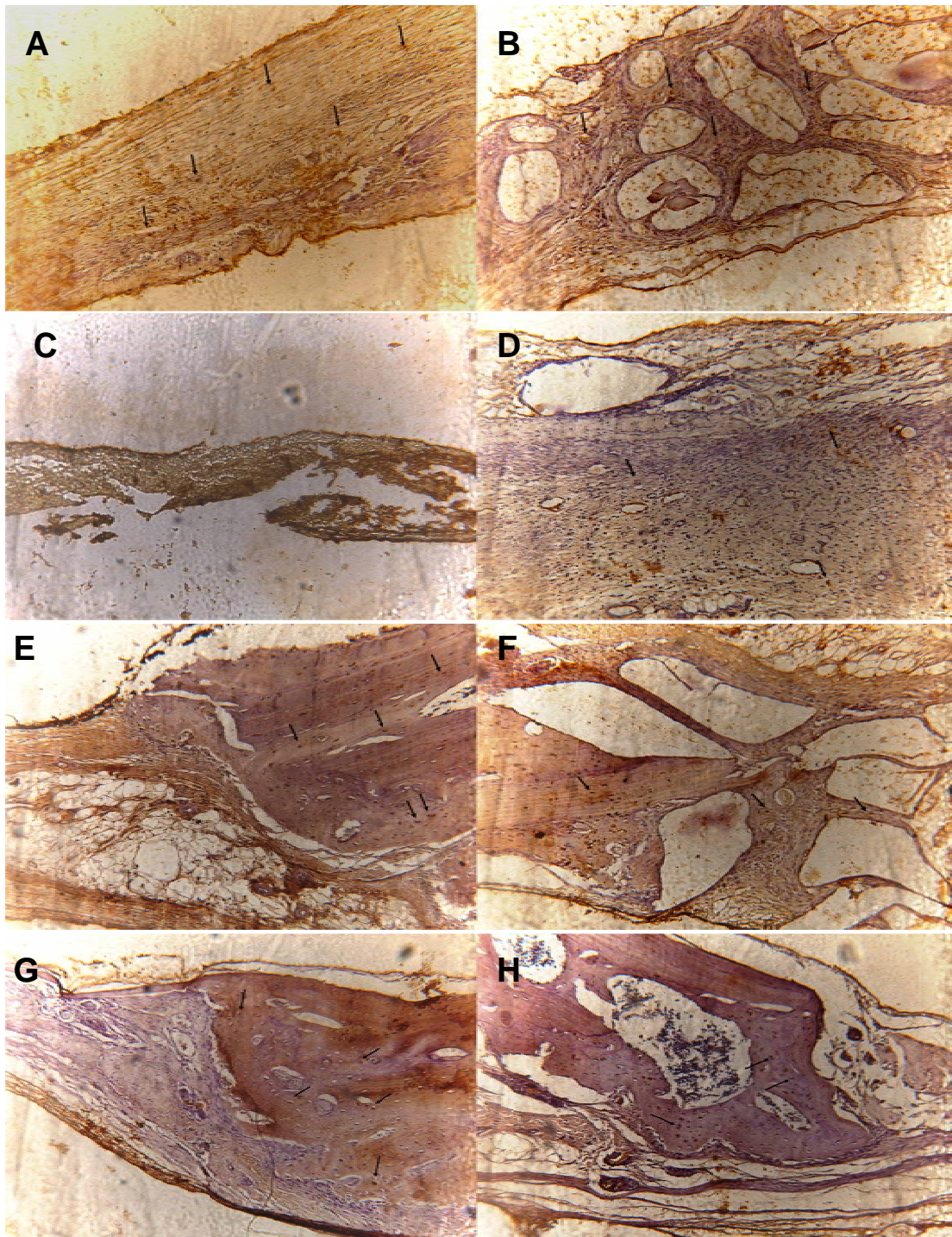


Figura 29: Imunomarcações positivas para BMP2 aos 7 e 30 dias **(A)** Grupo C - 7 d: Marcações positivas dispersas no centro do defeito; **(B)** Grupo VB - 7 d: Marcações positivas dispersas ao redor das partículas do material, com grande quantidade de marcações inespecíficas; **(C)** Grupo POLI - 7 d: Ausência de marcações no centro do defeito; **(D)** Grupo POLIVB - 7 d: Imunomarcações em áreas semelhantes a ilhotas dispersas no tecido conjuntivo; **(E)** Grupo C - 30 d: Marcações dispersas em áreas de matriz óssea; **(F)** Grupo VB - 30 d: Marcações ao redor das partículas do material; **(G)** Grupo POLI - 30 d: Tecido do centro do defeito apresenta disposição mais organizada e marcações expressas nas bordas do defeito; **(H)** Grupo POLIVB - 30 d: Marcações expressas nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).

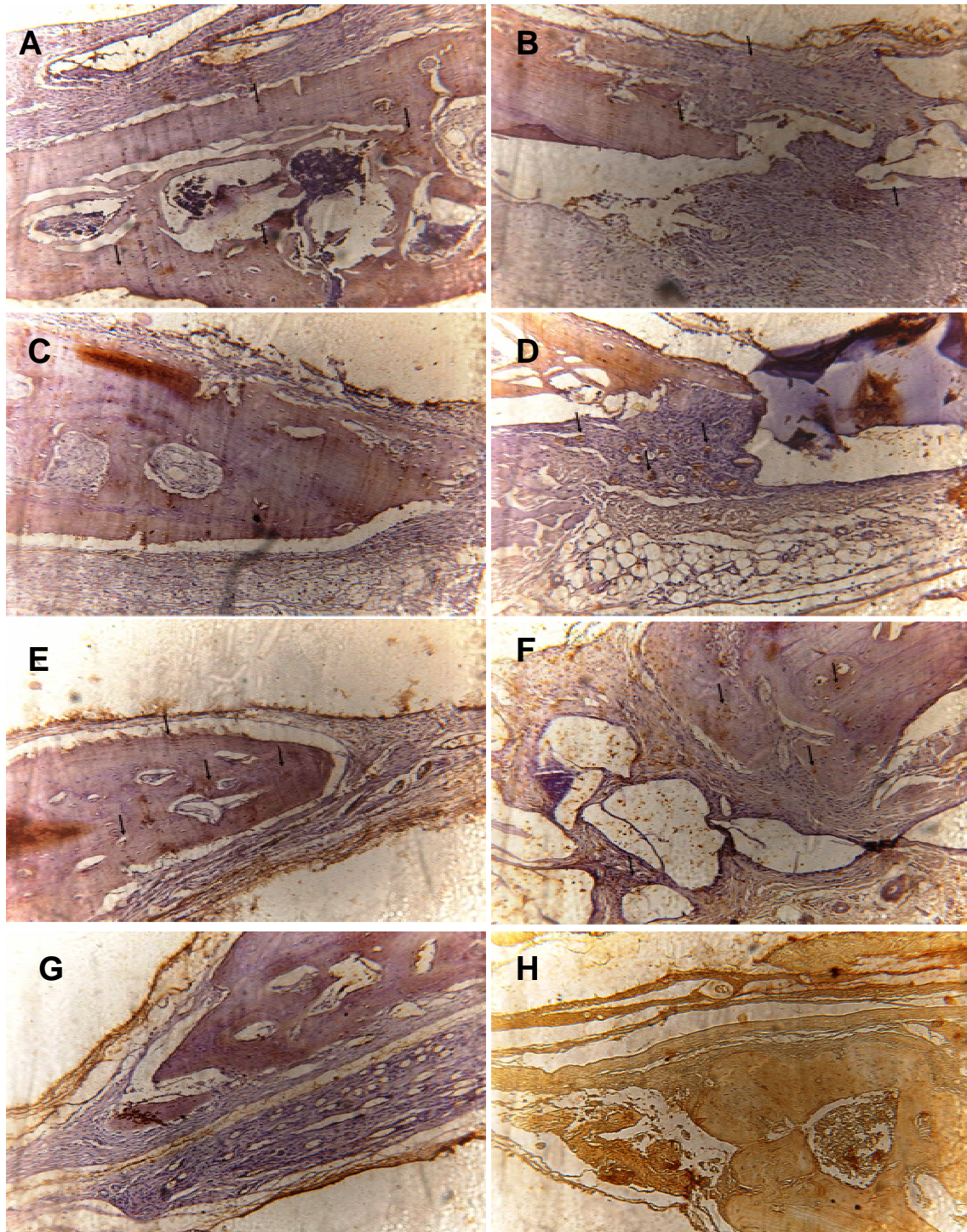


Figura 30: Imunomarcações positivas para OC aos 7 e 30 dias **(A)** Grupo C - 7 d: Marcações positivas expressas em osteoblastos e osteócitos nas bordas do defeito; **(B)** Grupo VB - 7 d: Marcações positivas expressas em pré-osteoblastos nas bordas do defeito; **(C)** Grupo POLI - 7 d: Ausência de marcações; **(D)** Grupo POLIVB - 7 d: Marcações dispersas nas bordas do defeito; **(E)** Grupo C - 30 d: Marcações positivas em células da linhagem osteoblástica; **(F)** Grupo VB - 30 d: Marcações ao redor das partículas do material e no osso pré-existente nas bordas do defeito; **(G)** Grupo POLI - 30 d: Ausência de marcações positivas; **(H)** Grupo POLIVB - 30 d: Ausência de marcações nas bordas do defeito (DAB, original de 160 X).

Tabela 2: Escore dos resultados qualitativos da análise imunoistoquímica para os grupos estudados, aos 7 e 30 dias pós-operatório.

PROTEÍNA	GRUPO	7 DIAS	30 DIAS
VEGF	C	++++	--
	VB	++++	--
	POLI	++++	--
	POLIVB	++++	--
CBFA1	C	++++++	+++++
	VB	++++	++++
	POLI	+	+
	POLIVB	++++	+
BMP2	C	+++++	++++
	VB	++++	++
	POLI	++	++
	POLIVB	++++	++
OC	C	+++++	+++++
	VB	+++	++++
	POLI	++	+
	POLIVB	++++	++

ESCORE

Ausente: +

Muito discreta: ++

Discreta: +++

Moderada: ++++

Pouco intensa: +++++

Intensa: ++++++

***Anexo E – Normas para Publicação segundo o
Periódico – “Clinical Oral Implants Research”***

Clinical Oral Implants Research

[Official publication of the European Association for Osseointegration](#)

Edited by:

Niklaus P. Lang



ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2004: 5/48 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine); 8/42 (Engineering, Biomedical)

Impact Factor: 2.139

Author Guidelines

Download Instructions to Authors as [PDF file](#) (size 43 kb).

Manuscripts should be sent in quadruplet to the editorial address below:

Clinical Oral Implants Research

Department of Comprehensive Dental Care

University of Berne School of Dental Medicine

Freiburgstrasse 7

CH-3010 Berne

Switzerland or to one of the Associate Editors:

Dr. Hans-Peter Weber, DDS, DMD
Harvard School of Dental Medicine
Department of Periodontology
188 Longwood Avenue
Boston
MA 02115
USA

Prof. Dr. DR.H.C. Daniel van Steenberghe, MD, LDS
Department of Periodontology
Catholic University of Leuven
Capucynenvoer 7
B-3000 Leuven
Belgium

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. When the manuscript has been accepted, the corresponding author will receive a Copyright Assignment Form from the editorial office to be returned signed on behalf of all co-authors. You can also download the [Copyright Assignment Form](#) here.

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.

Manuscripts - Provide your manuscript on one newly formatted 3.5-inch floppy disk; 4 printed, double-spaced copies including figures and tables must accompany the disk. The paper manuscript and the file on the disk must be the same. Label the disk clearly with the journal name, author and title, file content, computer system (DOS, Windows or Macintosh), word processor (Word, WordPerfect etc.) and version used. Do not convert your manuscript to ASCII format. Include only the files corresponding to the manuscript. Full details of manuscript submission of disk will be sent following notification of acceptance of the manuscript. 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. All material, including legends and references, must be typed **double-spaced** on only one side of plain white paper, size ISO A4 (210 x 297 mm), U.S. letter size (8.5 x 11 inches), with margins of at least 25 mm, or 1 inch. 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 article should be clearly divided as follows:

Title page - The first page should contain the title of the article, name(s) of the author(s), full first name(s), and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract - A separate abstract page should contain the name(s) of the author(s) followed by initials, title of the article, followed by the abbreviated journal title (*Clin Oral Impl Res*); and an abstract *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 erogenous 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. Submit at least one original set of illustrations, identifying each with a label on the back which indicates the number, author's name, and the top. Alternatively, arrange micrographs into plates fitting the space appropriately. Copies of the original illustration maybe submitted with the second and third copies of the manuscript. Line drawings should be professionally drawn; halftones should exhibit high contrast. Figure legends must be typed *double-spaced* on a separate page at the end of the manuscript. 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. Authors must submit the original colour transparencies and 2 sets of colour prints with the manuscript.

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 - Page proofs only will be sent. Only minor corrections are allowed without extra cost.

Offprints - The senior authors are given 50 offprints of their article. Additional offprints can be ordered from the publisher by using the offprint order form accompanying the proofs when page proofs are returned.