

Hermes Prefel

Ação de Biomateriais e Laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas – Área de concentração: Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho
Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli

Araraquara
2005

Pretel, Hermes

Ação de biomateriais e do laser de baixa intensidade na
reparação de tecido ósseo. Estudo histopatológico em ratos /
Hermes Pretel. – Araraquara : [s.n.], 2005.
165 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia.
Orientador: Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira
Ramalho

1. Osso e Ossos 2. Terapia a laser de baixa intensidade 3.
Materiais biocompatíveis 4. Durapatita 5. Óleo de Rícino 6.
Ratos I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Ação de Biomateriais e Laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos

Comissão Examinadora

Dissertação Para Obtenção do Título de Mestre em Ciências
Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria

Presidente: Prof^a. Dr^a. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

2^o Examinador: Prof. Dr. Hélio Ferraz Porciúncula

3^o Examinador: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Borsatto

1^o Suplente: Prof^a. Dr^a. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto

2^o Suplente: Prof^a. Dr^a. Kranya Victoria Diaz Serrano

Araraquara, 11 de fevereiro de 2005.

Dados Curriculares

Hermes Pretel

Nascimento	20 de outubro de 1977
Filiação	Horizonte Sakalauskas Pretel Georgina Petroli Pretel
1999 – 2002	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2003 – 2005	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Concentração Odontopediatria - Nível de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Dedicatória

À DEUS

Senhor, obrigado pela vida que me deste e pela tua constante presença em minha caminhada.

Aos meus Pais

À minha mãe, **Gina**, que tantas vezes renunciou seus próprios desejos e sonhos para que os meus se realizassem. Eu agradeço muito por toda dedicação prestada a mim, e tenho um orgulho muito grande em ser seu filho, espero não te decepcionar. Essa conquista é tanto minha quanto sua. Você é a pessoa mais importante da minha vida. Obrigado, mãe. Eu te amo muito.

Ao meu pai, **Dr.Horizonte**, que nunca mediu esforços para me ajudar nessa longa caminhada. Mesmo às vezes distante sempre esteve presente. Admiro sua força de vontade e capacidade de ser coerente, digno e batalhador, você é exemplo de ser humano. Isso tudo foi e está sendo muito motivador nessa minha caminhada. Obrigado, pai. Você é muito especial.

Aos meus Irmãos

Leonard e Patrícia que sempre estiveram presentes na minha vida acreditando e confiando em mim essa vitória também é de vocês. Meu muito obrigado. Adoro vocês.

... à minha adorada sobrinha Sofia

Pelo amor, carinho e muitos outros sentimentos verdadeiros que você nos proporciona.

... aos meus avós

Que com muitas dificuldades nos criaram. Espero corresponder e honrar a tamanha generosidade que tiveram comigo. Gosto muito de vocês.

...aos Familiares

Pelo apoio, amor e carinho.

... aos animais

Sem eles esse trabalho não teria sido realizado. O contato com eles nos transforma em seres humanos mais sensíveis.

“E Deus criou o homem à sua imagem, à imagem de Deus ele o criou: homem e mulher os criou. E Deus os abençoou e lhes disse: sede fecundos e multiplicai-vos, enchei a terra e submetei-a! Dominai sobre os peixes do mar, sobre os pássaros do céu e sobre todos os animais que se movem sobre a terra”.

(Gn 1, 27-28)

Agradecimentos especiais

À Prof^a. Dr^a. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho:

Orientadora desse trabalho, minha mãe científica, grande cientista, expoente no ensino e pesquisa. Sua sabedoria consegue com poucas palavras esclarecer difíceis dúvidas.

Sempre presente na arte do ensino. A senhora é exemplo de vida e dedicação profissional.

Agradeço por todas as oportunidades, e principalmente a confiança depositada em mim nesses anos. Espero não te decepcionar jamais.

Suas atitudes formaram um discípulo e acima de tudo um admirador. Aprendi com a senhora muito mais do que ensinamentos científicos. Obrigado por ter sido meu guia nessa longa jornada. Minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli:

Co-orientadora desse trabalho, amiga acima de tudo. Muito obrigado pela consideração com que sempre me atendeu, pelos conselhos, sugestões oportunas, pela enorme orientação e incentivo durante as fases de aprendizado na Faculdade.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara – UNESP, na pessoa de sua Diretora Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e seu Vice-Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP na pessoa da Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Loiola Cordeiro (coordenadora) e do Prof. Dr. Maurício Tatsusei Sakima.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela concessão da Bolsa de Estudos.

Aos Docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Prof^ª. Dr^ª. Ângela Cristina Cilene Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César de Abreu Lima, Prof^ª. Dr^ª. Josimeri Hebling Costa, Prof^ª. Dr^ª. Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Loiola Cordeiro meu respeito pelo aprendizado, companheirismo, amizade e pela maneira carinhosa e fraterna que me acolheram.

Aos Docentes do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar, Profa. Dra. Eleny Balducci Roslindo, Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho, Prof. Dr. Nilton Alves, Prof. Dr. Paulo Domingos André Bolini, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga muito obrigado pela lição de vida que tive aqui dentro. Sou muito grato pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Américo de Oliveira da Disciplina de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelos valiosos ensinamentos e conselhos, e por sua gentileza com que sempre me recebeu. Não sei como retribuir tamanho carinho e atenção. Meu muito obrigado, o senhor é um ícone a ser seguido.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, pelo conhecimento, apoio e amizade a mim dedicados.

Aos Funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Célia, Cris, Dulce, Odete, Regina, Sylvia, Tânia e em especial o Totó e o Edinho (*in memoriam*), pelos bons momentos vividos e pela forma prestativa com que sempre me receberam.

Aos Funcionários do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Elisa, Marcelo, Ronaldo. E em especial aos queridos amigos Luiz Potenza e Pedro Simões muito obrigado pela paciência em todos esses anos de convivência, aprendi muito com vocês. Sem o apoio de vocês esse e outros trabalhos nunca se concretizariam. Meus sinceros agradecimentos. Obrigado por conviver com vocês.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Adriano, Ceres, Eliane Cristina e Eliane Maria, Inês, Maria, Maria José, Marley, Odete, Sílvia e em especial a Sr^a. Maria Helena pelo carinho e dedicação nesses anos todos. Não tenho como agradecer tamanha dedicação de todos vocês.

Aos Funcionários do Setor de Graduação e de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Fernanda, Jurandir, Zacharias, Alexandre, Mara, Rosângela, Sylvia e Vera pela disponibilidade e paciência.

A todos os Funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP meu muito obrigado pela dedicação de vocês a essa casa de ensino, vocês são peças fundamentais para o bom funcionamento dessa Faculdade.

Aos meus colegas de Mestrado, Emi, Érika, Fábio, Fabíola, Jonas, Junia, Murilo, Pedro e Thiago (*in memorian*), que muito me ajudaram nesse período. Obrigado por tudo, e parabéns, a todos nós.

Os colegas do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo em especial o Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e a Prof^a. Dr^a. Rosane Lizarelli muito obrigado pela amizade e o suporte nos ensinamentos da física do laser.

Aos meus grandes amigos que me acompanham nessa empreitada desde o início, vocês são presentes de Deus: Matheus (gordo), Frank (japão), Pablo, Chrisley, Gaby, Tozan, Tsumanuma, Eduardo (faster), Peixe, Tatão, Marcio (nariga), Bruno, Renatinho, Fábio Alvarenga, Laine, Dani-Dani, Marquinho, Raquel, Tamer, Júlio, Paulão, Elaine, Eliane, Japinha, Luizão, Flávio Henrique, Alexandres (Xú e Boi), Leandrino, Cláudia, Emílio, Evaldo, Diego, Zeca, Fernandinho. Agradeço pela amizade e o convívio. Danilo (Pirú) obrigado pelos conselhos da vida, eu sou eternamente grato a sua amizade irmão. Marcela, você é parte disso tudo. Te adoro...Um beijo a todos!!!

Aos amigos da Oca 7 e da Gaiola que conviveram comigo esses últimos anos, espero que vocês tenham muito sucesso nessa vida. Vocês me ajudaram muito com momentos de alegria durante essa jornada. Muito obrigado....

Aos amigos de infância que tiveram outro rumo na vida, porém nunca deixamos de nos encontrar: Fábio, Rodrigo, Evandro, Thiago, Betão, Ganso vocês são como uma família para mim...

... E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

“ A vida é breve,
A arte é longa,
a ocasião fugida,
a experiência enganosa,
o julgamento difícil ”

Hipocrates (Escritor médico grego)

Sumário

1.	<i>Introdução</i>	13
2.	<i>Revisão da literatura</i>	16
2.1	Tecido Ósseo	17
2.2	Biomateriais	24
2.3	Hidroxiapatita	26
2.4	Proteína Morfogenética Óssea	32
2.5	Polímero do ácido ricinoléico	43
2.6	Laser de baixa intensidade	49
3.	<i>Proposição</i>	59
4.	<i>Material e método</i>	61
5.	<i>Resultados</i>	74
5.1	Resultados Mesoscópicos	76
	Período de 15 dias	78
	Período de 45 dias	79
	Período de 60 dias	80
5.2	Resultados Histológicos	81
	15 Dias	81
	Controle	84
	Laser	86
	Biomateriais	88
	Laser + Biomateriais	90
	45 Dias	92
	Controle	95
	Laser	97
	Biomateriais	99
	Laser + Biomateriais	101
	60 Dias	103
	Controle	106
	Laser	108
	Biomateriais	110
	Laser + Biomateriais	112
5.3	Análise estatística dos resultados	114
6.	<i>Discussão</i>	119
6.1	Da metodologia empregada	120
6.2	Do critério para análise dos resultados	129
6.3	Dos resultados obtidos	130
	Grupo Controle	130
	Grupo Laser	131
	Grupo Biomateriais	134
	Laser + Biomateriais	136
6.4	Dos resultados estatísticos	137
7.	<i>Conclusão</i>	139
8.	<i>Referências</i>	141
9.	<i>Anexos</i>	161
9.1	Anexo I – Comitê de Ética	162
	Resumo	163
	Abstract	164

“Não devemos nunca nos acostumar com a vida, isto seria a morte.”

Paulo Bonfim (1926)

1. Introdução

Há muito tempo existe a necessidade de recuperação dos defeitos ósseos de grandes dimensões provocado por traumas, infecções, e malformações, e despertam o interesse de pesquisadores em desenvolver materiais com características biológicas aceitáveis e que possam ser usados como substitutos dos tecidos ósseos (PADCT, 1994).

Frequentemente é realizado enxerto de osso autógeno, ou seja, é retirado tecido ósseo do próprio paciente para em seguida realizar o enxerto no local de interesse. O maior problema de tratamento é a limitação no volume de osso a ser retirado do sítio doador, o desconforto no pós-operatório, e o alto custo, devido à necessidade de uma segunda cirurgia, o que encarece o custo benefício da cirurgia para o paciente (RAY E HOLLOWAY, 1957).

A fim de minimizar esse problema vários pesquisadores trabalham em busca de novos biomateriais na intenção de suprir as intercorrências dos enxertos de osso autógeno.

Os biomateriais apresentam bons resultados para enxertos ósseos. No entanto, o maior problema dos enxertos com biomateriais é a ausência de vascularização no tecido lesado, dificultando assim sua osseointegração (LOZANO et al., 1976).

O princípio de neoformação óssea utilizando-se da bioengenharia tecidual está baseado na utilização de arcabouços (osteocondutores), moléculas sinalizadoras (osteointdutores) e células tronco (osteogênicas).

Por isso hoje, tem se realizado associações de biomateriais com o intuito de minimizar as deficiências individuais dos mesmos. Assim, utiliza-se de materiais osteocondutores, associados aos osteoindutores na busca de melhores resultados na regeneração tecidual (GUASTALDI, 2004).

Atualmente, o estímulo de incremento ósseo se consegue tanto com substâncias químicas, como pela utilização de ultra-som, emprego de campos eletromagnéticos, e mais recentemente pela terapia com laser de baixa intensidade (GJELSVIK^a, 1973).

O laser de baixa intensidade apresentou resultados promissores na década de 60, quando Mester e colaboradores iniciaram as pesquisas descrevendo seus primeiros resultados clínicos.

Descobriu-se que a irradiação laser de baixa potência estimulava a proliferação celular e também a vascularização em tecidos injuriados. Seu efeito estimulador inicialmente foi utilizado na cicatrização de feridas, e atualmente, este recurso terapêutico é utilizado na reparação de diversos tecidos biológicos (MESTER et al., 1985).

“O pensamento é a semente da ação.”

Emerson (1803-1882)

2. *Revisão da literatura*

Para fins de organização, este capítulo será didaticamente apresentado sob a forma de tópicos: Histologia do tecido ósseo; histórico e descrição dos biomateriais; apresentação e utilização de hidroxiapatita, proteína morfogenética óssea e polímero do ácido ricinoléico; e por fim, as características e aplicações do laser.

2.1 **Tecido Ósseo**

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, composto por 33% de matriz orgânica, dentre os quais 28% colágeno tipo I e 5% de proteínas não colagenosas, como a osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanas e proteínas morfogenéticas ósseas. Os 67% restantes compõem-se de mineral, principalmente por cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (TEN CATE, 2001).

A função do tecido ósseo é de sustentação e proteção dos órgãos do corpo. Também serve como alavanca para os músculos, impulsionando a movimentação, e fisiologicamente apresenta a função de reservatório mineral, principalmente de íons cálcio (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

O tecido ósseo é composto por quatro tipos de células:

- **Células Osteoprogenitoras:** Localizadas no periósteo, no endósteo, e revestindo os canais de Havers. Essas células são derivadas do mesenquima e apresentam potencial em se diferenciar nos osteoblastos, e quando privadas de oxigênio e nutrientes, diferenciam em células condrogênicas (GARTNER e HIATT, 2003).

-**Osteoblastos:** Advindas de células progenitoras, são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, incluindo fibras colágenas e proteínas não colagenosas. Produzem a enzima fosfatase alcalina óssea, possibilitando a mineralização da matriz óssea. Localizam-se na superfície do tecido ósseo, quando inativos são denominados células de revestimento (DUCY et al., 2000).

-**Osteócitos:** São células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos. Estão aprisionadas em lacunas dentro da matriz óssea calcificada. Apresentam função de manutenção do tecido ósseo, pois apresentam prolongamentos citoplasmáticos unidos por junções comunicantes formando um complexo necessário à manutenção e vitalidade da matriz;

Osteoclastos: São células gigantes multinucleadas derivadas de granulócitos-macrófagos, localizadas freqüentemente no endósteo, sendo responsável pela reabsorção do tecido ósseo. (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; TEN CATE, 2001; GARTNER e HIATT, 2003).

A formação do tecido ósseo pode se dar de duas maneiras, **intramembranosa** e **endocondral**. Embora histologicamente um osso não seja diferente do outro, a ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de um tecido mesenquimatoso, ou seja, células progenitoras diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea formando uma malha de espículas e trabéculas ósseas. De outra maneira, na ossificação endocondral ocorre um adensamento de células mesenquimais, que se diferenciam em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Por fim, o molde de cartilagem cresce servindo de esqueleto estrutural para o desenvolvimento do osso, e posteriormente é reabsorvido.

Tipos de tecido ósseo

Seja qual for o processo de ossificação pelo qual um osso é formado, o tecido resultante é sempre o mesmo. Porém histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: **osso primário**, embrionário, imaturo, isotrópico, ou osteóide; e **osso secundário**, maduro, anisotrópico, ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células, porém, apresentam diferentes orientações das fibrilas de colágeno quando analisados sob microscopia de luz polarizada. (BUSER et al., 1996).

O osso primário é o primeiro tecido ósseo a se formar durante o desenvolvimento fetal, e durante a reparação óssea. Possui, proporcionalmente, grande número de osteócitos, dispostos

irregularmente nas trabéculas ósseas neoformadas. As fibras colágenas apresentam-se sem organização definida e o teor mineral é menor do que no osso secundário.

O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de fibras colágenas modelando a forma trabecular do osso primário em lamelas dispostas paralelamente umas as outras, formando ângulos retos que definem pequenos espaços medulares, o chamado osso esponjoso. Quando as fibras colágenas encontram-se dispostas em camadas concêntricas em torno de capilares sanguíneos e nervos, denominamos de canal de Havers, constituindo o chamado osso compacto (GARTNER e HIATT, 2003).

Essa dinâmica de modelação óssea é explicada pela incidência de forças externas sobre o tecido, alterando assim a arquitetura das fibras colágenas, e por fim promovendo resistência ao tecido. Assim podemos explicar porque o osso é um tecido adaptável, ou seja, o tipo de modelamento ósseo está diretamente ligado à carga que ele recebe, determinando assim o osso esponjoso e compacto.

Reparação e remodelação óssea

A remodelação óssea não ocorre apenas no desenvolvimento do tecido, ou após uma injúria, seja esta patológica ou traumática. É um processo dinâmico, que ocorre no decorrer de toda vida, porém com

menor intensidade quando comparado ao processo de reparação tecidual geral.

O remodelamento ósseo se caracteriza por ser um processo cíclico e de longa duração que ocorre principalmente por intermédio dos osteoblastos realizando aposição óssea, e com os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. O resultado da atividade dessas células é uma verdadeira escavação acompanhada de liberação óssea, na qual produtos da degradação do tecido são incorporados pelos capilares sanguíneos, promovendo uma perfeita homeostase tecidual. Essa seqüência de eventos, na verdade, constitui um mecanismo de auto-reparação da estrutura óssea, preservando a massa e a arquitetura óssea dos organismos (RICHTER e BOYNE, 1969; PASCHOAL, 2003; LEONEL^a et al, 2003).

Sabe-se que a regeneração óssea não é somente um processo biológico, mas, fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos são também de fundamental importância na regeneração e manutenção do osso vivo (PASCHOAL, 2003).

Dentre os fatores citados, alguns pesquisadores têm estudado o fenômeno elétrico do osso (SHAMOS et al., 1963; MARINO e BECKER, 1970; MARINO e GROSS, 1989), na qual reportaram o fenômeno da eletricidade produzida quando estruturas ósseas eram artificialmente deformadas. Esse fenômeno é conhecido por piezoeletricidade. Quando o

tecido ósseo é submetido à ação de forças externas, desenvolve-se uma diferença de potencial surgindo uma pequena corrente elétrica. Os elétrons, então se deslocam para as regiões de compressão, deixando o local com potencial negativo, enquanto que, em regiões que sofrem tração existe uma ausência de elétrons, culminando com potencial positivo. As cargas negativas possuem a propriedade de ativar células precursoras dos osteoblastos. Por outro lado, os osteoclastos, células de reabsorção óssea, são ativados em regiões de polarização positiva. Portanto, podemos dizer que o tecido ósseo sofrendo ação de forças externas desencadeia potenciais elétricos, caracterizando esse tecido como um material piezelétrico.

A piezeletricidade óssea no processo de reparação merece grande atenção pelos pesquisadores, pois como as células precursoras do tecido ósseo apresentam tropismo por regiões eletronegativas, uma vez induzido essa condição em um tecido injuriado, conseguiríamos promover uma migração dessas células auxiliando assim o processo de reparação tecidual. Por isso, a uma busca constante por biomateriais piezelétricos, e ou estímulos extrínsecos capazes de induzir esse fenômeno (PASCHOAL, 2003).

Após a injúria do tecido ósseo, ocorrem inúmeras reações no processo de reparação óssea. A tabela abaixo resume os eventos fisiológicos desse processo.

Quadro 1 – Passos do processo de indução óssea (REDDI, 1987)

Tempo após defeito ósseo	Evento Celular	Processo Molecular
1 Min	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Formação do coágulo sanguíneo; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Formação da rede de fibrina; ➤ Liberação de Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF); ➤ Aparecimento de fibronectina;
1 Hora	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Chegada de polimorfonucleares (PMN) por quimiotaxia; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liberação de enzimas proteolíticas semelhantes: colagenase e elastina; ➤ Liberação de peptídeos colágenos;
3-18 Horas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Acúmulo de (PMN), e adesão das células; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proteólise limitada; ➤ Liberação de fatores quimiotáticos para fibroblastos;
1º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Quimiotaxia de fibroblastos e união celular da matriz extracelular implantada; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liberação de peptídeos da fibronectina; ➤ Aumento mobilidade celular; ➤ Desempenha papel de microtúbulos e microfilamentos;
2º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Continuação quimiotaxia por fibroblastos; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Início da síntese de proteínas e ácido nucléicos; ➤ Liberação de fatores de crescimento;
3 Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tradução do sinal originado da matriz para células superficiais; ➤ Proliferação celular; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ H-Timidina incorporada no DNA; ➤ Aumento da atividade da ornitina descarboxilase;
5º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proliferação celular; ➤ Diferenciação de condroblastos; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Síntese de colágeno tipo III; ➤ Aumento de SO₄ incorporação proteoglicanas;
7º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Condrócitos, síntese e secreção de matriz; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Síntese de colágeno tipo II;
9º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hipertrofia de condroblastos; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento da incorporação de Cálcio e atividade da fosfatase alcalina; ➤ Síntese de colágeno tipo IV; ➤ Fator VIII nos vasos sanguíneos;
10-12º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Osteoblasto; ➤ Formação óssea e Mineralização; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Síntese de colágeno tipo I; ➤ Síntese de proteoglicanas ósseas; ➤ Pico de incorporação de Cálcio e de atividade da fosfatase alcalina;
12-18º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Osteoclasto; ➤ Remodelação Óssea e dissolução da matriz implantada; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento das enzimas lisossomais (fosfatase ácida, sulfatase, e glucuronidase-β);
21º Dia	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Diferenciação medula óssea; 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aumento da incorporação de ferro no grupo (Heme); ➤ Acúmulo de lisossima; ➤ Síntese de colágeno tipo III;

2.2 Biomateriais

A busca por novos materiais sintéticos para o tratamento de alterações ósseas incentiva o estudo de uma técnica apoiada no desenvolvimento tecnológico, ainda pouco explorado, a do biomaterial.

Biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida, neste caso, o tecido ósseo. Um biomaterial é qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido, ou órgão do organismo. Excluem-se aqui os fármacos ou combinações de substâncias (GUASTALDI, 2004).

São requisitos desejáveis de um biomaterial, a biocompatibilidade com o tecido, atoxicidade, não ser carcinogênico ou pirogênico, apresentar estabilidade química e biológica, baixa densidade, pouco peso, resistência mecânica e elástica adequadas, e ter baixo custo (BOSS et al., 1995; GUASTALDI, 2004).

Dentre os inúmeros biomateriais, os cerâmicos e os poliméricos despertam grande interesse. Os materiais cerâmicos e poliméricos tanto podem substituir o tecido vivo sem função, como também estimular o crescimento de um novo tecido. Os metais inertes, por sua vez, apresentam como desvantagem a falta de biocompatibilidade na interface

metal-tecido vivo, o que favorece a proliferação de microorganismos no local, necessitando de substituição periódica (PADCT, 1994).

Em geral, os materiais usados como substitutos do tecido ósseo atuam por meio de três diferentes mecanismos: osteogênese, osteocondução e osteoindução (URIST, 1965; CARVALHO et al., 2004).

Osteogênico: Material capaz de formar osso diretamente a partir dos osteoblastos provenientes da área doadora.

Osteocondutor: É aquele que quando colocado em uma ferida óssea, preenche a cavidade e conduz o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte. Deve ser reabsorvido e simultaneamente substituído por tecido ósseo. Pode ser englobado pelo tecido de reparo passando a fazer parte do osso neoformado. São exemplos de materiais osteocondutores: sulfato de cálcio, colágeno, hidroxiapatita, polímero de mamona.

Osteoindutor: Auxilia a reparação da ferida óssea, induzindo a formação de novo tecido ósseo por mecanismo no qual células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Alguns exemplos são: osso autógeno, matriz orgânica do osso humano ou bovino e fatores de crescimento (BMP, PDGF) (BURCHARDT, 1983; LANCE, 1985).

Os polímeros têm se destacado entre os biomateriais no cenário mundial. O polimetilmetacrilato, por exemplo, é um polímero utilizado em áreas como a oftalmologia, a ortopedia, e a odontologia. Outros materiais pertencentes ao grupo dos polímeros são o politetrafluoretileno (teflon), o

polietileno, os poliésteres e os silicones. Porém, o grande desafio no estudo dos materiais poliméricos, consiste na busca de um polímero que se enquadre nos conceitos exigidos para ser classificado como um biomaterial. Ou seja, um material o mais parecido possível com o tecido vivo, capaz de interagir sem ativar o sistema de defesa do hospedeiro e que apresente toxicidade mínima, não causando destruição das células sangüíneas e não liberando radicais nocivos que possam afetar órgãos sensíveis (PADCT, 1994; HOLLINGER e LEONG, 1996).

2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa. Normalmente os cristais apresentam-se de forma hexagonal. Este tipo de hidroxiapatita é indicado para os casos de substituição do tecido ósseo e frequentemente é associado à matriz orgânica do osso e às membranas biológicas. Apresenta como características uma textura microgranular e lenta velocidade de reabsorção pelo organismo, demandando cerca de 4 a 6 meses para sua completa reabsorção (BLOCK e KENT, 1985; BELL e BEIRNE, 1988; COBB et al., 1990).

Devido à sua solubilidade nos líquidos fisiológicos, a sua reabsorção pelo tecido ósseo é uma certeza, característica essa que enquadra a hidroxiapatita como um biomaterial (TAGA et al., 2000).

Block e Kent em 1985 implantaram hidroxiapatita em mandíbulas de cães para aumento de rebordo. Outros animais receberam hidroxiapatita associada a osso autógeno, procurando promover osteogênese. Os espécimes foram obtidos com 4, 8 e 16 semanas. Após quatro semanas os implantes estavam estáveis e firmes, e, no grupo de hidroxiapatita não houve formação óssea nos períodos iniciais e a resposta inflamatória era mínima. Para o grupo hidroxiapatita mais osso, no período de 4 semanas, não foi observado formação óssea, porém no período de 8 semanas observou-se grande quantidade de osteoblastos, formação de sistema harvesiano e espículas ósseas entre tecido ósseo e implante. No período de 16 semanas, clinicamente o grupo de hidroxiapatita estava com os implantes firmes, sem inflamação. Histologicamente demonstrou-se crescimento de 1-2 milímetros de osso no rebordo. Nesse mesmo período, para o grupo hidroxiapatita mais osso os implantes apresentavam-se firmes, sem inflamação. Microscopicamente observou-se proliferação óssea no rebordo. O crescimento ósseo estendeu-se através do rebordo e penetrou no tecido mole subjacente. Apareceram, também, áreas de formação óssea não relacionada com formação óssea cortical, as quais foram interpretadas com sítios de indução osteogênica. Os autores concluíram que a adição de osso autógeno na hidroxiapatita promove estimulação de osteogênese nos aumentos de rebordo.

Bell e Beirne, em 1988, avaliaram o efeito do fosfato tricálcio e hidroxiapatita isolados e associados ao colágeno no reparo de defeitos em mandíbulas de ratos. Os animais foram divididos em grupo com hidroxiapatita e colágeno, grupo com tricálcio fosfato e colágeno e grupo com defeitos preenchidos com colágeno (grupo controle).

Os resultados obtidos por Bell e Beirne sob microscopia óptica dos períodos de 12 semanas apresentaram os implantes de hidroxiapatita e fosfato tricálcio envolvidos por tecido conjuntivo fibroso, macrófagos e algumas células gigantes. Apenas poucas áreas dos implantes tiveram contato direto com tecido ósseo, inclusive para os implantes associados ao colágeno. No grupo controle formou-se tecido adiposo e tecido fibroso. Os resultados mostraram que a hidroxiapatita e o tricálcio fosfato induziram resposta inflamatória mínima e não estimularam a cicatrização óssea. Na associação dos implantes ao colágeno não houve mudanças na resposta inflamatória ou processo de cicatrização óssea comparando com os grupos com implantes de hidroxiapatita isolado e fosfato tricálcio isolado.

Cobb et al., em 1990, analisaram as respostas cicatriciais nos períodos de 6 a 18 meses, nos defeitos ósseos criados na mandíbula de macacos, que foram preenchidos por misturas de osso autógeno e de hidroxiapatita densa em diferentes proporções, 25% osso e 75% hidroxiapatita; 50% de cada material; 75% osso e 25% de hidroxiapatita e 100% hidroxiapatita.

Tanto nos espécimes de 6 quanto de 18 meses, a relação entre tecido e a hidroxiapatita pode ser dividida em 3 categorias histológicas diferentes: A primeira foi caracterizada pelo encapsulamento individual dos grânulos de hidroxiapatita por fibras do tecido conjuntivo. Frequentemente, esse tecido conjuntivo mostrava-se disposto paralelamente à superfície de hidroxiapatita e exibia camadas de fibroblastos e macrófagos e outras vezes apresentavam células gigantes na interface tecido-hidroxiapatita. O segundo tipo mostrou-se como uma completa integração do osso com a hidroxiapatita. Geralmente o tecido ósseo paramelar e linhas reversas pareciam originar-se da periferia do osso do hospedeiro, progredindo em direção ao local implantado.

O terceiro tipo foi uma combinação dos dois anteriores, ou seja, frequentemente grânulos de hidroxiapatita mostraram encapsulamento parcial, interrompido por zonas de integração com o osso. As fibras do tecido conjuntivo, nesta terceira categoria, pareciam aderir à superfície da hidroxiapatita em orientação perpendicular.

Além disso, os defeitos que receberam 75% e 100% de hidroxiapatita mostraram recobrimento ósseo sobre as partículas de 75 e 66% respectivamente.

Esses resultados indicaram que as proporções 3:1 e 1:1 osso-hidroxiapatita podem ser usadas com sucesso para induzir o desenvolvimento ósseo em cirurgia reconstrutiva.

Sob microscopia de transmissão observou-se nos espécimes de 6 a 18 meses, que as fibras colágenas estavam intimamente associadas com a superfície da hidroxiapatita, ou localizadas em áreas de deposição de osteóide e sempre orientadas com disposição perpendicular. Por outro lado, o tecido conjuntivo fibroso que encapsula os grânulos, mostrava camadas de fibras e fibroblastos paralelos ao grânulo. Nos espécimes encapsulados não houve evidência de mineralização ou matriz associada com a superfície da hidroxiapatita.

ONO et al., em 1992, estudaram o comportamento da cerâmica de hidroxiapatita implantada subperiostealmente como implante “onlay” em crânio de coelhos, servindo como grupo controle, comparado com um grupo de hidroxiapatita associada ao atelocolágeno e um grupo de um complexo hidroxiapatita-atelocolágeno e proteína morfogenética óssea, para serem analisados e comparados do ponto de vista bioquímico, radiológico e histopatológico. Foram analisadas as respostas quanto à quantidade de fosfatase alcalina e os resultados revelaram que a porcentagem dessa enzima encontrada no grupo da proteína morfogenética óssea foi bem mais elevada que para os demais grupos, significando um índice de formação óssea acentuado. Na avaliação da densidade óssea houveram os índices mais elevados em todos os períodos (3, 6, e 9 semanas) ocorreram no grupo da proteína morfogenética óssea. Quanto às avaliações histopatológicas, demonstrou-se que no grupo de hidroxiapatita houve formação óssea nos

poros que estavam em contato com a superfície do crânio, no período de 9 semanas. Achados semelhantes foram observados com o grupo do atelocolágeno. Em contraste, puderam observar formação óssea no grupo de proteína morfogenética óssea já nos períodos iniciais. Inclusive notou-se que muitos osteoblastos emergiram da interface entre osso craniano e implante, com ativa formação óssea.

Esses achados demonstraram segundo Ono et al., que a proteína morfogenética óssea apresenta um grande potencial para induzir formação óssea. Além disso, a utilização dessa técnica de embebição de hidroxiapatita em atelocolágeno e proteína morfogenética óssea, nos enxertos “onlay”, poderia substituir os implantes de osso autógeno para as aplicações clínicas.

Taga et al., em 2000, avaliaram a capacidade de reparação de lesões ósseas perenes produzidas em calvária de cobaias com a utilização de matriz óssea bovina desmineralizada (Osseobond) e hidroxiapatita ultrafina (Bioapatita) como material de preenchimento e como mantedora de espaço viável. Uma lesão óssea circular de doze milímetros de diâmetro foi realizada na região da sutura dos ossos parietais de 37 cobaias (*Cavia porcellus*); 15 lesões foram preenchidas com uma mistura 1:1 de Osseobond e Bioapatita aglutinada com sangue do próprio animal; outras 15 receberam o mesmo tratamento e foram recobertas com membrana Dentoflex. Esses animais foram sacrificados 1, 3 e 6 meses após as cirurgias. Nos 7 animais do grupo

controle 6 meses e 0 h, as lesões foram preenchidas apenas com coágulo sanguíneo. As análises radiográficas, histológicas e morfométricas mostram que: Nos defeitos preenchidos com matriz óssea desmineralizada e hidroxiapatita sem recobrimento com membrana, ocorreram à presença de reação tipo corpo estranho, devido provavelmente à formação de acúmulos arredondados de hidroxiapatita, de tamanho relativamente grande, o que favoreceu a formação de tecido fibroso e a reabsorção óssea. Nos defeitos preenchidos com a mesma mistura e recobertos com a membrana, ao final de 6 meses pós-cirurgia, houve o preenchimento de 73,3% da área da lesão por tecido ósseo neoformado; os poucos acúmulos de hidroxiapatita observados estavam incorporados ao tecido ósseo neoformado. Os autores concluíram que a membrana recobrindo toda área do defeito funcionou como barreira contra invasão de células e exsudato do tecido conjuntivo inflamado, e a formação de corpos maiores de hidroxiapatita, fibrose e reação tipo corpo estranho, favorecendo com isso a ocorrência de neoformação óssea.

2.4 Proteína Morfogenética Óssea

As constantes inovações tecnológicas e os achados biológicos estão trazendo diferentes opções terapêuticas e conhecimentos importantes para o cirurgião-dentista. Muitos desses achados associam

direta ou indiretamente, a biologia à tecnologia. Recentemente pesquisadores vêm explorando o uso clínico das proteínas morfogenéticas do osso (BMP). O uso desses fatores de crescimento provavelmente terá importantes implicações, tanto para nossos conhecimentos biológicos como para a tecnologia de aplicação diária no consultório.

Fator de crescimento é um termo geral para designar uma classe de hormônios polipeptídios que estimulam uma ampla variedade de eventos celulares como proliferação, quimiotaxia, diferenciação e produção de proteínas matriciais extracelulares (URIST e STRATES, 1971).

As BMPs são consideradas fatores de crescimento osteoindutores com potencial de atuar sobre uma célula mesenquimal, tornando-a capaz de sintetizar osso. Foi também demonstrado que as BMP promovem, além da osteogênese, formação de dentina. Esses achados são relevantes para a clínica odontológica (URIST e STRATES, 1971; GONÇALVES et al., 1998; NUNES, 1999).

Com relação à sua aplicação clínica, vários autores demonstraram ser a BMP uma boa opção clínica para a correção de vários defeitos ósseos. A literatura também mostra sucesso com a utilização das BMP na reparação óssea ao redor de implantes, promovendo uma rápida osteointegração (CAÚLA et al., 1999).

Paralelamente aos estudos com as BMPs, muitas pesquisas são realizadas em busca da obtenção do veículo ideal, um dos principais problemas na efetiva utilização dessas proteínas (HOLLINGER e LEONG, 1996; RENGACHARY, 2002).

Uma característica importante que pode determinar o sucesso ou o fracasso dos enxertos osteoindutores é a eficiência do material carreador, veículo que propicia a sua bioatividade. O carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme, sem permitir que o material implantado ultrapasse seu sítio. Além disso, deve apresentar boa afinidade com a BMP, ausência de toxicidade e imunogenicidade, não provocar interferência na regeneração óssea, potencializar a atividade osteogênica da BMP, melhorar o desempenho mecânico para suporte de forças, ter receptividade à esterilização, ser reabsorvido à medida que ocorrer a formação óssea, ser biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanho e forma adequados para o enxerto (HOLLINGER e LEONG, 1996; NUNES, 1999; RENGACHARY, 2002).

Há uma infinidade de materiais utilizados para enxerto ósseo, e cada um possui suas limitações. Entretanto, técnicas combinadas têm mostrado melhores resultados do que aquelas nas quais só um tipo de material é usado.

Sampath e Rueger , 1994, realizaram um levantamento a respeito da estrutura, função e aplicações ortopédicas da proteína osteogênica 1

(OP – 1) e relataram que o implante de colágeno como carreador em conjunto com a OP –1 também conhecida como BMP-7, em grandes defeitos cirúrgicos criados no segmento diafisário de animais, leva à regeneração óssea; que é totalmente funcional, tanto biológica quanto mecanicamente.

Modelos in vitro e in vivo sugerem que a OP-1 contém dispositivos que podem ser usados como substitutos de implantes ósseos no reparo da fusão vertebral, no aumento da crista alveolar em cirurgias de reconstrução ortopédica e facial, e promove a osteointegração durante a fixação de próteses metálicas em vários procedimentos dentais e ortopedicos. A OP-1, também tem potencial terapêutico no tratamento da osteoporose e doenças ósseas metabólicas. Em humanos a formação óssea inicia-se entre a sexta e oitava semana de desenvolvimento fetal. As células progenitoras de origem mesenquimal migram para locais pré-estabelecidos onde se condensam, proliferam e diferencia-se em células formadoras de osso (osteoblastos). Ou se condensam, proliferam e diferenciam em condroblastos, células formadoras de cartilagem que subsequentemente serão substituídas por células formadoras de osso. Este processo também é observado nos ossos longos e denomina-se ossificação endocondral.

Na vida pós-fetal o osso se repara após injúria através de células progenitoras mesenquimais da medula óssea e do periósteo, assim elas se acumulam, proliferam e diferencia em cartilagem, que

subsequentemente será substituída por osso neoformado. A matriz óssea contém uma ou mais proteínas responsáveis pelo desenvolvimento ósseo normal e reparativo.

Em ratos a OP-1 contida nos implantes, recruta células mesenquimais e promovem sua diferenciação em condrócitos num prazo de 5 a 7 dias, que produzem matriz cartilaginosa que calcifica, sofrem hipertrofia, se degeneram, e sob a invasão de capilares são substituídos por osso novo neoformado. Entre 14 e 21 dias, o osso mineralizado é extensivamente remodelado e torna-se preenchido por elementos funcionais da medula óssea.

Na ausência de OP-1 o implante de matriz de colágeno será lentamente reabsorvido, e não haverá formação óssea. A quantidade e a média de formação óssea dependem da concentração de OP-1 no dispositivo carreador.

Os estudos sobre imunoinvestigação demonstram que a OP-1 está presente durante o desenvolvimento ósseo embrionário e nas fraturas durante a reparação. Apesar de não haver OP-1 na matriz e nas células durante a condensação da cartilagem no mesenquima. Ela foi detectada no pericondrio. Na ossificação endocondral a proteína aparece transitoriamente nos condrócitos hipertrofiados e se cora intensamente nos osteoblastos e no periósteo, e, nas áreas de degradação ativa da cartilagem e formação óssea. Há estudos mostrando também que a proteína OP-1 promove a proliferação celular e síntese de colágeno nas

culturas de osteoblastos. Ela estimula especificamente a síntese e secreção de fosfatase alcalina e produção de adenosina monofosfatocíclico (AMPc) em resposta à síntese de paratohormônio (PTH) e osteocalcina e mineralização da matriz extracelular das culturas de osteoblastos

Mulatinho e Taga, em 1996, realizaram trabalho que trata da apresentação de um caso clínico de implante de titânio imediatamente após a extração dentária. Os autores utilizaram uma mistura de Osseobond e Biohapatita como preenchimento e verificaram histologicamente que após 6 meses esses materiais foram substituídos por tecido ósseo altamente organizado do tipo lamelar ou secundário porém ainda em fase de remodelação.

Kinoshita et al., em 1997 realizaram o estudo da análise da regeneração do tecido periodontal de cães após aplicação de proteína óssea morfogenética recombinante humana (rhBMP-2) em defeitos periodontais horizontais em cães. Foi introduzido no defeito como material carreador de rhBMP-2, uma esponja de gelatina de ácidos polilático e poliglicólico. No grupo controle usou-se a mesma esponja sem a adição da proteína. Doze semanas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e os autores verificaram uma considerável neoformação óssea nos animais do grupo tratado. Observou-se inclusive a neoformação de cemento com fibras de Sharpey nas superfícies radiculares instrumentadas. A histometria mostrou que a neoformação óssea,

cementária, e de fibras de tecido conjuntivo foi significativamente maior no grupo tratado com rhBMP-2, indicando que mesmo nos casos de defeitos horizontais pode haver regeneração óssea com o uso da proteína morfogenética.

Gonçalves et al., em 1998, trabalho de levantamento bibliográfico, propõem-se apresentar uma revisão concisa sobre BMPs, enfocando sua atuação e aplicação clínica em procedimentos terapêuticos para o reparo tecidual. Assim temos que a sua identificação e purificação iniciou-se em com Urist em 1965 quando induziu a neoformação óssea em sítios ectópicos (tecido subcutâneo e intramuscular) implantados com fragmentos de osso desmineralizado, no período de duas semanas. Salientando-se que este fragmento de osso desmineralizado foi denominado por Urist de proteína morfogenética óssea. Somente na última década por meio de técnicas moleculares, identificou-se uma família de proteínas morfogenéticas estruturalmente relacionadas, contendo seqüências de aminoácidos homólogos às proteínas do Fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta).

Embora as funções exata de cada uma das BMPs não estejam completamente esclarecidas, sabe-se que as evidências indicam que elas aumentam a diferenciação e a expressão de condroblastos e osteoblastos em sítios ósseos lesados.

Quanto a sua origem e obtenção, sabe-se que as BMPs são produtos de metabolismo de osteoblastos, odontoblastos e de várias

células tumorais, e, são armazenadas em forma concentrada no osso, dentina e em células neoplásicas do osteossarcoma.

A extração de BMPs foi obtida de vários animais, como bois, porcos, ratos, camundongos, cães e coelhos, bem como de humanos. Independentemente da espécie animal de onde foi extraída, a BMP promoveu osteoindução. Em humanos a dificuldade de extração é muito grande, pois além de outros problemas é necessário uma tonelada de pó de osso para se extrair um grama de BMP.

Atuação e implicações terapêuticas

Os efeitos das proteínas morfogenéticas ósseas podem ser observados em células tronco geradoras de clones celulares osteogênicos, tanto *in vivo* como *in vitro*. A resposta celular, descrita após a aplicação de BMPs em tecidos ectópicos, consiste na quimiotaxia, promovendo a migração de células mesenquimais e monócitos para o local de implante: proliferação celular e diferenciação em condroblastos e osteoblastos; síntese dos componentes da matriz; maturação; mineralização e remodelação, resultando na formação de um ossículo.

Muitos pesquisadores (YASKO et al., 1992; ONO et al., 1992; HEDNER e LINDE, 1995; ZELLIN et al., 1996; HOLLINGER e LEONG, 1996; GONÇALVES et al., 1998; YUDELL e BLOCK, 2000; SPECTOR et

al., 2001; RENGACHARY, 2002; BRANDÃO et al., 2002; RUHÉ et al., 2004; KROESE-DEUTMAN et al., 2005) concentram-se no desenvolvimento do melhor substrato carreador, para a BMP, com atividade osteogênica intacta e um efeito osteoindutor efetivo, e, entre os biomateriais testados incluem-se os vários componentes da matriz extracelular, isolados ou combinados (colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanas), hidróxido de cálcio e fosfato de cálcio.

Perspectivas terapêuticas futuras

O substrato carreador ideal preencheria os seguintes requisitos: 1- relativa insolubilidade em condições fisiológicas. 2 – ser biodegradável; 3 – proteger contra atividades proteolíticas; 4 – funcionar como substrato para a adesão e proliferação celular; 5 – ser inerte imunologicamente; 6 – obter a liberação vagarosa de BMP através da degradação biológica controlada; 7 – ter estabilidade mecânica para unir defeitos ósseos.

As indicações para o uso das BMPs estão associadas principalmente a grandes perdas ósseas, decorrentes de anomalias de desenvolvimento e neoplasias, bem como de doenças infecciosas e inflamatórias, como doenças periodontais. Outras indicações são para a elevação do rebordo alveolar; fraturas extensas com perda tecidual impossibilitando a coaptação dos segmentos; e na indução à formação de dentina reparadora (SELLERS, et al., 2000; RENGACHARY, 2002).

Caúla et al, em 1999, se propuseram a apresentar uma revisão bibliográfica da proteína óssea morfogenética humana recombinante, sob vários aspectos: quanto a sua estrutura, mecanismo de ação, os tipos de carreadores e as suas vantagens em relação a outros substitutos ósseos. Assim tem-se que a proteína é proveniente de 13 proteínas purificadas e clonadas, gerando um material glicosado, duplo e processado da mesma forma que as moléculas de BMP encontradas no osso.

A BMP-2 aumenta a expressão da fosfatase alcalina e do hormônio paratireoideo (PTH), bem como induz a formação da osteocalcina, um marcador específico de osteoblastos. As BMPs são as únicas proteínas conhecidas capazes de induzir a expressão deste marcador de osteoblastos. Quando altas doses da BMP-2 são aplicadas, ocorre a formação óssea endocondral e intramembranosa. É necessário também o uso de um carreador, pois quando a BMP-2 é usada sem qualquer carreador, é necessário o uso de grandes quantidades e, além disso, ela é altamente solúvel dispersando-se imediatamente após o implante. Existem vários carreadores artificiais que podem oferecer suporte estrutural, são essencialmente osteocondutores, oferecendo estrutura para ajudar o osso a crescer no seu interior ou a sua volta.

Polímeros podem agir como carreadores efetivos, por serem biodegradáveis. Isso não acontece com a hidroxiapatita que parece permanecer no organismo. Existem dois tipos de substitutos ósseos que podem ser descritos como ósseo-condutores ou ósseo-indutores. Os

condutores se tornam incorporados no defeito pelo crescimento do osso das margens. Os enxertos ósseo-indutores estimulam as células mesenquimais a se diferenciar em células osteogênicas que produzem novo osso.

Allegrini e König, em 2000, descreveram um modelo experimental em coelhos para procedimentos de elevação de seio maxilar. Foram utilizados quatro materiais de enxerto com e sem associação à BMP bovina (0,5miligramas). Os períodos de observação foram de 8, 12 e 16 semanas, sendo utilizados marcadores seqüenciais de polifluorcromo (alizarina, calceína e tetraciclina) para avaliação dos períodos de deposição óssea. Nos animais de 8 semanas associados à BMP, houve um ganho de 33,34% na formação óssea, proporcionalmente aos controles. Em 12 e 16 semanas esta deposição permaneceu sem alteração significativa, enquanto nos controles houve contínuo crescimento ósseo. Esta diferença demonstra que a BMP estimulou a formação óssea durante os períodos iniciais de cicatrização, alterando, porém, o ciclo normal de deposição óssea em tempos mais prolongados. O modelo animal serviu eficazmente e sem complicações. Resultados indicaram que a BMP utilizada, apesar de promover osteoindução, pode ter sido insuficiente à formação óssea em quantidade e qualidade, necessárias à instalação de implantes de titânio.

2.5 Polímero do ácido ricinoléico

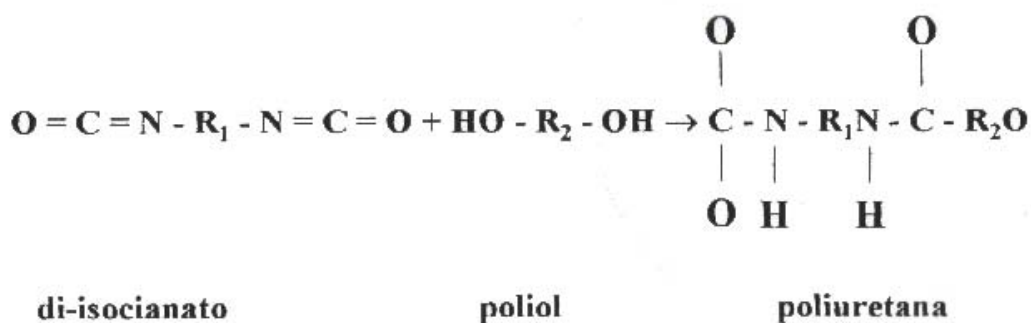
A mamona (*Ricinus comunis*), da classe Dicotiledônea, ordem Geraneales e família Euforbaceae, constitui um vegetal típico de clima tropical. O Brasil, devido às suas características climáticas e territoriais, apresenta-se como uma das grandes reservas mundiais deste produto. A mamona possui um grande potencial oleoquímico, podendo garantir o fornecimento de polióis e pré-polímeros a partir de ácidos graxos em larga escala.

O óleo de mamona, também conhecido como óleo de rícino ou “*castor oil*”, é um produto que contém em sua composição 81% a 96% de triglicerídios do ácido ricinoléico (12-hidroxioléico), podendo ser considerado um poliálcool natural por conter três radicais hidroxilas passíveis de serem utilizados na síntese de poliuretanas. Estruturalmente, o óleo de mamona é um poliéster possuindo três moléculas do ácido 12-hidroxioléico e este, por possuir três diferentes sítios ativos, a carboxila terminal, a insaturação no nono carbono e a hidroxila no décimo segundo carbono proporciona diferentes possibilidades de reações (PADCT, 1994; IGNÁCIO et al., 1997).

Os polióis vegetais à base do ácido ricinoléico são bastante estáveis quimicamente por causa das ligações uretanas, que apresentam maior resistência às reações hidrolíticas. A química envolvida na síntese do poliuretano está baseada nas reações com o grupo isocianato. A reação de pré-polymerização para a formação da poliuretana é realizada

entre um diisocianato e um polioliol, de maneira a deixar grupos isocianato de partida. O pré-polímero é um líquido viscoso com menor reatividade do que o diisocianato de partida. A reação de polimerização final com o pré-polímero para a formação da poliuretana pode ser feita com um dioliol, uma diamina ou ainda um polioliol. Os polióis utilizados na síntese de poliuretanas são moléculas de alto peso molecular, contendo dois ou mais radicais hidroxilas, apresentando-se geralmente nas formas de poliéster e poliéter. A poliuretana derivada do óleo de mamona apresenta uma fórmula molecular com certa compatibilidade com os tecidos vivos. Apresenta aspectos favoráveis de processabilidade; flexibilidade de formulação; versatilidade de gel; excelentes propriedades estruturais; ausência de emissão de vapores tóxicos; bom poder de adesão; não libera radicais tóxicos quando implantada, e tem baixo custo. (PADCT, 1994; IGNÁCIO et al., 1997; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999).

A poliuretana que foi utilizada neste estudo é derivada do polioliol poliéster, obtido a partir de ácido graxo vegetal retirado da mamona, o difenilmetanodiisocianato, com a seguinte fórmula química:



O vegetal conhecido no Brasil e no mundo pelos sinônimos de palma Christi, mamona, carrapateira, rícino, tartago, “castor oil”, “castor bean” é originário, possivelmente, da Índia, de onde se espalhou para todos os países de clima quente e temperado Pereira em 1929 citado por Rodrigues et al., 2002. Por outro lado, para De Candole, 1836 o vegetal é originário da África intertropical, pois sementes desta espécie foram encontradas em catacumbas de múmias notáveis. Isso comprova que essa semente era cultivada desde os tempos egípcios há mais de 4000 anos, e que essas civilizações apresentavam veneração por essa semente, provavelmente atribuindo-lhe propriedades medicinais.

A maior parte dos trabalhos com *Ricinus communis* foram executados com suas sementes. O óleo de rícino, obtido das sementes, apresenta além de seu emprego medicinal e cosmético, diversas utilidades para as necessidades humanas (RODRIGUES et al., 2002).

Ignácio et al., em 1997, ao empregar a poliuretana de mamona em defeitos produzidos no osso rádio de coelhos, verificou que este material é biocompatível, não apresentando reação tipo corpo estranho e permitindo o fenômeno de osteocondução através do conceito de regeneração tecidual orientada. Foi realizado um defeito de dois centímetros na diáfise radial de coelhos, no qual colocou-se cilindros de poliuretana da mamona adicionado carbonato de cálcio. Utilizou-se para referida pesquisa 34 animais distribuído em períodos de avaliação de 2, 4,

8 e 16 semanas. Foram realizadas avaliações radiológicas, macroscópicas e histológicas.

Teixeira e Ramalho, 1999 de maneira semelhante após implantarem a poliuretana associada ao carbonato de cálcio em defeitos produzidos nas mandíbulas de ratos, observaram a biocompatibilidade deste material, não havendo formação de cápsula fibrosa ou migração de células inflamatórias, apresentando, sim, o aparecimento de células osteogênicas.

Ohara et al., 1995, comprovaram a ausência de toxicidade sistêmica do polímero, avaliando a biocompatibilidade da poliuretana da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos, não detectaram reações tóxicas nos rins, no fígado nem no baço.

Vilarinho et al., 1996, posteriormente implantaram a resina da poliuretana vegetal derivada da mamona na câmara anterior do olho de camundongo, e verificaram que este material foi bem tolerado pelo organismo receptor, desencadeando reação inflamatória inicial, que diminui com o passar do tempo.

Carvalho^a et al., 1997, observaram a osteointegração progressiva, sem reações inflamatórias ou de corpo estranho após 6 semanas da implantação de grânulos da poliuretana em alvéolo dental de ratos.

Kharmandayan em 1997 estudou a interface entre osso-pino de poliuretano de óleo de mamona com e sem carbonato de cálcio em tibia de coelho. Foram utilizados grupos de 1, 30, 60, 120, 180 e 360 dias de

pós-operatório utilizando-se microscopia de luz e eletrônica de varredura para avaliação histológica. Os dados revelaram que, no primeiro dia de pós-operatório, a parede do canal de implante do pino era revestida por *smear layer*. Os grupos de 30, 60 e 120 dias de pós-operatório, mostraram a formação de tecido colágeno denso envolvendo a superfície do pino. Pequenas irregularidades de superfície dos implantes foram notadas nestes grupos, revelando a adesão do colágeno à superfície da resina o que provocou uma reparação na interface osso-pino. As trabéculas ósseas adjacentes revelaram uma disposição irregular tanto em cortes histológicos, como nos aspectos tridimensionais em imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura. A orientação de fibras colágenas é notada nitidamente, envolvendo a superfície do pino. Nos grupos de 180 e 360 dias de pós-operatório, houve uma formação de fibras colágenas de disposição ordenada. Os aspectos histológicos revelaram a presença de um tecido conjuntivo denso constituindo a interface osso-pino. O implante de poliuretano foi acompanhado de uma neoformação óssea bem evidente, na porção próxima à superfície que se estendeu até a profundidade do canal.

Além disso, nos estudos de Kharmandayan os dados obtidos revelaram diferenças apenas de aspectos estruturais decorrentes da reparação tecidual, nas fases examinadas, mais intensas no grupo de 360 dias de pós-operatório e com pinos com carbonato de cálcio.

Almeida et al., 2000, realizaram estudo histológico da reparação óssea de defeitos realizados em mandíbulas de ratos. Foram utilizados 18 animais, nos quais se realizaram perfurações trans-ósseas de 4,0 mm de diâmetro na região de ângulo. Os animais foram sacrificados em grupos de três em períodos pós-operatórios de 1, 3, 5, 7, 14 e 28 dias. Após processamento laboratorial as peças foram coradas pelo HE. Os resultados mostraram que a reparação dos defeitos ósseos produzidos em mandíbulas de ratos ocorre a partir do tecido ósseo das margens dos mesmos. A neoformação óssea ocorre também ao redor de esquirolas ósseas remanescentes. No entanto, o tamanho do defeito, bem como a utilização de barreira mecânica que impeça a proliferação de tecido conjuntivo em seu interior, são fatores que interferem na completa regeneração do defeito ósseo cirúrgico.

Cavalieri em 2000 realizou um estudo comparativo das respostas teciduais após a implantação de polímero de mamona, cimento ósseo e resina acrílica termicamente ativada em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados nas tíbias de coelhos, mediante análises macroscópicas através da microscopia de luz. Foram utilizados nove coelhos adultos divididos em quatro grupos: Polímero de Mamona (PM), Cimento Ósseo (CO), Resina Acrílica Termicamente Ativada (RATA) e Controle. Realizou-se a confecção de dois defeitos ósseos em cada tíbia. No lado direito, um defeito foi implantado com polímero de mamona (grupo - PM) e o outro com cimento ósseo (grupo - CO). No lado esquerdo, um defeito foi

implantado com resina acrílica termicamente ativada (grupo-RATA) e o outro foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo (grupo - CO). Decorridos 30, 60 e 90 dias, três coelhos de cada grupo foram sacrificados. As peças contendo o defeito ósseo foram removidas em bloco, fixadas em formol 10%, processadas e submetidas à análise macroscópica e microscópica através da microscopia de luz. O polímero de mamona, a resina acrílica termicamente ativada e o cimento ósseo foram bem tolerados pelos tecidos hospedeiros. O autor concluiu que o polímero de mamona permitiu o crescimento de tecido conjuntivo osteogênico no interior dos seus poros e fendas, bem como se incorporou ao tecido ósseo, promovendo a sua estabilidade no local de implantação. Verificou também que o polímero de mamona estava sendo lentamente substituído por tecido ósseo durante o processo de remodelação.

2.6 Laser de baixa intensidade

A palavra LASER é um acrônimo de "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*", ou seja, "Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação". O princípio da emissão estimulada foi proposto primeiramente, sob forma teórica, por Einstein, em 1917: a emissão estimulada de radiação é causada pela presença de um fóton indutor de energia interagindo com um átomo em seu estado excitado, resultando na liberação de dois fótons induzidos (GUTKNETCHT e EDUARDO, 2004).

Os diferentes tipos de laser de baixa densidade de potência possuem um efeito eminentemente analgésico, antiinflamatório e bioestimulante, sendo utilizados nos casos de lesões da cavidade bucal, como: aftas, herpes labial, queilite angular, trismos, parestesia, hipersensibilidade dentinária, pós-cirurgias, pós-intervenções endodônticas. A laserterapia, com essa finalidade, provoca um aumento da microcirculação local e da velocidade da cicatrização. A existência da fotoestimulação pelos lasers de baixa potência, tópico tão controverso e pouco entendido antes de 1980 tem sido objeto de intenso estudo científico. A aplicação clínica demonstra a evidência factual então obtida onde extensivas discussões da ação (com possíveis mecanismos) da luz visível monocromática nos fotorreceptores primários de células e organismos têm encantado tanto os profissionais clínicos quanto os pesquisadores.

Para que um laser possa funcionar, devem ser satisfeitas, simultaneamente, três condições fundamentais. Em primeiro lugar, é necessário dispor de um meio ativo, ou seja, de uma coleção de átomos, moléculas ou íons, que emitam radiação na parte óptica do espectro. Em segundo lugar, deve ser satisfeita uma condição conhecida sob o nome de inversão de população. Esta condição, geralmente não preenchida em nosso ambiente natural, é gerada por um processo de excitação denominado bombeamento: ela transforma o meio ativo em meio amplificador de radiação. Finalmente, é indispensável dispor de uma

reação óptica para que o sistema composto por essa reação óptica e pelo meio ativo seja a sede de uma oscilação laser (ALMEIDA LOPES et al., 2001).

Os primeiros sistemas LILT (*Low Intensity Laser Therapy*) tinham como meio ativo uma mistura gasosa de gás hélio e neônio (lasers de HeNe) que emitiam no vermelho (632,8 nm), mas que apresentam também outra linha de emissão no verde. Atualmente os sistemas laser LILT são, na sua grande maioria, constituídos de um cristal confeccionado em laboratório de diodo semiconductor de arseneto de gálio (GaAs) podendo estar dopado por diversos outros elementos, dependendo do comprimento de onda desejado (p. ex., In-índio dopa o cristal para emitir no vermelho) (GUTKNECHT e EDUARDO, 2004).

Efeitos primários ou Diretos

Efeito Bioquímico

O Laser controla a produção de substâncias liberadas nos fenômenos de dor e inflamação, como as prostaglandinas, prostaciclina, histamina, serotonina, bradicinina, leucotrienos, etc. Modifica também as reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação como de inibição, como são a produção de ATP e a síntese de prostaglandinas (CAMPANA et al., 1998).

Karu et al., 1995 demonstraram que a radiação laser exerce estímulo na produção de ATP no interior das células, originando e provocando a aceleração da mitose, fato que se produz quando há um aumento desta enzima das mitocôndrias.

O efeito bioquímico, como certos fármacos não-opiáceos, interfere na produção de prostaglandinas, pela interferência na atividade da ciclooxigenase que intermedia a produção desta substância pelo ácido araquidônico (CAMPANA et al., 1998).

Efeito Bioelétrico

Toda célula tem em seu interior mais cargas negativas do que positivas. No meio extracelular, existem substâncias de cargas positivas, como o Na^+ e K^+ . A diferença de potencial deve-se a existência de diferentes concentrações de íons positivos ou negativos dentro ou fora da célula, o que mantém a pressão osmótica da membrana celular, determinando a sua permeabilidade e agindo no limiar da condução da dor, impedindo que os estímulos dolorosos se transmitam aos centros superiores (KARU et al., 1995; BORTOLETTO et al., 2004).

Os íons de sódio são abundantes no meio externo e pode penetrar com facilidade pela membrana. Entretanto, a célula deve expulsá-los mediante um mecanismo denominado “bomba de sódio e potássio” e que,

logicamente, precisa de uma energia para seu funcionamento. Essa energia é extraída da hidrólise da ATP.

Em condições patológicas, as células não podem manter seu potencial de membrana, isto é, o gradiente iônico de ambos os lados dessa membrana se transforma, podendo chegar à zero ou inclusive inverter-se. As ações terapêuticas da energia a laser se manifestam das seguintes formas:

De modo direto, atuando sobre a mobilidade iônica;

De modo indireto, aumentando a quantidade de ATP produzida pela célula.

O efeito bioelétrico da radiação laser ajuda a normalizar o potencial da membrana, atuando como reequilibrante e normalizador da atividade funcional da célula (KARU et al., 1995).

Efeito Bioenergético

Há cerca de 70 anos o efeito bioenergético foi estudado a partir de diversos cultivos celulares independentes e observou-se que, quando se iniciavam as mitoses em um deles, notou-se o mesmo processo nos outros. No entanto se repetisse a mesma experiência interpondo uma barreira de vidro entre esses cultivos, a referida reação não chegava a ocorrer. Desse fato pode deduzir-se que as células vivas emitem irradiações próprias. Fazendo-se uma análise espectral observou-se que

essas irradiações vão desde o ultravioleta ao infravermelho. Esses resultados levaram alguns pesquisadores a citar essas experiências para explicar os efeitos do laser como um fenômeno de indução biológica, uma vez que, irradiando uma zona, as mais próximas seriam beneficiadas.

Dessa forma, pode-se admitir que as radiações laser proporcionam às células, tecidos e organismos, em conjunto, uma energia válida e que estimula, em todos os níveis, o trofismo, normalizando as deficiências e equilibrando as desigualdades.

Efeitos secundários ou indiretos

Após a ação do efeito primário há ocorrências secundárias tais como o estímulo ao trofismo celular e a microcirculação.

Estímulo ao Trofismo Celular

Com o aumento da produção de ATP, causada pela aplicação da energia laser de baixa intensidade, a velocidade de mitose é aumentada. Esse fato leva a concluir que o laser de baixa intensidade aumenta os processos de reparação tecidual; isto é, devido ao estímulo na capacidade de cicatrização do tecido conjuntivo. Esse fator contribui para reparar perdas de substância, sobretudo úlceras de diversas origens, como a ulceração aftosa recorrente e reparação de feridas cirúrgicas

(NARA et al., 1990; DORTBUDAK et al., 2000; GUZZARDELLA et al., 2002).

Estímulo a microcirculação

No sistema circulatório, as artérias se dividem e diminuem progressivamente de calibre até que, posteriormente às arteríolas, abre-se a rede capilar, com abertura e fechamento comandados pela atuação de um músculo chamado esfíncter pré-capilar. Em circunstâncias normais, funciona de forma periódica, ativando ou cessando o funcionamento das diferentes regiões (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Parece que a radiação laser tem uma ação indireta sobre o esfíncter pré-capilar, por meio de mediadores químicos, paralizando-o e produzindo sua abertura constante e, portanto, um estímulo a microcirculação. Admite-se que um dos intermediários, não o único, é a liberação de histamina. O fato é que a dilatação produzida é persistente e pode manifestar a maior ou menor distância, segundo a potência de radiação (BENEDICENTI et al., 1984).

O laser de baixa intensidade produz efeito acalórico. Portanto, se houver aumento de temperatura no local de aplicação da energia laser, deve-se ao aumento do metabolismo celular e da vasodilatação provocada na região (GUTKNECHT e EDUARDO, 2004).

Foi demonstrado que o laser de baixa potência aumentava o grau de vascularização do tecido neoformado, quando se irradiava feridas em processo de cicatrização (PRETEL et al., 2002; NICOLAU et al., 2003)

A bioestimulação com laser de baixa potência começou na Hungria com Mester (1966) e a partir daí até a década de 80, foram reportados vários experimentos *in vivo* que visavam à estimulação do processo de cicatrização de feridas e estudos em modelos usando feridas e queimaduras em pele e mucosa de animais (MESTER et al., 1985). Os primeiros estudos foram feitos *in vivo* e concluíam que o laser de baixa potência afetava o processo metabólico celular e aumentava o potencial regenerativo dos tecidos biológicos.

Muitos desses trabalhos demonstravam os efeitos do laser de baixa potência e o reconheciam como terapêutico, entretanto, os autores ainda não conseguiam explicar completamente sua ação, sobretudo quando lhe atribuíram uma importante ação sistêmica (MESTER et al., 1985).

Havia a necessidade, todavia, de serem feitos experimentos onde se trabalhassem com modelos mais específicos como células, ou grupo delas, isoladamente dentro de um determinado processo complexo, como é a cicatrização, por exemplo, e assim se pudesse chegar a resultados mais conclusivos. Foi quando começaram a aparecer trabalhos *in vitro*, com modelos em cultura de células, buscando dessa forma maior facilidade para fixação de parâmetros e limitação de variáveis nesses

experimentos (KARU et al., 1995; DORTBUDAK et al., 2000; BORTOLETTO et al., 2004).

A partir do final da década de 80, muitos autores e suas equipes como Karu et al., 1995, passaram a buscar exaustivamente explicações para a elucidação dos mecanismos de ação do laser de baixa potência.

Os lasers emitindo na região do visível foram os mais utilizados na terapia de cicatrização de feridas, desde Mester (1966), mas com o advento dos diodos lasers semicondutores os clínicos começaram a trabalhar principalmente com comprimentos de onda emitidos no infravermelho próximo, devido ao baixo custo desses equipamentos.

Karu em 1988 sugeriu um mecanismo de ação diferente para os comprimentos de onda emitidos no visível e no infravermelho próximo, já que alguns autores tinham observado in vitro diferenças significativas quando trabalharam com ambos. Com o passar do tempo, essas diferenças de resultados foram confirmadas in vitro por outros pesquisadores (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

É claramente observado nos dados da literatura que os efeitos do laser foram dose-dependente. Parâmetros de irradiação, como fluência e irradiância foram altamente relevantes para a obtenção de bons resultados. Os efeitos do laser de baixa potência dependeram da fluência, energia, potência e comprimento de onda in vitro (KARU et al., 1995; DORTBUDAK et al., 2000) e in vivo (TAKEDA, 1988; BRAVERMAN et al.,

1989; HALL et al., 1994; NICCOLI-FILHO e OKAMOTO, 1994; OLIVEIRA et al., 1997; SILVA JUNIOR et al., 2002).

A fluência administrada, 2 J/cm², para reparação e cicatrização de feridas em pele e mucosa comprovou-se eficaz em diferentes trabalhos clínicos e laboratoriais (MESTER et al., 1985; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PRETEL et al, 2002).

O mecanismo de ação do laser no processo de reparação e cicatrização tecidual ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, não há dúvida que a radiação laser aumenta o Ca²⁺ intracelular (KARU et al., 1995).

“A educação é simplesmente a alma de uma sociedade, passando de uma geração para outra.”

Chisterton (1874-1936)

3. Proposição

O propósito deste trabalho foi estudar o diferencial de neoformação óssea nos defeitos preenchidos com biomateriais, o polímero do ácido ricinoléico particulado, o pool de proteína morfogenética óssea e a hidroxiapatita absorvível, estimulado ou não pelo laser de baixa intensidade (*LILT*), sob análise morfológica realizada ao microscópio óptico comum e de luz polarizada.

“A grande falha dos educadores é nunca lembrarem que eles também foram crianças.”

Jacques De Lacretelle (1888)

4. *Material e método*

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) machos, adultos jovens com peso corporal de aproximadamente 300 gramas. Os animais dessa pesquisa foram cedidos pelo Biotério Central de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, e mantidos durante o período experimental no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Figura 1). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, constando na mesma o processo n^o 062/2004 (Anexo 1).

Todo instrumental cirúrgico desse experimento foi autoclavado a 121^oC por 20 minutos (Figura 2). As cirurgias foram realizadas em fluxo laminar, cujo local, foi previamente descontaminado com álcool 70^o e luz ultravioleta por 30 minutos (Figura 3).

Os animais foram anestesiados via intramuscular com Ketamina*, na dose de 0,1 ml/100 gramas de peso corporal, associado com o relaxante muscular Cloridrato de Tiazina** na dose de 0,01 ml/ 100 gramas de peso corporal (Figura 4).

Foi realizada depilação na superfície da base da mandíbula de cada animal e, em seguida a anti-sepsia local com detergente de mamona***, incisão de 2,0 cm com auxílio de tesoura reta (Figura 5), rebatimento da pele, músculo, periósteo, e exposição do osso da

* Ketamina Agener (Ketamina – 10%)- 10ml - uso veterinário. Agener União.

** Rompum® 2%- 10ml - uso veterinário. Bayer S. A.

*** Poliquil Germ – Poliquil – Araraquara – SP.

mandíbula (Figura 6). Um defeito em forma de canaleta com dimensões aproximadas de 4,0 mm de profundidade e 10 mm de comprimento foi confeccionado, utilizando-se micromotor* em baixa rotação (Figura 7) e fresa cilíndrica de aço nº58. Durante a confecção do defeito ósseo o local foi irrigado constantemente com solução fisiológica esterilizada (Figura 8). Os animais com os defeitos confeccionados, foram divididos eqüitativamente em 4 grupos submetidos aos seguintes procedimentos operatórios:

G.I- Grupo Controle ⇒ 15 animais não receberam qualquer tratamento.

O perióstio foi reposicionado sobre o defeito e suturado.

G.II - Grupo Experimental com estimulação Laser ⇒ 15 animais receberam apenas estimulação a laser na área do defeito. O perióstio foi reposicionado sobre o defeito e suturado.

G.III - Grupo Experimental com Biomateriais ⇒ 15 animais receberam preenchimento com resina de ácido ricinoléico particulada acrescido da proteína óssea morfogenética (BMP-HA), na proporção de (10:1) respectivamente, na área do defeito. A quantidade de material introduzido no leito cirúrgico foi de aproximadamente 7mg. O perióstio foi reposicionado sobre o defeito e suturado.

* Micromotor Beltec (LB-100) – Araraquara – SP.



Fig.1 - Biotério



Fig.2 - Instrumental



Fig.3 - Fluxo Laminar



Fig.4 - Anestesia



Fig.5 - Região de incisão



Fig.6 - Osso da mandíbula



Fig.7 - Confeção do defeito



Fig.8 - Defeito confeccionado



Fig.9 - Aparelho Laser

G.IV - Grupo Experimental com estimulação Laser e Biomateriais ⇒

15 animais receberam estimulação a laser na área do defeito e preenchimento com resina de ácido ricinoléico particulada acrescido da proteína óssea morfogenética (BMP-HA), na proporção de (10:1) respectivamente. A quantidade de material utilizado introduzido no leito cirúrgico foi de aproximadamente 7mg. O perióstio foi reposicionado sobre o defeito e suturado.

Nos grupos experimentais GII-laser e GIV-laser associado a biomateriais utilizou-se a Unidade Laser de baixa intensidade *Laser Beam Multi Laser DR 500** (Figura 9) com as seguintes especificações: laser de diodo (semicondutor) com meio ativo de Arseneto de Gálio-Alumínio, infravermelho, comprimento de onda de 785nm, potência de emissão de 50mW (nominal). A densidade de energia foi ajustada para 2 Joules por centímetro quadrado (2 J/cm^2) modo automático do aparelho, com emissão contínua aplicada por intermédio de uma ponta de fibra óptica de 1mm de diâmetro, uma única vez no centro de cada defeito ósseo dos grupos GII e GIV (Figura 10). Após os ajustes dos parâmetros físicos do aparelho foi realizada uma aferição da potência de emissão real com auxílio de um medidor de potência**, na qual foi medida a emissão da ponta de fibra óptica acoplada ao laser. Determinou-se a potência de 35mW (real). Então recalculado a dose e

* Laser Beam, Indústria e Tecnologia Ltda., Niterói - RJ – Brasil.

** FIELD MASTER - Coherent - Palo Alto - CA - USA

energia foram obtidos os seguintes parâmetros reais: $\lambda = 780\text{nm}$; $P = 35\text{mW}$; $T = 40\text{ s}$; $\Theta = 1,0\text{mm}$; $D = 178\text{J}/\text{cm}^2$; $E = 1,4\text{ J}$.

Nos grupos G.III e G.IV, os biomateriais utilizados para o preenchimento do defeito ósseo foram a resina do ácido ricinoléico particulada*, acrescida de proteína óssea morfogenética (BMP-HA)** (Figura 11).

O material foi introduzido no leito ósseo receptor utilizando-se instrumentos manuais especiais de pequeno diâmetro*** a fim de padronizar a quantidade de material.

Após o reposicionamento do periósteo sobre o defeito ósseo, tanto músculo masseter internamente, quanto a região de incisão foram suturadas com fio de poliglactina**** (Figuras 12 e 13). Realizou-se a anti-sepsia final com detergente de mamona. Os animais foram mantidos isolados em gaiolas individuais durante todo o período experimental em boas condições de alimentação, com ração e água *ad libitum*, temperatura controlada, iluminação e higiene adequadas. Ressalta-se que logo após a cirurgia, os animais foram submetidos a uma dieta especial a base de papa de fubá, durante três dias, para evitar o trauma oclusal sobre a ferida cirúrgica.

* Resina do ácido ricinoléico particulada (Aug-Ex) - granulação máxima $290\mu\text{m}$. Poliquil-Araraquara.

** BMP- Proteína Morfogenética Óssea Bovina - Gen-pro® 0,5cc - Baumer - Mogi Mirim.

*** Instrumento manual – colher de dentina – *Stainless Guth 3*.

**** Fio de sutura absorvível sintética (poliglactina), e agulha de sutura E-15. VICRYL 4.0 - ETHICON

Os períodos de sacrifício, para todos os grupos experimentais, foram 15, 45 e 60 dias pós-cirurgia.

A Tabela 2 ilustra como foram subdivididos os grupos em função do procedimento e do período de análise.

Tabela 2 – Identificação dos grupos e subgrupos do estudo

Grupos	Subgrupos	N	Procedimento
Controle	C15/C45/C60	15	Controle
LASER	L15/L45/L60	15	Laser (D= 178J/cm ² ; E= 1,4 J)
Biomateriais	B15/B45/B60	15	Aug-EX [®] + Gen-Pro [®]
LASER + Biomateriais	LB15/LB45/LB60	15	Laser (D= 178J/cm ² ; E= 1,4 J) + Aug-EX [®] + Gen-Pro [®]

Decorridos os períodos após a cirurgia, os animais foram sacrificados humanamente por meio de dose excessiva de anestésico* via intraperitoneal. As mandíbulas foram removidas com técnica cirúrgica apropriada e fotografadas com auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss (Citoval) com aumento aproximado de 20 vezes (Figura 14). O material foi fixado em formol de Lilly tamponado durante 96 horas. Em seguida descalcificado em solução de Morse durante 30 dias com troca da solução a cada 3 dias, e as peças permaneceram em cassetes plásticos a fim de impedir o contato do material com a superfície do frasco, facilitando a

* Hidrato de cloral (10%)

descalcificação. Após a descalcificação o material foi neutralizado em sulfato de sódio a 5% por 24 horas, lavado em água corrente por 10 minutos e, em seguida, desidratado numa seqüência de álcoois crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto). A seguir, diafanização em xilol e finalmente embebidos e incluídos em parafina pela metodologia de rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Foi utilizado nessas etapas o aparelho Histolab ZX-110 para o processamento laboratorial e para inclusão o Centro de Inclusão Modular.

O material assim processado foi cortado em micrótomo* com cortes semi-seriados de 6µm de espessura, utilizando lâminas descartáveis. O plano de secção dos cortes foi transversal em relação à lesão no ângulo da mandíbula.

As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas para posterior coloração. Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E) para a análise morfológica; em Tricrômico de Masson (TM) a fim de evidenciar a neoformação óssea frente ao polímero do ácido ricinoléico particulado, a hidroxiapatita e o colágeno existente no tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado do local; e em Picro Sirius (PS) para análise do grau de amadurecimento do colágeno por polarização. Os estudos histológicos foram analisados em microscópio óptico comum (Figura 15), e em microscopia de polarização (Figura 16).

* Micrótomo Rotatório modelo HM 325 – MICROM.

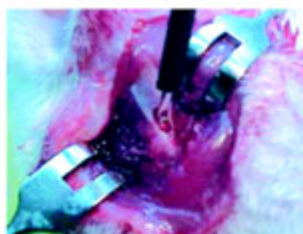


Fig.10 - Aplicação Laser



Fig.11 - Defeito com biomateriais



Fig.12 - Sutura interna



Fig.13 - Sutura externa



Fig.14 - Lupa



Fig.15 - Microscópio comum



Fig.16 - Microscópio polarização

Análise Histológica

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico comum* e de luz polarizada**, analisando os seguintes eventos: **1) grau de inflamação; 2) formação e qualidade do tecido ósseo; 3) grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia)**, de acordo com a birrefringência obtida pela luz polarizada em microscopia de polarização. Estes eventos foram codificados em escores como descritos abaixo na forma de tabelas:

Tabela 3 – Escore do grau de inflamação

Escore	Caracterização
1	Ausência de células inflamatórias.
2	Moderada presença de células inflamatórias.
3	Intensa presença de células inflamatórias.

adaptado ISO, 7405-1997

* Microscópio óptico Zeiss, modelo Jenaval.

** Microscópio óptico Zeiss, modelo Docuval acoplado com sistema de filtros de polarização.

Tabela 4 – Escore da formação e qualidade do tecido ósseo

Escore	Caracterização
1	Neoformação tecidual (preenchimento do defeito com tecido conjuntivo contendo capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e neoformação fibras colágenas).
2	Tecido conjuntivo denso sugerindo a diferenciação para tecido ósseo com presença de muitas células e fibras em processo de organização.
3	Neoformação óssea, na qual o tecido conjuntivo encontra-se em processo de diferenciação formando matriz óssea, ou osteon.
4	Presença de tecido ósseo.

Adaptado de DAHLIN, et al., 1988 e HEDNER E LINDE, 1995

Tabela 5 – Escore do grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia) e densidade mineral do tecido

Escore	Caracterização
1	Nenhum sinal de união óssea, preenchimento do leito com tecido conjuntivo – isotropia (ausência de birrefringência).
2	Osteon (Formação do tecido conjuntivo em osso com células osteoprogenitoras e osteogênicas) – anisotropia baixa.
3	Espículas isoladas de osso imaturo – anisotropia moderada.
4	Formação de osso compacto – anisotropia intensa (polarização total).

Adaptado de MARKEL, et al., 1991

Para avaliar semi-quantitativamente os escores e facilitar seu entendimento foram realizadas fotomicrografias de cada evento descrito acima. Assim temos:

Escores histológicos

Grau de Inflamação

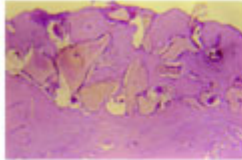


Figura - 17
Escore 1

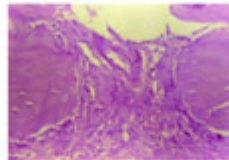


Figura - 18
Escore 2

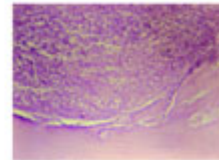


Figura - 19
Escore 3

Formação e Qualidade do tecido ósseo

Figura - 20
Escore 1

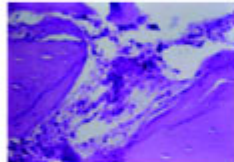


Figura - 21
Escore 2

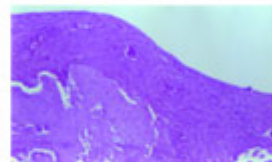


Figura - 22
Escore 3

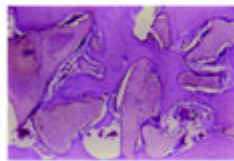
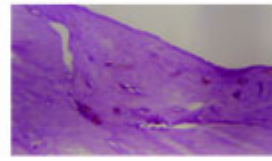


Figura - 23
Escore 4



Amadurecimento das fibras colágenas (anisotropia óssea)

Figura - 24
Escore 1

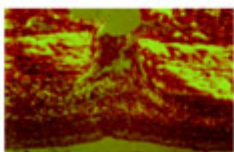


Figura - 25
Escore 2

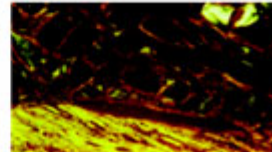


Figura - 26
Escore 3

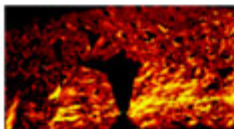
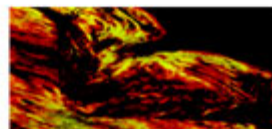


Figura - 27
Escore 4



Tratamento estatístico dos resultados

Os dados obtidos a partir da codificação dos resultados morfológicos foram tratados estatisticamente através de testes não paramétricos. Consideramos para cada espécime três eventos histológicos: 1) grau de inflamação; 2) formação e qualidade do tecido ósseo; 3) grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia). Essas variáveis correspondentes às alterações detectáveis em cada um dos quatro grupos experimentais: GI–controle; GII-laser; GIII-biomateriais; GIV-laser mais biomateriais. Foi utilizado o programa BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2003) para realização do teste Kruskal-Wallis com finalidade de comparar os grupos. E uma vez detectada diferença estatisticamente significativa, o teste de Mann-Whitney U para comparação dois a dois com o objetivo de identificar qual grupo apresenta a diferença. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

“O coração tem suas razões que a razão não conhece.”

Pascal (1623-1662)

5. Resultados

Os resultados encontrados neste trabalho serão expostos de duas maneiras:

Resultados mesoscópicos, subdivididos por períodos de estudo, obtidos a partir da análise das fotomicrografias das mandíbulas após o sacrifício dos animais, através de lupa estereoscópica com aumento médio de 20x.

Resultados histológicos, subdivididos dos grupos estudados, obtidos pela análise semi-seriada das lâminas com diferentes colorações histológicas: Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson e Picro Sirius, através do microscópio óptico e de polarização.

5.1 Resultados Mesoscópicos

Aos 15 dias, o grupo controle (Figura 28), apresenta a formação de um tecido fibrótico sobre o defeito, sugerindo uma invaginação de tecidos adjacentes no leito devido à descontinuidade do mesmo sobre o defeito.

No grupo laser (Figura 29), apresenta um tecido mole de preenchimento abaulado e circunscrito no defeito em continuidade com o leito cirúrgico. No grupo de biomateriais (Figura 30) são visíveis as partículas do polímero do ácido ricinoléico em meio a um tecido mole e transparente, que preenche o leito cirúrgico. O grupo laser associado aos biomateriais (Figura 31), apresenta característica semelhante ao grupo de biomateriais, porém as partículas aparecem mais unidas dando aspecto de uma maior compactação com o tecido que está envolvendo as mesmas.

Aos 45 dias, o grupo controle (Figura 32), mostra a presença de uma cápsula fibrótica delimitando toda a lesão, com características de um tecido de preenchimento. O grupo laser (Figura 33) diferentemente do controle aos 45 dias, apresenta formação óssea parcial com presença de vascularização. No grupo de biomateriais (Figura 34) o leito cirúrgico surge totalmente preenchido com partículas do polímero do ácido ricinoléico entrepostas a um fino tecido, que proporcionam sustentação às partículas no leito receptor. E o grupo laser associado aos biomateriais (Figura 35) apresenta característica de formação óssea, porém um osso

trabeculado com presença de capilares sanguíneos, em meio às partículas de biomateriais preenchendo o mesmo.

O período final de 60 dias, o grupo controle se apresenta totalmente reparado, porém com descontinuidade entre o defeito reparado e o tecido ósseo adjacente (Figura 36). Por outro lado, o grupo do laser apresenta-se totalmente preenchido por tecido ósseo com presença de inúmeros capilares sanguíneos. O leito cirúrgico encontra-se em íntimo contato com o osso adjacente (Figura 37). No grupo de biomateriais ainda é nítida a presença das partículas no interior do leito. O biomaterial está em meio ao tecido ósseo neoformado (Figura 38). E o grupo do laser com biomateriais, há também a presença dos biomateriais, porém em menor quantidade quando comparado ao grupo somente com biomateriais. O defeito não se encontra totalmente reparado (Figura 39).

Período de 15 dias

5.1 Resultados Mesoscópicos

Período de 15 dias

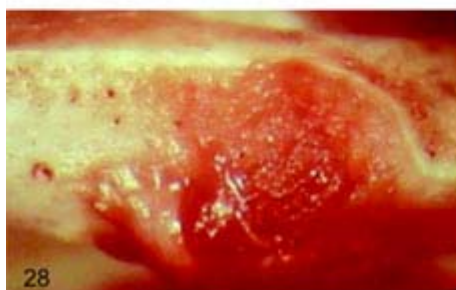


Figura 28 - GI-15dias : Tecido fibrótico sobre o defeito ósseo - 20x.

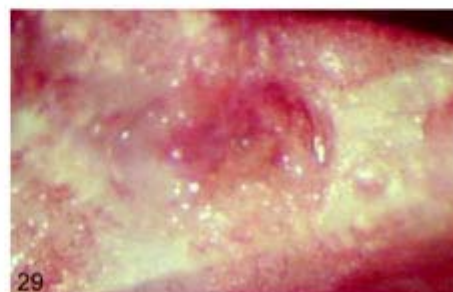


Figura 29 - GII-15dias : Formação de tecido abaulado e circunscrito a lesão - 20x.

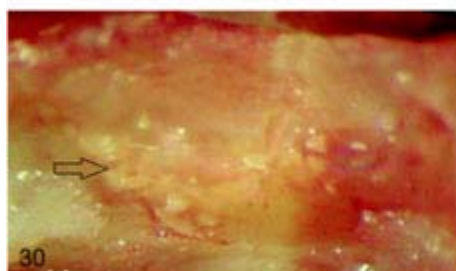


Figura 30 - GIII-15dias : Presença de partículas do polímero em meio a tecido neoformado - 20x. ⇨

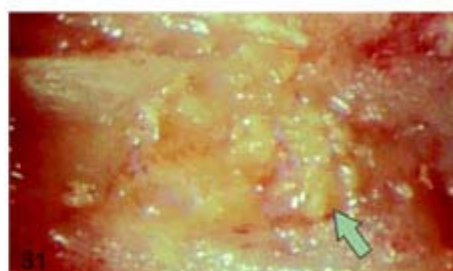


Figura 31 - GVI-15dias : Partículas do polímero entreposta ao tecido conjuntivo recém formado - 20x. ↵

Período de 45 dias

Período de 45 dias

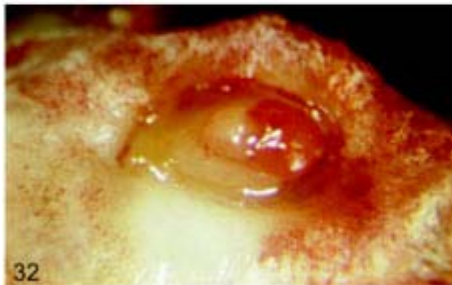


Figura 32 - GI-45dias : Presença de cápsula fibrótica delimitando toda a lesão - 20x.

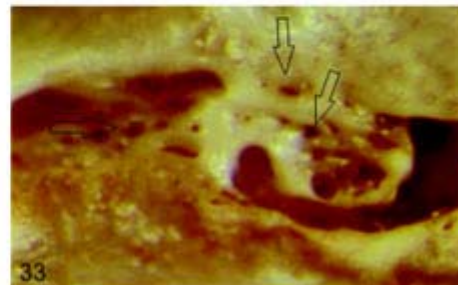


Figura 33 - GII-45dias : Formação parcial de tecido ósseo. Presença de capilares sanguíneos - 22x. ⇔

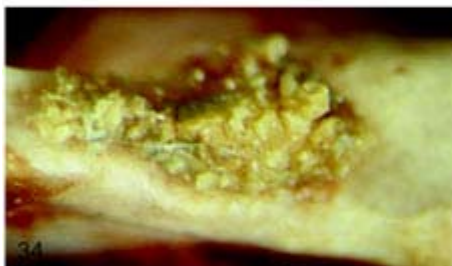


Figura 34 - GIII-45dias : Leito cirúrgico totalmente preenchido por partículas do polímero associado à hidroxiapatita - 20x.

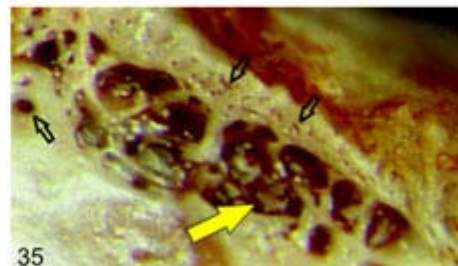


Figura 35 - GVI-45dias : Osso trabeculado com cortical compacta. Presença dos biomateriais ↘ e inúmeros capilares sanguíneos - 22X. ↗

Período de 60 dias

Resultados

80

Período de 60 dias

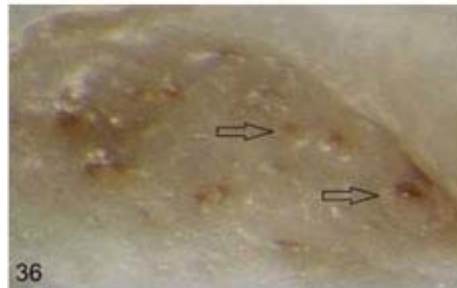


Figura 36 - GI-60dias : Defeito totalmente preenchido por tecido ósseo. Presença de poucos capilares sanguíneos - 20x. ⇨



Figura 37 - GII-60dias : Defeito totalmente preenchido com presença de inúmeros capilares sanguíneos - 20x. ⇨

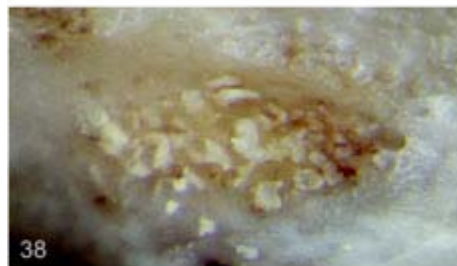


Figura 38 - GIII-60dias : Biomateriais entrepostos ao tecido ósseo neoformado - 20x.

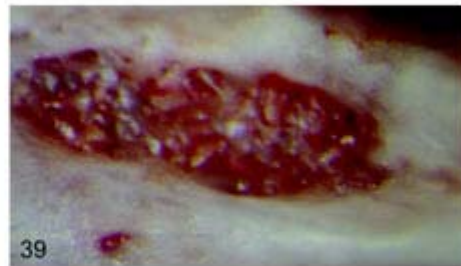


Figura 39 - GVI-60dias : Defeito em processo de cicatrização com presença de biomateriais entroposto ao tecido ósseo neoformado - 20X.

5.2 Resultados Histológicos

Previamente à descrição dos resultados será descrito as tabelas dos resultados das variáveis, apresentando a posição de cada espécime nos escores determinados. Juntamente com as tabelas serão apresentados seus respectivos gráficos. Os gráficos mostram a mediana de cada grupo ilustrando apenas um resultado.

15 Dias

Tabela 6 - Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para grau de inflamação no período de 15 dias

Grau de Inflamação (1,2,3) - 15 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	3	1	2	1
II	3	2	2	1
III	2	1	1	2
IV	2	1	2	1
V	3	1	2	2
Mediana	3	1	2	1

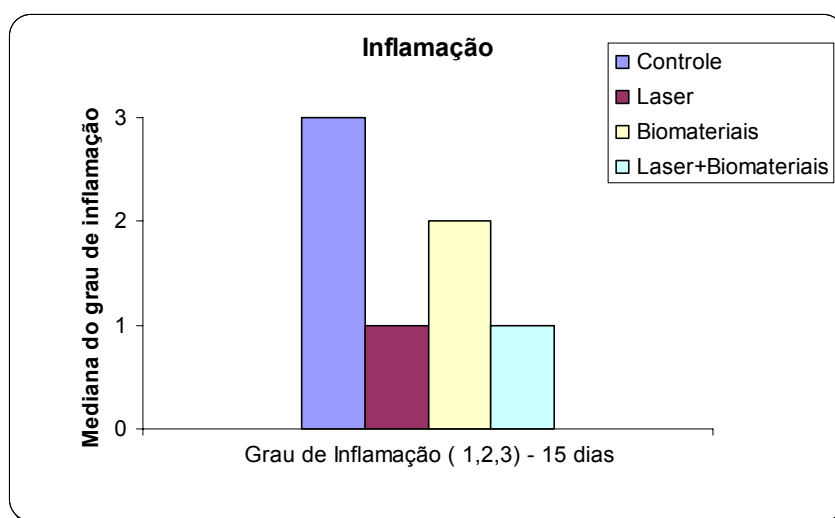


GRÁFICO 1 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau de inflamação no período de 15 dias.

Tabela 7 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para formação e qualidade do tecido ósseo no período de 15 dias

Formação e qualidade do tecido ósseo (1,2,3,4) - 15 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	1	2	1	1
II	1	1	1	1
III	1	2	1	1
IV	1	2	1	1
V	1	2	1	1
Mediana	1	2	1	1

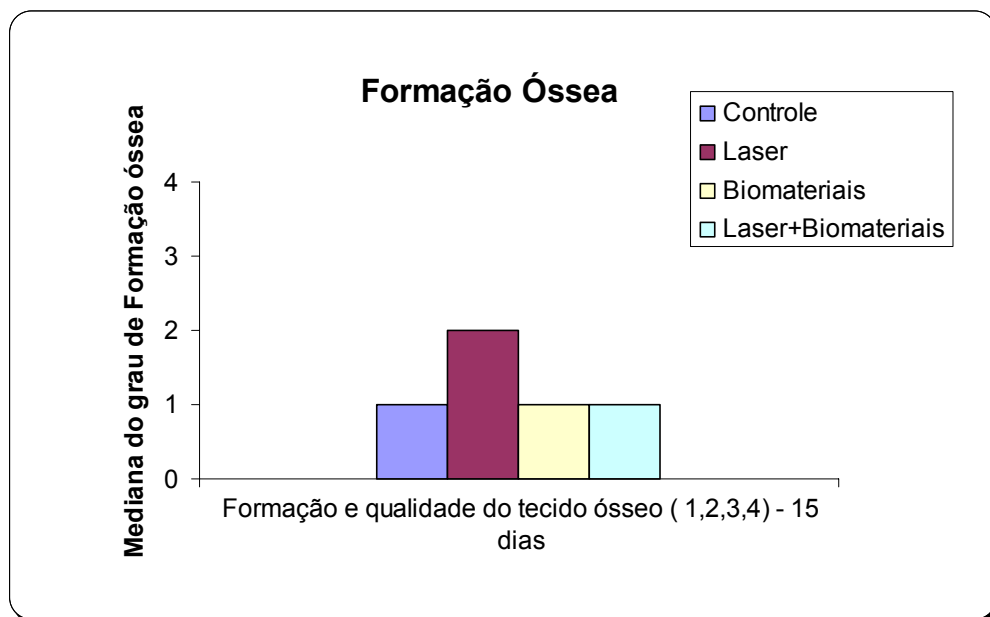


GRÁFICO 2 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau na formação e qualidade do tecido ósseo no período de 15 dias.

Tabela 8 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para amadurecimento do colágeno no período de 15 dias

Grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia)(1,2,3,4) - 15 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	1	2	1	2
II	1	2	1	2
III	1	2	1	2
IV	1	2	2	1
V	1	2	1	2
Mediana	1	2	1	2

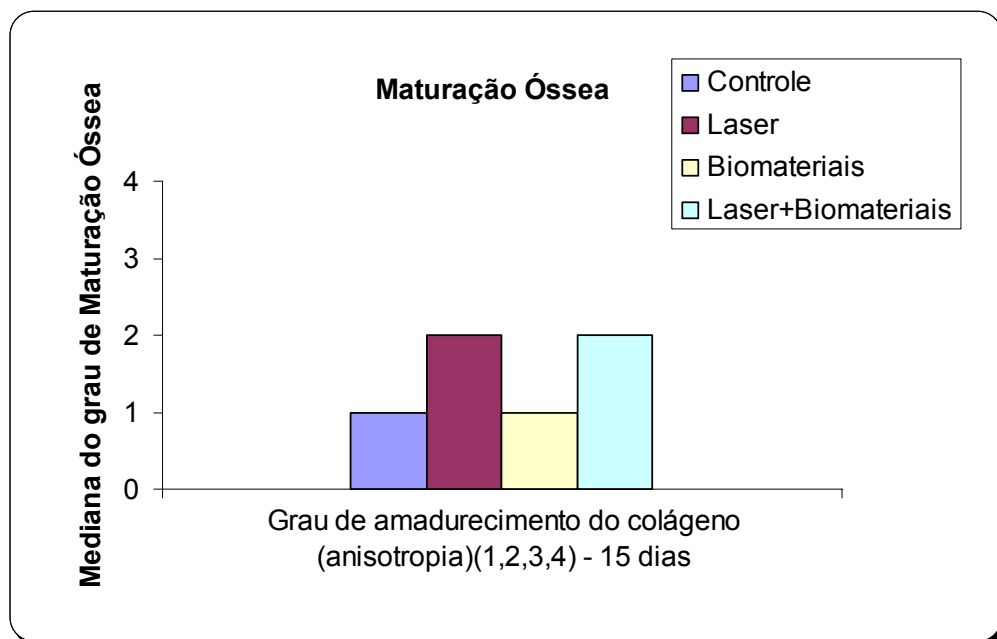


GRÁFICO 3 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau do amadurecimento do colágeno no período de 15 dias.

Controle

No período inicial de 15 dias, todos os espécimes encontram-se preenchidos por tecido conjuntivo desorganizado com presença de fina rede de fibrina composta por células sanguíneas, fibroblastos, macrófagos, e células em processo de degeneração (Figuras 40 e 41). Foi evidenciado nesse grupo pela análise histológica três espécimes com intensa reação inflamatória, e dois espécimes com moderada reação (Figura 42). Em nenhuma amostra há sinal de união óssea, e maturação das fibras colágenas. As fibras dispostas aleatoriamente são visualizadas em microscopia de polarização com ausência de birrefringência, ou seja, isotropia das fibras colágenas(Figura 43).

Controle

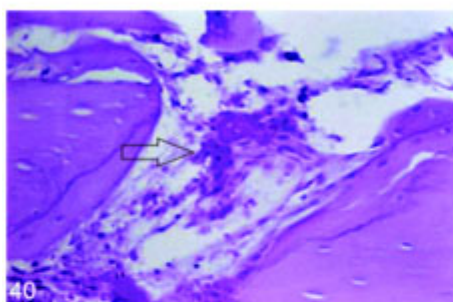


Figura 40 - GI-15dias : Desorganização tecidual com presença de tecido necrótico e células em processo de degeneração. \Rightarrow H&E - \pm 125X.

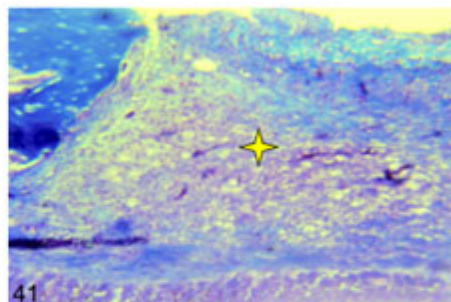


Figura 41 - GI-15dias : Células em degeneração. Tecido amorfo preenchendo o leito cirúrgico. \star TM - \pm 100 X.

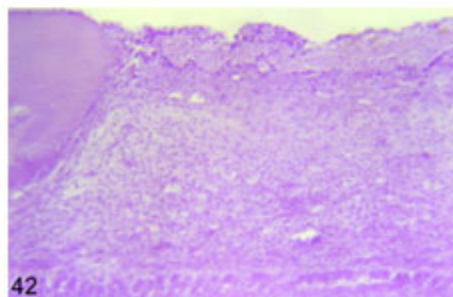


Figura 42 - GI-15dias : Presença de infiltrado inflamatório intenso de células polimorfonucleares. H&E - \pm 100X.

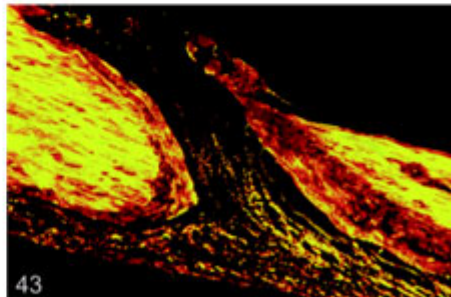


Figura 43 - GI-15dias : Ausência de birrefringência das fibras colágenas. PS - \pm 150 X.

Laser

Aos 15 dias verifica-se o preenchimento total do defeito com tecido conjuntivo denso tocando as superfícies laterais do leito. Em quatro espécimes há ausência de inflamação, e um deles apresenta inflamação moderada (Figura 44). Foi encontrado também um grande número de fibroblastos, osteoblastos em diferenciação produzindo fibras colágenas intrínsecas em meio ao grande número de osteócitos preenchendo grandes lacunas no interior da matriz orgânica óssea (Figuras 45 e 46). Pelo Picro sirius verificamos a birrefringência inicial das fibras colágenas caracterizando um osteon, e o tecido conjuntivo denso composto por grande quantidade de capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras. Verifica-se anisotropia baixa das fibras colágenas (Figura 47).

LASER

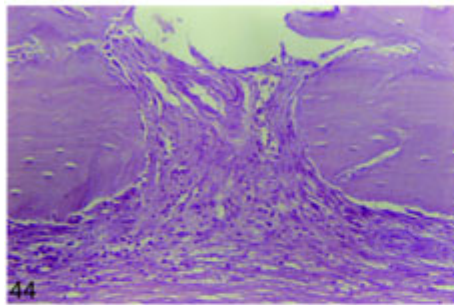


Figura 44 - GII-15dias : Presença de infiltrado inflamatório moderado. Tecido conjuntivo preenchendo o leito cirúrgico. H&E - \pm 230X.

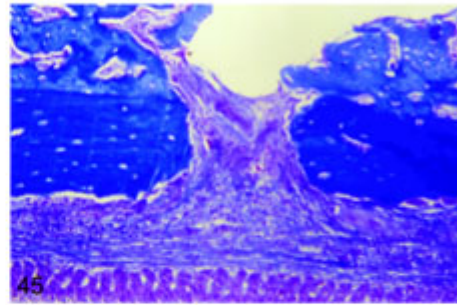


Figura 45 - GII-15dias : Tecido conjuntivo denso preenchendo o leito cirúrgico. TM - \pm 200 X.

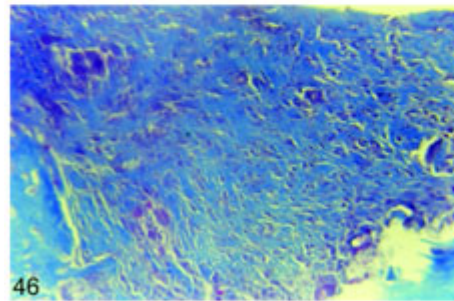


Figura 46 - GII-15dias : Tecido conjuntivo denso e matriz orgânica. Presença de inúmeros fibroblastos. TM - \pm 230X.

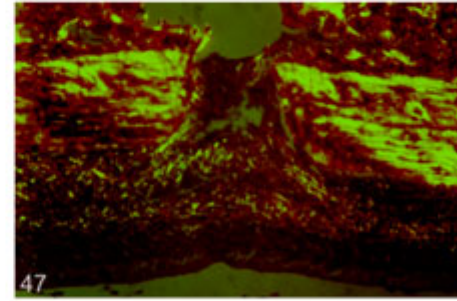


Figura 47 - GII-15dias : Birrefringência moderada das fibras colágenas. PS - \pm 200 X.

Biomateriais

Aos 15 dias os cortes histológicos mostram uma inflamação moderada em quatro espécimes com preenchimento de tecido conjuntivo no leito cirúrgico (Figuras 48 e 49). E em apenas um espécime ausência de inflamação. Todos os espécimes apresentam ausência de tecido ósseo. Entre as partículas do polímero do ácido ricinoléico verifica-se a neoformação de matriz constituída por tecido conjuntivo denso, e ainda verificamos íntimo contato entre as partículas e as células do tecido (Figura 50). Na análise por polarização verificamos as partículas do ácido ricinoléico, que são isotrópicas em íntimo contato com o tecido conjuntivo neoformado. Enquanto que as fibras colágenas aparecem com anisotropia baixa e em início de modelação ao redor das partículas do polímero (Figura 51).

BIOMATERIAIS

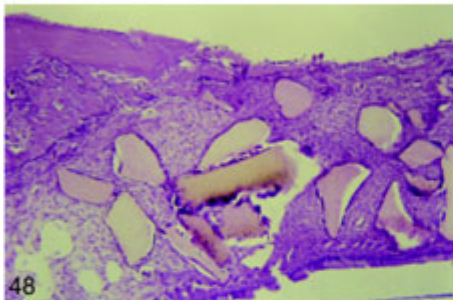


Figura 48 - GIII-15dias : Partículas do polímero rodeadas por tecido conjuntivo denso.
H&E - \pm 100X

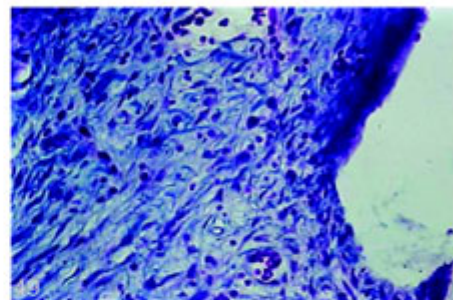


Figura 49 - GIII-15dias : Inflamação moderada no tecido preenchido por biomateriais.
TM - \pm 250 X.

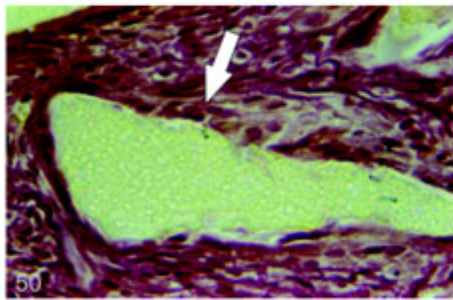


Figura 50 - GIII-15dias : Células do conjuntivo rodeando as partículas do polímero do ácido ricinoléico. \swarrow
PS - \pm 580X.

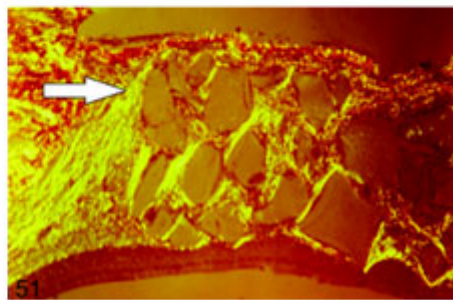


Figura 51 - GIII-15dias : Anisotropia moderada das fibras ao redor das partículas de polímero do ácido ricinoléico.
PS - \pm 100 X. \Rightarrow

Laser + Biomateriais

Nesse período inicial verificamos o leito totalmente preenchido pelos biomateriais em contato com tecido conjuntivo, presença de muitas células, capilares sanguíneos e uma linha reversa de crescimento no fundo da cavidade, em meio a inúmeros osteoblastos (Figura 52). Das cinco amostras, em três espécimes foi verificada moderada inflamação e em dois espécimes ausência de inflamação. Ao redor das partículas do polímero verificamos grande quantidade de células, dentre as quais, fibroblastos e osteoblastos (Figura 53). Um evento histológico observado é a diferença no tamanho, e no formato das partículas do polímero do ácido ricinoléico e da hidroxiapatita. Verifica-se também uma resposta tecidual diferente entre as duas partículas (Figura 54). Na análise por polarização da coloração de picro sirius, em quatro espécimes quantificamos escore grau 2, que denota anisotropia baixa (Figura 55), e um espécime com escore 1.

LASER + BIOMATERIAIS

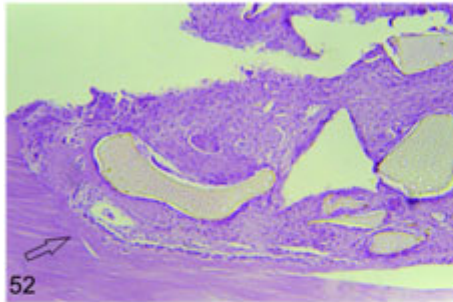


Figura 52 - GIV-15dias : Tecido denso rico em células e capilares. Presença de linha de crescimento com presença de células no fundo da cavidade \blackrightarrow .
H&E - \pm 120X.

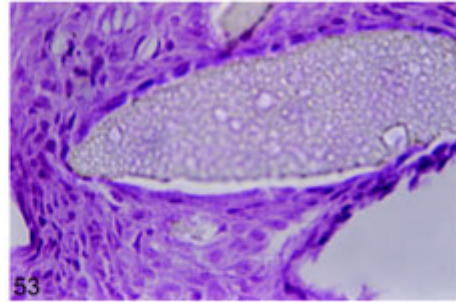


Figura 53 - GIV-15dias : Células do conjuntivo rodeando a partícula do polímero do ácido ricinoléico.
H&E - \pm 460 X.

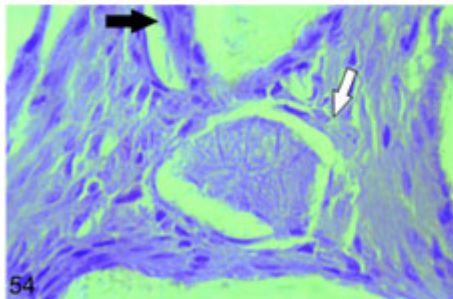


Figura 54 - GIV-15dias : Partícula de hidroxiapatita rodeada por células. \blackrightarrow Partícula do polímero do ácido ricinoléico em íntimo contato com células do conjuntivo. \blackrightarrow
H&E - \pm 460X.

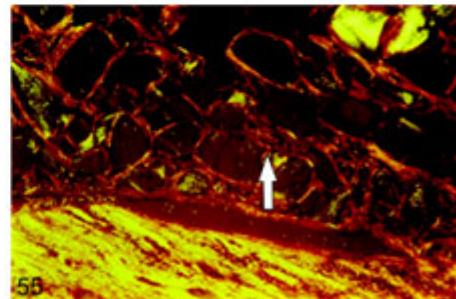


Figura 55 - GIV-15dias : Anisotropia baixa das fibras colágenas. Defeito preenchido com partículas em meio a matriz orgânica.
PS - \pm 120 X. \uparrow

45 Dias

Tabela 9 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para grau de inflamação no período de 45 dias

Grau de Inflamação (1,2,3) - 45 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	2	2	1	1
II	2	1	1	1
III	2	1	1	1
IV	2	1	2	2
V	2	1	2	1
Mediana	2	1	1	1

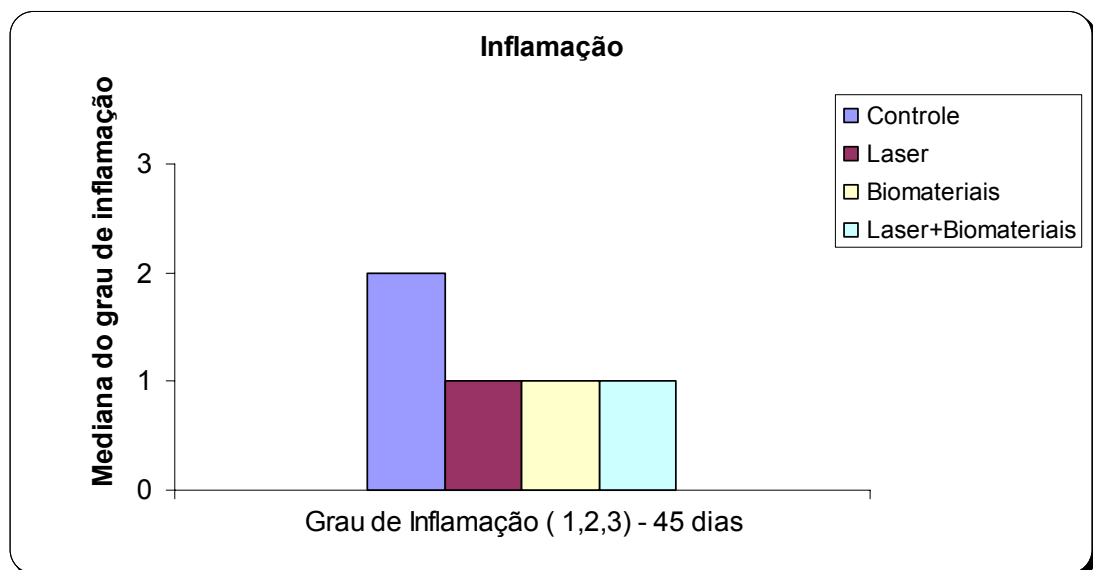


GRÁFICO 4 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau inflamação no período de 45 dias.

Tabela 9 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para formação e qualidade do tecido ósseo no período de 45 dias

Formação e qualidade do tecido ósseo (1,2,3,4) - 45 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	2	3	2	3
II	1	3	3	3
III	3	3	3	3
IV	2	3	2	3
V	2	3	2	3
Mediana	2	3	2	3

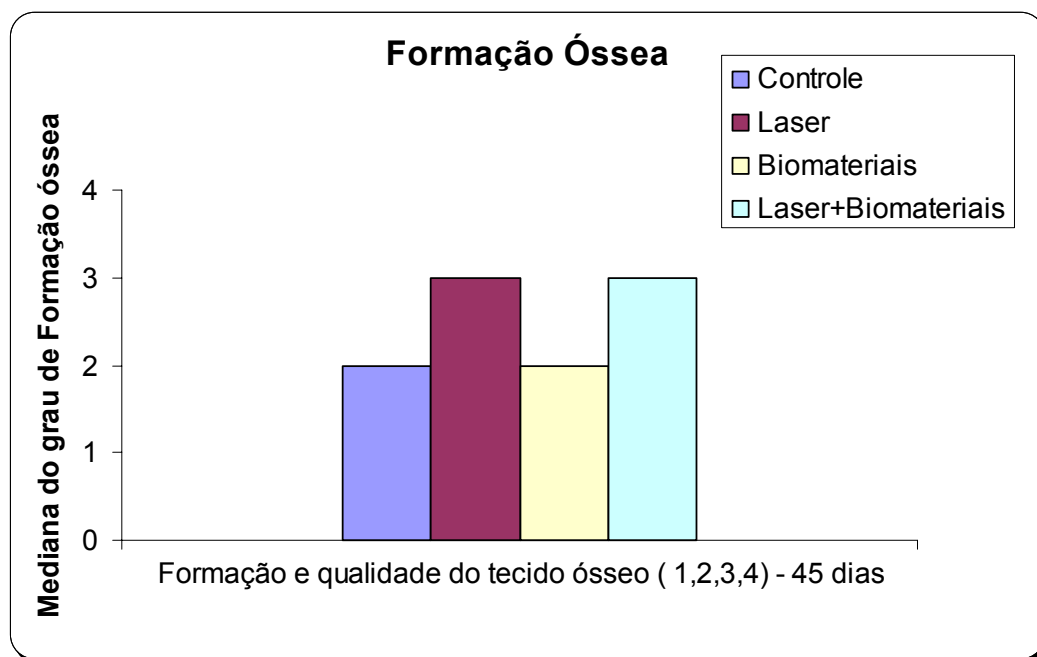


GRÁFICO 5 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana da formação e qualidade do tecido ósseo no período de 45 dias.

Tabela 10 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para o grau de amadurecimento do colágeno no período de 45 dias

Grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia) (1,2,3,4) - 45 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	3	3	2	3
II	2	3	2	3
III	3	3	3	3
IV	2	3	2	3
V	2	3	3	2
Mediana	2	3	2	3

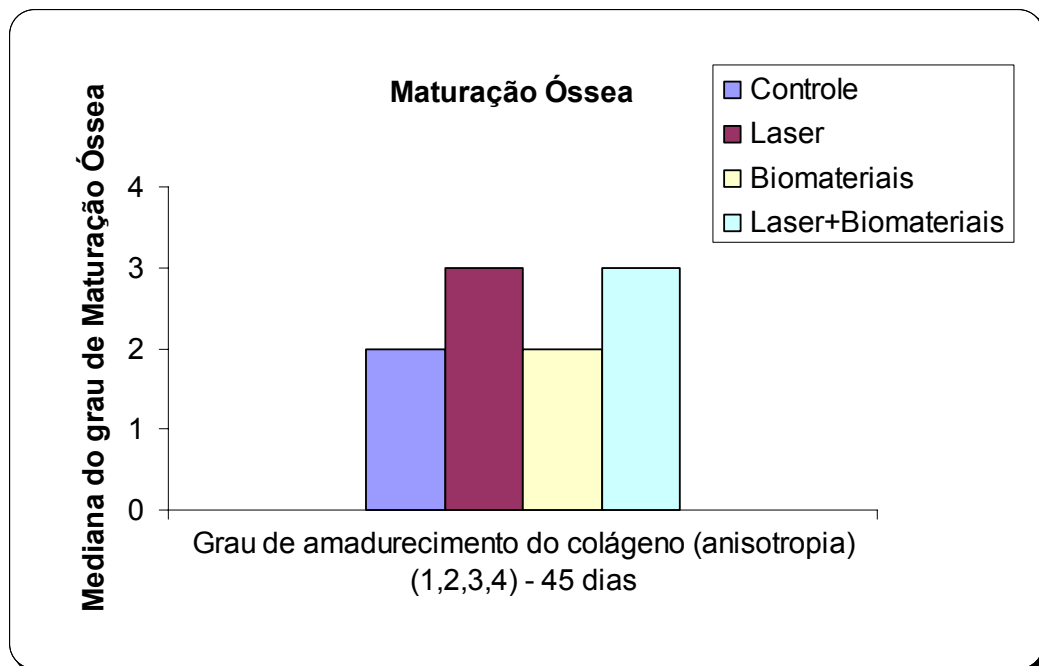


GRÁFICO 6 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana o grau de amadurecimento do colágeno no período de 45 dias.

Controle

Aos 45 dias o grupo controle apresenta o defeito parcialmente preenchido com tecido ósseo em formação constituído por numerosos osteoblastos se diferenciando em osteócitos formando várias camadas. Os cinco espécimes ainda apresentam moderada inflamação (Figura 56). E três desses cinco evidenciam a formação de osteon com grande quantidade de células (Figura 57). Há a presença de grandes espaços medulares (Figura 58). Pelo picro sirius observa-se a formação de tecido ósseo na porção inferior do leito cirúrgico, onde também observamos a presença de uma camada de osso recém formada (Figura 59). Verifica-se ainda em 2 espécimes uma moderada anisotropia das fibras colágenas.

CONTROLE

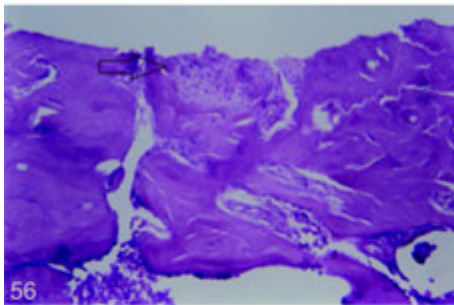


Figura 56 - GI-45dias : Preenchimento parcial do defeito ósseo. Presença de reação inflamatória moderada \Rightarrow . H&E - \pm 180X.

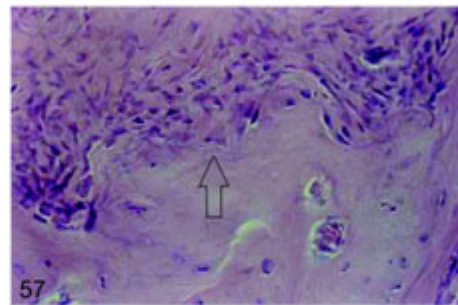


Figura 57 - GI-45dias :Linha reversa de crescimento. Matriz rica em células \uparrow . H&E - \pm 500 X.

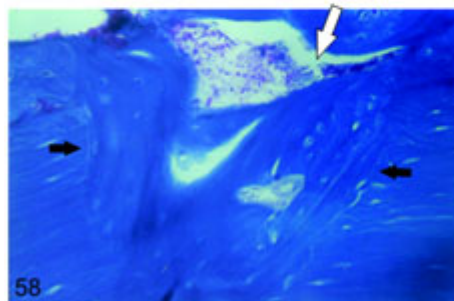


Figura 58 - GI-45dias : Presença de grandes espaços medulares. \uparrow Interface leito e osso neoformado \Rightarrow . TM - \pm 300X.



Figura 59 - GI-45dias : Anisotropia moderada da fibras colágenas. Artefato ilustrando separação de osso neoformado do leito cirúrgico \Rightarrow . PS - \pm 175 X.

Laser

Aos 45 dias resta um pequeno espaço a ser substituído pelo osso neoformado. Em quatro das cinco amostras há ausência de inflamação. E todos os espécimes apresentaram neoformação óssea com o defeito praticamente preenchido por tecido ósseo (Figura 60). Constatou-se também a formação de osso secundário com a presença de lamelas em locais isolados do leito cirúrgico (Figura 61). É bem evidente nesse período a grande quantidade de capilares sanguíneos facilitando o processo de reparação óssea (Figura 62). Pelo picro sirius percebe-se que o tecido ósseo já apresenta lamelas concêntricas evidenciando maturidade óssea. Essa maturidade é observada devido a disposição concêntrica das fibras colágenas, formando assim lamelas. Percebe-se ainda, uma linha de cimentação entre o leito receptor e a reparação óssea. Todos os espécimes apresentam anisotropia moderada (Figura 63).

LASER

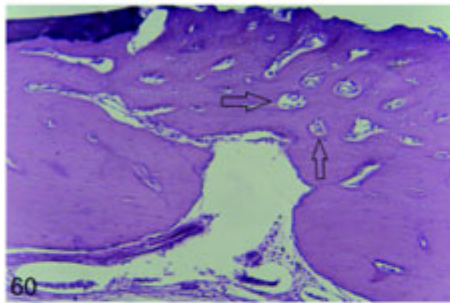


Figura 60 - GII-45dias : Preenchimento do defeito com tecido ósseo neoformado. Presença de muitos capilares sanguíneos. H&E - \pm 180X \Rightarrow .

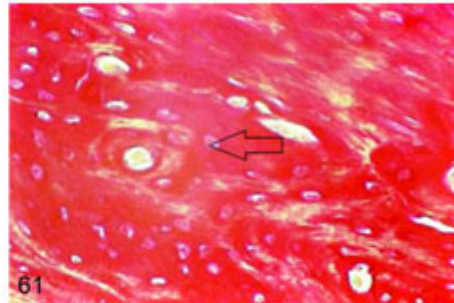


Figura 61 - GII-45dias : Presença de lamelas ósseas concêntricas. Osso secundário \Leftrightarrow . PS - \pm 580 X.

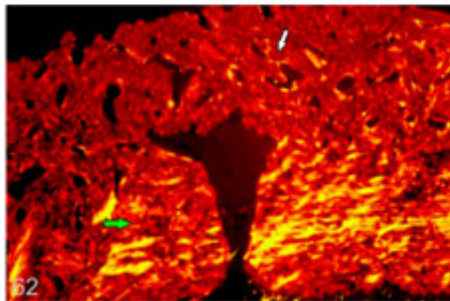


Figura 62 - GII-45dias : Preenchimento do defeito com tecido ósseo neoformado. Visualiza-se a diferença de anisotropia do leito cirúrgico (alta anisotropia \rightarrow) e do osso neoformado (moderada anisotropia β). PS - \pm 300X.

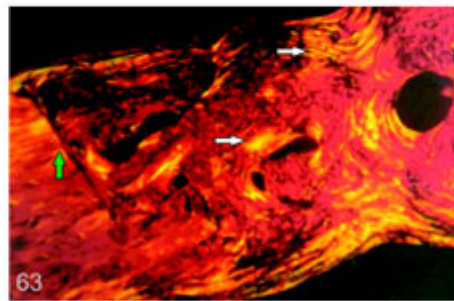


Figura 63 - GII-45dias : Anisotropia moderada da fibras colágenas. Fibras colágenas organizadas concentricamente \Leftrightarrow . Interface leito cirúrgico e osso neoformado \rightarrow . PS - \pm 175 X.

Biomateriais

As fibras colágenas estão em processo de amadurecimento, mudando a sua configuração para a posterior formação das lamelas, que denota a formação dos núcleos de matriz orgânica óssea. Três dos cinco espécimes apresentam ausência de reação inflamatória, e dois deles estão em processo de neoformação óssea com presença de grande quantidade de células. A Figura 64 ilustra os fragmentos do polímero do ácido ricinoléico entrepostos ao tecido ósseo, e a linha reversa de crescimento bem evidenciada no fundo da cavidade cirúrgica. Análise pelo Tricrômico de Masson mostra que o osso neoformado que rodeia os fragmentos de resina abriga no seu interior algumas células cartilaginosas (Figura 65). Na Figura 66 visualiza-se uma partícula do polímero em íntimo contato com o tecido ósseo rodeado por células. Pelo Picro sirius observa-se junto aos fragmentos de resina tecido ósseo com características embrionárias. Presença também de grande número de osteócitos presentes no interior da matriz neoformada, caracterizando um osso ainda em estado de maturação com anisotropia moderada (Figura 67).

BIOMATERIAIS

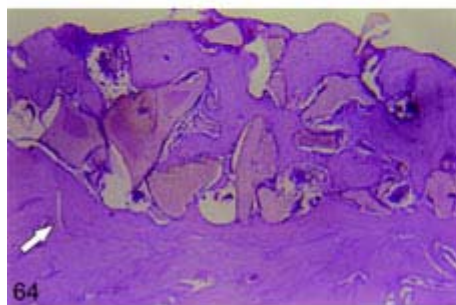


Figura 64 - GIII-45dias : Polímero do ácido ricinoléico rodeado por tecido ósseo. Visualiza-se a linha de formação óssea entre o leito e o enxerto de biomateriais \Rightarrow . H&E - \pm 80X.

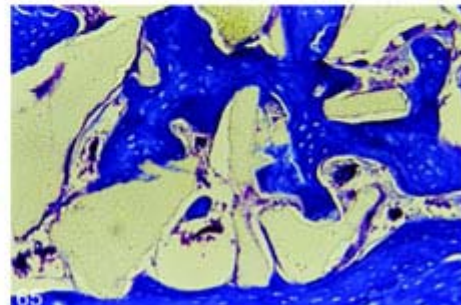


Figura 65 - GIII-45dias : Presença de células cartilaginosas ocasionais em meio ao tecido ósseo entreposto as partículas do polímero e da hidroxiapatita. TM - \pm 115 X.

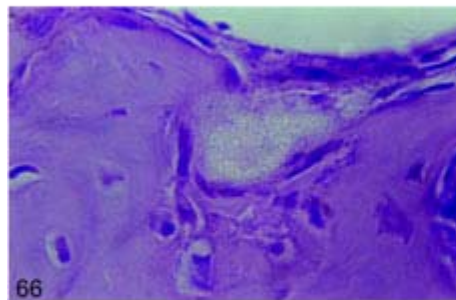


Figura 66 - GIII-45dias : Partícula do polímero do ácido ricinoléico em íntimo contato com o tecido ósseo. Há a presença de células do tecido ósseo margeando a partícula. H&E - \pm 1150X.

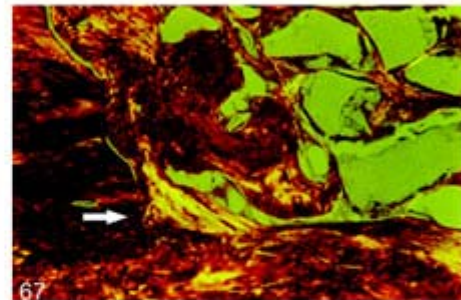


Figura 67 - GIII-45dias : Leito cirúrgico parcialmente preenchido por tecido ósseo em contato com as partículas. Nota-se a linha de separação entre o leito cirúrgico e o osso neoformado \Rightarrow . Anisotropia moderada das fibras colágenas. PS - \pm 150 X.

Laser + Biomateriais

Nesse período intermediário os cortes histológicos revelam a presença de biomateriais entreposto ao tecido ósseo neoformado (Figura 68). Ocorre uma diminuição no tamanho das partículas quando comparado ao grupo de biomateriais somente. Observa-se a ocorrência da remodelação das partículas do polímero do ácido ricinoléico e da hidroxiapatita que vão sofrendo reabsorção e se modificando espacialmente até obter uma conformação homogênea. A Figura 69 mostra um cristal de hidroxiapatita em contato com células clásticas envolvendo o cristal. Nota-se nessa região o tecido ósseo não mineralizado. Dos cinco espécimes quatro apresentam escore 1, ausência de inflamação. Observa-se neoformação óssea em todos os espécimes (Figura 70). Na análise em microscópio de polarização todas as amostras evidenciaram anisotropia moderada, com formação de tecido conjuntivo dentro dos poros do polímero do ácido ricinoléico (Figura 71).

LASER + BIOMATERIAIS

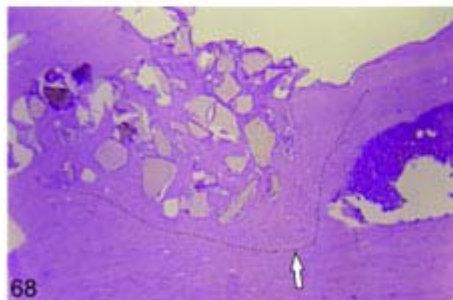


Figura 68 - GIV-45dias : Tecido ósseo formado preenchendo o leito cirúrgico em meio aos biomateriais. Interface do leito cirúrgico. \Rightarrow
H&E - \pm 80X.

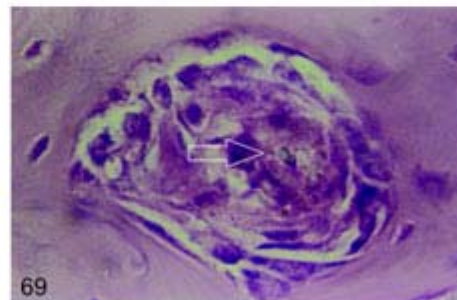


Figura 69 - GIV-45dias : Cristal de hidroxiapatita rodeado por células clásticas. \Rightarrow
H&E - \pm 1150 X.

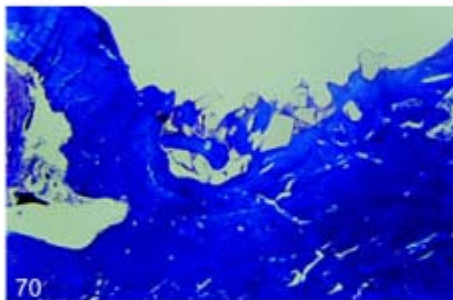


Figura 70 - GIV-45dias : Partícula do polímero preenchendo o leito em contato com o tecido ósseo neoformado.
TM - \pm 80X.

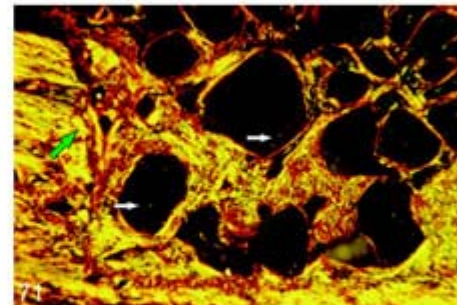


Figura 71 - GIV-45dias : Poros do polímero do ácido ricinoléico com presença de tecido conjuntivo \Rightarrow . Partículas em íntimo contato com tecido ósseo. Interface entre o osso remanescente e o osso neoformado \rightarrow .
PS - \pm 150 X.

60 Dias

Tabela 11 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para o grau de inflamação no período de 60 dias

Grau de Inflamação (1,2,3) - 60 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	1	1	2	1
II	1	1	1	2
III	1	1	2	1
IV	1	1	2	2
V	2	1	1	1
Mediana	1	1	2	1

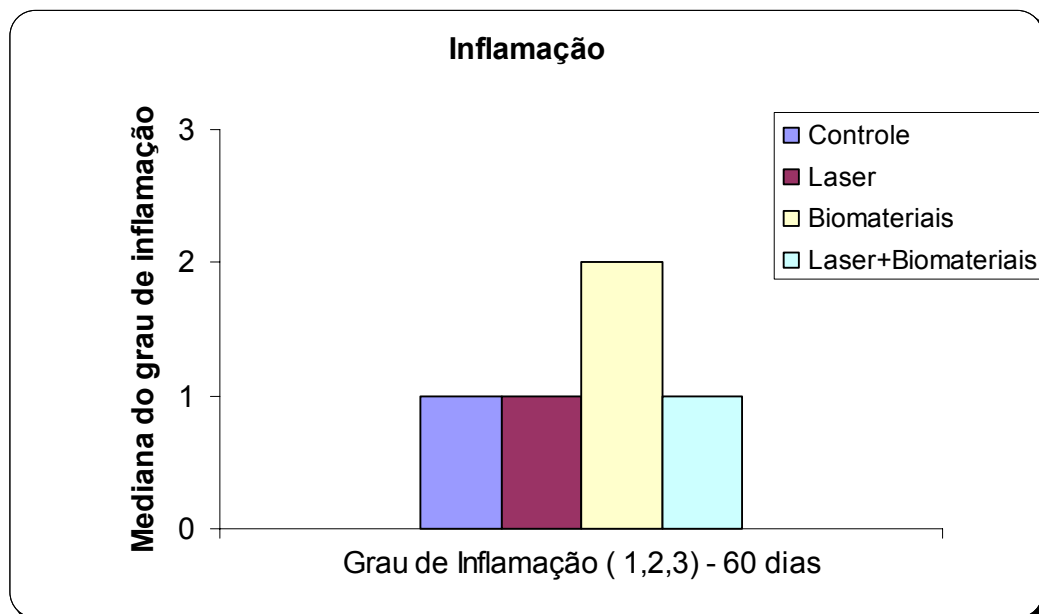


GRÁFICO 7 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau de inflamação no período de 60 dias.

Tabela 12 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para a formação e qualidade do tecido ósseo no período de 60 dias

Formação e qualidade do tecido ósseo (1,2,3,4) - 60 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	4	4	3	4
II	4	4	3	3
III	4	4	3	4
IV	3	4	3	4
V	4	4	3	3
Mediana	4	4	3	4

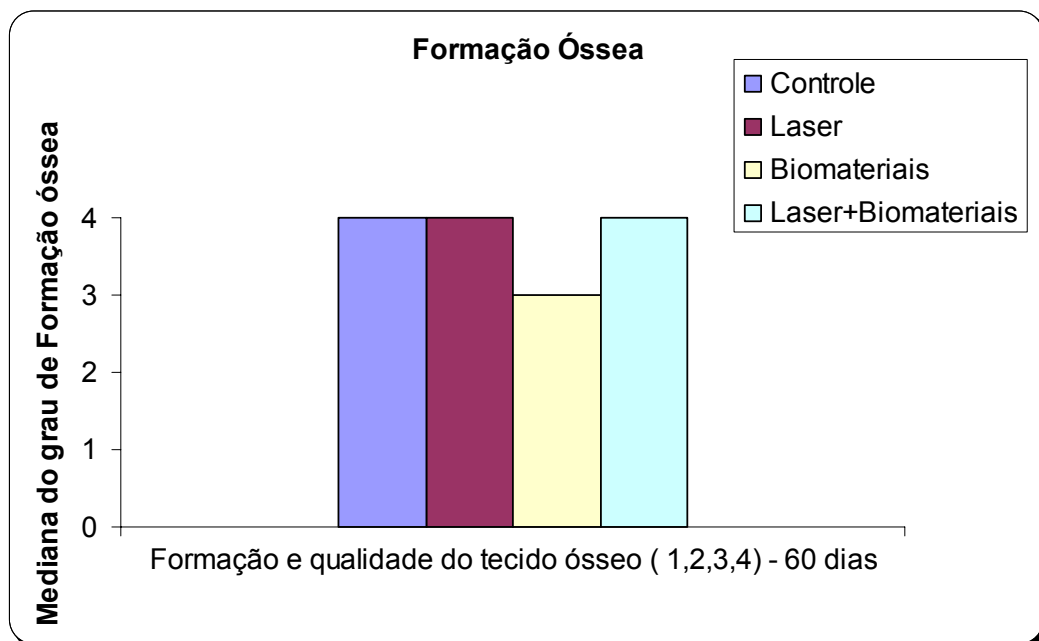


GRÁFICO 8 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana da formação e qualidade do tecido ósseo no período de 60 dias.

Tabela 13 – Escore individual de cada espécime e mediana de cada grupo para o grau de amadurecimento do colágeno no período de 60 dias

Grau de amadurecimento do colágeno (anisotropia) (1,2,3,4) - 60 dias				
Animais	Controle	Laser	Biomateriais	Laser+Biomateriais
I	3	4	3	4
II	4	4	3	3
III	3	4	3	4
IV	4	4	3	4
V	4	4	4	4
Mediana	4	4	3	4

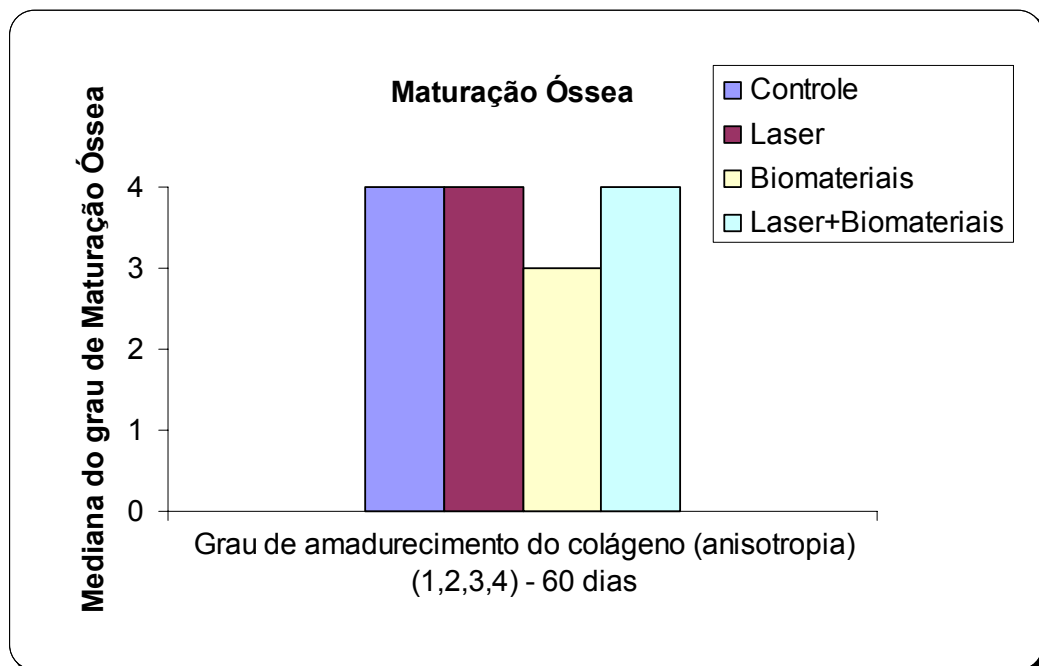


GRÁFICO 9 – Gráfico de barras ilustrativo da mediana do grau de amadurecimento do colágeno no período de 60 dias.

Controle

Verifica-se nesse grupo um tecido ósseo com organização lamelar concêntrica das fibras colágenas que constituem o chamado osso secundário. Nesse período final todos os espécimes apresentaram ausência de inflamação. Verifica-se na Figura 72 o leito cirúrgico totalmente preenchido por tecido ósseo e sua respectiva linha reversa de crescimento. A Figura 73 pela coloração de picro sirius sem polarização ilustra nitidamente a interface entre o leito e o osso neoformado. Em quatro dos cinco espécimes tivemos a presença de osso secundário com inúmeros osteócitos (Figuras 74 e 75). Pela análise em microscopia de polarização três espécimes apresentaram anisotropia intensa (Figura 76).

CONTROLE

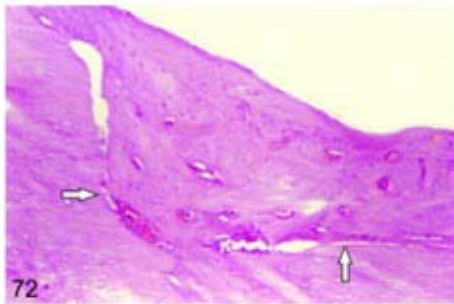


Figura 72 - GI-60dias : Tecido ósseo preenchendo totalmente o defeito. Vizualiza-se a interface leito e osso neoformado \Rightarrow . H&E - \pm 175X.

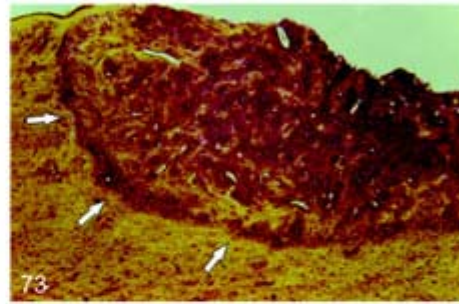
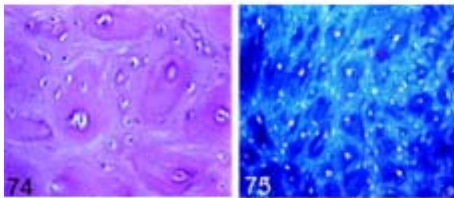


Figura 73 - GI-60dias : Interface entre o leito e o osso neoformado \Rightarrow . PS - \pm 120 X.



Figuras 74 e 75 - GI-60dias : Osso lamelar ou secundário com inúmeros osteócitos. H&E - \pm 520X. TM - \pm 480X.

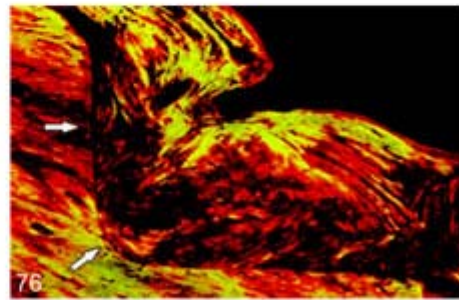


Figura 76 - GI-60dias : Defeito totalmente preenchido por tecido ósseo. Interface entre leito e osso neoformado \Rightarrow . Anisotropia intensa das fibras colágenas PS - \pm 250 X.

Laser

Aos 60 dias o tecido ósseo encontra-se completamente integrado ao osso receptor separado do mesmo por delicada linha reversa de crescimento (Figura 77). Nota-se que o novo osso além de grande quantidade de osteócitos apresenta canais de Havers com grande diâmetro, e presença de inúmeros capilares sanguíneos (Figura 78). Todos os espécimes apresentaram ausência de inflamação, presença de osso compacto e anisotropia intensa (Figura 79). Verificou-se também que o osso neoformado que preenche o leito é mais organizado e mineralizado que o osso do leito receptor (Figura 80).

LASER

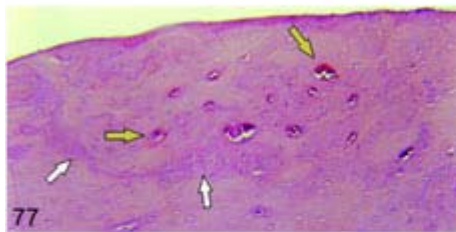


Figura 77 - GII-60dias : Tecido ósseo preenchendo totalmente o defeito. Visualiza-se a linha reversa de crescimento fortemente corada pela hematoxilina \Rightarrow . Presença de inúmeros capilares \Rightarrow . H&E - \pm 180X.

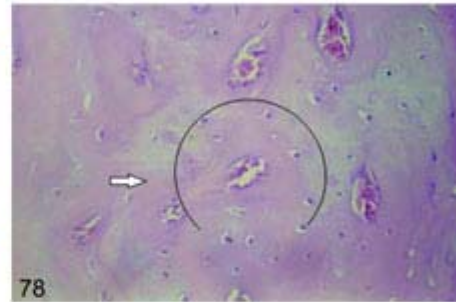


Figura 78 - GII-60dias : Osso do tipo Haversiano ou secundário (lamela ou osteon) \Rightarrow \odot .

H&E - \pm 460 X.

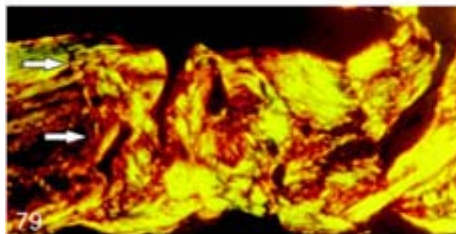


Figura 79 - GII-60dias : Intensa anisotropia das fibras colágenas. Interface do leito e osso neoformado \Rightarrow . PS - \pm 100X.

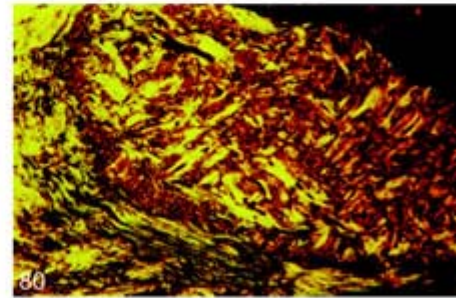


Figura 80 - GII-60dias : Tecido ósseo organizado com anisotropia intensa. PS - \pm 120 X.

Biomateriais

Aos 60 dias persistem os fragmentos do polímero do ácido ricinoléico em meio ao tecido ósseo formado (Figura 81). Ocorre a presença de uma moderada inflamação em três espécimes com presença de células multinucleadas (Figura 82). Verifica-se nesse período a ocorrência da remodelação óssea com presença de osteoclastos ativos (Figura 83). O osso neoformado está quase que todo do tipo lamelar, porém persistem alguns espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo. A formação óssea não está completa devido à presença de biomateriais. Pela análise de polarização três espécimes apresentam anisotropia moderada (Figura 84).

BIOMATERIAIS

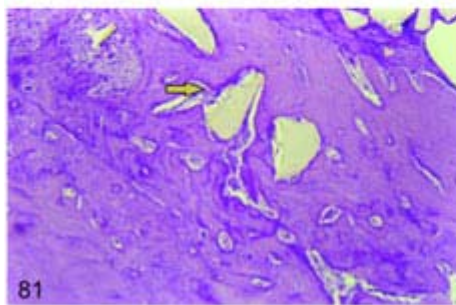


Figura 81 - GIII-60dias : Tecido ósseo preenchendo totalmente o defeito com presença de biomateriais em íntimo contato com tecido neoformado \Rightarrow .

H&E - \pm 180X.

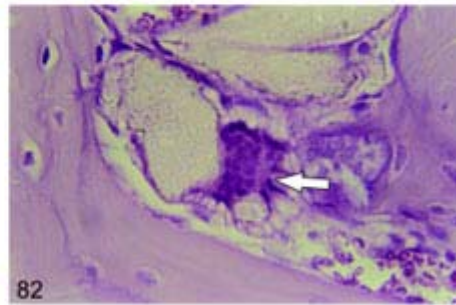


Figura 82 - GIII-60dias : Célula gigante multinucleada \Rightarrow .

H&E - \pm 1150 X.

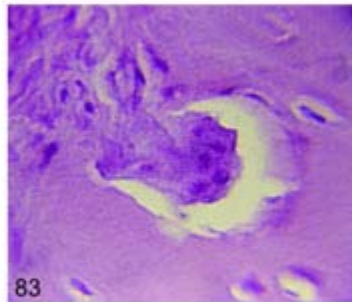


Figura 83 - GIII-60dias : Osteoclasto ativo. Processo de remodelação óssea.

H&E - \pm 1380X.

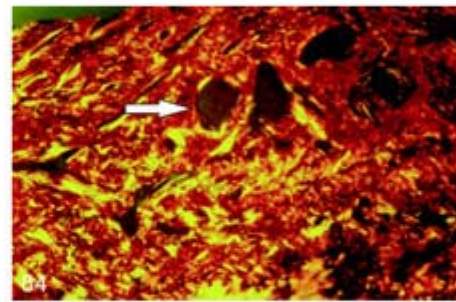


Figura 84 - GIII-60dias : Polarização total evidenciando anisotropia moderada das fibras colágenas. Polímero com imagem isotrópica \Rightarrow .

PS- \pm 100 X.

Laser + Biomateriais

Nesse período final verifica-se a presença de moderada inflamação com diferenciação do tecido conjuntivo em tecido ósseo ao redor das partículas do polímero em dois espécimes (Figuras 85). Na Figura 86 nota-se a perfeita interface osso-partícula do polímero do ácido ricinoléico demonstrando o alto grau de compatibilidade com o tecido ósseo. Na análise em microscópio de polarização observou-se o crescimento de tecido conjuntivo e capilares sanguíneos dentro dos poros do polímero (Figura 87). Quatro amostras apresentaram intensa anisotropia com formação de osso compacto. A Figura 88 ilustra a interface entre o leito cirúrgico e osso neoformado entreposto aos biomateriais. Verifica-se também anisotropia intensa das fibras colágenas.

LASER + BIOMATERIAIS

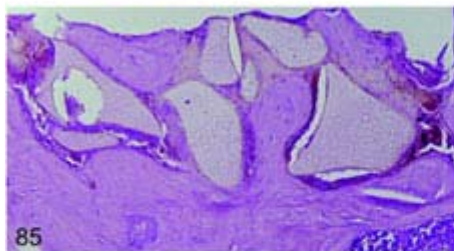


Figura 85 - GIV-60dias : Presença de moderada inflamação em meio aos biomateriais.

H&E - \pm 180X.

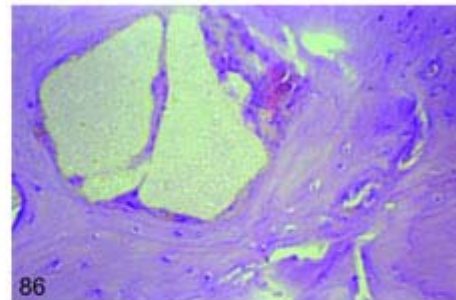


Figura 86 - GIV-60dias : Partículas do polímero em processo de reabsorção.

H&E - \pm 460 X.

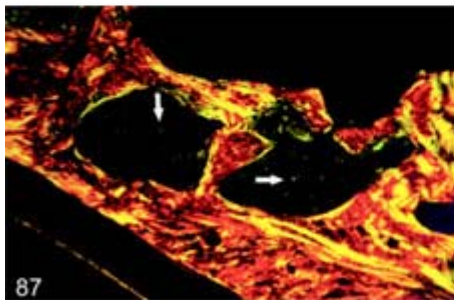


Figura 87 - GIV-60dias : Partículas do polímero em meio ao tecido ósseo. Poros do polímero preenchidos por tecido com anisotropia intensa \Rightarrow .

PS - \pm 550X.

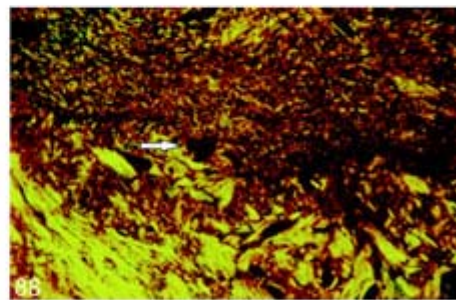


Figura 88 - GIV-60dias : Anisotropia intensa das fibras colágenas em meio a fragmentos de polímero do ácido ricinoléico isotrópico \Rightarrow .

PS - \pm 150 X.

5.3 Análise estatística dos resultados

Serão apresentados os resultados estatísticos para cada variável dependente:

- Grau de inflamação;
- Grau de formação e qualidade do tecido ósseo;
- Grau de amadurecimento do colágeno;

Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis inicialmente para verificação da existência de diferença significativa entre os escores dos quatro grupos previamente descritos na metodologia, considerando-se o nível de significância de 5%. Quando encontrada diferença estatisticamente significativa o teste de Mann-Whitney foi aplicado com o objetivo de localizar essas diferenças.

Tabela 14 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos para o evento grau de inflamação

	<i>15 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>60 dias</i>
H	10.6854	8.2525	4.5238
Graus de Liberdade	3	3	3
(p) Kruskal-Wallis	0.0136*	0.0411 *	0.2102

*Nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

Os resultados da Tabela 14 mostram que houve diferença significativa nos períodos de 15 dias ($p < 0,0136$), e 45 dias ($p < 0,0411$) para o evento grau de inflamação.

Tabela 15 – Teste de Mann-Whitney para o evento grau de inflamação no período de 15 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	1.00	2.4023	0.0163*
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	4.00	1.7756	0.0758
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	2.00	2.1934	0.0283*
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	5.00	1.5667	0.1172
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	10.00	0.5222	0.6015
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	7.50	1.0445	0.2963

*Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A Tabela 15 mostra que as diferenças significantes no evento grau de inflamação no período de 15 dias estão entre os grupos GI e GII; e GI e GIV.

Tabela 16 – Teste de Mann-Whitney para o evento grau de inflamação no período de 45 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	2.50	2.0889	0.0367*
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	5.00	1.5667	0.1172
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	2.50	2.0889	0.0367*
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	10.00	0.5222	0.6015
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	12.50	0.0000	1.0000
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	10.00	0.5222	0.6015

*Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A tabela 16 mostra que as diferenças significantes no evento grau de inflamação no período de 45 dias estão entre os grupos GI e GII; e GI e GIV.

Tabela 17 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos para o evento formação e qualidade do tecido ósseo

	<i>15 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>60 dias</i>
H	14.2500	10.6898	11.0833
Graus de Liberdade	3	3	3
(p) Kruskal-Wallis	0.0026*	0.0135*	0.0113*

*Nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

Os resultados da Tabela 17 mostram que houve diferença significativa nos períodos de 15 dias ($p < 0,0026$), 45 dias ($p < 0,0135$), e 60 dias ($p < 0,0113$) para o evento formação e qualidade do tecido ósseo.

Tabela 18 – Teste de Mann-Whitney para o evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 15 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	2.50	2.0889	0.0367*
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	12.50	0.0000	1.0000
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	12.50	0.0000	1.0000
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	2.50	2.0889	0.0367*
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	2.50	2.0889	0.0367*
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	12.50	0.0000	1.0000

*Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A Tabela 18 mostra que as diferenças significantes no evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 15 dias estão entre os grupos GI e GII; GII e GIII; e GII e GIV.

Tabela 19 – Teste de Mann-Whitney para o evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 45 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	2.50	2.0889	0.0367*
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	8.50	0.8356	0.4034
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	2.50	2.0889	0.0367*
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	5.00	1.5667	0.1172
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	12.50	0.0000	1.0000
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	5.00	1.5667	0.1172

Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A Tabela 19 mostra que as diferenças significantes no evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 45 dias estão entre os grupos GI e GII; GI e GIV.

Tabela 20 – Teste de Mann-Whitney para o evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 60 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	10.00	0.5222	0.6015
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	2.50	2.0889	0.0367*
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	10.00	0.5222	0.6015
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	0.00	2.6112	0.0090*
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	7.50	1.0445	0.2963
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	5.00	1.5667	0.1172

Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A Tabela 20 mostra que as diferenças significantes no evento formação e qualidade do tecido ósseo no período de 60 dias estão entre os grupos GI e GIII; GII e GIII.

Tabela 21 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos para o evento amadurecimento das fibras colágenas (anisotropia)

	<i>15 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>60 dias</i>
H	12.9200	5.6374	7.3077
Graus de Liberdade	3	3	3
(p) Kruskal-Wallis	0.0048*	0.1306	0.0627

*Nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

Os resultados da Tabela 21 mostram que houve diferença significativa no período de 15 dias ($p < 0,0048$) para o evento amadurecimento das fibras colágenas (anisotropia).

Tabela 22 – Teste de Mann-Whitney para o evento amadurecimento das fibras colágenas no período de 15 dias

<i>Comparação dois a dois</i>	<i>Mann-Whitney(U)</i>	<i>Z</i>	<i>Valor de p</i>
Controle(GI) X Laser(GII)	0.00	2.6112	0.0090*
Controle(GI) X Biomateriais(GIII)	10.00	0.5222	0.6015
Controle(GI) X Laser + Biomateriais(GIV)	2.50	2.0889	0.0367*
Laser (GII) X Biomateriais(GIII)	2.50	2.0889	0.0367*
Laser(GII) X Laser + Biomateriais(GIV)	10.00	0.5222	0.6015
Biomateriais(GIII) X Laser + Biomateriais(GIV)	5.00	1.5667	0.1172

Nível de significância 5% ($p < 0,05$)

A Tabela 22 mostra que as diferenças significantes no evento amadurecimento das fibras colágenas (anisotropia) no período de 15 dias estão entre os grupos GI e GII; GI e GIV; e GII e GIII.

“A maioria dos homens é mais capaz de grandes ações do que de boas.”

Montesquieu (1689-1755)

6. Discussão

6.1 *Da metodologia empregada*

Todo material, associação de materiais, e ou estímulos físicos empregados na reparação tecidual em seres humanos necessita ser previamente analisado quanto à sua eficiência e biocompatibilidade com os tecidos vivos. Tanto os materiais aqui utilizados (polímero do ácido ricinoléico, BMP e hidroxiapatita), quanto o estímulo da laserterapia de baixa intensidade já foram objeto de alguns estudos em animais (BLOCK e KENT, 1985; BELL e BEIRNE, 1988; COBB et al., 1990; TORIUMI et al., 1991; LINDE e HEDNER, 1995; FREITAS et al., 2000; ROCHKIND et al., 2004; NICOLAU et al., 2003). No entanto, as associações de materiais com estímulo de laserterapia são escassos na literatura (PINHEIRO et al., 2003), o que justifica a realização desse estudo (MARINS et al., 2004).

Devido a inúmeras pesquisas em animais sendo desenvolvidas em caráter mundial, hoje é de extrema importância a submissão dos projetos a um Comitê de Ética (DAHLIN et al., 1994; MACEDO et al., 2004). Nós pesquisadores temos o dever de apresentar responsabilidade no tratamento humanitário com os animais. Por essa, e outras razões esse trabalho foi submetido à apreciação do (CEEA), e obteve aprovação do mesmo.

Optou-se pela utilização de ratos no modelo experimental por ser um animal de pequeno porte de fácil obtenção e manuseio. Desta forma,

podemos propiciar aos animais, adequadas condições de sobrevivência, evitando assim desconforto aos mesmos. Além disso, o rato é um animal barato e de fácil acomodação, quando comparado a animais de grande porte (LIEBSCHNER, 2004). Outra questão a ser abordada é quanto ao sexo, as ratas fêmeas são inadequadas nesse modelo experimental devido à sua concentração hormonal, que pode ocasionar significativa perda óssea sistêmica, ocasionando assim diferentes resultados. Por isso o rato macho apresenta-se como um modelo experimental conveniente para a avaliação da reparação óssea, com inúmeros trabalhos descritos na literatura (LOZANO et al., 1976; TAKEDA, 1988; ALPER et al., 1989; TORIUMI et al., 1991; YASKO et al., 1992; NICCOLI-FILHO et al., 1993; LINDE e HEDNER, 1995; GARCIA et al., 1996; CARVALHO^a et al., 1997; LAMANO CARVALHO, 1997; SAITO e SHIMIZU, 1997; TSURUGA, 1997; DAHLIN et al., 1988; FUENTEFRÍA et al., 1998; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999; PURICELLI et al., 1999; KUCEROVÁ et al., 2000; SPECTOR et al., 2001; BRANDÃO et al., 2002; SILVA JUNIOR et al., 2002; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; PRETEL et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003; ROCHKIND et al., 2004).

O osso da mandíbula foi o local de escolha do modelo experimental devido à boa reprodutibilidade de forças mastigatórias incidentes sobre a injúria, quando comparado com o osso da tíbia. Outro fator relevante é o tipo de osso da mandíbula, com compacta externa exuberante e osso trabeculado internamente (TEN CATE, 2001). A maior dificuldade dessa

região é o acesso cirúrgico, pois os roedores apresentam o músculo masseter bem proeminente, dificultando assim o acesso ao ângulo da mandíbula. A confecção do defeito em forma de canaleta, diferentemente de trabalhos descritos na literatura que realizaram de forma circular (DAHLIN et al., 1988; BELL e BEIRNE, 1988), foi escolhida em função das características anatômicas da região, pois o ângulo da mandíbula dos ratos apresenta-se em forma de canaleta e o ramo da mandíbula, local de escolha dos demais trabalhos da literatura, apresenta-se de forma plana facilitando a confecção de defeitos circulares. A não utilização do ramo da mandíbula nesse trabalho é explicada pela inviabilidade da manutenção de material de preenchimento nesse local, pois seria necessário o uso de membranas para a adequada fixação do material de preenchimento. Por outro lado, o ângulo da mandíbula não apresenta essa dificuldade, eliminando assim a necessidade de utilização de membranas para fixação.

O alcance do sucesso no procedimento cirúrgico está diretamente relacionado aos cuidados para se evitar a contaminação do campo operatório, e conseqüentemente a contaminação dos animais. Com o intuito de dificultar a ocorrência de infecção nos animais, realizou-se a tricotomia e anti-sepsia da região de acesso do ângulo da mandíbula com detergente de mamona 10%, substância com característica bacteriostática (FERREIRA et al., 1999). Além disso, todo o instrumental cirúrgico foi esterilizado em autoclave à 121⁰ C, por 20 minutos. As

cirurgias foram realizadas no fluxo laminar previamente desinfetado com álcool 70⁰ e luz ultravioleta por 30 minutos antes do procedimento cirúrgico.

Independente dos cuidados de anti-sepsia 2 animais apresentaram infecção com presença de coleção purulenta no leito cirúrgico. Esses animais foram então sacrificados humanamente e desprezados da pesquisa, e posteriormente substituídos por outros animais. Nos dois casos, provavelmente a infecção deveu-se a contaminação e deiscência das suturas, que pode ter ocorrido tanto no procedimento cirúrgico, quanto no período experimental.

A sutura é fundamental para se evitar a contaminação do material implantado, mesmo em leitos preenchidos por coágulo. Por essa razão, utilizou-se fio de sutura reabsorvível, evitando assim um segundo ato cirúrgico. Entretanto, a utilização de fios de sutura reabsorvível pode induzir em um aumento da resposta inflamatória inicial, com atividade fagocitária para degradação dos mesmos (PURICELLI et al., 1999; MARIA et al., 2003;).

Na confecção do leito cirúrgico foi utilizado motor em baixa rotação com irrigação abundante de solução salina, a fim de minimizar a necrose celular devido ao aquecimento gerado pelo atrito da fresa de aço com o tecido ósseo. Desde 1957 Ray e Holloway, apresentavam a preocupação com o aquecimento na confecção de defeitos ósseos.

A administração de uma dieta mole de fubá se faz de extrema importância nos primeiros dias pós-cirurgia, pois os animais por serem roedores apresentam dificuldade na mastigação (TEIXEIRA e RAMALHO, 1999).

Os períodos de 15, 45 e 60 dias propostos nesse estudo são semelhantes aos estudos de regeneração óssea encontrados na literatura (PURICELLI et al., 1999; IGNÁCIO et al., 1997; TAVANO et al., 1999; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999; CALIXTO et al., 2001; MARIA et al., 2003). Esses períodos correspondem à resposta inicial e tardia dos biomateriais. Porém, na resposta tardia de 60 dias, o leito cirúrgico receptor ainda apresentava material de preenchimento, evidenciando assim, a necessidade de novos grupos tardios de 90 e 120 dias como proposto por diferentes autores. Porém nos grupos sem a utilização de biomateriais, grupos controle e laser, no período tardio de 60 dias, os defeitos cirúrgicos já se apresentavam totalmente recobertos por tecido ósseo.

A utilização de materiais de preenchimento para defeitos ósseos deve atuar como uma resistência mecânica à proliferação de tecidos muscular, epitelial e tecido conjuntivo subjacente, em meio a esse defeito. Essa interposição tecidual pode dificultar, ou impedir o processo de cicatrização óssea (RAY E HOLLOWAY, 1957; BUCHARDT, 1983; DAHLIN et al., 1988; BELL e BEIRNE, 1988; XIAO et al., 1996; MARINS et al., 2004).

O polímero do ácido ricinoléico é muito utilizado em pesquisas de preenchimento ósseo (IGNÁCIO et al., 1997; SILVA et al., 1997; ROSLINDO et al., 1997; LAMANO CARVALHO^b et al., 1997; FUENTEFRIA et al., 1998; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999; PURICELLI et al., 1999; TAVANO et al., 1999; CALIXTO et al., 2001; PASCON et al., 2001; SOUZA et al., 2002; KFURI JUNIOR et al., 2001; IGNÁCIO et al., 2002; LEONEL^b et al., 2003; MARIA et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2004). Sua larga utilização é explicada pelos bons resultados obtidos em trabalhos descritos na literatura. O polímero apresenta compatibilidade tolerável com os tecidos vivos (VILARINHO et al., 1996; MARIA et al., 2003), estabilidade mecânica aceitável com resistência a esforços mecânicos semelhante ao tecido ósseo, lentamente reabsorvido pelo organismo, presença de poros e de baixo custo (PADCT, 1994).

A matéria-prima para sintetizar o polímero é oriunda da semente da planta *Ricinus communis L.*, conhecida também como mamona, palma de cristo, rícino, *castor-oil* (RODRIGUES et al., 2002). O processo de síntese do óleo é de fundamental importância devido à presença da proteína ricina na semente. Essa proteína é altamente tóxica, porém óleo de rícino não é tóxico, visto que a ricina, não é solúvel em lipídios, ficando todo o componente tóxico restrito á torta, que é o subproduto da extração do óleo de mamona (MCKEON et al., 1999; MCKEON et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002).

As proteínas morfogenéticas ósseas BMPs são membros da superfamília do fator β de transformação do crescimento (TGF β), que é uma larga família de fatores de crescimento (RENGACHARY, 2002). Atualmente são amplamente difundidas nos casos de reabilitações do tecido ósseo, pois apresentam capacidade de estimular diferenciação de células mesenquimais em células especializadas, induzindo a neoformação de osso, cartilagem e dentina. (URIST e STATES et al., 1971; GONÇALVES et al., 1998; KROESE-DEUTMAN et al., 2005). Porém, as BMPs por apresentarem baixo peso molecular são facilmente solubilizadas nos fluídos corporais, necessitando assim de carreadores. A necessidade dos carreadores é reconhecida desde a identificação das BMPs. Inúmeros carreadores são estudados experimentalmente e clinicamente (HOLLINGER e LEONG, 1996; RENGACHARY, 2002). O produto utilizado nessa pesquisa, Gen-Pro[®], apresenta associação entre hidroxiapatita e um misturado de BMPs de origem bovina.

A associação do Gen-Pro[®] com o polímero do ácido ricinoléico Aug-EX[®] foi realizada pela necessidade do Gen-Pro[®] na utilização de um carreador. O fabricante da proteína sugere uma associação de 10 partes do carreador para 1 parte da proteína com hidroxiapatita em volume.

O laser de baixa intensidade apresenta excelentes resultados na terapia de regeneração tecidual (TAKEDA, 1988; BRAVERMAN et al., 1989; NARA, et al., 1990; NICCOLI-FILHO et al., 1993; HALL et al., 1994; NICCOLI-FILHO e OKAMOTO, 1994; GARCIA et al., 1995; GARCIA et al.,

1996; SAITO e SHIMIZU, 1997; OLIVEIRA et al., 1997; FREITAS et al., 2000; KUCEROVÁ et al., 2000; PRETEL et al., 2002; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; NICOLAU 2003; PINHEIRO et al., 2003; ROCHKIND et al., 2004).

Benedicenti et al., em 1984, demonstraram que o fluxo de sangue em capilares do mesentério aumentou após a irradiação com um diodo laser operando em 904 nm. Outra característica do laser nas células comprovado por Karu et al., em 1995, é o aumento da produção de ATP causado pela aplicação da energia laser de baixa intensidade, aumentado à atividade mitótica das células. Esse fato pressupõe que o laser de baixa intensidade aumenta os processos de reparação tecidual, isto é, devido ao estímulo na capacidade de cicatrização do tecido conjuntivo, assim como à neoformação de vasos, a partir dos já existentes. Ambos os fatores contribuem para reparar tecidos, sobretudo na reparação de feridas cirúrgicas. Assim, a terapia laser é utilizada em associação com biomateriais de preenchimento (PINHEIRO et al., 2003), e ou, em defeitos preenchidos apenas com coágulo sanguíneo (KUCEROVÁ et al., 2000).

Entretanto, observam-se claramente nos dados da literatura que os efeitos do laser são dose-dependente, ou seja, parâmetros de comprimento de onda, potência, frequência, fluência ou dose e energia são altamente relevantes para a obtenção de bons resultados (WILDER-SMITH, 1988; TAKEDA, 1988; NARA et al., 1990; GARCIA et al., 1995; YAMAMOTO et al., 2001; BORTOLETTO et al., 2004).

Os parâmetros de utilização do laser nessa pesquisa foram determinados devidos a bons resultados encontrados em trabalhos anteriores em tecido conjuntivo (PRETEL et al., 2002). Por outro lado, a escolha por uma aplicação única do laser em contato direto com a área lesionada, diferentemente das pesquisas que propõem várias aplicações trans-cutâneas (MESTER et al., 1985; HALL et al., 1994; TAKEDA, 1988; FREITAS et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003; ROCHKIND et al., 2004), foi feita pela facilidade de aplicação, evitando-se imobilização e anestésias que teriam de ser realizadas nas múltiplas aplicações, ao mesmo tempo em que poderiam ocasionar artefatos relevantes na análise dos resultados.

A morte dos animais induzida com excesso de anestésico, nesse caso, com hidrato de cloral a 10% via intraperitoneal é uma prática indicada pelo conselho canadense de proteção dos animais (OLFERT et al., 1998).

Com relação aos corantes utilizados, optou-se pela utilização de três colorações: hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e picro sirius devido à análise mais apurada que cada coloração pode oferecer. A hematoxilina e eosina, coloração de rotina nos permite avaliar a morfologia celular; pelo tricrômico de Masson que evidencia a substância intercelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999), e a coloração pelo picro sirius, para análise sob microscopia de polarização, é utilizada para

detectar o amadurecimento das fibras de colágeno tipo I. A cor e a intensidade da birrefringência do colágeno variam dependendo do diâmetro das fibras e da espessura do tecido formado. Esse método possui a vantagem de revelar a organização tridimensional das fibras colágenas, e o principal componente do osso (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003). Anisotropia é definida como grau de orientação do osso trabecular dentro do defeito. Alta anisotropia indica forte orientação do osso trabecular no defeito ósseo. Enquanto que, baixa anisotropia indica orientação mais desordenada do osso trabecular (MARKEL et al., 1991).

6.2 Do critério para análise dos resultados

O critério de análise histomorfológica dos resultados, após tratamentos com biomateriais e ou estímulos de laserterapia são variados. Nota-se que, na maioria das vezes os autores descrevem os aspectos histológicos e morfométricos observados, o qual usualmente apresenta critérios subjetivos de análise (BELL e BEIRNE, 1988; ONO et al., 1992; YASKO et al., 1992; NAGAHARA et al., 1994; SPECTOR et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; RUHÉ et al., 2004; MARINS et al., 2004). No entanto, DAHLIN et al., em 1988, e LINDE e HEDNER, em 1995, preocuparam-se em tornar um pouco menos subjetiva à análise dos resultados histomorfológicos. Desta forma, resolvemos adaptar os critérios utilizados por esses autores às particularidades da nossa pesquisa. Assim, constituímos três tópicos

histomorfológicos. Cada um desses tópicos foi dimensionado por escores com valores bem definidos e claros para a análise. Registrou-se então cada escore com fotomicrografias buscando dar ao leitor uma idéia bem próxima, e o menos subjetiva possível dos resultados obtidos.

6.3 Dos resultados obtidos

Grupo Controle

Os resultados do grupo controle foram semelhantes aos achados da literatura, no qual, visualiza-se a formação de tecido ósseo após um período de 15 dias (DAHLIN et al., 1988; DAHLIN et al., 1994; GUZZARDELLA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2003; MACEDO et al., 2004).

A reação inflamatória no período inicial é um processo natural do organismo. Após o trauma e a injúria dos vasos sanguíneos local, forma-se um coágulo rico em fibrina. Em quatro dias é formado o chamado tecido de granulação com novos capilares, macrófagos, fibroblastos, e a secreção de fatores de crescimento locais (AUKHIL, 2000; SODEK e MCKEE, 2000). Essa inflamação é bem vinda no processo de reparação inicial. Porém essa deve ser controlada, evitando assim o desconforto no processo de reparação.

Aos 45 dias observou-se a formação de osteon com grande quantidade de osteócito. Essa condição nos mostra a formação de osso embrionário (KATCHBURIAN e ARANA, 1999; TEN CATE, 2001). Esse período apresenta também o defeito cirúrgico preenchido por uma cápsula fibrosa. Esse fenômeno é descrito por DAHLIN et al., 1988, 1994, e ocorre devido à interposição de outros tecidos na ferida cirúrgica. Para resolver esse problema é indicada a utilização de membranas e ou biomateriais de preenchimento agindo como um espaçador biológico.

Nos 60 dias o defeito cirúrgico apresentou-se praticamente completo preenchido por osso neoformado. Um tecido ósseo com presença de lamelas concêntricas com evidente birrefringência das fibras colágenas pela coloração do picro sirius. Verificou-se ainda nesse período, a presença de uma linha reversa de crescimento fortemente corado pela hematoxilina. Essa linha representa a interface dos ossos remanescente e neoformado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Grupo Laser

Os resultados do período inicial de 15 dias foram semelhantes aos citados na literatura. Verificou-se uma reação inflamatória mínima com presença de tecido conjuntivo em organização, presença de inúmeros capilares sanguíneos, e fibroblastos. Esses resultados foram verificados também por vários pesquisadores (BRAVERMAN et al., 1989; TAKEDA, 1988; HALL et al., 1994; SAITO e SHIMIZU, 1997; FREITAS et al., 2001;

GUZZARDELLA, 2002, SILVA JUNIOR et al., 2002; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003). Uma possível explicação para essa diminuição do tempo no processo regeneração é descrito por Karu et al., 1995, na qual, demonstram o incremento do nível de ATP pelo estímulo às membranas das mitocôndrias em cultivo de cultura de células. O aumento de energia intracelular ocasiona em um acréscimo na síntese de proteínas, maior produção de matriz orgânica e intensa mitose celular (BORTOLETTO et al., 2004).

Outra possível explicação é o efeito da ativação da microcirculação, que aumenta os níveis de oxigenação e nutrição tecidual melhorando consideravelmente o metabolismo e a regeneração tecidual (BENEDICENTI et al., 1984).

Diferentemente desses resultados, Niccoli-Filho et al., em 1993 não obtiveram os resultados de diminuição no tempo de cicatrização, quando da utilização de laser com comprimento de onda verde em irradiação de alvéolos de ratos.

É difícil a comparação de trabalhos na literatura utilizando laser de baixa intensidade, porque existe uma grande variedade nos métodos de estudo (TAKEDA, 1988; NICOLAU, 2003). Porém, sabe-se que, o comprimento de onda, a energia total irradiada, a frequência de emissão e a dose estão diretamente relacionados com uma eficiente resposta celular a laser terapia (WILDER-SMITH et al., 1988; NARA et al., 1990; DORTBUDAK et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001).

No período de 45 dias o leito cirúrgico apresentou-se praticamente preenchido por tecido ósseo neoformado. A presença de lamelas concêntricas evidencia o processo de organização das fibras colágenas, levando o osso a apresentar características de suporte às forças mastigatórias (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

Sob análise em microscopia de polarização, nesse período o tecido ósseo apresentou anisotropia moderada, o que confirma a presença de osso secundário ou lamelar. A coloração pelo picro sirius nos mostrou as mudanças estruturais da matriz óssea neoformada. A intensidade de coloração e a birrefringência das fibras colágenas variavam dependendo do seu diâmetro e da espessura do tecido. Essa análise nos permitiu verificar a organização tridimensional das fibras colágenas, que é o maior componente do tecido ósseo. (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003).

No período final, o defeito se encontrava totalmente preenchido com tecido ósseo lamelar em meio aos capilares sanguíneos. Lozano et al., 1976 ressaltam a importância da rápida neovascularização no local injuriado. Por essa razão, o reposicionamento do periósteo é de fundamental importância, pois os capilares presentes no periósteo originam novos capilares por brotamento. Esses capilares apresentam justapostos ao seu endotélio células indiferenciadas, os pericítos, capazes de se diferenciar em células osteogênicas promovendo a recuperação da lesão (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Grupo Biomateriais

No período inicial a presença de um processo inflamatório é justificado pela resposta fisiológica normal frente a presença dos biomateriais. O polímero do ácido ricinoléico por se apresentar na forma de partículas irregulares, causa um processo inflamatório inicial. Esses resultados são semelhantes a outros trabalhos citados na literatura (LAMANO-CARVALHO et al., 1997; PURICELLI et al., 1999; CALIXTO et al., 2001; BONINI et al., 2002). As partículas por se apresentarem irregulares com presença de pontas estimulam o deslocamento das cargas elétricas de sua superfície para a região das pontas, deixando assim o material com um potencial piezoelétrico (TAGLIARO, 1966; TRIPLER, 1994).

Shamos et al., 1963; Marino e Becker, 1970; Gjelsvik^b, 1973; Marino e Gross, 1989; Tanaka, 1999, descreveram o efeito da piezoelectricidade no tecido ósseo e mostraram que em regiões de compressão ocorre deslocamento de elétrons enquanto que em regiões de tração ocorre ausência de elétrons deixando o local com potencial positivo. Sabe-se também que as células precursoras de osteoblastos apresentam tropismo por regiões eletronegativas, e os osteoclastos por regiões positivas.

Assim podemos explicar a ação dos osteoclastos nas regiões de pontas das partículas de biomateriais. Nessas regiões ocorre um processo inflamatório exacerbado, pois temos deslocamento de elétrons

para as pontas das partículas. Essas partículas em contato com o tecido ósseo repelem as cargas negativas do tecido, deixando o meio com carga positiva, e ativando assim a ação dos osteoclastos.

O polímero do ácido ricinoléico apresenta um potencial osteocondutor, que é evidenciado pela análise em microscopia de polarização, na qual visualizamos as fibras colágenas se organizando primeiramente em torno das partículas como visto na Figura 51 (IGNÁCIO et al., 1997; LAMANO CARVALHO et al., 1997; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999; CALIXTO et al., 2001; LEONEL^a et al., 2003).

No período de 45 dias ocorreu o aparecimento de cartilagem ao redor dos fragmentos do polímero (Figura 65). Normalmente no processo de reparação óssea há formação de células cartilaginosas de preenchimento. Pois, devido à diminuição da vascularização após a injúria, o único tecido que suporta condições adversas de oxigênio e nutrientes é o tecido cartilaginoso. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Outra possível explicação desse fato é que em presença das BMPs alguns autores relatam a formação de ossificação endocondral. (YASKO et al., 1992; SANDHU et al., 1996; TSURUGA et al., 1997).

Aos 60 dias persistia a ocorrência dos biomateriais em íntimo contato com o tecido ósseo neoformado. Porém, com a presença de uma moderada resposta inflamatória. Possivelmente devido ao processo de reabsorção dos biomateriais e a ação da remodelação óssea fisiológica, ocorreu o aparecimento da inflamação com retardo da completa

neoformação óssea, fato que está em acordo com diversos pesquisadores (PURICELLI et al., 1999; TEIXEIRA e RAMALHO, 1999; MAGRO-FILHO et al., 1999; CALIXTO et al., 2001; LEONEL^a et al., 2003; MASTRANTONIO e RAMALHO, 2003).

Laser + Biomateriais

No período inicial visualizamos a presença de grande quantidade de células, capilares e fibroblastos em meio aos biomateriais de preenchimento. Essa característica diferentemente do grupo de biomateriais somente nos evidencia a importância da vascularização da injúria. Esse fator é condição necessária para o sucesso dos enxertos tanto com biomateriais quanto com osso autógeno (CAMPBELL et al., 1953; RAY e HOLLOWAY, 1957; RICHTER e BOYNE et al., 1969; LOZANO et al., 1976; BUCHARDT, 1983; BLOCK e KENT, 1985; LANCE, 1985; BELL e BEIRNE, 1988; ALPER et al., 1989; ILIZAROV, 1989; COBB et al., 1990; MARKEL et al., 1991; TORIUMI et al., 1991; SERVICE, 2000).

Nos 45 dias verificamos um grau de inflamação menor do que os resultados do GIII-biomateriais. Provavelmente o laser abreviou o processo inflamatório permitindo ao tecido, condições de uma neoformação e maturação do tecido ósseo (FREITAS et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; CAMPANA et al., 1998).

Aos 60 dias uma característica importante para os biomateriais é a presença de poros no interior dos mesmos. O polímero do ácido ricinoléico na forma particulada apresenta poros, o que propicia uma vascularização mais intensa. Na Figura 87 é evidente a formação de tecido conjuntivo no interior dos poros, o que ocasiona um aumento de superfície e uma reabsorção mais efetiva (TSURUGA et al., 1997; CALIXTO et al., 2001; LEONEL^a et al., 2003).

6.4 Dos resultados estatísticos

Para a variável grau de inflamação, o teste estatístico confirmou os resultados obtidos através da análise histológica. Os grupos irradiados pelo laser nos períodos de 15 e 45 dias apresentaram diferença significativa em relação aos demais grupos. Esse resultado mostra o efeito biomodulador do laser de baixa potência (GARCIA et al., 1996; CAMPANA et al., 1998; FREITAS et al., 2000; FREITAS et al., 2001).

No evento formação e qualidade do tecido ósseo, o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença nos grupos dentro dos três períodos de análise. Aos 15 dias o grupo laser apresentou diferença significativa comparada aos demais grupos. No período de 45 dias os grupos com bioestimulação laser apresentaram melhores resultado quando comparados aos demais grupos (FREITAS et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003). Nos 60 dias, o grupo de biomateriais apresentou um atraso em relação aos grupos irradiados com o laser e o controle.

Esse resultado nos mostra que no período final de análise os biomateriais estavam ainda sendo reabsorvidos. Por essa razão, a diferença estatística foi apontada mostrando uma incorporação lenta e gradativa dos biomateriais (CARVALHO^a et al., 1997; CALIXTO et al., 2001).

A análise para o evento maturação e anisotropia das fibras colágenas demonstrou diferenças significantes apenas no período de 15 dias, para os dois grupos irradiados com laser (GIII e GIV). No grupo da associação laser e biomateriais, as fibras se organizaram inicialmente em torno dos materiais enxertados, mostrando a importância de um arcabouço osteocondutor no processo de reparação tecidual (GARAVELLO-FREITAS et al, 2003; GUASTALDI, 2004).

A análise estatística não demonstrou diferenças no processo de amadurecimento das fibras colágenas, aos 45 e 60 dias, para todos grupos (GI, GII, GIII e GIV). Este fato é explicável uma vez que, a análise histomorfológica, sob microscópio mostrou o processo de formação (fibrilogênese), amadurecimento e organização das fibras colágenas ocorrendo à formação de tecido ósseo. Assim sendo, a análise estatística confirma a neoformação óssea nesses períodos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

“Uma descoberta não consiste em ver o que todo mundo viu, mas em pensar o que ninguém ainda pensou.”

Albert E. Gyorgy

7. Conclusão

Enfatizando as condições experimentais específicas desse trabalho e considerando seus resultados, julgamos válidas as seguintes conclusões:

- Os biomateriais promovem neoformação óssea lenta e gradativa;
- Há persistência de biomateriais aos 60 dias;
- O laser estimula células e a microcirculação tecidual, e, a associação aos biomateriais acelera o processo de reparação tecidual;
- A reparação óssea é antecipada com o uso da laser terapia.

“Sejamos razoáveis: busquemos o impossível.”

Platão

8. Referências

Referências*

ALLEGRIINI JR. **Neoformação óssea e induzida por enxertos aloplásticos xenógenos e pela proteína morfogenética óssea (BMP), em seios maxilares de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. São Paulo 2000. 98p. Dissertação (Mestrado em Anatomia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.

ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**. São José dos Campos, v. 3, n. 1, jan./jul. 2000.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.29, n.2, p.179-184, 2001.

ALPER, G. et al. Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 298, n. 6, p. 371-376, Dec.1989.

AUKHIL, I. Biology of wound healing. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 22, p. 44-50, Feb. 2000.

AYRES, M. et al. **Bioestat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 290p. 2003.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BELL, R.; BEIRNE, O.R. Effect of hydroxyapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 46, n. 7, p. 589-594, July 1988.

BENEDICENTI, A. et al. Effect of a 904 nm laser on microcirculation and arteriovenous circulation as evaluated using telethermographic imaging. **Parodontol. Stomatol. (Nuova)**, Savonna, v.23, n.2, May-Aug, p.167-78. 1984.

BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxylapatite with and without autogenous bone in dogs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 3-7, Jan. 1985.

BONINI, S. et al. Resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona: estudo da migração e diferenciação de células no sítio inflamatório. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 17, n. 35, p. 27-37, jan./mar. 2002.

BORTOLETTO, R. et al. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. **Lasers Med Sci.**, London, v. 18, n. 4, p. 204-206, 2004.

BOSS, J. H. et al. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. **Isr. J. Med. Sci.**, Jerusalem, v. 31, n. 4, p. 203-209, Apr. 1995.

BRANDÃO, A. C. et al. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 147-154, 2002.

BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 9, n. 1, p. 50-58, 1989.

BUSER, D. et al. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. 1^a ed., Livraria Santos Editora, São Paulo, 269p., 1996

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n. 174, p. 28-42, Apr. 1983.

CALIXTO, R. F. E. et al. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 257-262, jul./set. 2001.

CAMPANA, V. et al. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 16, n. 6, p. 317-320, Dec. 1998.

CAMPBELL, C. J. et al. Experimental study of the fate of bone grafts. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 35-A, n. 2, p. 332-346, Apr. 1953.

CARVALHO^a, T. L. et al. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of *Ricinus communis* polyurethane resin: histometric analysis in rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 37, n. 4, p. 449-452, Dec. 1997.

CARVALHO^b, T. L. et al. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 26, n. 2, p. 149-152, Apr. 1997.

CARVALHO, P.S.P. et al. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News**, São Paulo, n.3, p. 255-260, mai/jun., 2004.

CAÚLA, A.L.; MACHADO, F.; BARBOZA, E. O potencial da proteína óssea morfogenética humana recombinante-2 (RHBMP-2) na regeneração óssea. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 185-192, 1999.

CAVALIERI, I. **Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo, em tíbia de coelhos**. São José dos Campos, 2000. 108p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual Paulista - UNESP, São José dos Campos, 2000.

COBB, C.M. et al. Restoration of mandibular continuity defects using combinations of hydroxyapatites and autogenous bone: microscopic observations. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 48, n. 3, p. 268-275, Mar. 1990.

COSTA, C. A. S. et al. Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. **Odonto 2000 - Odontologia do Século XXI**, Araraquara, v. 1, n. 1, p. 44-48, jun.1997.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast. Reconstr. Surg.**, Philadelphia, v. 81, n. 5, p. 672-676, May 1988.

DAHLIN, C. et al. Restoration of mandibular non union bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.23, n.4, p.237-42, Aug. 1994.

DORTBUDAK, O. et al. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 540-545, Dec. 2000.

DUCY, P. et al. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, Washington, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, Sept. 2000.

FERREIRA, C.M. et al. Evaluation of the anti microbial activity of three irrigating solution in the pulpal necrosy. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.10, n.1, p.15-221, 1999.

FIGUEIREDO, A. S. D. et al. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir. Bras. [serial online]**, v. 19, n. 4, p. 370-382, jul/ago. 2004.

FREITAS, A. C. et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein levels. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 187-190, 2001.

FREITAS, I. G. F. et al. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 154, p. 548-554, Feb. 2000.

FUENTEFRIA, N. et al. Avaliação histológica da reação tecidual, frente a implante de poliuretana vegetal, na tíbia de rato. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 13, n. 26, p. 29-49, abr./jun. 1998.

GARAVELLO-FREITAS, I. et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 70, n. 2, p. 81-89, May/June 2003.

GARCIA, V. G. et al. Ação da radiação laser na reparação de feridas de extração dental infectadas. estudo histológico em ratos. **RGO**, Porto Alegre, v. 43, n. 4, p. 191-194, jul./ago. 1995.

GARCIA, V. G. et al. Reparação de feridas de extração dental submetidas ao tratamento com raio laser - estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odontol. Lins**, Lins, v. 9, n. 1, p. 33-42, jan./jun. 1996.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 456p., 2003.

GJELSVIK^a, A. Bone remodeling and piezoelectricity. I. **J. Biomech.**, New York, v. 6, n. 1, p. 69-77, Jan. 1973.

GJELSVIK^b, A. Bone remodeling and piezoelectricity. II. **J. Biomech.**, New York, v. 6, n. 2, p. 187-193, Mar. 1973.

GONÇALVES, E.A.L. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. 299-304, 1998.

GUASTALDI, A.C. Biomaterial – ponderações sobre as publicações científicas. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.58, n.3, p.205-206, 2004.

GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C.P. **A odontologia e o laser**: atuação do laser na especialidade odontológica. 1ª ed. São Paulo: Quintessence editora, 320p. 2004.

GUZZARDELLA, G. A. et al. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med. Sci.**, London, v.17, n.3, p.216-20. 2002.

HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, Jönköping, v. 18, n. 1/2, p. 29-34, 1994.

HEDNER, E.; LINDE, A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes - an experimental study in rat mandibular defects. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 103, n. 4, p. 236-241, Aug. 1995.

HOLLINGER, J. O.; LEONG, K. Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. **Biomaterials**, Guilford, v. 17, n. 2, p. 187-94, Jan. 1996.

IGNÁCIO, H. et al. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Rev. Bras. Ortop.**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 187-194, 2002.

IGNÁCIO, H. et al. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio. Estudo experimental em coelhos. **Rev. Bras. Ortop.**, São Paulo, v. 32, n. 10, p. 815-821, out. 1997.

ILIZAROV, G. A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n. 239, p. 263-285, Feb. 1989.

INTERNATIONAL STANDARD – ISO 7405:1997(E). Dentistry-preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-test methods for dental materials. 1ª ed. Geneve, Switzerland, 18p., 1997.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 427p., 1999.

KARU, T. et al. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 27, n. 3, p. 219-223, Mar. 1995.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto - atlas correlações clínicas**. 1ª ed. São Paulo: Panamericana, 381p., 1999.

KFURI JUNIOR, M. et al. Comparação entre pinos absorvíveis de poliparadioxanona e de poliuretana da mamona na fixação de segmentos osteocondrais do fêmur distal de coelhos. **Rev. Bras. Ortop.**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 125-131, abr. 2001.

KHARMANDAYAN, P. **Estudo da interface de contato entre osso e implantes de poliuretano com e sem carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e eletrônica de varredura, em coelhos.** São Paulo, 1997. 175p. Tese (Doutorado em Medicina) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1997.

KINOSHITA, A. et al. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 2, p. 103-109, 1997.

KROESE-DEUTMAN, H. C. et al. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, n. 10, p. 1131-1138, Apr. 2005.

KUCEROVÁ, H. et al. Low-level laser therapy after molar extraction. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 18, n. 6, p. 309-315, Dec. 2000.

LAMANO CARVALHO, T. L. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of Ricinus communis polyurethane resin: Histometric analysis in rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v.37, n.4, p.449-452. 1997.

LANCE, E. M. Some observations on bone graft technology. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n.200, p.114-24, Nov. 1985.

LEONEL^a, E. C. F. et al. A presença do calo ósseo na neoformação óssea promovida pelo polímero de mamona. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 5, p. 314-317, set./out. 2003.

LEONEL^b, E. C. F. et al. Ação de diversos materiais de preenchimento durante a neoformação óssea. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 3, p. 154-156, maio/jun. 2003.

LIEBSCHNER, M. A. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 9, p. 1697-1714, Apr. 2004.

LINDE, A.; HEDNER, E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. **Calcif. Tissue Int.**, Berlin, v.56, n.6, p.549-53, Jun. 1995.

LOZANO, A. J. et al. The early vascularization of onlay bone grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 58, n. 3, p. 302-305, Sep. 1976.

MACEDO, N.L. et al. Bone regeneration with bioactive glass implantation in rats. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v.12, n.2, p. 137-143, 2004.

MAGRO FILHO, O. et al. Implante de película de poliuretano no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 2, p. 69-72 mar./abr. 1999.

MARIA, P. P. et al. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. **Acta. Cir. Bras.**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 332-336, jul./ago. 2003.

MARINO, A. et al. Origin of the piezoelectric effect in bone. **Calcif. Tissue Res.**, Berlin, v. 8, n. 2, p. 177-180, 1971.

MARINO, A.; BECKER, R. O. Piezoelectric effect and growth control in bone. **Nature**, London, v. 228, n. 5270, p. 473-474, Oct. 1970.

MARINO, A.; GROSS, B. D.. Piezoelectricity in cementum, dentine and bone. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 507-509, 1989.

MARINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.

MARKEL, M. D. et al. Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 73, n. 6, p. 914-923, July 1991.

MASTRANTONIO, S. S.; RAMALHO, L. T. O. Resposta do tecido conjuntivo de camundongos ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 31-37, jan./jul. 2003.

MCKEON, T. A.; CHEN, G.O.; LIN, J.T. Biochemical aspects of castor oil biosynthesis. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 28, n. 6, p. 972-974, Dec. 2000.

MCKEON, T. A.; LIN, J.T.; STAFFORD, A.E. Biosynthesis of ricinoleate in castor oil. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 464, p. 37-47, 1999.

MESTER, E. et al. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39. 1985.

MULATINHO, J.; TAGA, R. Aplicação de Osseobond e bioapatita em caso de coloração imediata de implante de titânio. Estudo clínico e histológico. **Rev. Bras. Implant.**, Curitiba, v.4, p.11-15, jul/ago. 1996.

NAGAHARA, K. et al. An in vivo evaluation of an osteoinductive implantable material produced by osteoblastic cells in vitro. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 9, n. 1, p. 41-48, Jan./Feb. 1994.

NARA, Y. et al. Growth acceleration of human dental pulpal fibroblasts by semiconductor laser. **Surgical and Medical Lasers**, v. 3, n. 4, p. 200-203, Dec. 1990.

NICOLAU, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med. Sci.**, London, v.18, p. 89-94, 2003

NICOOLI-FILHO, W. D. et al. Efeito da radiação laser do tipo hélio-neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 213-221, jul./dez. 1993.

NICOOLI-FILHO, W. D.; OKAMOTO, H. Effect of the helium-neon laser on the healing of extraction wounds: a histological study in rats. **J. Laser Appl.**, Toledo, v. 6, n. 4, p. 237-240, Aug. 1994.

NUNES, F. D. O uso das proteínas morfogenéticas do osso em odontologia. **Rev. da Assoc. Paul. Cir. Dent.** São Paulo, v. 53, n. 4, p. 300, jul/ago. 1999.

OHARA, G.H.; KOJIMA, K.E.; ROSSI, J.C. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta. Ortop. Bras.**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 62-68, 1995.

OLFERT, E.D. et al. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. **Consejo Canadiense de Protección de los animales.** Ontario, v.1, 1998.

OLIVEIRA, J. A. G. P. et al. Ação da irradiação laser (arsênio-galio) sobre a cronologia do processo de reparo em feridas cutâneas. estudo histológico em ratos. **ROBRAC: Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 6, n. 21, p. 28-31, mar. 1997.

ONO, I. et al. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 90, n. 5, p. 870-879, Nov. 1992.

PADCT- Edital SNM 02/9404. Apoio a projetos para o desenvolvimento de novos materiais. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseado em poliuretanas derivadas de óleo de mamona. São Carlos: Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo. jul., 1994.

PASCHOAL, A.L. **Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo.** São Carlos, 2003. 112p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

PASCON, E. A. et al. Biocompatibilidade de materiais endodônticos. Resposta do tecido ósseo de cobaia à resina poliuretana derivada do óleo de mamona - Parte 3. **Rev ABO Nac.**, Rio de Janeiro, v. 8, n.6, p. 356-368, dez./jan. 2001.

PINHEIRO, A. L. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseus membrane. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 21, n. 5, p. 301-306, Oct. 2003.

PRETEL, H. et al. Avaliation of wound healing using the laser and pomade of esther ricinoleic acid. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.81, sp. iss. B, p.B91, Dec. 2002. Abstract 398.

PRETEL, H. et al. Bone regeneration after implant with mamona particles added BMP and hydroxyapatite, biostimulated by low intensity laser. **J. Dent. Res.** Chicago, v.82, sp. iss. C, p.172, Dec. 2003. Abstract Ib163.

PURICELLI, E. et al. Estudo histológico do polímero poliuretano da mamona implantado no ângulo mandibular de ratos. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 40, n. 1, p. 38-41 set. 1999.

RAY, R. D.; HOLLOWAY, J. A. Bone implants; preliminary report of an experimental study. **J Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 39-A, n. 5, p. 1119-1128 Oct. 1957.

REDDI, A. H. et al. Biologic principles of bone induction. **Orthop. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 207-212, Apr. 1987.

RENGACHARY, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. **Neurosurg Focus**, Charlottesville, v. 13, n. 6, p.1-6, Dec. 2002.

RICHTER, H. E.; BOYNE, P. J. New concepts in facial bone healing and grafting procedures. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 27, n. 7, p. 557-559, July 1969.

ROCHKIND, S. et al. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, n. 3, p. 249-253, June 2004.

RODRIGUES, R. F. O. et al. As folhas de Palma Christi - *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, jul./dez. 2002.

ROSLINDO, N. C. et al. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal e germes dentários in vitro. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 265-274, jul./dez. 1997.

RUHÉ, P. Q. et al. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, n. 11, p. 2123-2132, May 2004.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v. 111, n. 5, p. 525-532, May. 1997.

SAMPATH, T.K.; RUEGER, D.C. Structure, function, and orthopedic applications of osteogenic protein-1 (OP-1). **Complications in Orthopedics**, Coribn, v.9, n.4, p.101-107, 1994.

SANDHU, H. S. et al. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. **Spine**, Hagerstown, v. 21, n. 18, p. 2115-2122, Sept. 1996.

SELLERS, R. S. et al. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 82, n. 2, p. 151-160, Feb. 2000.

SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, Washington, v. 289, n. 5484, p. 1498-1500, Sept. 2000.

SHAMOS, M. H., et al. Piezoelectric effect in bone. **Nature**, London, v. 197, p. 81, Jan. 1963.

SILVA JUNIOR, A.N. et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 20, n. 2, p. 83-87, Apr. 2002.

SILVA, M. J. A. et al. Estudo do comportamento do tecido ósseo frente ao implante do polímero de mamona em raios de coelhos, pela análise quantitativa das radiopacidades nas imagens radiográficas convencionais. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 5, n. 3/4, p. 69-77, jul./dez. 1997.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 24, p. 99-126, Oct. 2000.

SOUZA, A. M. et al. Biopolímero da mamona na reconstrução de falhas ósseas após ressecção de tumores no esqueleto apendicular. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco**, Recife, v. 47, n. 2, p. 116-123, 2002.

SPECTOR, J. A. et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 107, n. 1, p. 124-134, Jan. 2001.

TAGA, R et al. Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de osseobond e bioapatita e membrana absorvível de cortical óssea bovina. **JBE**, Curitiba, ano1, n.1, p.78-87, 2000.

TAGLIARO, A. **Física**. 10^a ed. São Paulo: Editora F.T.D., 1966

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 388-391, Dec. 1988.

TANAKA, S. M. A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator. **J. Biomech.**, New York, v. 32, n. 4, p. 427-430, Apr. 1999.

TAVANO, O. et al. Estudo da densidade radiográfica digial de tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 7, n. 3/4, p. 53-58, jul./dez. 1999.

TEIXEIRA, H. M.; RAMALHO, L. T. O. Reação à resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 49-61, jan./jun. 1999.

TEN CATE, A.R. **Histologia bucal**. Desenvolvimento, estrutura e função. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 439p., 2001.

TORIUMI, D. M. et al. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Chicago, v. 117, n. 10, p. 1101-1112, Oct. 1991.

TRIPLER, P. A. **Física**: para cientista e engenheiros. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

TSURUGA, E. et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. **J. Biochem.** Tokyo, v. 121, n. 2, p. 317-324, Feb. 1997.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, n. 698, p. 893-899, Nov. 1965.

URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1392-1406, Dec. 1971.

VILARINHO, R. H. et al. Implante de resina de poliuretana vegetal na camara anterior do olho de camundongo. **Odonto 2000 - Odontologia do Século XXI**, Araraquara, v. 1, n. 0, p. 25-29, 1996.

WILDER-SMITH, P. The soft laser: therapeutic tool or popular placebo? **Oral. Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 66, n. 6, p. 654-658, Dec. 1988.

XIAO, Y. et al. Expression of extracellular matrix macromolecules around demineralized freeze-dried bone allografts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 11, p. 1233-1244, Nov. 1996.

YAMAMOTO, M. et al. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 16, n. 3, p. 213-217, 2001.

YASKO, A. W. et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 74, n. 5, p. 659-670, June 1992.

YUDELL, R. M.; BLOCK, M. S. Bone gap healing in the dog using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 58, n. 7, p. 761-766, July 2000.

ZELLIN, G., et al. Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. **Connect. Tissue Res.**, New York, v. 35, n. 1-4, p. 279-284, 1996.

"O acaso não existe. Nós que não conhecemos as leis da casualidade"

Jorge Luis Borges

9. Anexos

9.1 Anexo I – Comitê de Ética

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Araraquara, 04 de outubro de 2004

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 062/2004

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 27/09/2004, após a avaliação final do projeto de sua responsabilidade intitulado "Ação de biomateriais e laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea" (Proc. CEEA nr. 24/2004) considerou-o **APROVADO**, devendo o **relatório final** ser apresentado em **MARÇO/2005**.

Atenciosamente.


Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA

Ao
C.D. HERMES PRETEL
DD. Pesquisador Responsável
Nesta

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaidá, nº 1.639 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 201-6431 / fax (16) 201-6433 / e-mail: director@foa.unesp.br - home page: http://www.foa.unesp.br

Resumo

PRETEL, H. **Ação de Biomateriais e do Laser de Baixa Intensidade na Reparação de tecido ósseo. Estudo histológico em ratos.** 2005. 165f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas – Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

A poliuretana derivada do óleo de mamona propicia estimulação na reparação óssea por apresentar propriedades de osteocondutividade auxiliando na neoformação óssea. Quanto a osteoindução, pode ser estimulada por fatores de crescimento, como a BMP, e por fatores físicos como o laser. O trabalho avaliou a regeneração óssea a partir da confecção de uma lesão na base da mandíbula de rato, preenchida com mamona particulada, acrescida do “pool” de BMP e Hidroxiapatita (HA) absorvível. Posteriormente aplicou-se ou não um estímulo local com o laser de baixa intensidade. O aparelho utilizado foi o Laser beam (Semicondutor de Arseneto de Gálio-Alumínio, infravermelho - 785nm, 35mW). Foram usados 60 ratos Holtzman, divididos em quatro grupos de 15 animais, e estes subdivididos em 5 animais por período de análise, da seguinte forma: Grupo Controle (somente defeito); Grupo Experimental com estimulação laser (dose=178J/cm²; energia=1,4J); Grupo Experimental com mamona particulada acrescido de (BMP-HA); Grupo Experimental com mamona particulada acrescido de (BMP-HA), e estimulação laser (dose=178J/cm²; energia=1,4J). Os ratos foram sacrificados nos períodos de 15, 45 e 60 dias; as mandíbulas foram removidas e processadas para inclusão em parafina, e os cortes de 6µm foram corados por H&E, Tricrômico de Massom e Picro sirius. *Os resultados histológicos mostraram formação óssea em todos os grupos. Nos grupos com o laser, a resposta tecidual foi antecipada em relação aos demais grupos promovendo a rápida neoformação da matriz óssea.*

Palavras-chave: Osso e Ossos; Terapia a laser de baixa intensidade; Materiais biocompatíveis; Durapatita; Óleo de rícino; Ratos.

Abstract

PRETEL, H. **Biomaterials and LILT on the bone tissue healing activity. Study in rats.** 2005. 165f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas – Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

It suggest that polyurethane achieved from (*Ricinus communis*) induces bone repair because their osteoconductivity properties. In concerning the bone-inducing, that promotes osseous neoformation, it has been stimulate by growth factors, as bone morphogenetic protein (BMP), and laser therapy. The aim of this study was to evaluate osseous regeneration after mandible defects created in rats, and covered with polyurethane resin particles (*Ricinus communis*), added with BMP and absorbable Hydroxyapatite (HA), stimulated or not by Laser beam. It was used the laser equipment “Laser beam” (Infra-red, continuous, Gallium-arsenide, 785nm, 35mW). Were utilized for this study 60 rats (Holtzman), were distributed in 4 groups of 15 animals. The control group (with only defect); the experimental group with laser stimulated (fluency=178J/cm²; energy=1,4J); the experimental group with resin particles added with (BMP-HA), and another similar group with laser stimulation (fluency=178J/cm²; energy=1,4J). The animals were then sacrificed at the 15th, 45th and 60th days; mandibles were removed and processed for light microscopy. The histological examination samples were stain with H&E, Tricomomic of Masson and Sirius Red. The results showed osseous neoformation in all groups. However, in the groups with laser stimulation the tissue response presented demonstrating earlier bone matrix formation.

Keywords: Bone and Bones; Laser Therapy; Biocompatible Materials; Castor Oil; Durapatite; Rats.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação intitulada “Ação de biomateriais e laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. estudo histológico em ratos”, por processos fotocopiadores ou tramitação eletrônica.

Hermes Pretel
Araraquara, 11 de fevereiro de 2005.