



Universidade Federal da Paraíba



Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós Graduação em Odontologia

**Estudo comparativo entre enxertos de
Hidroxiapatita e Gesso Paris na
reparação óssea em calvária de ratos**

Antônio Carlos Lopes Branco

João Pessoa 2011

Antônio Carlos Lopes Branco

Estudo comparativo entre enxertos de hidroxiapatita e gesso paris na reparação óssea em calvária de ratos

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em odontologia da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de mestre em odontologia na área de estomatologia.

Orientador: Francisco de Assis Limeira Junior

Co-orientador: Fabiano Gonzaga Rodrigues

João Pessoa 2011

FICHA CATALOGRÁFICA



Este trabalho foi realizado no laboratório.de Bodiagnóstico da Escola Técnica de saúde e no laboratório.de Microscopia e Imagem Biológica (TAIMIN) da Universidade Federal da Paraíba.

BRANCO A.C.L. Estudo comparativo entre enxertos de hidroxiapatita e gesso paris na reparação óssea em calvária de ratos. Dissertação (Mestrado em Estomatologia) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

Banca examinadora

Aprovado em ____/____/____

1) Prof(a). Dr(a).:_____

Instituição_____assinatura_____

2) Prof(a). Dr(a).:_____

Instituição_____assinatura_____

3) Prof(a). Dr(a).:_____

Instituição_____assinatura_____

DEDICATÓRIA

À DEUS, PERMANENTE LUZ EM MEU CAMINHO,
AOS MEUS PAÍS, AFRÂNIO E CONSUELO EXEMPLOS DE CARINHO E RENUNCIA EM
FAVOR DOS FILHOS, QUE FORAM E AINDA SÃO A PEÇA CHAVE NA MINHA
FORMAÇÃO, ACREDITARAM COMPARTILHARAM E CONTRIBUÍRAM COM A
REALIZAÇÃO DE MEUS SONHOS, SEM PERMITIR QUE NADA ME FALTASSE.
ME DERAM A MÃO TODAS AS VEZES QUE PRECISEI, SEM RELUTAR NOS MOMENTOS
MAIS DIFÍCEIS E MUITAS VEZES ANGUSTIANTES DA MINHA VIDA, EM TODAS AS
INSTÂNCIAS E NÍVEIS DE DIFICULDADES.
A DISPONIBILIDADE E O AFETO DE VOCÊS POR MIM, ME ALIMENTA DE UM
SENTIMENTO DE GRATIDÃO IMENSURÁVEL.
AOS MEUS FILHOS QUE MESMO SEM ENTENDEREM A IMPORTÂNCIA DE MEUS
PASSOS, ME IMPULSIONARAM SEMPRE PARA QUE UM DIA POSSAM SE ORGULHAR
DE MIM.
AS PESSOAS QUE JUNTO A MIM CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO DESTE
SONHO TÃO ANTIGO.
AGRADEÇO ATÉ ÀQUELAS QUE ME VIRARAM AS COSTAS, POIS
INVOLUNTARIAMENTE SERVIRAM DE MAIS UM IMPULSO PARA QUE PUDESSE
CHEGAR AOS MEUS OBJETIVOS.
POR ESTA RAZÃO, FAZEMOS PARTE DESTA MESMA VITÓRIA, E É A VOCÊS QUE
DEDICO.

“Há homens que lutam um dia;

E por isso são bons;

Há aqueles que lutam por

muitos dias;

E por isso são muito bons;

Há aqueles que lutam anos;

E são melhores ainda;

*Porém há aqueles que lutam toda
vida;*

“Esses são imprescindíveis.”

Bertold Brecht

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof.Dr. **Francisco de Assis Limeira Junior** e meu Co-orientador Prof. Dr. **Fabiano Gonzaga Rodrigues**, pelo incentivo e total apoio durante todo o desenvolvimento do projeto.

A Minha Amiga **Tamires Sena Alcoforado**, bolsista do Laboratório de Imagens Biológicas do CCS-UfPb , por ter colaborado de maneira decisiva na elaboração deste trabalho. A Você minha profunda gratidão a amizade.

Ao Prof. **Dr. Frederico** pelo auxílio e orientação na fase final deste projeto, sem as quais este não seria possível.

A profa. **Icléa Honorato**, pela gentileza na liberação do Laboratório de Bodiagnóstico da Escola de Saúde da UfPb, que foi decisivo na finalização e qualidade deste projeto.

A minha companheira **Antônia Claudino de Oliveira**, pelo total apoio , incentivo,pelas horas de dedicação junto a mim ,dentro e fora da escola, colaboração com sua experiência em toda a fase cirúrgico-experimental e moral do projeto sem a qual teria sido muito mais difícil o caminho.

E mais Uma vez, fico sem palavras para agradecer a minha mãe Consêlo Simões Branco por todas as vezes que me incentivou, apoiou, induziu, pois sem isto, nada seria possível , ou não teria o mesmo sabor em minha vida.

A todos que contribuíram direta e indiretamente, o meu mais sincero obrigado e que Deus os ilumine.

RESUMO

A utilização de materiais em enxertos ósseos, que favorecem a regeneração, é um fato bastante comum nos procedimentos reabilitadores. Diversos materiais são utilizados para este fim, mas dentre eles, o gesso paris, que foi um dos precursores desta linha, entrou em desuso em detrimento de materiais mais elaborados. O objetivo deste estudo foi fazer uma análise comparativa entre o gesso paris e a hidroxiapatita reabsorvível, visando estabelecer uma margem de confiabilidade de utilização para este material nos dias atuais como uma opção de baixo custo e fácil manuseio. Para isto, foi feito uma análise em 36 ratos Wistar fêmeas, com a utilização destes materiais, para uma posterior análise histológica da reparação da ferida cirúrgica. Este estudo demonstrou que nesta situação, não existiu diferença no potencial de reparação óssea se comparando os dois materiais e o grupo controle que utilizou apenas coágulo sanguíneo, como também a excelente biocompatibilidade dos mesmos com o potencial negativo de produzir reações indesejadas.

LINHA DE PESQUISA

Biomateriais em odontologia

DESCRITORES

Gesso paris

Hidroxiapatita

Enxerto\Biomateriais

ABSTRACT

The use of bone graft materials that promote the regeneration, it is a fact quite common in rehabilitation procedures. Various materials are used for this purpose, but among them, the plaster paris, which was one of the forerunners of this line fell into disuse at the expense of more elaborate materials. The objective of this study was a comparative analysis between the plaster paris and resorbable hydroxyapatite, to establish a degree of reliability of use for this material today as an option for low cost and easy handling. For this, an analysis was performed on 36 female Wistar rats with the use of these materials, for subsequent histological analysis of wound repair. This study demonstrated that in this situation, there was no difference in the potential of bone repair by comparing the two materials and the control group using only a blood clot, as well as the excellent biocompatibility of the same with the negative potential to produce unwanted reactions.

LINE SEARCH

Biomaterials in dentistry

DESCRIPTORS

Plaster paris

hydroxyapatite

Graft \ Biomaterials

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS DO REPARO ÓSSEO	16
2.2 IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA NO REPARO ÓSSEO	18
2.3 SULFATO DE CALCIO	20
3.OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. HIPÓTESE DE ESTUDO	22
5. METODOLOGIA	23
5.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	23
5.1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	23
5.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	23
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	23
5.4 ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS	24

5.5 DIVISÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	24
5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS	25
5.7 CARACTERÍSTICA DOS BIOMATERIAIS	26
5.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	27
5.8.1 ANESTESIA GERAL	28
5.8.2 TÉCNICA CIRÚRGICA	30
5.8.3 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	36
5.8.4 CICLO DE SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	36
5.8.5 COLETA DOS DADOS.....	36
5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	38
5.9.1 CRITÉRIOS DE GRADAÇÃO	38
5.9.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	38
6.RESULTADOS.....	41
7.DISSCUSSÃO.....	57
8.CONCLUSÃO.....	63
10.ANEXOS.....	64
9.REFERÊNCIA.....	66

1. INTRODUÇÃO

Durante muitos anos trabalhos de pesquisa vem sendo estruturados com o objetivo de encontrar um material que possibilite a reconstituição óssea de maneira adequada. Este material prioritariamente deverá possuir características compatíveis com a reparação ou substituição do tecido ósseo.

Inicialmente estas pesquisas se deram com a utilização de materiais de origens biológicas, como enxertos e transplantes, que recebem a classificação de autógenos.

Essencialmente o osso é constituído de dois componentes:

- a) matriz mineralizada, fosfato de cálcio cristalino;
- b) matriz orgânica contendo principalmente colágeno tipo I e traços de fatores de crescimento como proteínas morfogenéticas

Inicialmente, faz-se necessária uma breve introdução sobre os três mecanismos biológicos de formação óssea: osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A osteogênese surge, inicialmente, das células transplantadas no enxerto, que proliferam e formam novo osteóide. A quantidade de regeneração óssea durante essa fase depende da quantidade de células ósseas transplantadas que resistem ao procedimento de enxerto.

A osteoindução é a formação de tecido ósseo a partir da diferenciação dos fibroblastos do tecido conjuntivo em osteoblastos.

Na osteocondução há formação óssea por meio de um processo de crescimento de capilares e células ósseas progenitoras, seja dentro, em volta ou através do enxerto ósseo ou arcabouço previamente instalado, servindo como um elo de ligação para a formação de um novo osso. Diferentemente da osteoindução, esse processo ocorre em locais onde já há formação de tecido ósseo (KONTIO, 2004).

Segundo LeGeros (2002), os enxertos autógenos e alógenos são as opções tradicionais de tratamento para defeitos ósseos extensos, porém o seu uso é associado com diversas desvantagens. Os autógenos apesar de serem considerados os mais efetivos, necessitam de um procedimento cirúrgico adicional, trazem uma viabilidade limitada e carregam a possibilidade de morbidade do sítio doador.

Substitutos ósseos Alógenos e xenógenos, tem sido estudados para substituir os riscos associados com o osso autógeno, mas o seu uso é complicado devido a imunogenicidade e conseqüente rejeição, seqüestro do enxerto, infecção, e o seu potencial de transmissão de doenças.

A atuação desses substituintes ósseos na osteogênese é puramente passiva; eles oferecem uma matriz de tecido duro para a indução da fase II, responsável pela angiogênese e proliferação fibroblástica do leito receptor sobre o enxerto ósseo, e logo começa a osteogênese do tecido conjuntivo.

Os tecidos calcificados que participam do processo de regeneração óssea podem ser identificados em tecido condróide, cartilagem calcificada, osso fibrorreticular, e osso lamelar, sendo a identificação do tecido condróide possível somente com técnicas que preservam a natureza calcificada dos tecidos (Dhem et al, 1989; Franch, 1994). Jasty et al. (1992) e Suominen et al. (1995) *apud* SHEYLA et al. (2008), encontraram osso fibrorreticular com tres semanas e osso reticular com seis semanas, após a implantação de hidroxiapatita em cães e coelhos respectivamente. Estes autores não observaram na interface hidroxiapatita osso, a presença de tecido conjuntivo fibroso. Concluíram que a presença de um componente osteocondutivo favorece o crescimento ósseo nas fases iniciais do pós operatório.

1.1 JUSTIFICATIVA

A pesquisa teve como objetivo comprovar as características de ósteoindução do gesso paris utilizado obedecendo todo o protocolo de manipulação para este fim, objetivando encontrar um material de baixo custo e alta efetividade nos procedimentos de regeneração óssea, sendo que a análise inicial desta pesquisa visou apenas avaliar o comportamento do material pré-cristalizado frente ao processo de regeneração óssea.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS DO REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Como tecido especializado em suportar pressões, sucede à cartilagem, tanto na ontogênese quanto na filogênese. Constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue. Além dessas funções, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1985).

Como outros tecidos conjuntivos de sustentação, o osso é composto de células e uma matriz extracelular que contém substância fundamental orgânica e fibras colágenas. Essa matriz orgânica constitui 33% do tecido ósseo, dos quais 28% são colágeno do tipo I e os 5% restantes são *proteínas não colágenas* (BURKITT *et al.*, 1994).

O componente principal da matriz óssea é o colágeno, semelhante ao encontrado na pele e tendões, porém mais resistente e menos solúvel, provavelmente devido às características do "*cross-linking*" entre as cadeias de polipeptídeos, no seu processo de maturação (MODOLIN; SOUZA, 1993). Há ainda pequena quantidade de substância fundamental amorfa que contém proteoglicanas e glicoproteínas. Entre as glicosaminoglicanas do tecido ósseo encontra-se a condroitina-4-fosfato, a condroitina-6-sulfato e o queratossulfato (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1985).

A substância inorgânica da matriz óssea é composta por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Seu tamanho é de 25 a 50Å de largura e 100Å de comprimento. Possuem uma superfície de contato muito grande, favorecendo as trocas iônicas, o que limita seu crescimento. Estes cristais mantêm relação direta com o colágeno e colocam-se paralelamente ao seu eixo longitudinal, devido à forças ou ainda por ligações físicas diretas (MODOLIN; SOUZA, 1993). A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e

resistência característica do tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1985; WILLIAMS *et al.*, 1995).

As células que formam o tecido ósseo são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo que as duas primeiras são derivadas de células mesenquimais. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção da matriz óssea extracelular, estando agregados em uma única camada de células situadas em aposição ao osso em formação. Os osteócitos são células ósseas maduras que se encontram incluídas na matriz óssea (dentro de lacunas) recentemente depositada por eles, quando ainda eram osteoblastos. São responsáveis pela manutenção da matriz óssea, contribuindo para a homeostase do cálcio sanguíneo. Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas, cuja função é reabsorver osso. Estão ativamente associados ao remodelamento do osso. Quando em atividade, os osteoclastos repousam sobre a superfície do osso e, através de erosão pela ação enzimática, formam um recesso pouco profundo conhecido como Lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção (BURKITT *et al.*, 1994, WILLIAMS *et al.*, 1995). Ao contrário dos osteoblastos e dos osteócitos, os osteoclastos provavelmente são derivados do sistema macrófago – monócito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1985; BURKITT *et al.*, 1994).

2.2 IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA NO REPARO ÓSSEO

A Hidroxiapatita se constitui um dos biomateriais mais utilizados para o preenchimento de cavidades ósseas, não apenas por apresentar excelente biocompatibilidade, mas também por estar associado a bons níveis de osteocondução. Pode ser reabsorvível ou não reabsorvível. O tipo reabsorvível é indicado nos casos onde se necessita da substituição do mesmo pelo tecido ósseo e freqüentemente é associado à matriz orgânica de osso e membranas biológicas na sua utilização. Dentre elas existem disponíveis no mercado duas marcas: uma de procedência norte-americana com granulação média de 100 micrômetros¹ e a outra desenvolvida no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru com uma granulação média de 10 a 50 micrômetros². O tipo não reabsorvível é indicado nos casos cirúrgicos onde houve grande perda de tecido

¹ OSTEOTEN[®]

² BIOAPATITA[®]

ósseo e necessita-se realizar um preenchimento da cavidade surgida em consequência da lesão patológica. No mercado nacional existem várias marcas disponíveis de Hidroxiapatita não reabsorvível, todos de procedência nacional³ e de procedência norte-americana⁴ (TAGA; MULATINHO, 1999).

A Hidroxiapatita pode ser utilizada em qualquer região do organismo onde haja osso, como em Ortopedia, Cirurgia Plástica, reconstruções faciais e em Odontologia (GARBIN; GARBIN, 1994). É um material de preenchimento e possui boas aplicações clínicas em Odontologia, como em cavidades alveolares (ROSA; BRENTAGANI; GRANDINI, 1995; TAKESHITA *et al.*, 1997), defeitos periodontais (SEIBERT; NYMAN, 1990; MILÁN; DOMINGUEZ, 1998), preenchimento de defeito em torno de implante (CAIAZZA *et al.*, 2002; LINS *et al.*, 2003; TAKESHITA *et al.*, 1997), aumento de rebordo em indivíduos edêntulos para suporte de prótese total (CALLAN; ROHRER, 1993; DIAZ, 1995), entre outras indicações. Além disso, vários estudos experimentais sobre reparo ósseo que avaliaram a performance de implantes de Hidroxiapatita foram realizados, comprovando sempre o seu potencial osteocondutor e sua capacidade de estimular a atividade osteoblástica (BUCHAIM *et al.*, 2002; CHU *et al.*, 2002; DALBY *et al.*, 2002; DALKÝZ *et al.*, 2002; DELIGIANII, *et al.*, 2001; KURASHINA *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2003; MANSO *et al.*, 2002; MOURSI *et al.*, 2002; ROSEN; HOBBS; SPECTOR, 2002).

Marzola; Toledo Filho; Zorzetto (1996) relataram seis casos cirúrgicos de exéreses de cistos odontogênicos, onde foram usados implantes⁵ associados a uma membrana reabsorvível⁶. Para os autores, após o uso desses biomateriais em mais de 20 pacientes, com acompanhamento de mais de dois anos, parece lícito concluir que se trata de um excelente material implantar, com ótima aceitação pelos pacientes e, que não apresentaram nenhum sinal de eliminação ou rejeição.

Gabrielli *et al.* (2001) realizaram um estudo histológico sobre implantes de Hidroxiapatita em cavidades ósseas confeccionadas em arco zigomático de ratos. Para tanto 50 ratos albinos foram divididos em quatro grupos que receberam: grupo I – controle; grupo II – implantes de Hidroxiapatita não reabsorvível⁷; grupo III – implantes de Hidroxiapatita experimental; grupo IV - implantes de Hidroxiapatita

³ HA-40®, OSTEOSYNT®, BIOSYNTH®

⁴ INTERPORE 200® Porosa

⁵ Bioapatita® e Osseobond®. Atualmente denominados, respectivamente, Gen-phos® e Gen-ox® e produzidos pela Baumer S.A, Mogi Mirim – SP.

⁶ Dentoflex®. Atualmente denominada Gen-derm® e produzida pela Baumer S.A, Mogi Mirim – SP.

⁷ Interpore®

experimental associada a colágeno. Segundo os autores, os melhores resultados foram encontrados nas cavidades submetidas a implante de Hidroxiapatita experimental que apresentou propriedades superiores em relação a neoformação óssea. Neste grupo, a aposição direta de tecido ósseo neoformado sobre o implante foi constatada já a partir do período de 15 dias pós-implantar. Ressaltam, ainda, os autores, que todos os materiais testados foram biocompatíveis, com resposta inflamatória mais intensa para o grupo IV.

Brandão *et al.* (2002), estudando os efeitos da Hidroxiapatita sintética (HA) granular, em reparo alveolar pós-exodontia, observaram que no alvéolo com implante apenas de HA, o volume ósseo presente foi menor em relação ao grupo controle 21 e 42 dias após a cirurgia refletindo um significativo atraso na cronologia do reparo alveolar. No entanto, para os autores, a persistência de partículas de HA no alvéolo a ausência de inflamação aos 42 dias pós-operatório apontam para um benefício a longo prazo, como a manutenção da anatomia do alvéolo.

2.3 SULFATO DE CALCIO

O gesso paris (CaSO_4) tem sido utilizado desde o final do século 19. Os defeitos ósseos tratados com este material mostrou uma cicatrização mais rápida e mais maduras do tecido ósseo recém-formado que o controle (ALDERMAN, 1969)

Mineral chamado gipsita, cozido a baixa temperatura e empregado em diversas modalidades. Passa por várias etapas antes de sua composição final, iniciando-se pela extração do ambiente natural, seguida por sua trituração, pela desidratação através de cozimento em fornos especiais, até a trituração completa que o torna pó.

Existem tipos de gesso diferentes, de acordo com o grau de calcinação, sendo o gesso de Paris obtido por calcinação incompleta, de modo que resta meia molécula de água para cada molécula de gesso paris.

Esta substância é um simples e altamente biocompatível enxerto possuindo uma história muito longa clínica. Ela tem sido usada em defeitos periodontais, tratamentos endodônticos, sítios após exodontias, e procedimentos de elevação do seio maxilar.

O gesso paris como barreira de membrana tem sido utilizada para prevenir a perda do material enxertado, visto que não interfere com os processos de cura. O gesso paris pode também ser utilizado em associação com outros tipos de

materiais, tais como o osso autógeno, desmineralizado, liofilizado, polímeros ou hidroxiapatita, um aumento do efeito positivo na regeneração óssea potencial tem sido reportada (RICCI, 2000)

Ele combinado com osso autógeno mostrou consideravelmente maior potencial de regeneração. Foi demonstrado que este material pode servir como uma matriz que pode suportar os outros materiais de enxerto particulados (PECORA, 2001).

Além disso, tem sido proposto como um sistema de entrega de antibióticos, facilitando o crescimento de fatores, e proteína morfogenética óssea.

Por ser um material de rápida reabsorção que deixa para trás uma malha de fosfato de cálcio, que promove regeneração óssea (TURNER, 2003), com uma mais rápida taxa de reabsorção de gesso paris provavelmente pode permitir uma entrada mais cedo de células osteoprogenitoras (MCNEILL, 1999).

O gesso paris normalmente é para ser reabsorvido por volta de seis semanas em defeitos tibiais de coelho, enquanto (BEESON, 1981), em um estudo radiográfico da medula canina, o gesso paris apareceu ser totalmente reabsorvida e substituído por osso em 13 semanas (TURNER, 2003).

Nenhuma resposta inflamatória adversos foi observada com o uso de gesso paris, e este material demonstrou ser tão eficaz quanto osso o autólogo na obtenção de um completo selamento de grandes defeitos ósseos (RICCI, 2000; TURNER, 2003).

Entre os materiais de enxerto, tem sido utilizado com sucesso para a regeneração óssea guiada como relatado em implantologia por Sottosanti (1993) e Rocci (1997). Esta substância foi utilizada para induzir a formação óssea em vários estudos experimentais in vivo. Um relatório inicial de Pecora (1998) descreve os resultados da biópsia óssea tomadas a partir de 2 pacientes após nove meses a elevação dos seios usando um enxerto de gesso paris hemi-hidratado de grau médico. Os resultados indicaram que houve a formação de osso novo.

Semelhantes achados histológicos foram confirmados por De Leonardis e Pecora (1998) em uma série de 60 casos. Guarnieri e Bovi¹⁹ usado um gesso paris, que foi pré-endurecido a 140°C por 1 hora e, em seguida, implantados com algum gesso paris recém-preparado em uma estrutura óssea trabecular.

O gesso paris é considerado um material seguro, porque é absorvível, maleável, facilmente manipulável, e pode ser usado como um enchimento ou agente aglutinante de implantes ósseos, além de apresentar baixo custo.

Ele pode ser usado como uma barreira física, permitindo o mecanismo osteopromoção, bem como realização de regeneração óssea em ensaios clínicos controlados e em estudos com animais (PIETRZAK, 2000).

Uma das principais vantagens associadas com gesso paris é a sua biocompatibilidade in vitro e sua tolerância ao vivo em tecido gengival (SHAFFER, 1971).

Embora os relatórios tenham documentado resultados positivos obtidos com o uso dos materiais acima mencionados, há também uma demanda por estudos que demonstrem os achados histológicos dos efeitos do gesso paris, e quando utilizado como uma barreira, no tratamento de defeitos ósseos.

Uma desvantagem associada ao uso do SC como material de enxerto é sua elevada taxa de degradação. Ele sofre um processo de degradação em uma taxa de aproximadamente 1mm/semana podendo ser completamente degradado em aproximadamente 04 (quatro) semanas (RICCI, 2000)

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL

A finalidade desta pesquisa foi avaliar a reparação de cavidades críticas confeccionadas em calvária de ratos após a implantação isoladamente de gesso paris em grau não médico , cristalizado e particulado e a hidroxiapatita sintética reabsorvível sem a utilização de membranas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar microscopicamente reparação óssea após o implante de hidroxiapatita sintética reabsorvível e gesso paris em cavidade ósseas confeccionadas em calvária de ratos;
- Avaliar comparativamente a reparação óssea após o implante de gesso paris e a hidroxiapatita sintética isoladamente em cavidade ósseas confeccionadas em calvária de ratos;

4. HIPÓTESE DE ESTUDO

Ho: A reparação de cavidades ósseas em calvária de ratos não é incrementada pelo implante de gesso paris e hidroxiapatita sintética.

H1: A reparação de cavidades ósseas em calvária de ratos é incrementada pelo implante de gesso paris e hidroxiapatita sintética.

5. METODOLOGIA

5.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal do CCS da Universidade Federal da Paraíba.

5.1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto pauta-se pelos preceitos éticos, conforme as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA): quando estes são utilizados em pesquisas, objetiva-se adequar os animais ao menor desconforto, angústia ou dor. Considerando que os animais submetidos a tais estudos são indefesos e não podem escapar aos procedimentos, foram respeitadas as normas para prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei 11.794/08, regulamentada pelo decreto 6889/09. Este projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do LTF/UFPB.

5.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra foi constituída de 36 ratos Wistar fêmeas com 90 dias de vida e obtidos do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 36 ratos albinos, da linhagem Wistar, adultos, fêmeas, com 90 dias de vida, tendo peso estimado em torno de 300g, procedentes do biotério do LTF (laboratório de tecnologia Farmacêutica) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A escolha para ratos se baseia no fato de que são animais de custo razoável, disponibilidade e fácil manipulação, embora possuam uma manutenção dispendiosa. O peso de 300g é um peso utilizado pouco abaixo da média de grande número de trabalhos publicados sobre reparação tecidual (PEPLOW et al., 2010).

CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Todos os animais com as características iniciais descritas anteriormente

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Animais que não se enquadraram nas características iniciais, animais debilitados após o procedimento cirúrgico, que apresentaram complicações pós-operatórias, quadro clínico alterado (prenhez), animais que foram a óbito.

5.4 ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do Centro de Ciências da Saúde da UfPb, em gaiolas separados por grupo de 04 em ambiente climatizado 24 horas, acondicionados em gaiolas específicas com utilização de cama de serragem trocadas periodicamente. Os animais receberam água e ração sólida peletizada com alto teor de proteína (20 a 27%) *ad libitum* (Labina® - Purina Nutrimentos) adquiridos da empresa NUTRIVET, habitual fornecedor deste tipo de ração.

5.5 DIVISÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos distintos, (grupos 1, 2, 3), sendo os grupos compostos por 12 animais, obedecendo os períodos observacionais de trinta, quarenta e cinco e sessenta dias respectivamente. Cada grupo por sua vez foi subdividido da seguinte maneira: os dois primeiros em 03 subgrupos de 04 animais e o terceiro em 02 subgrupos com a mesma quantidade, suprimindo-se o grupo controle. (subgrupos G<x>-C, G<x>-CA, G<x>-HI, aonde o <x> refere-se aos grupos .

GRUPOS	QUANTIDADE
GRUPO 1 (G1)	12 ANIMAIS
GRUPO 2 (G2)	12 ANIMAIS
GRUPO 3 (G3)	12 ANIMAIS

Quadro 1

G1	G1-C	G1-Ca	G1-Ha	12 animais, sendo 4 por sub-grupo
G2	G2-C	G2-Ca	G2-Ha	12 animais, sendo 4 por sub-grupo
G3	G3-C	G3-Ca	G3-Ha	12 animais, sendo 4 por sub-grupo

Quadro 2

O tamanho da amostra configurada está baseada na literatura científica correlata, na qual se pode constatar um número de animais compatível com a necessidade de resultados confiáveis, do ponto de vista de significância estatística, bem como nos estudos anteriores do grupo de pesquisa.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador e seu auxiliar, seguindo rigorosamente a mesma metodologia. Cada animal foi identificado de acordo com o grupo e o subgrupo ao qual foi incluído.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS

Cada gaiola foi identificada com etiqueta que continha data de cirurgia, sacrifício, massa corporal, nome do experimento, e responsáveis pela pesquisa. Cada animal foi marcado no momento da cirurgia na orelha com uma incisão em forma de cunha da seguinte maneira, o grupo controle não teve nenhuma marcação, para o grupo que utilizou o gesso paris foi feita uma marcação cirúrgica

em forma de cunha na orelha direita, para o grupo que utilizou a Hidroxiapatita a marcação foi feita na orelha esquerda.



Fig 00 Marcação na orelha em forma de cunha

5.7 CARACTERÍSTICA DOS BIOMATERIAIS

O biomaterial a base de gesso paris foi o gesso paris convencional que foi manipulado com água destilada e após a cristalização triturado com grau e pistilo até uma granulometria média aproximada de 251 micrômetros (Figura 1) e posteriormente esterilizado em estufa a temperatura de 140°C por 2 horas. Como material para análise comparativa a Hidroxiapatita reabsorvível granulada Bionnovation® (Biomedical).



Fig. 1 Gesso Paris cristalizado

5.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos de anestesia geral e técnica cirúrgica seguiram os princípios descritos por Frota (2003, 2006), a saber .(Figura 2)



Fig. 2 instrumental cirúrgico

5.8.1 ANESTESIA GERAL

Para a anestesia geral dos animais foi feita inicialmente uma pré anestesia com éter PA numa campânula de vidro, para diminuir o estresse do animal, até ele obter um relaxamento satisfatório, determinado pelo seu reflexo motor .

Posteriormente foi utilizado o Cloridrato de Quetamina a 5% (60-90 mg/kg) aplicado no músculo da coxa do animal,posteriormente o Cloridrato de Xilazina a 2% (4-8 mg/kg) com aplicação intraperitoneal, utilizando-se sempre conjunto descartável de seringa e agulha para insulina obtendo-se um período de aproximadamente duas horas de anestesia. (Figura 3)



Fig 3. Anestesia do animal

Imediatamente após o efeito da anestesia, foi realizada a tricotomia da região mediana da calota craniana dos ratos, envolvendo a área que seria incisada longitudinalmente e lateralmente com uma margem de aproximadamente 3 cm de cada lado da incisão. Os animais foram imobilizados em uma mesa cirúrgica confeccionada para este fim, mesa esta que possui pinos de contenção inicialmente projetados para serem colocados no conduto auricular, mas que durante este projeto foi utilizado na região infra articular da região crânio mandibular do animal, pois esta posição, proporcionou um melhor alinhamento com o plano horizontal posicionando melhor o crânio para o procedimento em questão devido a dificuldade da perfuração que foi feita com trefina, e este referido instrumento não possui a convexidade segura para perfuração em calota craniana de dimensões reduzidas aonde a convexidade é de diferença fundamental. Segundo, para minimizar o risco de atingir a dura-máter o que poderia provocar o óbito do animal.

Entre cada procedimento todo conjunto era limpo com álcool 70° e animal coberto com pano de campo estéril fenestrado associado a papel absorvente para não deixar a irrigação molhar o corpo do animal, melhorando o pós operatório.

5.8.2 TÉCNICA CIRÚRGICA

Primeiramente, foi realizada a anti-sepsia da região da calota craniana, com Polivinilpirrolidona-iodo5 a 10% na região a ser incisada(Figura 4). Em seguida à aposição dos campos operatórios, promove-se a infiltração anestésica local de 0,1ml de Cloridrato de Lidocaína com Adrenalina, na concentração de 1:200.000 (Figura 5).

Este procedimento foi adotado com o intuito de diminuir o sangramento no transoperatório e promover um maior conforto no pós-operatório imediato.



Fig 4 anti-sepsia da região da calota craniana

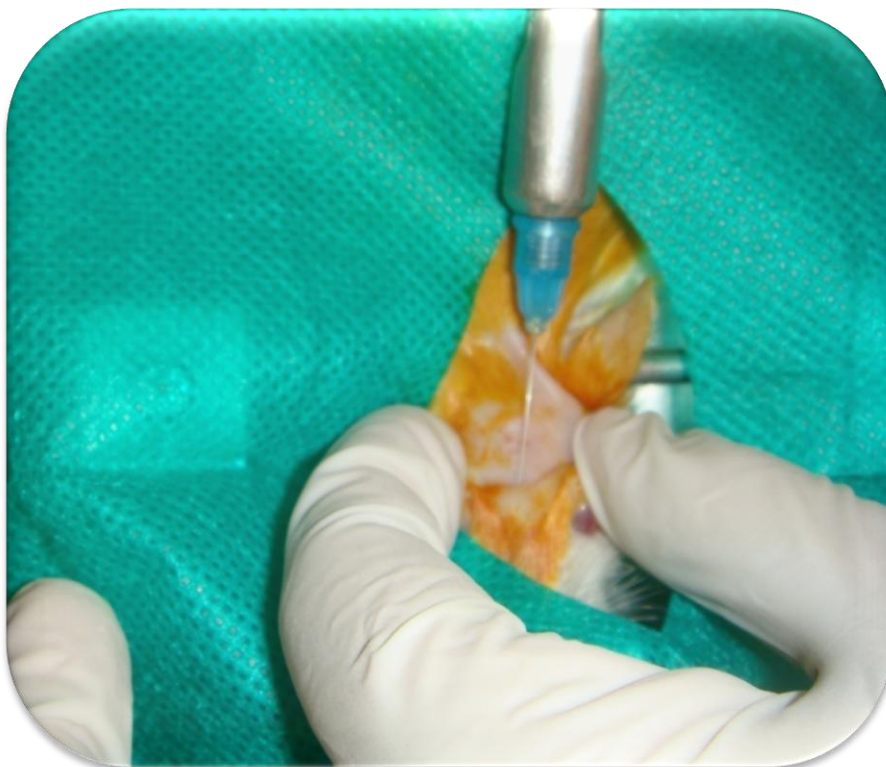


Fig 5 infiltração anestésica local

Em seguida, realizou-se uma incisão linear através da pele e do periósteo, indo da região fronto-nasal à protuberância occipital externa, com o uso de uma lâmina de bisturi número 15, montada em cabo de bisturi do tipo Bard-Parker número 3. (Figura 6) Com o destaca-periosteio de Molt, efetua-se o descolamento do retalho e o seu afastamento através de descoladores delicados (Figura 7)

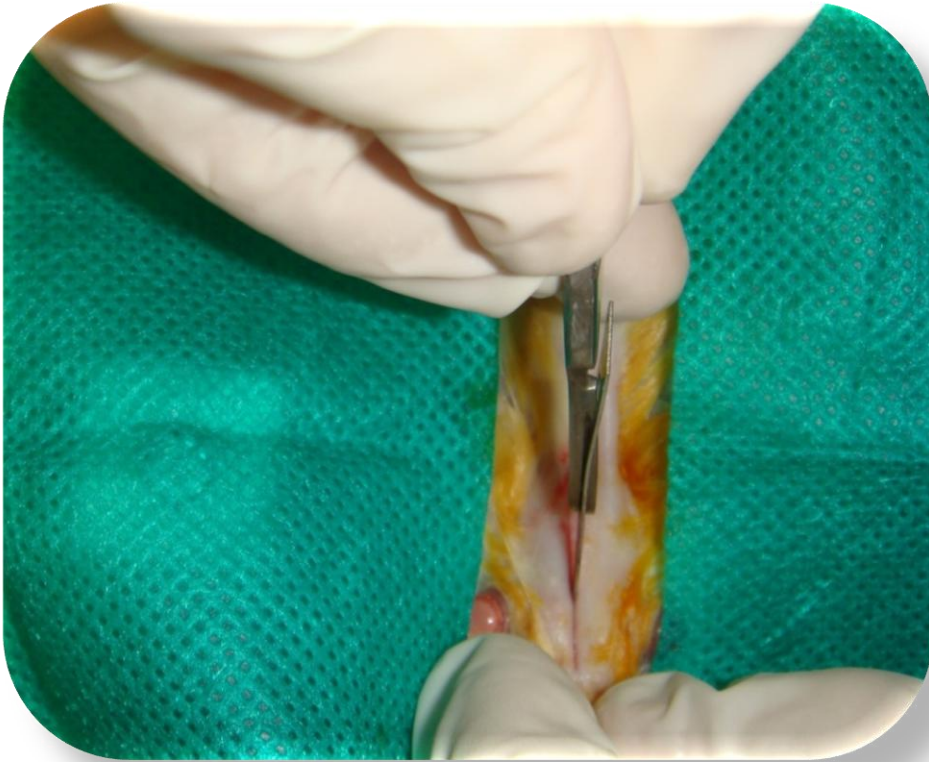


Fig. 6 incisão

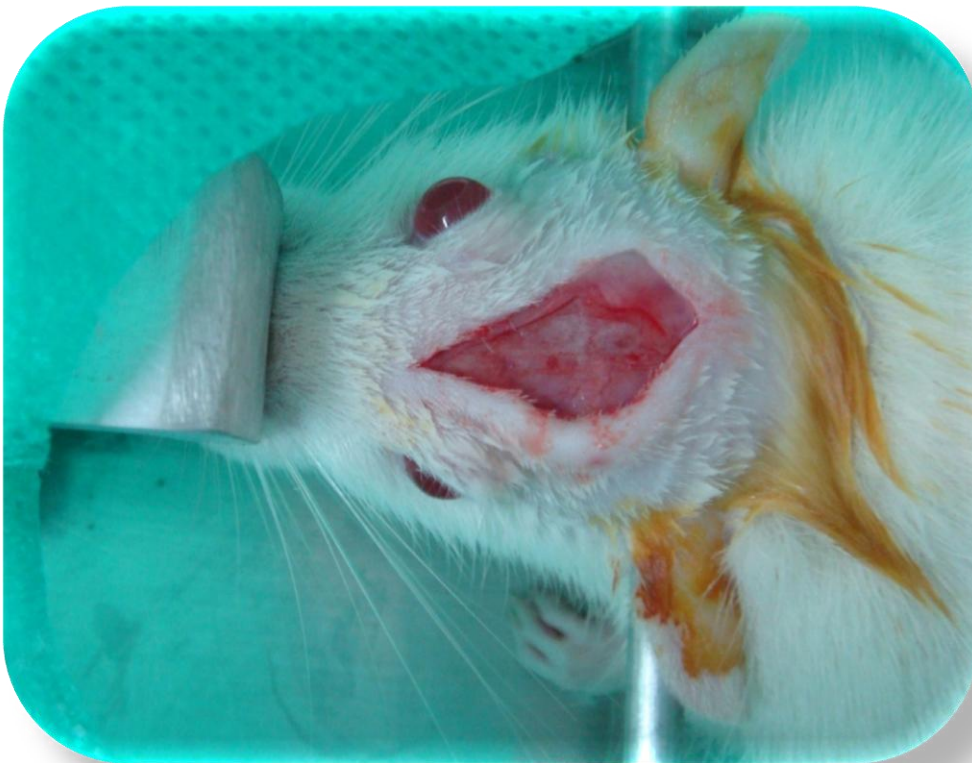


Fig 7 descolamento do retalho e o seu afastamento.

Através de uma broca trefina de 10,0 mm de diâmetro, foi realizada uma ostectomia centralizado sempre na sutura parietal utilizando um contra ângulo com redução 16:1 para micro motor elétrico acionado a uma velocidade de 30.000 rpm. e irrigação externa com uso de soro fisiológico 0,9%, evitando assim um superaquecimento e subsequente necrose óssea. Todos os procedimentos foram executados utilizando uma lupa 3X e iluminação direta adequada.(Figuras 8[a,b,c])

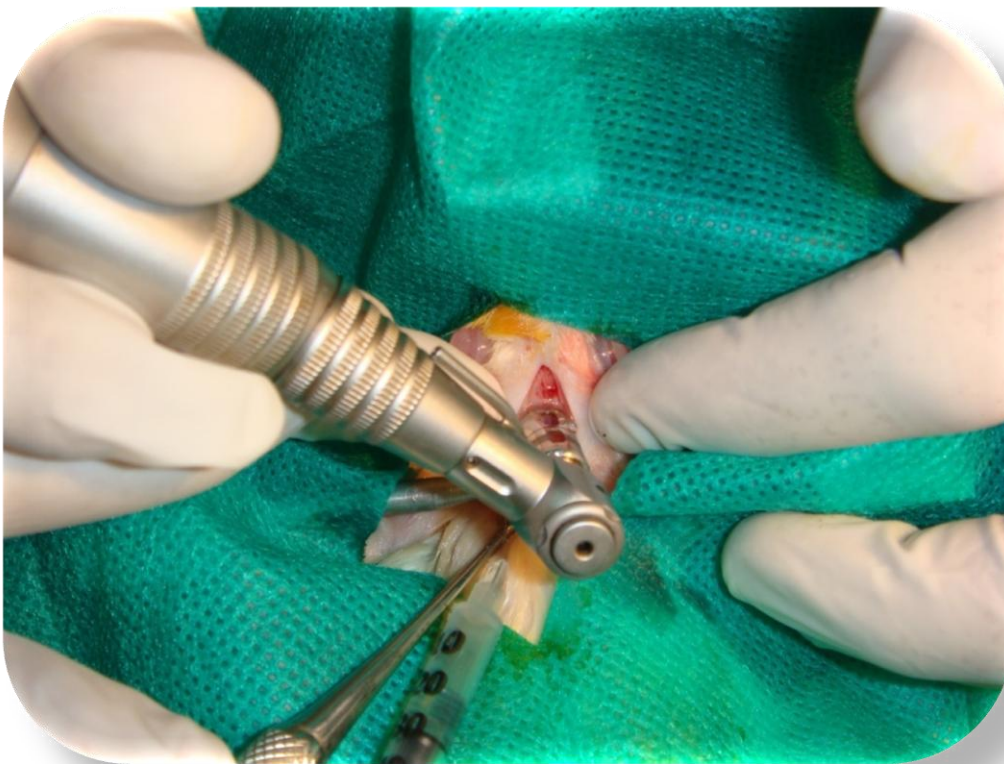


Fig. 8-a Ostectomia

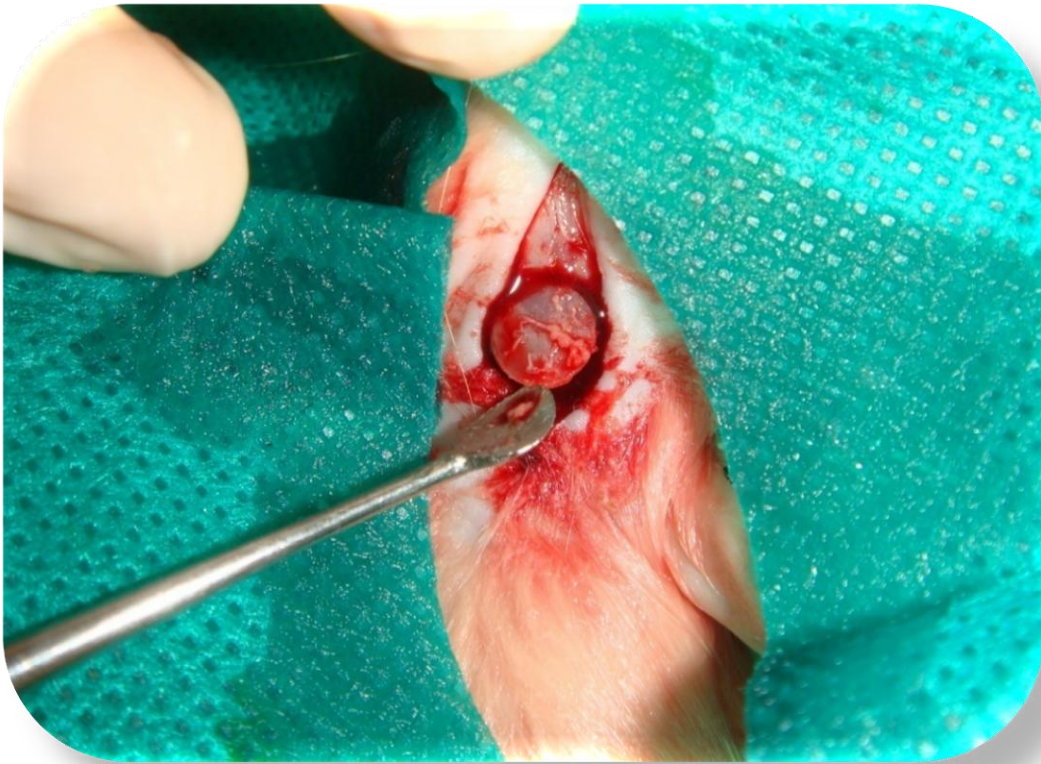


Fig.8-b



Fig.9-c

O preenchimento do defeito ósseo foi feito com gesso paris (grupo G<1,2e3>-Ca) (Figura 9), hidroxiapatita(grupo G<1,2e3>-HI) e o grupo G<1e2>-C apenas coágulo sanguíneo (controle) .



Fig.9 O preenchimento do defeito ósseo

Por último, foi confeccionada a sutura interrompida simples para periósteo e a pele confeccionada com o fio de poliamida⁸ (mononylon 5-0). (Figura 10)

⁸ Ethicon® - Johnson & Johnson

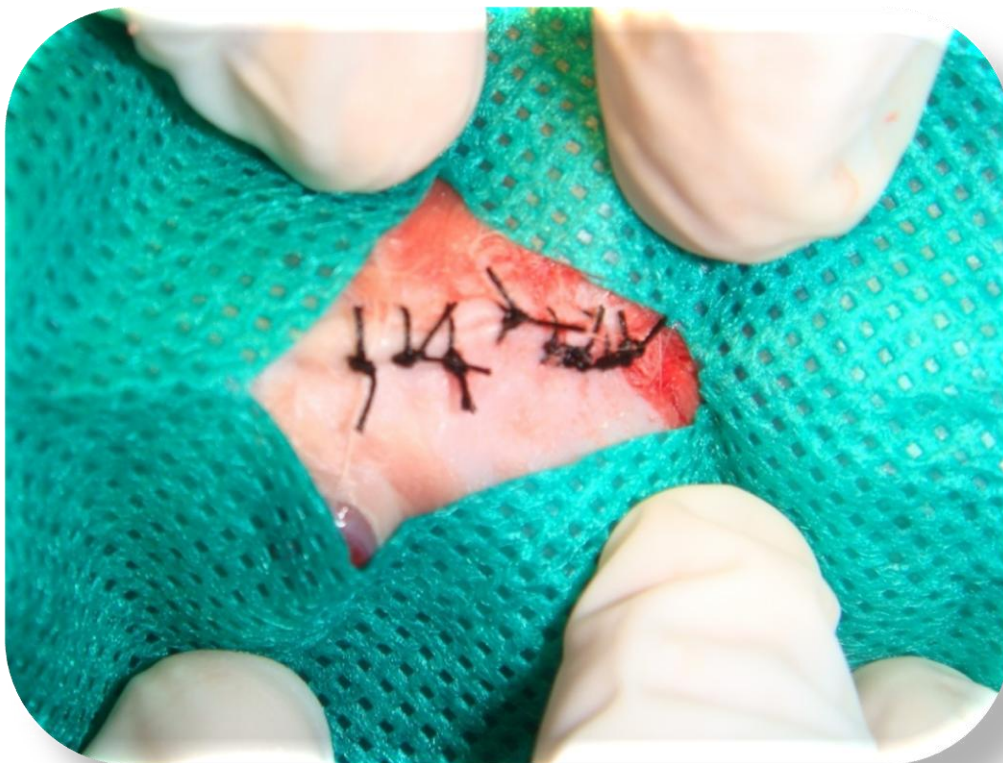


Fig..10 Sutura interrompida simples

5.8.3 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Os animais foram mantidos a temperatura corpórea, sendo acondicionados em ambiente sem ar condicionado, com o intuito de o ambiente permanecer aquecido no período pós-anestésico, evitando, assim, hipotermia corporal, depressão cardiorrespiratória e óbito (HARKNESS, WAGNER, 1993). imediatamente após o procedimento foi efetuada a limpeza da ferida cirúrgica com PVPI, para que os animais que despertassem primeiro da anestesia não ficassem estimulados a praticar o canibalismo, devido ao odor exalado pelo sangue presente na ferida cirúrgica. A dieta foi mantida (FIGUEIREDO, TAKITA, GOLDENBERG, 1997).

5.8.4 CICLO DE SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais em cada grupo foram sacrificados de acordo com a cronologia preestabelecida obedecida, com os períodos de 30, 45 e 60 dias de pós-operatório com dose letal dos anestésicos utilizados anteriormente, as lesões

removidas imediatamente após com disco diamantado deixando uma margem de segurança e sem remover a pele na área da lesão pretendendo-se preservar ao máximo toda a estrutura em anexo .

No grupo de Hidroxiapatita com 45 dias, foram escolhidos aleatoriamente dois animais, devidamente marcados, que após o sacrifício foram submetidos a tomografia computadorizada visando dimensionar a cavidade óssea em questão para uma comparação ao achado histológico.(Figura 11 [a,b,c])

Todo o processamento histotécnico foi realizado no Laboratório de Bodiagnóstico da Escola de Saúde da UfPb

5.8.5 COLETA DOS DADOS

A coleta de dados foi obtida através de cortes histológicos seqüenciados para confecções de lâminas coradas com HE .

As alterações encontradas foram devidamente anotadas, fotografadas com câmera digital com iluminação adequada para este tipo de tomada, e catalogada tomando por base as informações fornecidas e observadas.

5.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Imagens Biológicas do CCS, e Laboratório de Bodiagnóstico da Escola de Saúde da UfPb. Os espécimes foram fixados em formol neutro (paraformaldeído 4%), à temperatura ambiente e posteriormente descalcificados em solução de ácido nítrico a 0,5% por 15 dias. Após a descalcificação, os espécimes foram lavados em água corrente, por 24 horas, desidratados em cadeia crescente de álcool (70 a 100%), diafanizados em banhos de xilol e incluídos em parafina. Os blocos seccionados em cortes seriados de 5,0mm dentro do defeito, procurando sempre posições aleatórias dentro do mesmo para obter um registro das alterações em áreas variadas da ferida, predominantemente na região de maior diâmetro, foram corados por Hematoxilina e Eosina (H.E.) .

Cada peça foi marcada no bloco e nas lâminas de acordo com o grupo e animal obtido, sendo assim cada subgrupo foi dividido em mais 4 , an(1), an(2),

an(3) e an(4) referente ao animal de que foi obtido. Esta marcação foi feita em caráter aleatório quando do processamento das peças obtidas..

A análise histológica e tomada fotográfica foram feitas no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da UfPB.

Foram utilizados como parâmetros histológicos: infiltrado inflamatório, vascularização, reação de corpo estranho (RCE), tecido conjuntivo fibroso (TCF), atividade osteoblástica e neoformação óssea .

5.9.1 CRITÉRIOS DE GRADAÇÃO

Para a avaliação dos resultados histológicos nos diferentes parâmetros, será utilizado (1) para *presente* e (0) para *ausente*. Quando *presente*, o infiltrado inflamatório avaliado pela quantidade de núcleos celulares no tecido conjuntivo ; a neoformação óssea, levando em consideração a presença de osso imaturo, segundo os aspectos, a saber:

1) *Leve* – neoformação óssea incipiente restrita às bordas do defeito ósseo.

2) *Moderada* – neoformação óssea a partir da borda do defeito ósseo e ilhotas no interior do mesmo.

As inclusões serão avaliadas utilizando-se o (1) para presentes ou (2) para ausentes .

5.9.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada no laboratório de imagens Biológicas do CCS Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por dois observadores independentes, quantificando a área (μm^2) de ferida cirúrgica, determinando a distância entre os bordos das fotos obtidas com aumento de 2x em campo claro utilizando microscópio ótico, câmera digital acoplada o programa FIJI , gerando os gráficos, o software OriginLab Pro8 e para análise estatística o programa ASSISTAT



Fig 11 animais posicionados no tomógrafo (Tomoface Paraíba)

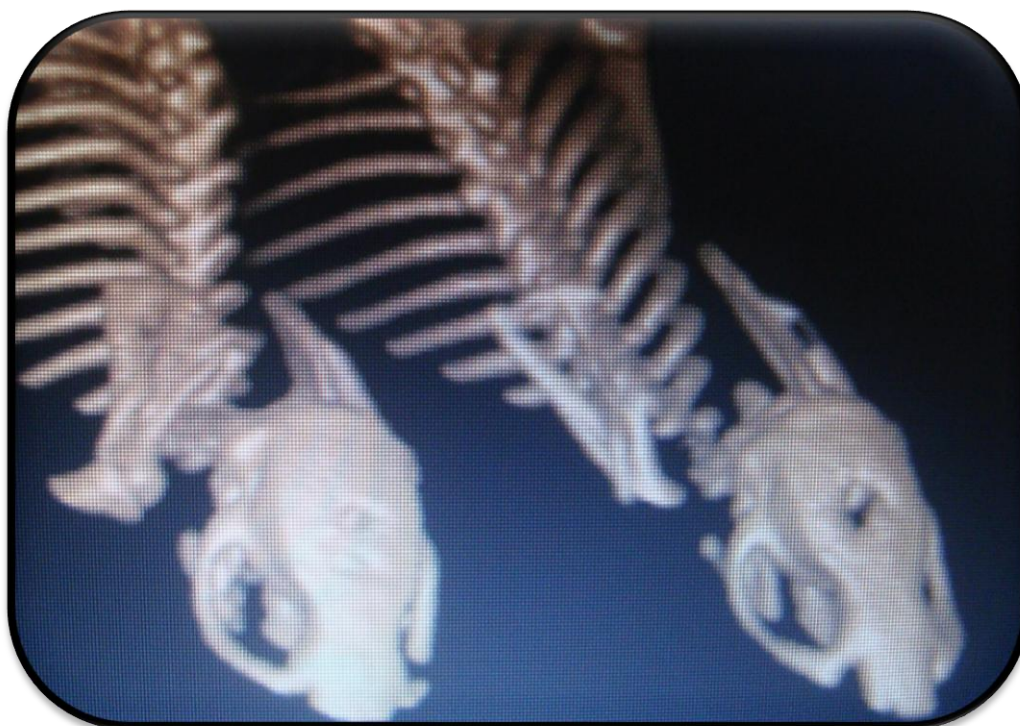


Fig 11 b reconstrução 3D da imagem obtida

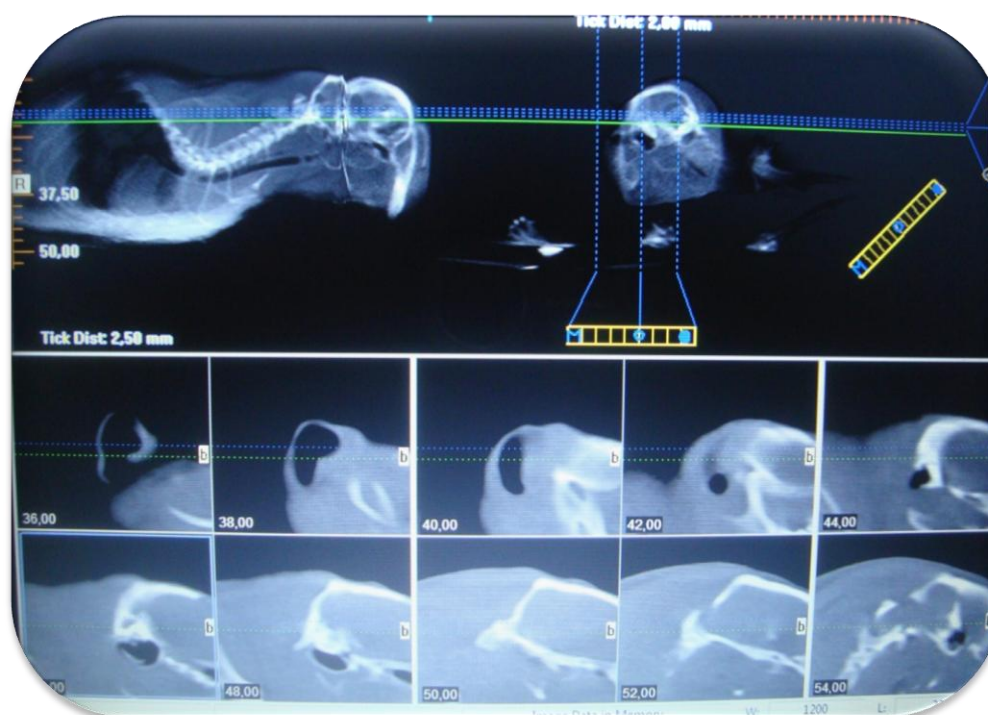


Fig 11c imagem tomográfica

6. Resultados

Feita a coleta das amostras, verificou-se inicialmente uma grande semelhança no aspecto macroscópico em todos os cortes, com a cavidade óssea completamente visível e recoberta pelos tecidos moles do animal com uma comunicação direta com o interior da caixa craniana, consoante se pensava, nas tomadas tomográficas efetuadas no grupo de hidroxiapatita de 45 dias, foi verificada a presença de cavidade com dimensões compatíveis com a lesão inicial, sem aparência de regeneração visível, provavelmente devido a diminuta espessura óssea no local de aproximadamente 1 a 2 mm de tábua óssea.

Histologicamente as diferenças foram um pouco mais visíveis conforme relato a ser apresentado a seguir.

Inicialmente foi feito um levantamento em cada grupo e de cada animal separadamente, analisando-se os três cortes por amostra, procurando identificar a região da lesão que seria analisada, procurando-se sempre o ponto de maior afastamento entre os bordos da ferida. Esta análise foi feita realizando-se as medições em campo claro com um aumento de 4x, com um zoom de 6X em equipamento fotográfico digital acoplado tendo como padrão para tomada das medidas uma retícula de 10% fotomicrografada nas mesmas condições acima

Figura (12)



Fig 12 reticula

Posteriormente as fotos foram analisadas no programa OriginPro 8 e todas as medidas devidamente anotadas para que pudesse ser gerado um gráfico no software Fiji , conforme figuras (13 a,b,c,d), aonde pudesse ser demonstrada a diversidade nos cortes , levando-se em consideração de que o comportamento tecidual seria diferenciado para cada parte da lesão.

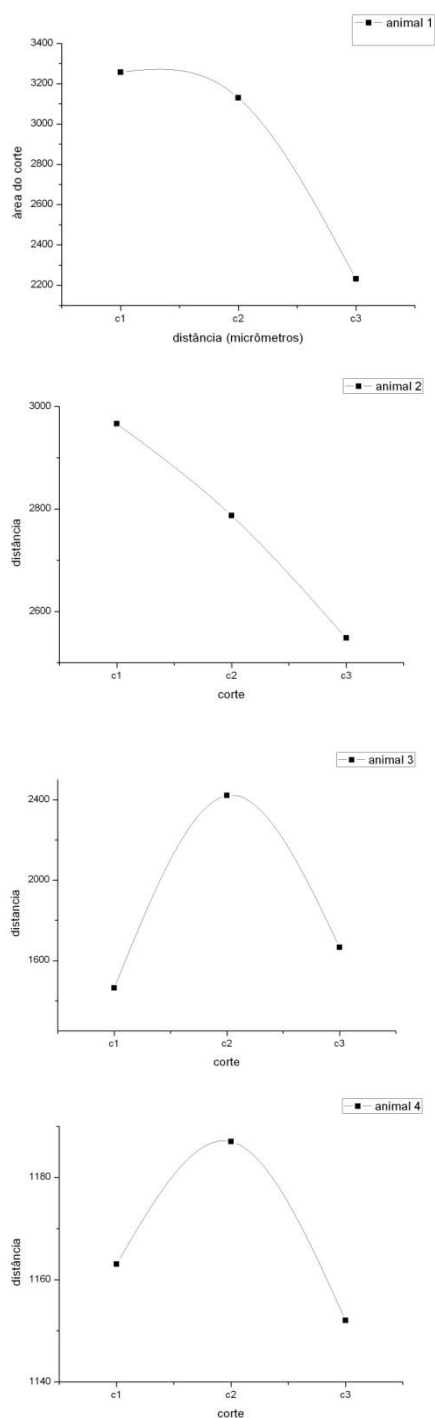


Figura (13 a,b,c,d) Amostra dos gráficos para cada subgrupo

Feita a análise, foi feita uma média e gerado um gráfico com todas as medidas apresentadas por grupos, para que fosse demonstrada a média das dimensões. Figura (14)a e b

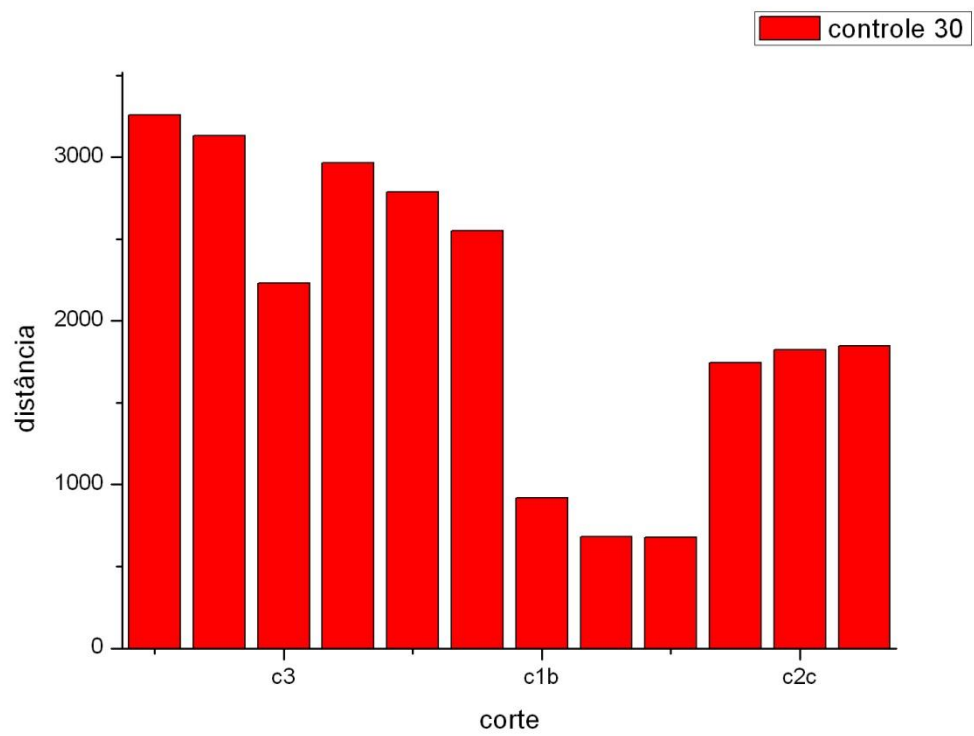


Fig 14 a

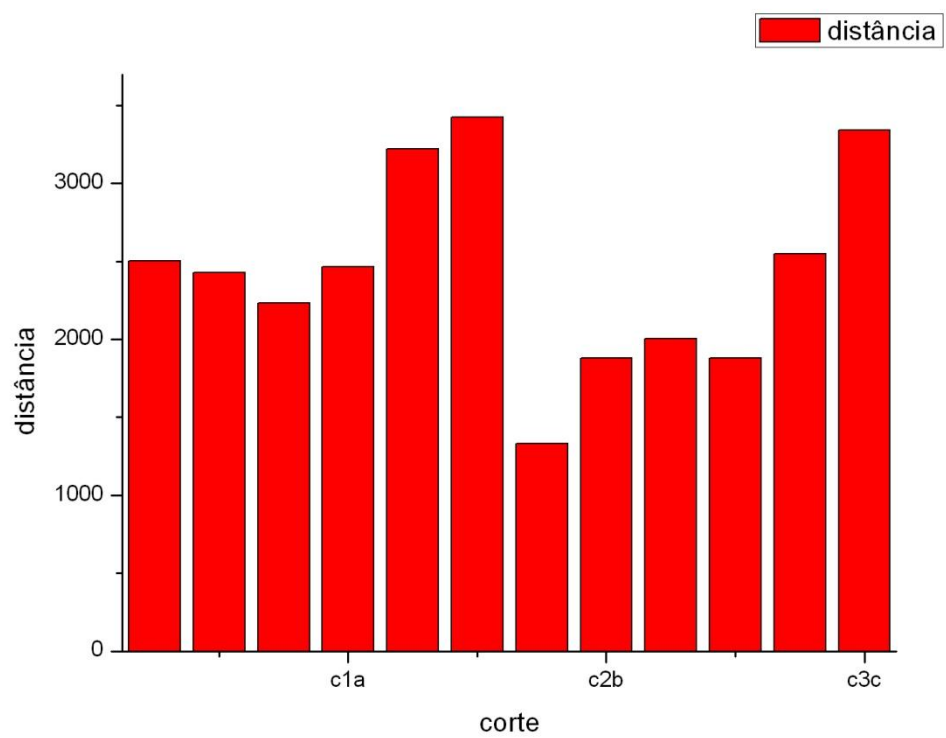


Fig 14 b

Posteriormente foi feita uma tomada fotográfica das lâminas escolhidas para uma avaliação da atividade celular nestas áreas, levando em consideração a quantidade percentual de núcleos por região analisada o que denotaria um maior poder de reparação.

Esta análise está representada pela tabela a seguir:

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

(Experimento em Blocos com Repetições)

1) VARIÁVEL – PRESENÇA DE NÚCLEOS POR LÂMINA (%)

PLANILHA DE DADOS

BLOCOS	TRATAMENTOS		
	T1: C (controle)	T2: CA (Sulfato de cálcio)	T3: HA (Hidroxiapatita)
B1_30 dias	1.7	6.42	18.94
	2.2	6.35	18.44
	1.6	8.56	20.26
	1.8	8.49	23.70
B2_45 dias	3.46	9.59	13.51
	3.14	10.10	16.43
	4.31	9.59	17.56
	4.64	5.28	14.58
B3_60 dias	10.03	17.69	14.54
	9.38	23.43	14.25
	10.25	27.24	18.88
	13.02	17.92	18.87

QUADRO RESUMO – ANOVA de 2 fatores com interação.

Fonte variação	g.l.	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	Sig. p-valor
Tratamento	2	878.43	439.22	84.61	0.000 **
Bloco	2	358.75	179.38	34.56	0.000 **
Tratamento x Bloco	4	353.82	88.46	17.04	0.000 **
Resíduo	27	140.15	5.19		
Total	35	1731.16			

Resultado significativo: (**) p-valor < 0,01 ou 0,05 Nível de significância adotado $\alpha = 0,05$

A ANOVA aplicada para a variável Presença de Núcleos por Lâmina (%) Grau de Reparação Óssea, apresentou resultados estatisticamente significativos para os fatores TRATAMENTOS, sendo estatística $F = 84.61$ com $p\text{-valor} = 0,000 < 0,05$ e, para o fator BLOCOS apresentando resultado estatisticamente significativo, sendo estatística $F = 34.56$ e significância $p\text{-valor} = 0,000 < 0,05$. Para as iterações entre TRATAMENTOS x BLOCOS apresentou também resultados significativos com $F = 17.04$ e significância $p\text{-valor} = 0,000 < 0,05$. O teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para comparações múltiplas dos fatores TRATAMENTOS x BLOCOS, apresentou os seguintes subconjuntos homogêneos:

Variável: Grau de Reparação Óssea			
Teste Post Hoc	FATORES Tratamentos	N	Subconjuntos Homogêneos*
Tukey	T1_C	12	5.46 a
	T2_CA	12	12.55 b
	T3_HA	12	17.50 c
Tukey	Blocos		
	B1_30 dias	12	9.87 b
	B2_45 dias	12	9.35 b
	B3_60 dias	12	16.29 a
Tukey	Tratamentos x Blocos		
	T1 x B1	4	1.82 c
	T1 x B2	4	3.89 c
	T1 x B3	4	10.67 c
	T2 x B1	4	7.46 b
	T2 x B2	4	8.64 b
	T2 x B3	4	21.57 a
	T3 x B1	4	20.34 a
	T3 x B2	4	15.52 a
	T3 x B3	4	16.64 b

* Subconj. Homogêneos (letras iguais): médias não diferem estatisticamente entre si.

Posteriormente foram feitas fotografias com luz polarizada, figs (15 a e b) procurando verificar a presença de osso imaturo, seqüestros ósseos, e osso maduro através da visualização das lamelas e da presença ou ausência de núcleos de osteócitos nas ilhotas o que caracteriza tecido viável e não sujeito a reabsorção pelos osteoclastos .

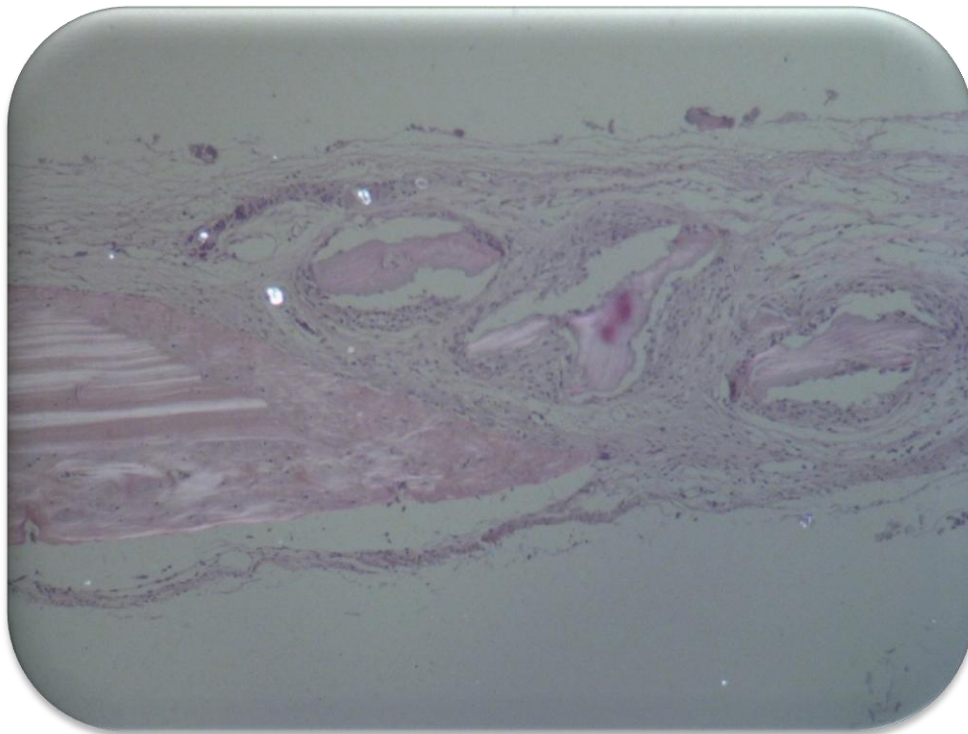


Fig 15 a Fotomicrografia com luz polarizada

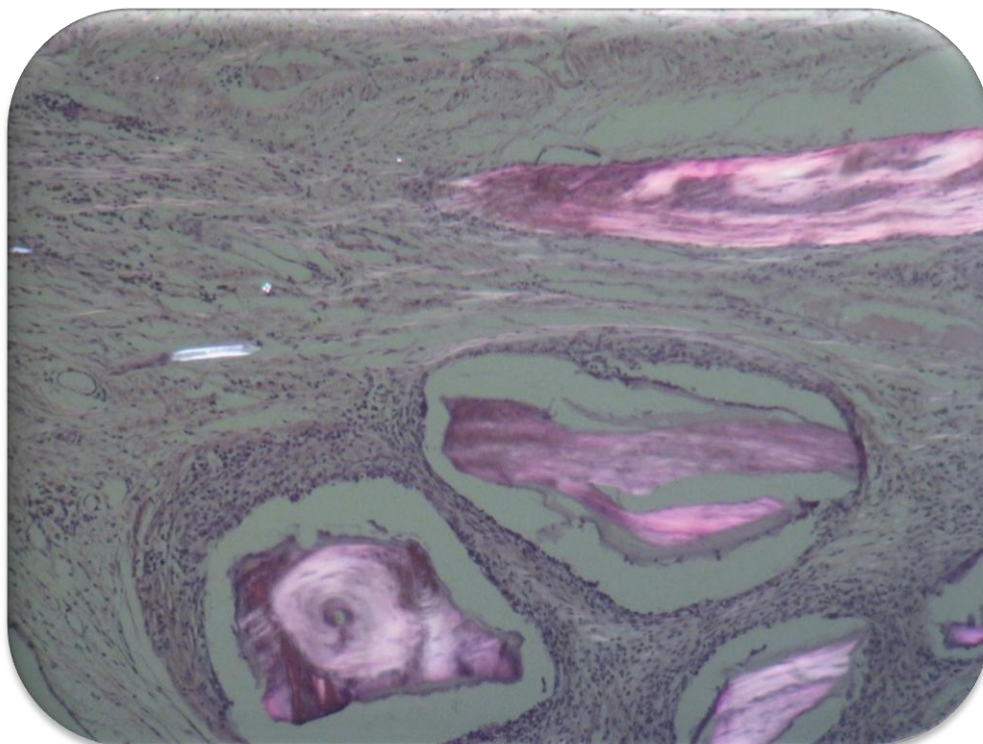


Fig 15 b Fotomicrografia com luz polarizada demonstrando a bi-refrigência

Nas fotos em campo claro, foram verificada a presença de um padrões muito diferenciados de crescimento ósseo radial e bastante irregular Figura

(16), uns em forma de digitações, outros em forma de ilhas envolvidas intimamente por um tecido conjuntivo com alta densidade de condrócitos e alguns macrófagos .

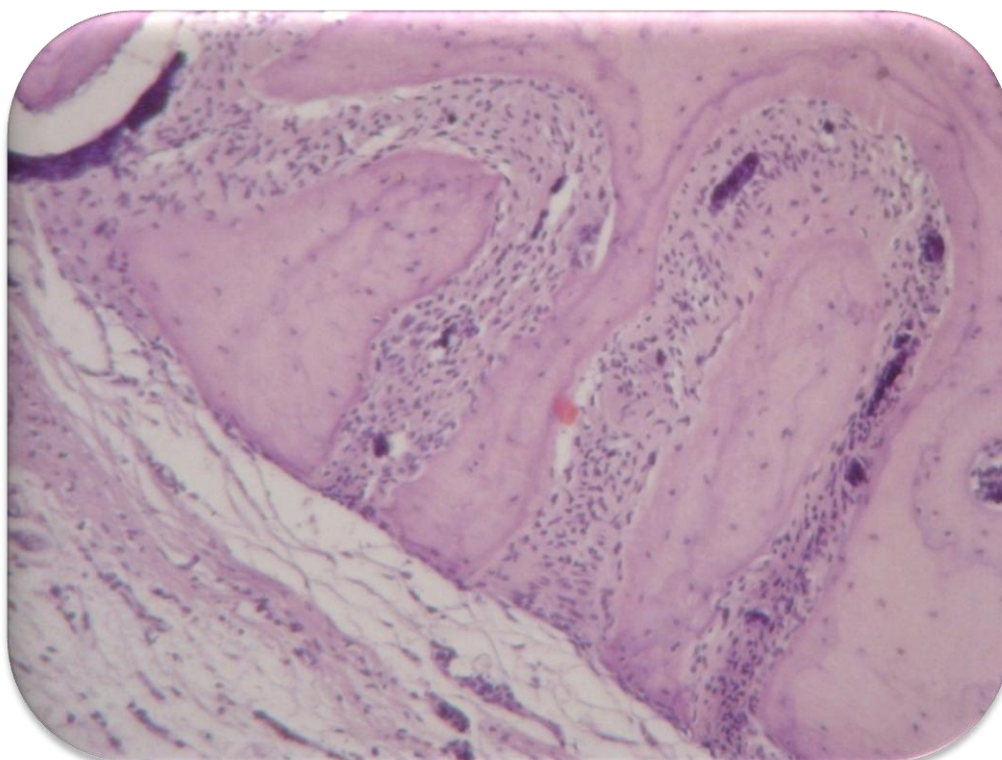


Fig 16 osso neoformado circundado por tecido conjuntivo bastante celularizado

Nesta análise não foi feita uma avaliação histomorfométrica do crescimento radial pois a localização dos cortes foi feita de maneira bastante variável de maneira que o resultado não seria satisfatório por o comportamento poderia variar de acordo com a localização .

A avaliação da presença ou ausência de insertos nos dois grupos, no caso a grupo Ca e Há , foi feita de maneira a detectar apenas a presença ou ausência dos mesmos, pois a análise de quantificação destas partículas, primeiramente só foi viável no grupo Ca 30, Figura 17 (a e b), pois como o número de inserções era bastante acentuado e não havia sido ainda metabolizado e reabsorvido, esta proporção em relação ao tecido conjuntivo foi possível através de software, mas a partir do grupo Ca45, esta análise estava sendo muito variável , pelo fato do programa analisar a presença destes insertos, pela variação de tons de cinza, e alguns deles estavam com uma coloração idêntica ao tecido ósseo vizinho

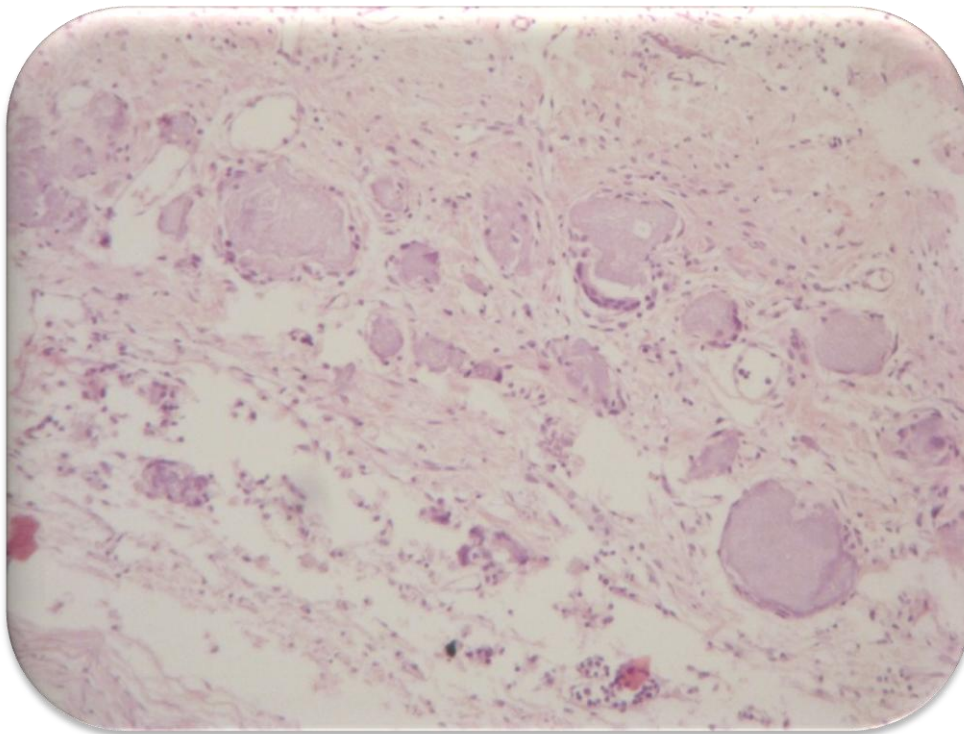


Fig 17 a inserções de $2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (gesso paris)(10X)

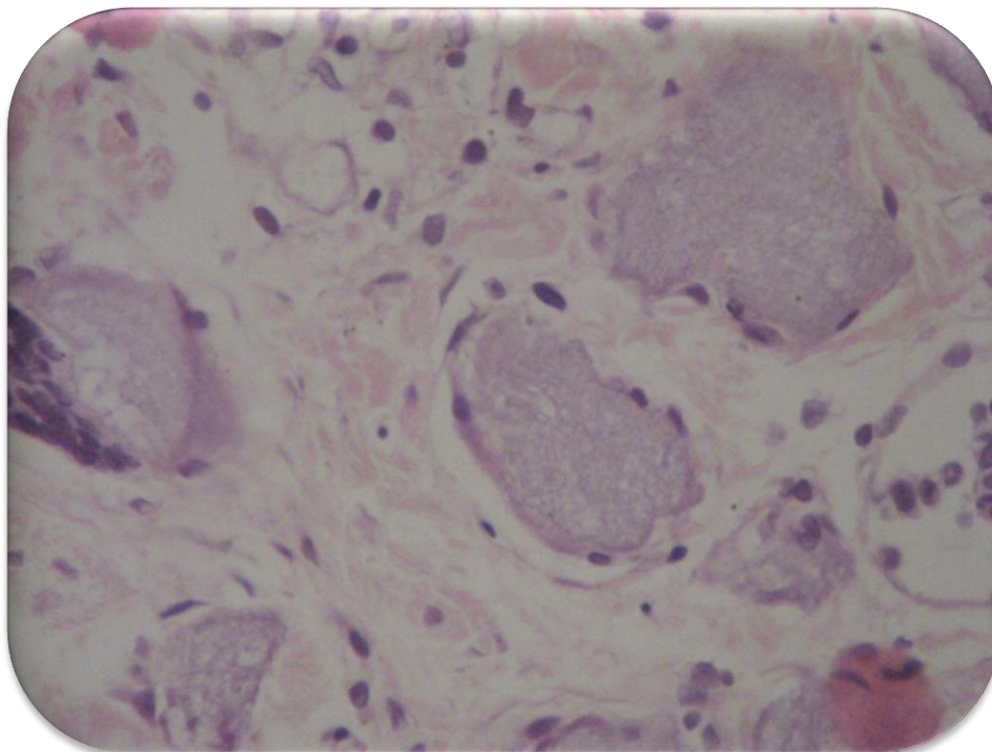


Fig 17 b Aumento de 40x mostrando o $2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

O grupo com enxerto de hidroxiapatita analisado, apresentou os grânulos em forma de cavidades, devido ao fato do processamento das lâminas

descalcificar a hidroxiapatita figura (18 a e b) da mesma maneira que o tecido ósseo, pois é o mesmo mineral que está na composição óssea.. Estes grânulos se apresentaram em uma distribuição com pouca densidade se levada em consideração a quantidade colocada durante o procedimento, densidade esta que não promoveu nenhum tipo de reparo detectável histologicamente ..

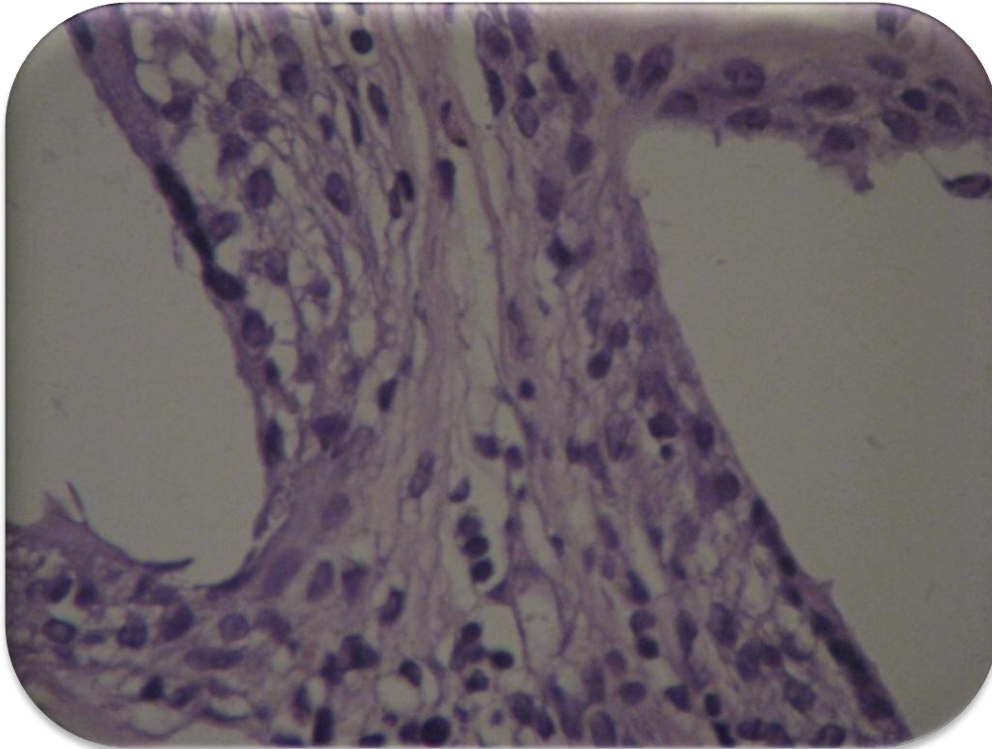


Fig 18 a (aumento de 40X) lacunas de insertos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

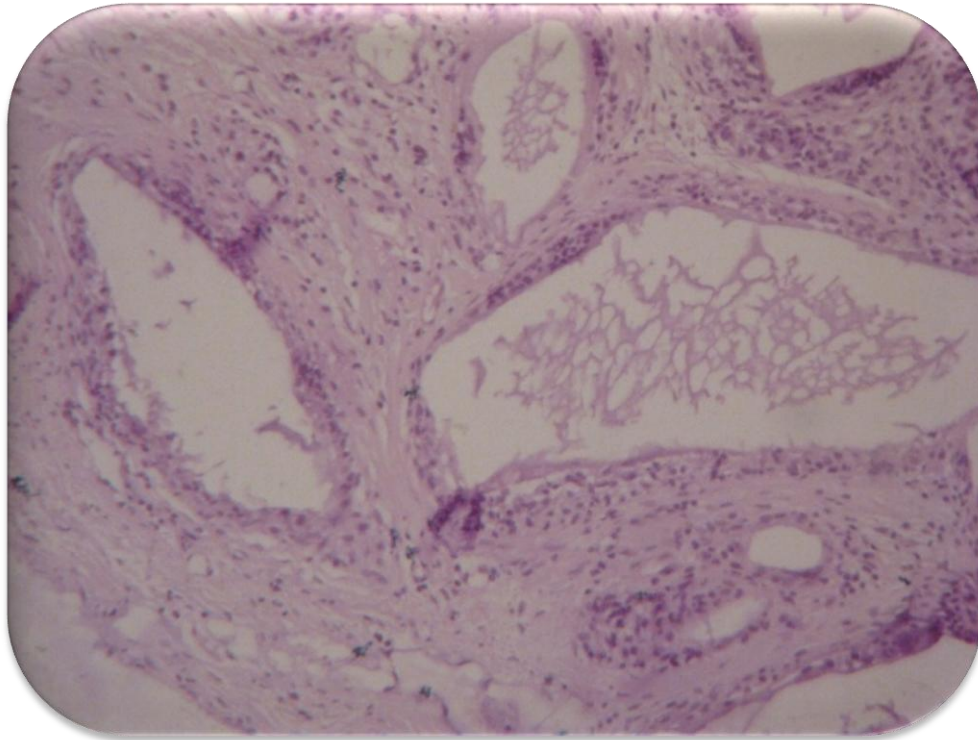


Fig 18 b (aumento de 40X) lacunas de insetos de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Praticamente inserido em todas as amostras, encontrou-se seqüestros ósseos, provavelmente derivados do procedimento cirúrgico, alguns deste viáveis e outros necróticos determinados pela ausência núcleos de células (osteócitos) nas lacunas e presença de osteoclástos que são células multinucleadas especializadas em remoção na proximidade. A característica destes seqüestros, é a presença de lamelas de tecido conjuntivo maduro, alguns canais incompletos, como que seccionados. Figura 19

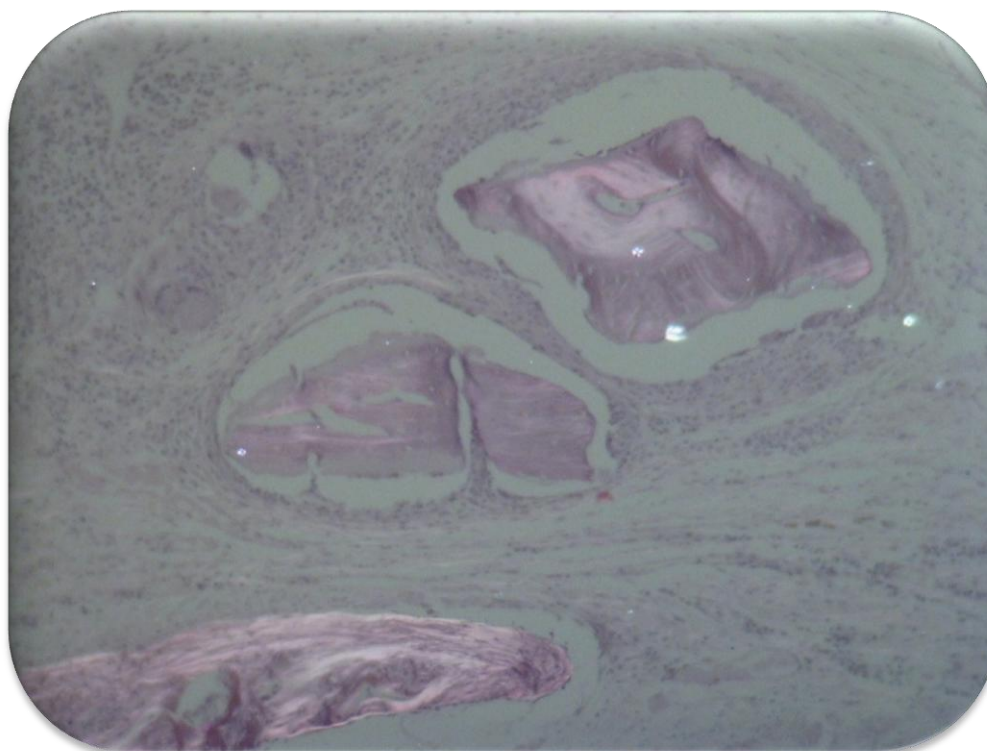


Fig 19 sequestros ósseos viáveis e necróticos

Todo o experimento foi executado in vivo sem a utilização de membrana ou qualquer outro tipo de barreira que pudesse isolar e manter em posição o material de enxerto utilizado.

ANÁLISE 1- PRESENÇA DE OSSO MADURO, IMATURO, SEQUESTROS E INCLUSÕES

Grupo	Ossos imaturos	Ossos maduros	sequestros	inclusões
controle 30	ausente	ausente	presente	ausente
controle 45	presente	ausente	presente	ausente
controle 60	presente	ausente	presente	ausente
2CaSO ₄ .H ₂ O 30	ausente	ausente	presente	presente
2CaSO ₄ .H ₂ O 45	presente	ausente	presente	presente
2CaSO ₄ .H ₂ O 60	presente	ausente	presente	ausente
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ 30	presente	ausente	presente	presente
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ 45	presente	ausente	presente	presente
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ 60	presente	ausente	presente	ausente

TRATAMENTO X BLOCO

	Osso imaturo	Osso maduro	sequestros	inclusões
Ausente	22,2	100	-	55,6
Presente	77,8	-	100	44,4
Total	100	100	100	100

Osso imaturo

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ausente	2	5,6	22,2	22,2
	Presente	7	19,4	77,8	100
	Total	9	25	100	
Missing	n.s.a.	27	75		
Total		36	100		

Osso maduro

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ausente	9	25	100	100
Missing	n.s.a.	27	75		
Total		36	100		

Sequestros

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Presente	9	25	100	100
Missing	n.s.a.	27	75		
Total		36	100		

Inclusões

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Ausente	5	13,9	55,6	55,6
	Presente	4	11,1	44,4	100
	Total	9	25	100	
Missing	n.s.a.	27	75		
Total		36	100		

2) VARIÁVEL - GRAU DE REPARAÇÃO ÓSSEA

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	2.09140	1.04570	1.2470 ns
Blocos	2	2.02893	1.01446	1.2098 ns
Trat x Bloc	4	2.62501	0.65625	0.7826 ns
Resíduo	18	15.09408	0.83856	
Total	26	21.83941		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
2	18	3.5546	1.247	0.311
2	18	3.5546	1.2098	0.3214
4	18	0.1167	0.7826	>0.050

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias tratamento

1	2.78944 a
2	2.14422 a
3	2.27622 a

dms = 1.10193

Médias de bloco

1	2.08000 a
2	2.37967 a
3	2.75022 a

dms = 1.10193

Tratamentos x Blocos

	B1	B2	B3
--	----	----	----

T1	2.4807	2.8130	3.0747
T2	1.3887	2.0250	3.0190
T3	2.3707	2.3010	2.1570

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo

A ANOVA aplicada para a variável Grau de Reparação Óssea, apresentou resultados estatisticamente significativos para os fatores TRATAMENTOS, sendo estatística $F = 1.2470$ com $p\text{-valor} = 0,000 > 0,05$ e, para o fator BLOCOS apresentando resultado estatisticamente significativo, sendo estatística $F = 1.2098$ e significância $p\text{-valor} = 0,000 > 0,05$. Para as interações entre TRATAMENTOS x BLOCOS apresentou também resultados significativos com $F = 0.7826$ e significância $p\text{-valor} = 0,000 > 0,05$. O teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para comparações múltiplas dos fatores TRATAMENTOS x BLOCOS, apresentou os seguintes subconjuntos homogêneos:

7.Discussão

Os primeiros relatos sobre enxertos ósseos bem sucedidos datam do início do século passado, quando Walker (1820) apud Shena, transplantou osso autógeno no homem. No início do século XX, a transplantação óssea obteve grande popularidade na medicina humana, porém com sucesso questionável(VOLKOV,M. 1970).

Desde 1892, a literatura médica descreve o uso do gesso paris como um enxerto ósseo. Nos últimos 15 anos, cientistas e clínicos associados com a United States Gypsum(USG) e Wright Medical Technology têm estudado e caracterizado exhaustivamente o gesso paris. Foi descoberto que projetando a forma e o tamanho dos cristais, a taxa de reabsorção do produto final poderia ser controlada, fornecendo resultados clínicos consistentes.

A segunda guerra mundial estimulou o interesse por enxertos, autógenos, alógenos e xenógenos (GEORGE BURNET W.1978).Ocorreram muitos experimentos e erros na seleção dos biomateriais, na cirurgia, na análise mecânica, na reabilitação protética e na terapia periodontal. Falhas precoces foram comuns e freqüentemente resultaram em infecção, dor, desconforto e com conseqüente perda de tecido ósseo.

No final da década de 60 e início da de 70, Volkov, Parrish e Ottolenghi publicaram os sucessos obtidos com enxertos alógenos em humanos, utilizados no tratamento de defeitos ósteoarticulares devido a retirada de tumores e no tratamento da artrite (HOLMES,R.E 1979).

Nos últimos dez anos, devido a extensa documentação científica sobre procedimentos clínicos experimentais, tem-se desenvolvido tanto na odontologia como na medicina ortopédica novos materiais para enxertos que tem sido experimentados.

Dentre os biomateriais, os a base de fosfato de cálcio são os mais utilizados. Entre os substitutos ósseos destacam-se os corais marinhos das famílias *Poritidae* e *Goniopora*, que através de reações hidrotérmicas com fosfato de amônio bibásico, são convertidos em hidroxiapatita. (Kuhne et al 1994)50.

Entretanto a hidroxiapatita natural tem limitações, porém a hidroxiapatita obtida através da reação entre reagentes inorgânicos, pode ser preparada por diferentes métodos e tem mostrado bons resultados, não apresentando obstáculos (George Burnett, W 1978).23

O Osso é composto de uma matriz orgânica rígida, grandemente fortalecida por depósitos de sais de cálcio, O osso compacto médio contém 30% de matriz e 70% de sais.

Dos sais ósseos de fosfato de cálcio, os principais são denominados de hidroxiapatita. Este material, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo o principal constituinte da fase mineral dos ossos e dos dentes, tem sido sintetizadas e extremamente utilizadas para preencher defeitos ósseos (Holmes, R.E. 1979).

A partir das últimas décadas, pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento e obtenção de biomateriais visando a reparação de tecidos duros. Combinar os requisitos biomecânicos com os ambientes bioquímico e celular circundantes, tem sido um desafio formidável.

Quando a hidroxiapatita é colocada próxima ao osso, primeiramente ela atua como uma prótese, e posteriormente, atuará como um suporte para a regeneração dos tecidos (Fox, S.M. et al 1991).

A Hidroxiapatita permite que os tecidos cresçam dentro de sua estrutura, devido a interconexão dos poros, reduzindo a encapsulação, e aumentando a velocidade de crescimento do tecido ósseo o que reduz o período de recuperação. (White, E., Shors, E.C 1986) 88 Favorece também o suporte nutricional do tecido dentro de seus poros, uma continuidade com o osso em volta. (Holmes, R.E. 1979) .

Levando-se em consideração as dificuldades estruturais encontradas nesta pesquisa, alguns fatos foram destaque durante todo o processo dentre os quais vou enumerar alguns:

O Gesso paris, foi empregado pela primeira vez em 1892, por Dressmann, para preencher defeitos ósseos criados artificialmente em cães (SOTTOSANTI, 1995) e vem sendo utilizado na odontologia há mais de 30 anos (KIM et al. 1998). Esse material apresenta propriedades que lhe confere vantagens significativas no tratamento de defeitos periodontais e endodônticos (ORSINI, 2001) , tais como: ser biocompatível, esterilizável, poroso, inerte, biodegradável, radiopaco, bem tolerado pelos tecidos, facilmente manipulado, não estimular reação inflamatória ou de corpo estranho, aderir à superfície radicular, prevenir o colapso dos tecidos vizinhos e invaginação de tecido mole para o interior do defeito ósseo, promover suporte estrutural, permitir o ingresso de células osteoprogenitoras, além de ser facilmente encontrado no comércio e ter baixo custo (FRAME, 1975; SOTTOSANTI, 1995; TAY et al., 1999; ANSON 1998, 2000; AL RUHAIMI, 2001; SBORDONE et al., 2005; Outras grandes vantagens deste material estão na capacidade de estimular a angiogênese, que é extremamente importante na formação óssea (STROCCHI, 2002) , ser solúvel, o que não permite a colonização bacteriana sobre ele mesmo e sua rápida reabsorção, entre 4 e 5 semanas, que coincide com a taxa de neoformação de osso vital (SBORDONE et al., 2005) ORSINI et al. (2001) obtiveram resultados consistentes na combinação destes materiais aliados ao uso de Gesso paris como barreira e classificou essa associação como promissora. O Gesso Paris provou ser uma válida barreira para correção de defeitos ósseos periodontais por impedir invaginação de tecido mole, e por manter espaço seguro protegendo o coágulo sanguíneo e outras partículas recobertas por ele (SOTTOSANTI 1992, 1995; ANDREANA, 1998; ROSEN&REYNOLDS, 1999; ORSINI, 2001) Segundo TREVISAN JR et al. (2005) o Sulfato de Cálcio não deve ser utilizado isoladamente, mas Sempre em associação a outro material, servindo de aglutinante das partículas do enxerto ao qual se associa. Além de funcionar como membrana reabsorvível ao recobrir o sítio cirúrgico PECORA (1997) , afirma que de acordo com o princípio de osteopromoção, o tecido conjuntivo pode ser barrado, deixando células ósseas conduzirem a regeneração do osso. Baseado nestas circunstâncias, o Gesso Paris provou ser uma válida barreira para correção de defeitos ósseos periodontais por

impedir a invaginação de tecido mole e por manter espaço seguro, protegendo o coágulo sanguíneo e outras partículas recobertas por ele (SOTTOSANTI 1992, 1995; ANDREANA, 1998; ROSEN&REYNOLDS, 1999; ORSINI, 2001) . O alto custo das membranas convencionais e, nos casos de membranas não-reabsorvíveis à necessidade de um segundo estágio cirúrgico, tornam a RTG uma terapia quase que inacessível a grande parcela da população. A barreira de Gesso paris contorna perfeitamente estes inconvenientes e apresenta resultados comprovadamente satisfatórios, que referendam sua utilização em situações de limitações financeiras, apresentando-se como possibilidade viável a pacientes com baixo poder aquisitivo que necessitam de RTG para correção de defeitos periodontais e endodônticos. Além das vantagens até aqui discutidas, SOTTOSANTI (1993) ainda ressalta que a principal propriedade deste material como barreira é a possibilidade de selamento em casos em que ocorra exposição pós-cirúrgica da membrana de Gesso paris devido à migração de tecido mole. PAYNE et al. (1996) explica que isso ocorre justamente por causa da quimiotaxia dos fibroblastos gengivais pelo Gesso paris sem alteração da morfologia celular.

O gesso paris, misturado com enxerto ósseo autólogo, foi testado por Alexander *et al*, nas artrodeses da coluna vertebral na região lombar sem utilização de materiais de osteossíntese – trabalho publicado em 2001 – baseado em casuística de 32 pacientes e seguimento de um ano. A análise radiográfica mostrou resultados semelhantes entre os grupos comparados (Alexander,D.I.; 2001).

Questionamos se o efeito do gesso paris, substância que conhecidamente não apresenta qualquer resistência estrutural e tem taxa de absorção pelo organismo elevada, não se deu mais pela presença do osso autólogo, sendo apenas um elemento de expansão da massa de enxerto, sem propriedades de fato como substituto ósseo.

A pequena espessura da calvária do animal gerou uma grande dificuldade durante a abordagem cirúrgica, pois o espaço gerado pela remoção da referida tábua óssea foi insuficiente para conter o material utilizado no enxerto, permitindo uma grande mobilidade do mesmo por absoluta falta de contenção o que contribuiu de maneira decisiva no potencial de ósteoindução dos mesmos. Este fato associado a extrema mobilidade do tecido cutâneo do animal e a não utilização de qualquer outro meio

de contenção, como membranas fixadas ou não, levou a uma grande difusão do material pelas áreas circunvizinhas.

A manutenção do volume e da espessura do enxerto (implante) na fase inicial da regeneração óssea, é um fator importante para a função osteogênica(Jensen et al.,1996 Ripamonti,1996).

Nesta pesquisa optou-se pela utilização dos materiais sem associação com nenhum tipo de membrana que visasse imobilizar o mesmo na região de enxertia.

Uma condição favorável a colocação de qualquer matéria de enxertia óssea, significa primeiramente um leito receptor compatível e capacitado a promover a estabilidade primária deste referido material, propriedade esta que é mais favorecida quando esta cavidade possui pelo menos três paredes, e quando ela tem profundidade suficiente para reter uma quantidade mínima de enxerto que poderá ser posteriormente dimensionada, o que não neste caso não invalida nenhum dos dois materiais utilizados nesta pesquisa, pois as condições não foram totalmente nem minimamente favorável a sua contenção.

Houve o grande deslocamento a nível macroscópico de grande parte do material de enxerto pela grande mobilidade da região como também pela falta de arcabouço inicial que pudesse promover sua imobilização.

Provavelmente pelo fato deste material ficar quase que totalmente envolvido por membranas, no caso em uma face pelo periósteo e na outra face pela meninge, possuindo uma interface óssea mínima para que pudesse haver migração de osteócitos que levassem a uma reparação de maneira satisfatória.

A impossibilidade de promover uma imobilização do enxerto pela atividade motora do animal, provavelmente criaram condições desfavoráveis a esta resposta, isto associado ao alto metabolismo da espécie, provavelmente fez um diferencial quanto a velocidade de reabsorção dos mesmos.

Chegou-se a conclusão, após a análise de todas as amostras que o padrão histológico das peças, se mostrou de maneira bastante inconclusiva, variando de animal para animal independente do enxerto utilizado e do tempo pois estudos apesar de mostrarem que o grau de reabsorção destes materiais ocorre de

maneira completa em aproximadamente quatro semanas, (RICCI, 2000) o estudo mostrou a presença de inserções em até seis semanas.

Quando da formação de tecido ósseo em área enxertada, a condição para que isto ocorra é a não interposição de tecido fibroso na interface osso enxerto.

Um aspecto ainda controverso é a biodegradação da hidroxiapatita sintética. Alguns estudos não evidenciaram sinais de reabsorção ou degradação, outros observaram sinais de degradação do material implantado. Esta controvérsia segundo Van Blitterswijk et al (1996). apud BORGES.A.P.B (1997), pode ser em parte a procedimentos diferentes na preparação da hidroxiapatita sintética e ao despreendimento mecânico de partículas.

Estatisticamente não houve diferenças significativas entre os dois materiais apesar da hidroxiapatita ter uma taxa de degradação e um poder de ósteoindução conhecidamente menor que o gesso paris.

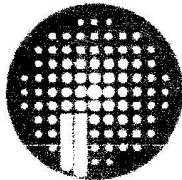
MARTIN et al. (1993) observaram muitas lacunas de Howship na superfície da hidroxiapatita, e sua diminuição com o tempo. Os autores atribuíram a este fato, sua reabsorção por osteoclastos e substituição por osso, num processo similar a remodelação normal

8. CONCLUSÃO

Considerando todas as análises histológicas feitas , pode-se concluir que :

- Não houve diferença significativa entre os dois materiais quando a reparação óssea dentro do proposto pela pesquisa.
- O alto grau de reabsorção do gesso paris é fator determinante para o não bloqueio de crescimento do tecido conjuntivo fibroso.
- A hidroxiapatita o o gesso paris usado em pequenas cavidades , possui um alto grau de reabsorção e dispersão o que influencia na permanência do leito ósteoindutor.
- O tipo de cavidade óssea é fator determinante na contenção do biomaterial.

9. ANEXOS



PgPNBSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 15 de dezembro de 2010

CEPA N° 0712/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior (Orientador)

Orientando(a) : ANTÔNIO CARLOS LOPES BRANCO

Departamento/Setor: LTF

Ref.: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ENXERTOS DE HIDROXIAPATITA E GESSO PARIS NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 36 ratos

Período: 03/2011 até 06/2011.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

10. REFERÊNCIAS:

ALDERMAN NE. Sterile plaster of Paris as an implant in the infrabony environment: a preliminary study. **J Periodontol.** 1969; 40:11–13.

AL RUHAIMI KA. Effect of calcium sulphate on the rate of osteogenesis in distracted bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30:228-233.

Alexander DI, Manson NA, Mitchell MJ. Efficacy of calcium sulfate plus decompression bone in lumbar and lumbosacral spinal fusion: preliminary results in 40 patients. *Can J Surg.* 2001;44(4):262-6.

ARTZI, Z.; TAL, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluation at 9 months. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1015-1023, 2000.

BRANDÃO, A. C. *et al.* Histomorphometric Analysis of Rat Alveolar Wound Healing with Hydroxyapatite Alone or Associated to BMPs. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 3, p. 147-154, 2002.

BORGES, A. P. B. *et al.* Hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. Avaliação histológica por microscopia eletrônica de retrodispersão. V.10: Trabalho apresentado: VI Jornadas Internacionales de La Sociedad Espanhola de Cirurgia., 1997

BUCHAIM, R. L. *et al.* Gen-phos Implant in Surgical Cavities performed in the Tibia of Rats submitted to Experimental Chronic Alcoholism. A Microscopy Study. **R. FOB**, v. 10, n. 1, p. 17-22, jan./mar. 2002.

CAIAZZA, S. *et al.* Avaliação da Regeneração Óssea Guiada, em fêmur de coelhos, usando membranas de colágeno. **Int. J. Oral Implantol.**, ano III, n. 11, p. 3-40, 2002.

CALLAN, D. P.; ROHRER, M. D. Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 575-582, 1993.

CHU, T. M. G. *et al.* Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. **Biomaterials**, v. 22, p. 1283-1293, 2002.

DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J. Neurosurg.**, v. 74, p. 487-491, 1991.

DALBY, M. J. *et al.* Increasing hydroxyapatite incorporation into poly (methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. **Biomaterials**, v. 23, p. 569-576, 2002.

DALKÝZ, M. *et al.* Avaliação dos Efeitos de Diferentes Biomateriais em Defeitos Ósseos. **Int. J. Oral Implantol.**, ano III, n. 11, 2002.

DAMIEN CJ, RICCI JL, CHRISTEL P, *et al.* **Formation of a calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes.** *Calcif Tissue Int.* 1994;55:151-158.

DAVIES JE. **Histodynamics of endosseous wound healing.** In: Davies JE, editors. Bone engineering. Canada: EM2. 2000. pp. 1-11.

DELIGIANNI, D. D. *et al.* Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. **Biomaterials**, v. 22, p.87-96, 2001.

DIAZ, J. C. Q. Aumento del reborde mandibular atrófico con hidroxiapatita porosa. **R. Cubana Estomatol.**, Julio/Dic. 1995.

DHEM, A. *et al.* Skeletal growth and condroid tissue. *Arch.Ital. Anat.Embriol.*v. 94, n. 3,p.237-241, 1989

FINI, M. *et al.* The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. **J. Orthop. Res.**, v. 20, p. 756-763, 2002.

GABRIELLI, M. A. C. *et al.* Hydroxyapatite Implants with or without Collagen in the Zygomatic Arch of Rats. Histological Study. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n. 1, p. 9-15, 2001.

GARBIN, C. M.; GARBIN, N. M. **Enxertos Ósseos e Regeneração Tecidual Guiada: Noções Básicas**. São Paulo: Pancast, 1994, 97p.

GERBI, M. E. M. M. **Avaliação da Eficácia do Implante de Osso Orgânico Bovino Liofilizado associado ou não ao uso de Membrana Biológica no Reparo Ósseo de Feridas Cirúrgicas em Fêmur de Ratos**. Salvador, 2001. 181p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, 2001.

GOTTLOW, J. *et al.* New attachment formation in the human periodontium by guided bone regeneration. **J. Clin. Periodont.**, v. 13, n. 6, p. 604-616, July 1986.

GROSS, J. S. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. **Comp. Aplic.**, v. 18, n. 10, p. 1013-1038, 1997.

IGLHAUT, J. *et al.* Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. **Int. J. Periodontics Restorative Res.**, v. 23, p. 107-117, 1988.

IMAZATO, S.; FUKUNISHI, K. Potential efficacy of GTR and autogenous bone graft for autotransplantation to recipient sites with osseous defects: evaluation by re-entry procedure. **Dent.Traumatol.**, v. 19, p. 1-6, 2003.

JENSEN, S. S.; *et al.* **Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes**. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 11, p. 55-66, 1996

KONTIO R. **Treatment of orbital fractures: The case for reconstruction with autogenous bone.** J Oral Maxillofac Surg 2004;62:863-8.

KURASHINA K. *et al.* Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials**, v.23, p. 407-412, 2002.

Effect of bovine bone grafts on the bone healing process - an experimental study.
R. Bras. Ciênc. Saúde, v. 7, n. 2, p44, 2003b.

LINS, L. E. F. *et al.* The Influence of Hydroxyapatite on Bone Healing in Titanium Implants as shown by Scanning Electron Microscopy. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 20, n. 1, Jan./Apr.2003

MACEDO, N. L.; JARDINI, M. N.; CARVALHO, Y. R. Estudo da reação tecidual ao implante subcutâneo de dois tipos de hidroxiapatita em ratos. **R. Odont. UNESP**, v. 1, n. 24, p. 19-28, 1995.

MACEDO, N. L. *et al.* Guided Bone Regeneration with Subperiosteal Implants of PTFE and Hydroxyapatite Physical Barriers in Rats. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2003.

MARCATONIO JUNIOR, E.; MARCATONIO, R. A. C.; CIRELLI, J. A. Regeneração óssea: vertical e horizontal. *In*: TUNES, U. R.; RAPP, G. E. (Coord.). **Atualização em Periodontia e Implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap. 15, p. 297-316.

MARTIN,R.B.;CHAPMAN,M.N.;SHARKEY,N.A.;ZISSIMOS,S.L.;BAY,B.;SHORS,E.C. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hidroxyapatite 1 yr after implantation. *Biomaterials*. V.14, n 5, p.341-348, 1993

MARZOLA, C. *et al.* Implantes de Bioapatita + Osseobond + Membrana Reabsorvível Dentoflex + Aglutinante Dentoflex. Apresentação de casos clínico-cirúrgicos. **R. Bras. Ciência Estomatol.**, v. 1, n. 2, p. 51-63, jul. 1996.

MCNEILL SR, COBB CM, RAPLEY JW, et al. **In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study.** *J Clin Periodontol.* 1999;26:239-245

MILÁN, L. C. P.; DOMÍNGUEZ, M. G. Efectividad del implante de hidroxiapatita en defectos óseos periodontales. Presentación de un caso. **Multimed**, V. 3, N. 1, 1998.

MOED BR, WILLSON CARR SE, CRAIG JG, et al. **Calcium sulfate used as bone graft substitute in acetabular fracture fixation.** *Clin Orthop.* 2003;410:303-309.

MOURSI, A. M. *et al.* Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite. **Biomaterials**, v. 23, p.133-144, 2002.

MUNDELL, C. *et al.* Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, n. 9, p. 1004-1012, Sept. 1993.

NOVAES JÚNIOR; BATISTA JUNIOR. Técnicas Regenerativas em Periodontia. *In*: TUNES, U. R.; RAPP, G. E. (Coord.). **Atualização em Periodontia e Implantodontia.** São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap. 11, p. 181-225.

NOVAES JUNIOR, A. B.; MORAES, N.; NOVAES, A. B. "BioFill" - membrana biológica nacional para regeneração tecidual guiada. *R. Bras. Odont.*, v. XLVII, n. 3, p. 25-28, maio/jun. 1990a.

Uso do BioFill como membrana biológica no tratamento da lesão de furca com e sem a utilização da hidroxiapatita porosa. *R. Bras. Odont.*, v. XLVII, n. 5, p. 29-32, set./out. 1990b.

OKAMOTO, T. *et al.* Implante de Boplant em alvéolos dentais - Estudo histológico em ratos. *R. Facul. Odont. Araçatuba*, v. 3, n. 1, p. 13-21, 1974.

PELTIER LF. **The use of plaster of Paris to fill large defects in bone.** *Am J Surg.* 1959;97:311-315.

PECORA G, DE LEONARDIS D, IBRAHIM N, et al. **The use of calcium sulfate in the surgical treatment of a “through and periradicular lesion ”.** *Int Endod J.* 2001;34:189-197.

PIETRZAK WS, RONK R. **Calcium sulfate bone void filler: A review and a look ahead.** *J Craniofac Surg.* 2000;11:327- 333.

Assessment of bone repair following the use of inorganic bone graft Gen-ox®
Inorganic and membrane or not with 830-nm laser light. **International Congress Series**, v. 1248, p. 445-447, 2003c.

PINTO, L. P.; BRITO, J. H. M.; OLIVEIRA, M. G. Avaliação Histológica do Processo de Reparo Ósseo na Presença da Proteína Morfogenética Óssea (Gen-pro®) Associada com uma Membrana Biológica (Gen-derm®). **R. Bras. Implantol. Prótese Implante**, v. 10, n. 37, p. 25-32, 2003.

RICCI JL, ALEXANDER H, NADKARNI P, et al. **Biological mechanisms of calcium sulfate replacement by bone.** In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto, Canada: Em Squared Inc.; 2000:332-344.

RIPPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hidroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, n.17, p.31-35, 1996.

ROBBINS, S. L.; ANGELL, M.; KUMAR, V. Inflamação e Reparação. In: **Patologia Básica**. Tradução de Aron Gelman. São Paulo: Atheneu/EDUSP, 1986, cap. 02, p. 32-68. Tradução de: Basic Pathology.

ROSA, A. L.; BRENTAGANI, L. G.; GRANDINI, S. A. Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Implants in the Dental Alveolus of Rats. A Histometric Study. **Braz. Dent. J.**, v. 6, n. 2, p. 103-109, 1995.

ROSEN, V. B.; HOBBS, L. W.; SPECTOR, M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. **Biomaterials**, v. 23, p. 921-928, 2002.

SANTAMARIA, J. *et al.* Bone regeneration after radicular cyst removal with and without guided bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 27, p. 118-120, 1998.

SCHLIEPHAKE, H. *et al.* Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 112-118, 2004.

SEIBERT, J.; NYMAN, S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. **J. Periodontol.**, v. 61, n. 3, p. 157-165, Mar. 1990.

SHEYLA, M.C. *ET AL.*; HAP-91® E COL.HAP-91® *Casuística e estudos científicos. 3ª edição Sabará 2008*

SIGURDSSON, T. J. *et al.* Periodontal repair in dogs: recombinant bone morphogenetic protein - 2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 131-138, 1995.

SILVA JÚNIOR, A. N. *et al.* Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, p.83-87, 2002.

SLOTTE, C.; LUNDGREN, D.; BURGOS, P. M. Placement of Autogeneic Bone Chips or Bovine Bone Mineral in Guided Bone Augmentation: A Rabbit Skull Study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 18, n. 3, p. 795-806, 2003.

SONOHARA, M. K.; GRECHI, S. L. A. Avaliação da resposta biológica a diferentes barreiras mecânicas, utilizadas na técnica de regeneração tecidual guiada (RTG). **R. Fac. Odont. Bauru**, v. 2, n. 4, p. 96-102, out./dez. 1994.

SOTTOSANTI J. **Calcium sulfate: an aid to periodontal, implant and restorative therapy.** *Calif Dent Assoc J.* 1992;20:45, 60, 62.

TAGA, R. *et al.* Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **R. Bras. Implant.**, jan./fev. 1997.

TORRICELLI, P. *et al.* Laser biostimulation of cartilage: *in vitro* evaluation. **Biomed. Pharmacother.**, v. 55, p. 117-120, 2001.

TURNER TM, URBAN RM, GITELIS S, *et al.* **Resorption evaluation of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect.** *Orthopedics.* 2003;26(suppl 5):S577- S579.

TURNER TM, URBAN RM, HALL DJ, *et al.* **Osseous healing using injectable calcium sulfate-based putty for the delivery of demineralized bone matrix and cancellous bone chips.** *Orthopedics.* 2003;26(suppl 5):S571-S575