

Estela Kaminagakura

Cirurgiã-Dentista

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

**Avaliação da biocompatibilidade do enxerto ósseo
autógeno, da membrana de colágeno absorvível e
do carbonato de cálcio natural pulverizado sobre o
processo de reparo ósseo.**



**Tese apresentada à
Faculdade de Odontologia
de Piracicaba/UNICAMP,
para obtenção do grau de
Mestre em Biologia e
Patologia Buco-Dental.**

Piracicaba-2001

Estela Kaminagakura

Cirurgiã-Dentista

Avaliação da biocompatibilidade do enxerto ósseo autógeno, da membrana de colágeno absorvível e do carbonato de cálcio natural pulverizado sobre o processo de reparo ósseo.

2001110027

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPC, 25/08/01
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, para obtenção do grau de Mestre em Biologia e Patologia Bucodental.

Orientador: Profº Dr. Pedro Duarte Novaes. Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP

Piracicaba-2001

ii

N.º CHAMADA: UNICAMP
K128a
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 44274
 PROC. 16-392101
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 14/06/02
 N.º CPD

CM00156331-7

Ficha Catalográfica

K128a Kaminagakura, Estela.
 Avaliação da biocompatibilidade do enxerto ósseo autógeno, da membrana de colágeno absorvível e do carbonato de cálcio natural pulverizado sobre o processo de reparo ósseo. / Estela Kaminagakura. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
 xii, 74f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ossos – Regeneração. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 16 de Fevereiro de 2001, considerou a candidata ESTELA KAMINAGAKURA aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

2. Prof. Dr. JOSE ROBERTO PINTO

3. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR.

A *Deus*, pois

“Ele é um poderoso protetor, um sólido apoio,
um abrigo contra o calor, uma tela contra o ardor do meio-dia,
um sustentáculo contra os choques, um amparo contra a queda.

Ele eleva a alma, ilumina os olhos;

dá saúde, vida e benção.”

(Ecle 34: 19-20)

Dedicatórias

Aos meus pais, *Minoru e Masako*, pela maneira incondicional e infinita que me amam, por não medirem esforços para me proporcionar **todas** as oportunidades e pelos exemplos de honestidade, simplicidade, trabalho, união e amor. Enfim, exemplos de vidas a serem seguidos.

Aos meus irmãos

Ricardo, pois sinto a sua presença silenciosa acompanhando a minha caminhada.

Walter, por me acompanhar em todos os momentos de alegrias e tristezas, não permitindo que eu desanimasse. Obrigada pelo suporte emocional, conselhos, carinho e inúmeras outras coisas...

“Bendito seja *Deus* que nos reuniu...”

Agradecimentos

Ao Prof Dr.

José Roberto Pinto

Por ter me ensinado a concretizar sonhos,

Por impulsionar a minha vida acadêmica,

Pelo estímulo, pela confiança, pelo respeito

Mas, sobretudo pelo carinho e pela amizade verdadeira que
sempre demonstrou por mim.

Agradecimentos

Ao Prof. *Dr. Pedro Duarte Novaes*

pela forma com que sempre me atendeu, pela paciência com minha inquietude de aprendiz, pela orientação e credibilidade. Obrigada principalmente por respeitar e incentivar todas as minhas decisões. A você, com muito carinho e consideração.

Ao Prof. Dr. *Oslei Paes de Almeida*

pela inquestionável seriedade e competência com que exerce a ciência, pelo tempo que me dispôs e pela oportunidade de continuar o curso de pós-graduação.

Agradecimentos

À *Elisa Mie Ikari* por ter se tornado uma “irmã” ao longo destes anos. Por todas as lembranças que me traz, por todas as coisas que me ajudou a realizar. Agradeço por absolutamente **tudo**!

Ao *Renato Bonacín Pires* por seu incansável companheirismo, pela lealdade, pelas incontáveis virtudes que nele há. Sinto-me agraciada pela generosidade e pelo zelo que sempre me dispensa.

Ao tio *Ossamu e família* pelo amor que sempre nos manterá unidos e pela maneira que assistem nossos pais na nossa ausência.

À *Ângela Celis de Almeida Lopes* por tornar a distância e a saudade de casa mais amena e por tudo que aprendemos e partilhamos. Piracicaba ficará marcada em grande parte pela sua presença.

À *Maria Cândida A. Lopes, Messias Franca de Macedo e Silvana Pasetto* por se unirem despretenciosamente a esta milícia de “anjos-amigos”.

Aos *amigos* que aqui ganhei, sejam eles nos laboratórios, nas salas de aulas, nos corredores, nos seminários, nos churrascos, nas viagens para casa, na ESALQ...Não me importa quantos nomes vocês tenham! Obrigada a todos pela convivência calorosa e fraterna, pelo incansável apoio que **com certeza** me encorajou a sair de casa e criar novos vínculos.

Agradecimentos

À *Faculdade de Odontologia de Piracicaba* - UNICAMP pelas condições oferecidas para a minha aprendizagem.

Ao Prof. Dr. *Antônio Wilson Sallum*, Diretor da FOP-UNICAMP

À Profª Drª *Altair Antoninha Del Bel Cury*, coordenadora geral da pós-graduação da FOP-UNICAMP.

À Profª Drª *Darcy de Oliveira Tosello*, coordenadora do curso de pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pela competência em gerenciar, por sua alegria inata e pela forma amável com que sempre me ajudou.

À *Universidade Estadual de Londrina* local que sempre será a minha “Casa”.

À *Universidade Norte do Paraná* por todas as oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. *Marcos Frossard* e à Profª Drª *Maria Celeste Morita* pelo incentivo e confiança.

Aos professores da área de histologia, de modo especial ao Prof^{os} Drs. *José Merzel* e *Sérgio Lúne*, modelos de profissionais do ponto de vista tanto científico quanto humano. A vocês, minha admiração!

Ao Profº Dr. *Francisco Humberto Nociti Júnior* pela análise criteriosa do meu trabalho e pelas valiosas sugestões.

Agradecimentos

Ao *CNPq*, Conselho Nacional de Pesquisa, pela bolsa concedida (136157/99-8).

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP 96/07166-4) pela doação do equipamento utilizado na realização da análise histométrica.

A todas as funcionárias dos laboratórios de histologia: *Elíene Romaní, Ivani Odas Demétrio e Maria Aparecida Varella* pelos auxílios na realização dos procedimentos experimentais, pelo carinho e pela amizade. E a todos os demais profissionais da FOP, especialmente *Wanderley Vieira* (biotério), *Érica* (secretária da pós-graduação) e as “*meninas*” da biblioteca.

Ao tio *José Ascânio* e família pelo apoio. Ao *Nório Ikarí* e família pela maneira carinhosa e cuidadosa com que me acolheram.

A todos os meus amigos “Londrinenses”, de maneira muito especial, ao *Josmar Moreira* e, à *Lia Ogawa* e ao *Dr. Nelson Fonseca Júnior*.

A *todos* que de alguma maneira contribuíram nos procedimentos deste experimento.

Sumário

	Pág
Resumo -----	02
Abstract -----	03
1 – Introdução -----	04
2 – Revisão de literatura -----	06
Princípio biológico da ROG -----	06
Membranas absorvíveis na ROG -----	08
Material aloplástico de preenchimento -----	19
3 – Proposição -----	28
4 – Materiais e Métodos -----	29
5 – Resultados -----	35
Análise histológica -----	35
Análise estatística dos dados histométricos -----	46
6 – Discussão -----	49
7 - Conclusão-----	62
Referências bibliográficas -----	63

Resumo



objetivo deste trabalho foi analisar histologicamente e histometricamente a técnica de Regeneração Óssea Guiada (ROG) associada ou não ao enxerto ósseo autógeno e ao carbonato de cálcio natural pulverizado sobre o processo de reparo ósseo, nos defeitos bicorticais confeccionados, em calvária de ratas. Foram utilizadas 60 ratas adultas, em cada calota foram realizados 2 defeitos circulares de 4mm de diâmetro, sendo um do lado direito e outro do lado esquerdo da sutura sagital mediana. Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos: grupo I controle; II enxerto ósseo autógeno; III carbonato de cálcio natural pulverizado; IV recebeu membrana de colágeno absorvível nas corticais ósseas interna e externa; V carbonato de cálcio entre as membranas de colágeno e VI enxerto ósseo autógeno entre as membranas. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 14 e 28 dias. O material coletado foi analisado através de microscopia de luz e de luz polarizada. Os resultados histológicos sugeriram que no período de 14 dias o material que promoveu maior osteogênese foi o do grupo do osso autógeno e no período de 28 dias foi o grupo osso autógeno associado à membrana de colágeno. O carbonato de cálcio natural exibiu reação inflamatória de corpo estranho intensa e quando associado à membrana de colágeno houve formação de abscesso. Os resultados deste estudo demonstraram que o enxerto ósseo autógeno associado às membranas de colágeno exibiram reparo ósseo significativamente maior quando comparado aos outros grupos.

*T*he purpose of this study was to analyse histologically and histometrically the Guided Bone Regeneration (GBR) associated or not with autogenous bone graft and natural granular calcium carbonate in the treatment of a bicortical osseous defects created in rats skull. Sixty adult female rats received bilateral 4 mm trephine defects in the parietal area. The animals were assigned to one of following: group I- control procedure; II- autogenous bone graft; III- natural granular calcium carbonate; IV- collagen membrane placed ecto-endocranially; V- calcium carbonate between collagen membranes and VI- autograft between collagen membranes. The animals were killed 14 and 28 days after surgery. The results were assessed by light and polarization microscopy. The best results as for bone regeneration was observed at 14 days with autogenous bone graft without collagen membranes and at 28 days with autograft between membranes. Natural granular calcium carbonate showed severe foreign-body inflammatory reaction and when associated with collagen membranes abcess formation was observed. The results of this study demonstred that autogenous bone graft associated with collagen membranes exhibited significantly better bone healing as compared to another groups.



reconstrução óssea representa um desafio para a classe cirúrgica e ortopédica. Muitos defeitos no esqueleto facial podem resultar de traumatismo, infecção ou recessão tumoral (GONÇALVES, 1997) podendo causar severas seqüelas funcionais e estéticas. Importantes avanços no entendimento sobre a reparação do tecido ósseo foram obtidos graças aos estudos experimentais em animais e portanto sua utilização é recomendada para melhorar o entendimento de técnicas cirúrgicas e testar materiais para implantes (LANE & SANDHU, 1987).

O osso autógeno esponjoso é o melhor tipo de enxerto que existe pois causa pouca inflamação, sofre revascularização mais rápida, apresenta maior potencial de osseoindução e osseocondução e, conseqüentemente uma remodelação em menor espaço de tempo (GOLDBERG & STEVENSON, 1987). A grande desvantagem do enxerto autógeno é a cirurgia adicional na área doadora do paciente com a possibilidade de causar morbidade e desconforto. Outra desvantagem seria a fonte limitada de osso em quantidade e qualidade (JORGE, 1999). Portanto, há muito interesse no desenvolvimento de materiais alternativos para evitar que uma segunda cirurgia seja feita para obtenção do enxerto autógeno diminuindo a morbidade do sítio doador e do trans-operatório (GARCIA, 1999).

A técnica da Regeneração Óssea Guiada (ROG) baseia-se no princípio que os diferentes componentes celulares do tecido tenham índices variados de migração durante o processo de reparo ósseo. Através da colocação de uma barreira física sobre o defeito, células indesejáveis são excluídas do local a sofrer reparo e a proliferação de células

osteoprogenitoras é favorecida. Atualmente tem-se associado as barreiras físicas aos materiais de preenchimento, pois esta associação parece favorecer os resultados da ROG e os efeitos dos materiais de preenchimento (LINDE et al., 1993).

Materiais de preenchimento aloplástico têm sido pesquisados. O desenvolvimento de um material que satisfaça os critérios de um substituto ideal tem sido muito enfocado. Embora os experimentos com estes biomateriais revelem resultados promissores, a literatura ainda relata muita controvérsia a respeito do tipo de material ideal, atestando que este assunto está longe de ser elucidado.



tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). O osso difere dos demais tecidos não só na sua estrutura físicoquímica, mas também na sua capacidade de remodelação e regeneração durante todo o período pós-fetal (GOMES, 1998). Essa habilidade do tecido ósseo de se remodelar e de se regenerar tem sido atribuída tanto à proliferação de células osteoprogenitoras, como à indução da proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (CORMACK, 1991).

Princípio biológico da técnica da Regeneração Óssea Guiada (ROG)

Regeneração é definida como a reconstituição de partes ou estruturas perdidas; é o processo biológico pelo qual a arquitetura e a função dos tecidos perdidos são completamente restaurados (COTRAN et al., 1996).

O que compromete o sucesso da neoformação óssea é a rápida formação de tecido conjuntivo frouxo no local a sofrer reparo (GOMES, 1998). Nas últimas décadas, muitos estudos em animais documentaram a possibilidade de excluir as células indesejáveis por meio de barreiras físicas objetivando a proliferação de células específicas para repovoarem o defeito ósseo com o tipo de tecido desejado (NYMAN, 1991).

O princípio da utilização de algum tipo de barreira física para favorecer a regeneração tecidual específica é empregado em cirurgias reconstrutivas desde 1957, quando MURRAY

Revisão de literatura

et al.; realizaram defeitos ósseos cirúrgicos nos ossos ilíaco e fêmur de cães e os protegeram com um material plástico e inelástico. Após 10 semanas, observou-se crescimento ósseo de 6mm no osso ilíaco e 5mm no osso do fêmur, com as mesmas características microscópicas do osso circundante preexistente. Os autores puderam concluir que o material plástico impediu que o tecido conjuntivo invadisse a loja cirúrgica, permitindo a neoformação óssea.

MELCHER & DREYER, em 1962, confeccionaram defeitos circulares de três milímetros de diâmetro em fêmur de ratos. As cavidades testes foram recobertas com uma membrana de acetato-celulose ou com osso orgânico e nos locais controles nenhum material foi colocado. Os autores verificaram neoformação óssea em todas as cavidades, exceto no grupo controle, e constataram que estas barreiras físicas protegeram o coágulo sanguíneo contra a invasão de células não osteogênicas do tecido conjuntivo, preservaram o tamanho do coágulo e preveniram sua desorganização eliminando a pressão dos tecidos circunvizinhos.

O princípio da Regeneração Tecidual guiada (RTG), ou seja, a utilização de uma barreira mecânica objetivando a exclusão de células teciduais indesejáveis da ferida cirúrgica, foi desenvolvido inicialmente para regenerar tecidos periodontais destruídos por processos inflamatórios (NYMAN et al., 1982; GOTTLOW, et al., 1984).

Vários estudos subseqüentes, em diversos animais experimentais, demonstraram a possibilidade da utilização do princípio da técnica de RTG nas cirurgias excedendo o campo da periodontia e uma das suas aplicações seria nas cirurgias ósseas reconstrutivas

(NYMAN, 1991). Portanto a ROG obedece o mesmo princípio biológico da RTG proposta por NYMAN et al.(1982).

• Membranas absorvíveis na ROG

Vários tipos de barreiras físicas são sugeridos para serem utilizados em RTG e em ROG, mas de forma simplificada há duas categorias (DOWELL & MORAN & QUTEISH, 1991): as membranas não absorvíveis (PTFE-e e filtros de Millipore) e as absorvíveis (colágeno e de ácido polilático) (SALLUM, 1996).

Sem dúvida, a membrana não absorvível mais utilizada e com sucesso nestas técnicas é a de PTFE-e (politetrafluoretileno-expandido), um produto comercial originalmente desenvolvido para ser empregado na cirurgia geral e ortopédica (DOWELL & MORAN & QUTEISH, 1991) o que posteriormente sugeriu seu emprego nas terapias periodontais (LUNDGREN et al, 1992). DOWELL & MORAN & QUTEISH em 1991, em seu trabalho de revisão, afirmaram que, apesar do amplo emprego das membranas de PTFE-e (Gore-Tex®), esse material apresenta algumas desvantagens como: pouca maleabilidade que dificulta sua adaptação sob o retalho, consumindo tempo; tendência de se aderir à superfície onde são adaptadas, impedindo a proliferação celular na área de contato; alto custo, o que poderia reduzir o seu emprego na prática clínica; possibilidade de exposição prematura da membrana, podendo desencadear um processo infeccioso (MILLER et al,1996) e, por último, necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para sua remoção (SALLUM,1996). Para evitar esses inconvenientes, materiais absorvíveis como colágeno, ácido poligláctico e láctico (MINABE, 1991) têm sido desenvolvidos e testados em estudos

Revisão de literatura

clínicos e laboratoriais (MILLER et al., 1996). Recentemente, a ênfase tem sido colocada no uso das membranas de colágeno por causa da sua baixa antigenicidade, alta resistência à tensão, baixa extensibilidade, (MENDIETA & WILLIAMS, 1994; PITARU et al., 1987), capacidade de aumentar a adesão celular (MILLER et al., 1996) e sua propriedade de ser hemostática (SALLUM, 1996).

O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada no tecido conjuntivo, incluindo a pele, o osso, o ligamento e a cartilagem (MENDIETA & WILLIAMS, 1994). É utilizado de variadas formas físicas como membrana, esponja e grânulo; podendo também ser usado como agente hemostático, para proteção das feridas cirúrgicas e queimaduras, como guia para o crescimento da inervação periférica (SISKEN & WALKER & ORGEL; 1993) e nas terapias baseadas na técnica de RTG (GOISSIS et al., 1999). Melhoras graduais estão sendo introduzidas para a utilização de membranas absorvíveis obtidas a partir do colágeno (PITARU et al., 1989), vicryl (FLEISHER & DE WAAL & BLOOM, 1988) e ácido polilático (SALLUM, 1996).

Membranas de colágeno foram utilizadas primeiramente em humanos, em defeitos infraósseos, na forma de dura-máter congelada e desmineralizada por BUSSCHOP & DE BOEVER (1983), que constataram o aumento do ligamento periodontal e preenchimento ósseo. GARRETT et al (1988) mencionaram que a FDA/USA alertou sobre a possibilidade de transmissão da doença de Creutzfeldt-Jakob através do enxerto de dura-máter.

YUKNA (1992) comparou as membranas de PTFE-e e de dura-máter congelada e desmineralizada alógena em lesões de furca classe II da mandíbula, em 11 pacientes. A cobertura dos defeitos foi aleatoriamente determinada e a reentrada cirúrgica foi realizada

Revisão de literatura

um ano após. Ambas as membranas exibiram resultados clínicos favoráveis e não houve diferença nos resultados entre os dois materiais.

QUTEISH et al., (1991) testaram a biocompatibilidade, a reabsorção e as características de invasão celular da membrana de colágeno humano em cultura de tecidos e quando implantados em coxa de ratos. Os experimentos *in vitro* ao 5º e 7º dia pós-plaqueamento mostraram que fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal humano cresceram na superfície do colágeno humano, respectivamente. Os resultados dos experimentos *in vivo* mostraram que houve reabsorção do colágeno pela invasão de fibroblastos na 6ª semana e após seis semanas observaram diminuição de fibroblastos no material. Este período foi considerado um ideal para se formar um novo ligamento nos defeitos periodontais em humanos.

A avaliação da efetividade da membrana absorvível do tipo I foi feita por CHUNG et al (1990), em dez pacientes com bolsa periodontal igual ou maior que 5mm de profundidade e com evidência de perda óssea igual ou maior que 40%. A membrana de colágeno tipo I (Colla-Tec Corporation, Princeton,NJ) foi adaptada aos dentes nos defeitos experimentais, o retalho foi reposicionado e suturado. O lado controle consistiu no mesmo procedimento, mas sem a interposição de membranas e foi realizado no lado contralateral do arco no mesmo paciente. A reentrada cirúrgica foi realizada após um ano e apresentou ganho de inserção no lado teste de $0,56 \pm 0,57\text{mm}$, ao passo que no lado controle houve perda de $0,71 \pm 0,91\text{mm}$. A neoformação óssea no lado teste foi de $1,16 \pm 0,95\text{mm}$ enquanto não se observou ganho no lado controle. Os resultados desse trabalho

Revisão de literatura

demonstraram que os locais tratados com a membrana de colágeno tipo I exibiram regeneração significativamente melhor quando comparados ao local controle.

No estudo de O'BRIEN et al (1995) foram realizados em cães 48 defeitos tipo deiscência, medindo aproximadamente 5mm de largura e 5mm de profundidade. Os locais experimentais escolhidos, caninos e pré-molares, foram cobertos por membranas de colágeno extraídas de tendão bovino (Matriz densa protótipo IV- Colla Tec), posicionadas 2 a 3mm além das bordas dos defeitos. 24 locais não receberam cobertura alguma, serviram como controle. Os cães foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 2, 6 e 16 semanas. A análise histológica revelou que na 2ª semana pós-operatória a membrana foi uma barreira efetiva, excluindo o epitélio gengival da ferida durante os estágios iniciais. Porém, após este período não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. Os autores concluíram também que as membranas foram biodegradadas entre a 2ª e 6ª semana pós-operatória e se apresentaram biocompatíveis para esse modelo experimental.

VAN SWOL et al (1993) publicaram os resultados de três meses de estudo clínico que avaliaram a efetividade do colágeno preparado a partir da pele bovina (Perogen, absorvível Palo Alto, CA) na regeneração de furca classe II, em humanos. 38 pacientes foram selecionados para o estudo, sendo 28 para o grupo teste, lesões que receberam a membrana de colágeno, e 10 para o grupo controle. Durante a reentrada cirúrgica, foi observada a melhora clínica em todas as mensurações feitas, nos 2 grupos. No grupo tratado as lesões de furca horizontais demonstraram melhora estatisticamente significante ($p < 0,001$) sobre o grupo controle, 23 lesões tratadas com colágeno exibiram uma redução de 25% na sondagem e apenas 10% no controle obtiveram o mesmo.

Revisão de literatura

A Bio Gide® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland) é uma membrana colágena absorvível de origem suína. O propósito da investigação clínica de ZITZMANN & NAEF & SCHÄRER (1997) foi comparar a membrana de colágeno de origem suína Bio Gide® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland) com a membrana não absorvível de PTFE-e (Gore Tex®) em situações em que houve exposição da superfície dos implantes. Um total de 84 implantes (Branemark, Nobel biocare, Göteborg, Sweden) foi colocado em defeitos ósseos de 25 pacientes, sendo que 58 colocados na maxila e 26 na mandíbula. Em 13 pacientes escolhidos aleatoriamente, os defeitos foram cobertos com a membrana de colágeno e em 12, com a de PTFE-e. Todos os 84 defeitos foram preenchidos com matriz mineral óssea de origem bovina, Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland), e cobertos com suas respectivas membranas. O tipo, as dimensões e a morfologia dos defeitos foram detalhadamente descritos inicialmente e na reentrada cirúrgica, o que permitiu calcular a superfície do implante exposta. A reentrada cirúrgica ocorreu após 4 meses para mandíbula e 6 meses para maxila. A redução do tamanho do defeito foi significativa para os 2 tipos de membranas ($p < 0,0001$). Em relação ao controle, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($p > 0,94$). Os autores puderam concluir que a membrana absorvível utilizada em associação com enxerto ósseo representou uma alternativa viável para substituir o bem estabelecido método utilizado com as membranas de PTFE-e.

HÜRZELER et al. (1998) verificaram a eficácia da membrana de colágeno (Bio Gide®) isolada ou associada com o Bio-Oss® em torno de implantes dentais expostos. Após a extração de todos os pré-molares e 1^{os} molares de 5 macacos, dois implantes

Revisão de literatura

endósteos foram instalados em cada quadrante. Os defeitos foram tratados com membrana de colágeno somente (grupo I), membrana de colágeno e Bio-Oss® (grupo II) e PTFE-e e Bio-Oss® (grupo III), sendo que o grupo IV serviu como controle. Após 6 meses os animais foram sacrificados e a análise histológica e histométrica realizada. Os dados experimentais indicaram que as membranas de colágeno não devem ser utilizadas sozinhas no tratamento de implantes dentais expostos, mas quando associadas ao material de preenchimento aumentaram a neoformação óssea.

As avaliações histológicas de HÜRZELER et al (1998) mostraram que parte da estrutura do colágeno da membrana Bio Gide ® permanecia intacta após 6 meses, quando empregada para ROG em macacos. Essa membrana bilaminar promove dupla função: a camada interna que fica em contato com tecido ósseo é porosa e consiste de fibras colágenas desarranjadas, permitindo que os osteoblastos penetrem e ocorra neoformação óssea sem interferências enquanto uma superfície externa densa contacta os tecidos moles e com isso previne que os fibroblastos invadam o defeito ósseo. Os materiais biodegradáveis são mais flexíveis e, em associação com um material de preenchimento, são indicados para prevenir o seu colapso e manter o espaço para formação do coágulo e da regeneração óssea.

Em 1993, MUNDELL et al. demonstraram a eficácia da membrana de colágeno na ROG no arco zigomático de coelhos. Em 8 coelhos foram realizadas osteotomias verticais de 1mm (estreita) e 5mm (larga), bilateralmente. Em um dos lados foi posicionada uma membrana de colágeno (Colla-Tec, Inc, an Integra LifeSciences Co, Plainsboro, NJ) antes da sutura (lado teste) e no lado contralateral os tecidos foram reposicionados e suturados (controle). Nos períodos de 2ª e 4ª semanas pós-operatórias, 4 animais foram sacrificados e

Revisão de literatura

os exames radiográficos e microscópicos foram realizados. Na 4ª semana pós-operatória, o local controle de osteotomia larga exibiu invasão por fibroblastos, com formação de um tecido conjuntivo fibroso; enquanto no lado teste houve união óssea sem invaginação de tecido fibroso. Estes sugeriram que as membranas de colágeno puderam prevenir efetivamente a invasão do coágulo por células não osteogênicas, especialmente em defeitos ósseos amplos, podendo ser úteis nos casos cirúrgicos que requerem extensa reposição dos segmentos ósseos onde a união fibrosa seria um acontecimento indesejável.

No estudo realizado por MOONEY et al. (1996) foram confeccionadas osteotomias verticais de 5mm no arco zigomático, bilateralmente. Os segmentos ósseos foram fixados utilizando microplacas e parafusos ou fios de osteossíntese. Alguns defeitos foram cobertos com membrana de colágeno absorvível e outros foram deixados descobertos. A análise histológica, na 4ª semana pós-operatória, revelou que a fixação rígida coberta com membrana exibiu regeneração óssea mais organizada que aquela dos defeitos tratados pela técnica semi-rígida e cobertos por membrana. Todas as osteotomias não cobertas mostraram invasão por fibroblastos resultando em má união. Esses resultados demonstraram a eficácia da ROG com membrana de colágeno em defeitos ósseos extensos. A associação da fixação rígida e a técnica de ROG demonstraram aumentar a organização do trabeculado ósseo, mas não, a taxa da osteogênese.

As propriedades físicas e biológicas do colágeno bovino tipo I, seco e congelado foram recentemente investigadas por HYDER et al. em 1992. Esponjas de colágeno foram implantadas em tecido subcutâneo de ratos e a análise histológica foi realizada. O estudo do coeficiente de elasticidade revelou que o material tinha força e resistência à deformação

Revisão de literatura

adequadas à manipulação. Em contato com o sangue e com os fluidos teciduais mantinham a espessura ideal para serem adaptadas sob o retalho mucoperiosteal. A espessura apropriada do material para as condições cirúrgicas foi de 1,5mm. No estudo de biocompatibilidade não havia evidência de toxicidade e nos estudos *in vitro* também não havia sinais de rejeição. A reabsorção do material com invasão de células do hospedeiro, incluindo fibroblastos, foi de 4 semanas nos ratos, um período compatível com o uso deste material em ROG.

MILLER et al. (1996) compararam a taxa de reabsorção entre as membranas de colágeno do tipo I e as membranas de ácido polilático/cítrico. Nesse experimento foram implantadas membranas com dimensões de 2x4mm na mucosa alveolar, apicalmente aos incisivos superiores de coelhos. A membrana de colágeno foi posicionada de um lado e o polímero de ácido polilático no lado contralateral. Os animais foram sacrificados no dia zero e nas semanas 1,3,5,7,9 e 12 pós-operatórias. O exame histológico revelou que na 1ª semana houve resposta inflamatória mais severa ao redor da membrana de colágeno e em alguns animais formou-se abscesso. Por volta da 2ª semana, a membrana de colágeno era imperceptível, mas havia sinais de inflamação aguda com proliferação de muitos capilares e infiltrado inflamatório significativo. A membrana de ácido polilático ainda era visível na 12ª semana, embora muito fragmentada. Nesse estudo concluiu-se que esta membrana é reabsorvida numa taxa mais lenta e produz menos inflamação que a de colágeno, portanto, o colágeno foi uma barreira menos adequada.

Segundo PARODI & SANTARELLI & CARUSI (1996), o colágeno em seu estado nativo é a forma mais estável da membrana. Sua forma molecular é caracterizada por três

Revisão de literatura

cadeias polipeptídicas que são naturalmente enroladas em tripla hélice. Essa estrutura previne sua digestão pelas proteases. Para aumentar a resistência e prolongar a reabsorção do colágeno, algumas membranas (Paroguide®, Collectica) são produzidas por um processo de imersão que aumenta as ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas. As técnicas anteriormente utilizadas deixavam um resíduo tóxico, mas o novo tipo de imersão da membrana de colágeno em azida reduz a toxicidade e mantém a estrutura da tripla hélice intacta. Essa estrutura particular resulta em um efeito selador mais prolongado das membranas com ligações cruzadas, em comparação com as outras membranas colágenas, e evita também reação inflamatória de corpo estranho.

O ponto crítico para o sucesso da ROG é a taxa de reabsorção da membrana absorvível, que é controlada pelo grau de ligações cruzadas da membrana. Essas membranas permanecem intactas por períodos mais prolongados do que as não ligadas. As ligações cruzadas das fibras de colágeno podem ser induzidas por luz ultravioleta ou sob tratamento por produtos químicos (MENDIETA & WILLIAMS, 1994).

CANCIAN et al (1992) avaliaram histologicamente 3 membranas de colágeno em 3 períodos diferentes de tratamento, através do glutaraldeído à 0,05% por 8, 22 e 28 horas. Posteriormente, os materiais foram implantados em tecido subcutâneo de ratos por 3, 7, 15, 30, 60 dias. A análise microscópica mostrou padrão irritativo para os três grupos: reabsorção completa para o grupo I (8 horas) e incompleta para o II (22 horas) e III (28 horas) após 60 dias. Mesmo assim, houve boa aceitação biológica do colágeno, que pôde ser considerado promissor para a confecção de barreiras físicas.

Revisão de literatura

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis pela remodelação e degradação da matriz extracelular e dos componentes da membrana basal. No trabalho de MOHD et al. (1999) foi avaliado o nível de MMP-3 e MMP-8 durante as fases iniciais da regeneração após o emprego da técnica da ROG. 32 pacientes com defeitos ósseos de 2 ou 3 paredes e bolsa periodontal $\geq 6\text{mm}$ foram divididos em 2 grupos baseados na idade, sexo, hábito de fumar e severidade da doença periodontal. Todos os defeitos intraósseos foram tratados utilizando uma membrana absorvível (Guidor®), mas em apenas 1 grupo foram administradas 3 gramas de amoxicilina no período pré-operatório. As amostras do fluido gengivo-crevicular, para quantificar as enzimas, foram obtidas do local onde a membrana tinha sido posicionada (local do defeito), do local próximo ao dente envolvido no retalho cirúrgico (controle cirúrgico) e do local contralateral saudável (controle). As amostras foram colhidas no início, 1, 4 semanas e 3 meses após a cirurgia e analisadas utilizando a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoasorbent) para a MMP-3 e IFMA (Time-Resolved Immunofluorescence Assay) para MMP-8. Níveis relativamente altos para MMP-8 foram detectadas nos três tipos de locais, nos períodos iniciais e na 1ª semana. Na 4ª semana, a MMP-8 aumentou no grupo da membrana e no controle cirúrgico. Não houve diferença significativa entre o nível das enzimas nos grupos que receberam antibiótico e os que não receberam. A análise das enzimas evidenciou que a renovação da matriz colágena ocorre nas fases precoces do reparo periodontal, após o procedimento cirúrgico convencional e ROG. A presença da membrana pareceu aumentar o nível destas enzimas que devem estar relacionadas com seu o processo de reabsorção através do sistema do hospedeiro.

Revisão de literatura

Em 1997, SCHLEGEL et al. estudaram a resposta imunológica de 2 tipos de membranas de colágeno em coelhos e posteriormente em humanos: a membrana Bio Gide B, composta de 2 tipos de colágeno (I e III) de origem suína e a Bio Gide®, composta da mesma forma, mas com uma purificação adicional para remoção das lipoproteínas. Dois fragmentos de membrana Bio Gide B foram implantados subcutaneamente em 3 coelhos, o sangue dos animais foi coletado 7 e 11 semanas posteriores e foi analisada a presença de anticorpos anti-Bio Gide B, através da técnica de ELISA. A resposta imunogênica foi discreta em dois dos três coelhos. No outro grupo experimental, foram implantados 2 fragmentos da membrana Bio Gide® em 4 coelhos da mesma maneira e o sangue coletado após 4 e 9 semanas não exibiu nenhuma resposta imune nos 2 períodos de sacrifício. O estudo clínico complementar compreendeu pacientes que tinham a indicação de ressecção radicular na região de molares. Algumas feridas foram protegidas com membrana Bio Gide® e outras serviram como controle. As tomadas radiográficas foram realizadas nos períodos pós-operatórios de 3, 6 e 9 meses. Neste último período, o grupo tratado demonstrou regeneração óssea melhor que o controle e pareceu não induzir resposta inflamatória severa. Os autores concluíram, nesse trabalho, que a membrana Bio Gide® apresenta um comportamento melhor do que a Bio Gide B.

• Material aloplástico de preenchimento:

O osso autógeno esponjoso é o melhor tipo de enxerto que existe, pois causa pouca inflamação, sofre revascularização mais rápida, apresenta maior potencial de osseoindução e osseocondução e, conseqüentemente, apresenta uma remodelação em menor espaço de tempo (GOLDBERG & STEVENSON, 1987). A grande desvantagem do enxerto autógeno é a cirurgia adicional na área doadora do paciente, com a possibilidade de causar morbidade e desconforto. Outra desvantagem seria a fonte limitada de osso em quantidade e qualidade (JORGE, 1999).

Na tentativa de limitar o uso do enxerto ósseo autógeno, vários materiais minerais são utilizados como substitutivos ósseos: a hidroxiapatita, o fosfato tricálcio e o vidro bioativo (GUILLEMIN et al., 1989). Segundo BAJPAI (1983), um enxerto ou um substituto ósseo ideal deve ser um material biologicamente inerte, prontamente disponível, biodegradável e facilmente adaptável ao local em termos de forma e tamanho.

O emprego do coral natural como substituto ósseo é muito comum nos países europeus. Ele é composto por 98% de carbonato de cálcio (CaCO_3) e cerca de 2% de diversos amino-ácidos e possui uma estrutura cristalina orto-rômbica denominada de aragonite (DAMIEN et al., 1994). Segundo FRAICAN et al. (1996), o coral natural é um substituto ósseo que está sendo amplamente usado nas cirurgias maxilofaciais e ortopédicas. Ele é utilizado para corrigir os defeitos ósseos periodontais (ISSAHAKIAN & OUHAYOUN, 1989; YUKNA, 1994), pois possuiu propriedades de osseocondução e reabsorção (GUILLEMIN et al., 1989). De acordo com esses autores, até o presente

Revisão de literatura

momento, os fragmentos de corais foram utilizados em mais de 500 pacientes em diferentes cirurgias ósseas e dentais, implantados no crânio, na crista ilíaca, nas reconstruções craniofaciais e de base de crânio, nas diáfises e metáfises dos ossos longos, nas fusões vertebrais e nos defeitos periodontais infraósseos.

O estudo de GUILLEMIN et al. (1989) comparou o comportamento de duas espécies de fragmentos de corais, *Porites* e *Acropora*, que foram implantados em ossos longos de carneiros e porcos. As análises microscópicas foram realizadas nos períodos pós-operatórios de um e dois meses. Os cortes não descalcificados observados sob microscopia de luz revelaram que os implantes de corais foram reabsorvidos e gradativamente substituídos por tecido ósseo neoformado. Os fragmentos de corais mostraram ser um material biocompatível e osseocondutor e, que atuaram como um arcabouço para a direta aposição osteoblástica. Conclui-se também que houve maior formação óssea em porcos do que em carneiros, mas a causa desse fenômeno não pôde ser esclarecida neste experimento.

No estudo desenvolvido por DAMIEN et al (1994), o coral natural foi testado no tecido subcutâneo de ratos para se observar as alterações da superfície do material durante o processo de reabsorção. Duas diferentes formas do substituto ósseo foram testadas: alguns animais receberam o carbonato de cálcio na forma de bloco e outros na forma de partículas associadas ao colágeno do tipo IV. Nos períodos pós-operatórios de 2, 4, 6 e 8 semanas os animais foram sacrificados. Os resultados histológicos indicaram a formação de uma camada rica em fosfato de cálcio sobre o coral, a qual foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura e pela microanálise de raios x. Nesse estudo, concluiu-se que durante a dissolução do coral ocorreu a liberação de íons da sua superfície, criando espaços

Revisão de literatura

para que íons fosfato fossem precipitados e assim se interassem com os íons cálcio para formar uma camada superficial rica em fosfato de cálcio sobre o material. Posteriormente, a camada formada atraiu macrófagos e outras células fagocitárias para iniciar o processo de degradação dos corais mediado por células. A formação desta camada rica em fosfato de cálcio pareceu também favorecer a união do material ao leito receptor.

O potencial osteogênico de cinco materiais aloplásticos foi avaliado por NAAMAN BOU-ABBOUD et al. (1993). A hidroxiapatita porosa (PHA), hidroxiapatita densa (DHA), hidroxiapatita semi-porosa (SPHA), o fosfato tricálcio (TCP) e o carbonato de cálcio natural (NC) foram implantados no tecido conjuntivo da papila palatina de porcos. O exame histológico foi realizado nos períodos pós-operatórios de 1, 2, 3, 4, 8, 12 e 24 semanas. O TCP e o NC foram totalmente reabsorvidos até 24ª semana. A DHA, PHA e SPHA exibiram reabsorção limitada, embora houvesse células gigantes multinucleadas em contato com a PHA e a SPHA. Não houve neoformação óssea em torno ou próximo aos materiais testados. Os autores puderam concluir que nenhum destes materiais, nas formas testadas, possuem a capacidade de induzir formação óssea no local extra-esquelético.

Recentemente, VUOLA et al. (1996) realizaram um estudo para comparar a formação óssea no interior de blocos estruturalmente similares, como a HA e o carbonato de cálcio, implantados no tecido muscular de ratos com ou sem osso esponjoso autógeno. O tecido muscular foi o eleito, pois além de ser altamente vascularizado não possui a influência direta do tecido ósseo. Em um grupo, o músculo latissimus dorsal esquerdo recebeu o bloco de carbonato de cálcio e osso autógeno esponjoso e o lado direito recebeu o mesmo bloco

Revisão de literatura

sem o osso esponjoso (controle). No outro grupo, foi realizado o mesmo procedimento com o bloco de HA. Os animais foram sacrificados nas 3^a, 6^a e 12^a semanas pós-operatórias. A análises histológica e histométrica foram realizadas e nenhuma neoformação óssea foi verificada onde não havia osso esponjoso. Nas 3^a e 12^a semanas a formação óssea foi significativamente maior no grupo do carbonato de cálcio associado ao osso esponjoso ($p < 0,05$) do que no grupo da HA, embora os blocos de carbonato de cálcio tivessem perdido 40% da sua área inicial.

VUOLA et al. em 1998 complementaram o trabalho anterior avaliando o efeito dos tecidos formados sobre as propriedades mecânicas dos blocos da HA e do carbonato de cálcio. A força de compressão dos blocos foi mensurada antes de serem implantados no tecido muscular dos ratos, no período pós-operatório de 3 e 6 semanas e também na 12^a semana para o grupo da HA. No exame histológico, os blocos de HA não exibiram reabsorção, já os blocos de carbonato de cálcio foram reabsorvidos rapidamente e perderam gradativamente sua resistência à compressão que inicialmente foi maior do que a HA. Na 3^a semana, os grupos tratados com osso esponjoso foram mais resistentes do que o grupo controle e após seis semanas o tecido neoformado pôde ser considerado tão resistente quanto o osso pré-existente.

O estudo de JENSEN et al. (1996) avaliou qualitativamente e quantitativamente a reação tecidual em torno de quatro diferentes substitutos ósseos instalados em tíbias de coelhos, enfatizando a taxa de reabsorção. Dois defeitos monocorticais de 5mm de diâmetro foram realizados em tíbia de coelhos bilateralmente. Cada um dos defeitos recebeu aleatoriamente um destes materiais de preenchimento: Endobon® (Merca Biomaterialien,

Revisão de literatura

Darmstadt, Germany), Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland), Pro-Osteon 500® (Interpore International, Irvine, CA) ou Interpore 500 HA/CC® (Interpore International). A avaliação clínica e histológica foi realizada no período pós-operatório de 8 semanas e não se verificou diferença na quantidade de osso neoformado ao redor dos 4 materiais analisados. O Interpore 500 HA/CC® sofreu reabsorção completa, porém os demais materiais não exibiram biodegradação detectável e o Bio-Oss® apresentou maior taxa de osseointegração dentre os materiais.

YUKNA (1994) comparou a eficácia do enxerto de carbonato de cálcio natural sobre a curetagem aberta nos defeitos periodontais infraósseos. Participaram desse estudo 20 pacientes submetidos ao tratamento periodontal básico, depois os defeitos ósseos selecionados receberam carbonato de cálcio (local teste) ou foram somente curetados cirurgicamente (local controle). Entre os 6 e 12 meses pós-operatórios, a reentrada cirúrgica foi realizada expondo os defeitos para verificar o processo de reparo, sob visualização direta. Os defeitos preenchidos com enxerto de carbonato de cálcio demonstraram ganho ósseo médio de 2,3mm (67,7%), enquanto no lado controle o preenchimento ósseo médio foi de 0,7mm (25,9%). O autor concluiu que o carbonato de cálcio testado apresentou ser seguro e clinicamente efetivo como substituto ósseo nos tratamentos periodontais com perda óssea.

MORA & OUHAYOUN (1995) realizaram uma avaliação clínica do carbonato de cálcio natural (NCS) em relação à hidroxiapatita porosa (HAP) no tratamento da doença periodontal com perda óssea. Defeitos ósseos de 1, 2 ou 3 paredes com profundidade de bolsa ≥ 6 mm foram tratados através de curetagem aberta (n=10), ou preenchidos com o

Revisão de literatura

NCS (n=10) ou com HAP (n=10). Medições foram realizadas antes da intervenção cirúrgica e após 12 meses e não houve diferença significativa entre os tratamentos no grupo do NCS e da HAP, embora as análises estatísticas tivessem revelado benefícios na utilização destes biomateriais em relação à simples curetagem.

KIM et al (1996) realizaram um estudo clínico para avaliar a utilização de implantes de carbonato de cálcio poroso absorvível e a técnica de RTG em defeitos periodontais infraósseos. Selecionaram-se 80 pacientes com doença periodontal crônica, incluindo defeitos de 1 ou 2 paredes, os quais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos. Os defeitos do grupo I foram tratados com carbonato de cálcio e membranas de PTFE-e; os do grupo II, com membranas de PTFE-e; os do grupo III, com carbonato de cálcio e no grupo IV não foi interposto nenhum material. Após seis meses, os 64 pacientes que completaram o estudo foram avaliados clinicamente. Houve redução na profundidade das bolsas e ganho de inserção em todos os grupos tratados, porém nos grupos I, II e III foram observados resultados melhores quando comparados aos do grupo IV. Nas condições deste experimento, o implante de carbonato de cálcio não aumentou os efeitos da técnica da RTG.

No estudo de MOON et al (1996) foi verificado o reparo periodontal após a utilização da membrana de poliglactina associada ao carbonato de cálcio absorvível ou à HA. Defeitos bilaterais nas regiões mesiais do 2º, 3º e 4º pré-molares de sete cães foram confeccionados e tratados com membrana de poliglactina (grupo controle), com membrana de poliglactina associada à HA ou ao CC. As membranas foram adaptadas de acordo com o contorno do defeito e posicionadas apicalmente à junção amelo-cementária. Os retalhos foram

Revisão de literatura

reposicionados e suturados. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 1, 3, 6, 12, 26, 32 e 56 semanas. A análise histológica revelou que a regeneração do cemento iniciou-se na 6ª semana em todos os grupos, enquanto a reparação óssea foi observada a partir da 3ª semana no grupo controle e por volta da 6ª semana nos outros dois grupos. Após a 12ª semana não houve diferença na regeneração periodontal entre os grupos analisados.

O propósito do trabalho de CORRENTE et al. (1997) foi investigar a possibilidade de se tratar rebordos alveolares atróficos empregando um material de preenchimento absorvível (carbonato de cálcio natural) associado ao sistema de selamento de fibronectina-fibrina. 22 implantes de titânio foram colocados no rebordo alveolar em 11 pacientes edêntulos com altura do rebordo inadequada. Depois da instalação dos implantes, os defeitos do tipo deiscência ou supraósseo foram tratados com carbonato de cálcio e o sistema de selamento de fibronectina-fibrina. Além disso, os retalhos foram reposicionados, suturados e evitou-se qualquer compressão sobre a área. Após seis meses foram realizadas avaliações clínica e radiográfica. A maioria dos casos (15 dos 22) exibiu completa cobertura dos implantes por um tecido com aspecto de osso cortical mineralizado. Em 4 casos selecionados ao acaso, uma pequena biópsia da região perimplantar foi realizada, o que confirmou a presença de tecido osteóide e revelou partículas residuais de carbonato de cálcio. Esses resultados indicaram que o carbonato de cálcio associado ao sistema de selamento fibronectina-fibrina foi uma alternativa viável no tratamento desses defeitos ósseos perimplantares.

Revisão de literatura

ARNAUD et al. (1993) avaliaram o potencial osteogênico da mistura de fator transformador do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), cola de fibrina e carbonato de cálcio natural na regeneração dos defeitos confeccionados em calvária de coelhos. Os animais foram submetidos à trepanação dupla nos ossos parietais. No grupo I, nenhuma substância foi injetada nos defeitos, o grupo II recebeu carbonato de cálcio e cola de fibrina, o grupo III recebeu fator transformador do crescimento $\beta 1$, o grupo IV recebeu TGF- $\beta 1$ e cola de fibrina e o grupo V, a mistura de carbonato de cálcio, cola de fibrina e TGF- $\beta 1$. Os defeitos contralaterais de todos os grupos foram deixados sem tratamento. A análise histológica foi realizada nos períodos pós-operatórios de 30 e 60 dias, os resultados sugeriram que a associação do fator de crescimento com a cola de fibrina e com o carbonato de cálcio natural foram considerados um substituto ósseo interessante para ser empregado *in vivo*.

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são uma família de glicoproteínas da matriz óssea que exercem um papel importante na osteogênese durante o período embriológico e na vida pós-fetal. O objetivo do trabalho de GAO et al. (1997) foi determinar os efeitos do implante de carbonato de cálcio contendo BMP xenógena e colágeno tipo IV sobre o reparo ósseo, a resposta imune e suas propriedades mecânicas. Para isso, foram confeccionados defeitos cirúrgicos de 16mm de comprimento em tíbia de carneiros que foram preenchidos com implantes cilíndricos compostos de carbonato de cálcio natural, BMP xenógeno e colágeno do tipo IV ou foram preenchidos com carbonato de cálcio somente, servindo como controle. As tíbias foram estabilizadas através de miniplacas de autocompressão e parafusos corticais. As amostras de sangue e as tomadas radiográficas foram realizadas no dia 0 e na 3ª, 6ª, 12ª, 16ª semanas. Houve aumento no número de anticorpos nos animais

Revisão de literatura

dos grupos testados em relação ao controle, nos períodos entre 3ª e 6ª semanas, mas ele retornou aos níveis normais na 12ª semana. Formou-se osso lamelar estruturalmente normal sem a interposição de tecido conjuntivo entre o implante e o tecido ósseo neoformado, tanto no grupo teste quanto no controle. Os implantes compostos mostraram ter integridade mecânica, serem osseointdutores e osseocondutores, serem fáceis de manipular e, segundo os autores, podem ser indicados para as cirurgias reconstrutivas, embora a antigenicidade da BMP possa ser um fator a ser considerado com cautela.

No estudo de DUPOIRIEUX et al. (1994), três diferentes substitutos ósseos foram comparados. Foi criado um defeito no osso nasal e outro similar no osso frontal, de 6mm de diâmetro, em 30 ratos. No grupo I, o enxerto ósseo desmineralizado utilizado foi esterilizado através de autoclave por 1 hora a 80°C; o grupo II recebeu enxerto esterilizado por gás de óxido de etileno e o grupo III recebeu carbonato de cálcio natural. Os resultados foram avaliados aos dois meses pós-operatórios através dos exames macroscópico, microscópico e radiográfico. Os implantes ósseos desmineralizados esterilizados por óxido de etileno induziram à formação óssea em 90% dos casos, enquanto o tratado pelo calor úmido não mostrou qualquer osteogênese. O carbonato de cálcio foi osseointegrado em 50% dos casos, mas a osseointusão não foi suficiente para ocorrer a reparação completa. Concluiu-se que o enxerto ósseo desmineralizado esterilizado por óxido de etileno foi o substituto ósseo mais favorável neste modelo experimental, atestando que este processo de esterilização preservou a capacidade osteogênica do enxerto.

 O propósito deste trabalho foi avaliar histologicamente e histometricamente a técnica de Regeneração Óssea Guiada (ROG) associada ou não ao enxerto ósseo autógeno e ao implante aloplástico (carbonato de cálcio natural pulverizado), na evolução do reparo de defeitos ósseos bicorticais em calvária de ratas.

Materiais e Métodos

Animais e anestesia

Neste estudo foram utilizadas 60 ratas *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com idade de 6 meses e peso médio de 258 gramas, foram alimentadas com ração comercial sólida e água à vontade. Permaneceram sob um ambiente de temperatura, umidade e luz/escuro controlados. O manuseio dos animais seguiu as normas propostas pelo Comitê de ética da UNICAMP, aprovado sob o nº 094/1.

Como meio de indução da anestesia, foi utilizado ketamina (Francotar®-Virbrac do Brasil Indústria e Comércio Ltda-São Paulo/Brasil) injetado por via intramuscular na dosagem de 1ml/kg por peso vivo e utilizada sedação suplementar com cloridrato de xylazina (Virbraxyl® 2%-Virbrac do Brasil Indústria e Comércio Ltda-São Paulo/Brasil) na posologia de 0,1ml/kg, segundo as normas do fabricante. A seguir, foi realizada tricotomia na região dorsal da calvária, antissepsia com PVPI 10% (Glicolabor®-Indústria Farmacêutica-São Paulo/Brasil) e colocação de campos estéreis.

Procedimento cirúrgico

Após a anestesia, a pele, o tecido subcutâneo e o periósteo foram seccionados e afastados lateralmente através de uma incisão mediana de 15mm na calvária do animal. Depois da exposição dos ossos parietais e localização da sutura sagital mediana, 2 defeitos

Materiais e Métodos

ósseos bicorticais foram produzidos, sendo um do lado direito e o outro do lado esquerdo, sempre preservando o seio sagital médio. Para isso, utilizou-se uma broca Trefina (3i® Implants Innovations, Incorporations-USA) de 4mm de diâmetro (fig.1) montada em contra ângulo de baixa rotação.

Durante confecção das cavidades, houve cuidado para não expor a duramáter, evitando danos ao cérebro. As perfurações foram realizadas sob irrigação constante com solução fisiológica de cloreto de sódio à 0,9% (Glicolabor®-Indústria Farmacêutica-São Paulo/Brasil), evitando aquecimento excessivo do tecido ósseo (fig.2). Após realizar as perfurações, os fragmentos do osso parietal foram removidos com auxílio de um instrumento manual para expor a duramáter (fig.3).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos com 10 ratas cada. Os procedimentos foram como se seguem:

No grupo I (C), os defeitos bicorticais confeccionados não receberam tratamento serviram como controle.

O grupo II (A) foi preenchido por enxerto de osso autógeno.

No grupo III (CC), os defeitos foram preenchidos com carbonato de cálcio natural pulverizado (Drogal®-Laboratório de Manipulação- São Paulo/Brasil).

No grupo IV (M), a membrana de colágeno absorvível, Dentoflex® (Odontec Materiais Odontológicos Ltda- São Paulo/Brasil), posicionadas nas duas corticais ósseas.

O grupo V (MC) recebeu membranas nas duas corticais interpostas ao carbonato de cálcio natural.

Materiais e Métodos

No grupo VI (MA) colocou-se enxerto de osso autógeno e também membranas nas duas corticais.

As membranas foram previamente preparadas baseando-se num modelo confeccionado com uma lâmina de chumbo do filme radiográfico. Tal lâmina sofreu uma marcação de diâmetro de 8mm através de um compasso de ponta seca, posteriormente foi recortada com uma tesoura e esterilizada em estufa a 160°C por 2 horas. A membrana previamente preparada foi então cuidadosamente posicionada no interior do defeito entre a duramáter e a tábua interna da calvária e outra foi colocada na face externa do defeito. Com isso, as membranas se estenderam 2mm além das margens do defeito; tanto na tábua óssea interna quanto na externa.

O enxerto de osso autógeno foi adquirido do fragmento removido durante a confecção dos defeitos bicorticais, o fragmento do lado direito da sutura sagital mediana foi triturado e posicionado no defeito confeccionado no lado esquerdo e vice-versa.

Após o tratamento dos defeitos ósseos, o periósteo foi reposicionado e a pele foi suturada com fio de nylon 4-0 monofilamentado (Ethicon®-Johanson & Johnson Produtos Profissionais Ltda). Durante o período pós-operatório de 4 dias, os animais receberam, para analgesia, dipirona 20mg/kg via gavagem.

Os animais foram sedados (cloridrato de xylazina), anestesiados (ketamina) e depois sacrificados por éter etílico em campânulas hipersaturadas, nos períodos pós-operatórios de 14 e 28 dias, num total de 5 animais por grupo por período de sacrifício. Após a eutanásia, os defeitos criados foram removidos através de ostectomia com broca tronco cônica 701

Materiais e Métodos

montada em baixa rotação sob irrigação com soro fisiológico, e separados na sutura sagital mediana. Os materiais coletados foram fixados em formol a 4% tamponado.

As amostras retiradas sofreram processo de descalcificação em EDTA 5%, com trocas diárias, por um período de 30 dias. Após a descalcificação, as amostras foram divididas ao meio, de forma a fornecer cortes coronais do centro da cavidade óssea cirúrgica. Elas foram então incluídas em parafina (Paraplast®) e cortes semi-seriados de 5µm foram feitos. Algumas lâminas foram coradas pela técnica rotineira de hematoxilina e eosina, para análise em microscopia de luz, e outras foram coradas por Picro-Sirius e observadas em microscopia de luz polarizada, para análise do tecido osteóide.

Análise histológica

Na análise de microscopia de luz foi avaliada a intensidade da reação inflamatória, os eventos da reparação óssea, tais como necrose, hemorragia, atividade osteoclástica e osteoblástica, presença de tecido conjuntivo, maturação óssea, grau de degradação dos biomateriais e revascularização dos enxertos ósseos.

Análise histométrica

Posteriormente, as lâminas foram submetidas à análise histométrica do tecido neoformado através do microscópio de luz na objetiva para aumento de 40 vezes, utilizando o programa para análise de imagens KS 400 (Kontron Elektronik- Alemanha).

Materiais e Métodos

As imagens histológicas do tecido neoformado selecionadas para contagem foram capturadas pelo computador através da câmera de vídeo, sobrepondo-se a elas um retículo de 49 pontos, onde cada ponto correspondia a $0,8 \text{ mm}^3$, com a qual foi feita a determinação da densidade volumétrica do tecido (WEIBEL et al., 1966).

Para se estabelecer o número mínimo de pontos a serem contados em cada animal, utilizou-se a metodologia proposta por GUNDERSEN & JENSEN (1987). Através da relação $B/\sqrt{A}$, sendo B o perímetro e A a área do tecido em estudo e do normograma dado pelos autores, estimou-se o número de pontos que permitiu uma medição com erro menor que 0,05. Após avaliar 60 cortes aleatoriamente escolhidos, verificou-se que 196 pontos por animal, ou seja, 4 áreas testes a serem contados seriam suficientes. As áreas testes foram aplicadas em 2 cortes histológicos por animal. Os valores da densidade volumétrica (V_v) foram expressos em porcentagem, sendo o numerador o volume do osso neoformado (V_o) e o denominador o volume da área teste (V_t), baseou-se na relação $V_v = V_o/V_t$.

Análise estatística

Os valores percentuais foram transformados através da equação $\arcsin \sqrt{\%} + 0,5 \times 180/3,1416$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre as médias, estabelecido a 5% para determinação da significância, para isto utilizou-se o programa computacional SAS (SAS INSTITUTE, 1997).

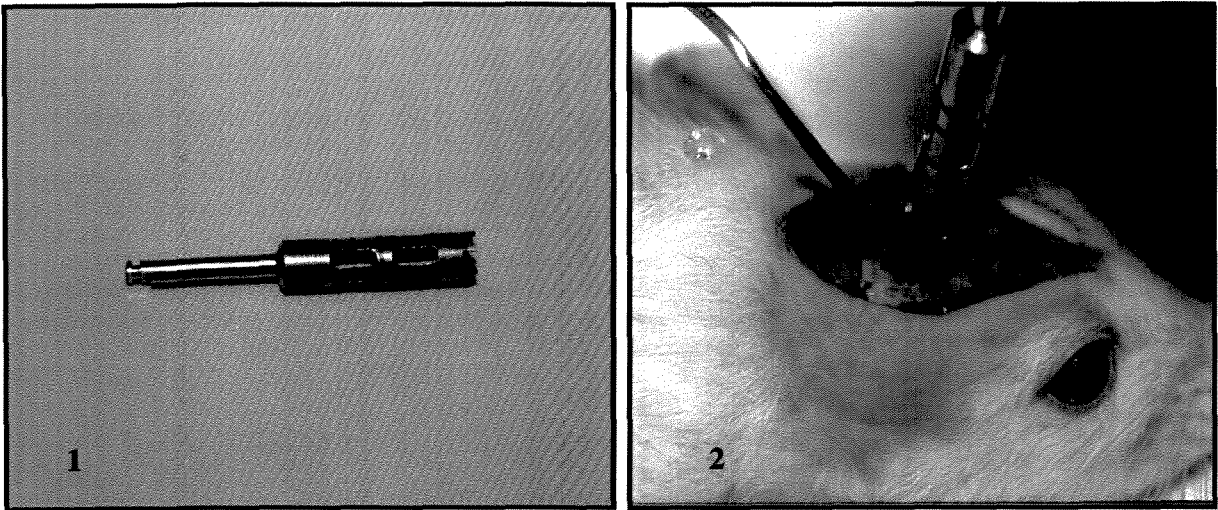


Fig. 1 –Broca Trefina de 4 mm de diâmetro utilizada para confeccionar os defeitos.

Fig. 2 –Confecção dos defeitos bicorticais com refrigeração da broca.

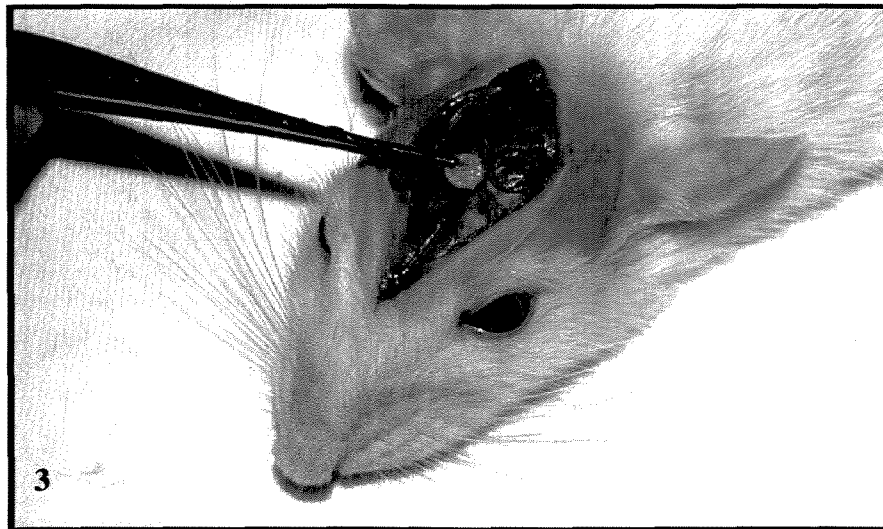


Fig. 3- Defeitos bicorticais de 4mm de diâmetro, confeccionados em calvária de ratas, preservando a sutura sagital mediana.

Resultados

Análise histológica

Período de 14 dias

Grupo I - Controle (C):

Os cortes histológicos exibiram um espessamento periostal na região periférica da cavidade óssea cirúrgica, atividade osteogênica com volume razoável, linha cimentante evidente ao exame histológico apresentou-se um pouco melhor do que o grupo que recebeu as membranas de colágeno nas superfícies interna e externa, presença de osteoblastos sobre o osso neoformado, presença de uma membrana conjuntiva fibrosa sobre todo o defeito com grande número de fibroblastos orientados paralelamente entre si e angiogênese intensa.

Alguns cortes apresentaram hemorragia e presença de poucas células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos.

Grupo II - Osso autógeno (A):

No grupo que recebeu o enxerto ósseo autógeno, aos 14 dias verificou-se linha cimentante evidente, inflamação discreta, hemorragia, neoformação óssea advinda da borda lateral do defeito e proliferação de vasos sanguíneos. Presença de grande número de osteoclastos na superfície de alguns fragmentos enxertados, outros poucos apresentaram

vitalidade pois, estavam sofrendo revascularização e havia tecido osteóide ao seu redor (Fig.3) que foi posteriormente confirmado através da microscopia de luz polarizada (Fig.4).

Grupo III - Carbonato de cálcio (CC):

Este grupo apresentou osteogênese desorganizada e muitas vezes escassa advinda das laterais do defeito e do periósteo, linha cimentante evidente, severa reação inflamatória com grande número de células gigantes de corpo estranho (fig. 5), muitos macrófagos, plasmócitos e neutrófilos. O corte exibia áreas vazias circundadas pelas células inflamatórias multinucleadas, provavelmente ocupadas pelo carbonato de cálcio que foi removido durante o processo de descalcificação (fig. 6). Não se observou áreas hemorrágicas.

Grupo IV - Membranas (M):

Houve a formação de tecido conjuntivo denso sobre toda a extensão do defeito, as membranas colocadas na superfície interna e externa da calota coaptaram-se e conseqüentemente ocorreu pouca osteogênese. O limite entre o defeito cirúrgico e o osso neoformado estava evidente com a formação de um tecido imaturo, bem celularizado e arranjado em calo ósseo. Este grupo apresentou reação inflamatória dentro da malha da membrana de colágeno. Em alguns cortes esteve presente células multinucleadas e hemáceas entre e dentre as membranas.

Grupo V - Membranas e carbonato de cálcio natural pulverizado (MC):

Observou-se pouquíssima osteogênese, linha cimentante evidente, formação de abcesso, presença de grande número de neutrófilos e células gigantes multinucleadas de corpo estranho. Muitas destas células marginando espaços vazios os quais correspondiam aos locais preenchidos pelo material que foi removido pelo processo de descalcificação.

Iniciou-se o mecanismo de absorção das membranas e do carbonato de cálcio. Formou-se também uma cápsula de tecido conjuntivo denso sobre toda a extensão do defeito com alguns fibroblastos aprisionados.

Grupo VI - Membrana e osso autógeno (MA):

Presença de osteogênese advinda das laterais do defeito e não das bordas, provavelmente por causa do trauma durante o início da perfuração através da broca tréfin. Alguns fragmentos estavam sendo incorporados, ou seja, iniciaram o processo de revascularização. Outros estavam sendo reabsorvidos, pois apresentaram muitos osteoclastos em suas superfícies (fig.9).

Houve formação de tecido de granulação na membrana, reação inflamatória com muitos neutrófilos presentes e áreas hemorrágicas.

Período de 28 dias:

Grupo I - Controle (C):

Havia tecido ósseo neoformado nas bordas do defeito em quantidade considerável advinda do perióstio. Algumas vezes este tecido apresentava-se desorganizado, formando um calo ósseo (fig.7).

Presença de uma membrana de tecido conjuntivo excassa em fibras e células e, pouco corada sobre toda a extensão do defeito.

Neste período notou-se poucas células inflamatórias.

Grupo II - Osso autógeno (A):

Muitos fragmentos em reabsorção, com muitas células multinucleadas em contato com os fragmentos enxertados e presença de células inflamatórias circundando-os. Alguns fragmentos apresentaram angiogênese no seu interior.

Presença de capilares entre o tecido conjuntivo. Osteogênese, em alguns animais, foi intensa preenchendo grande parte do defeito.

Grupo III -Carbonato de cálcio natural pulverizado (CC):

Aparentemente quase todo carbonato de cálcio parecia ter sido reabsorvido. Presença de muitas células inflamatórias de corpo estranho com espaços vazios em seu interior,

Resultados

representando a fagocitose das partículas de carbonato de cálcio que ainda permaneceram no tecido.

A osteogênese a partir do periósteo variou de imperceptível até o completo preenchimento do defeito. Quando houve osteogênese intensa o tecido estava bem organizado e com crescimento linear, provavelmente foi uma tentativa de isolar o carbonato de cálcio dos tecidos vitais (Fig.11). Isto atestou um comportamento irregular deste material.

Grupo V - Membranas e carbonato de cálcio natural pulverizado (MC):

Grande parte do carbonato de cálcio estava reabsorvido, as partículas presentes foram fagocitadas pelas células gigantes multinucleadas de corpo estranho. Pode-se visualizar neutrófilos e células degeneradas, formação de abscesso, em alguns casos notou-se a presença de fistula e em outros muito tecido de granulação. Foi verificada pouca atividade osteogênica nos bordos do defeito, formando um calo ósseo. As membranas já estavam sendo reabsorvidas (fig.12).

Grupo VI - Membranas e osso autógeno (MA):

Os fragmentos ósseos enxertados apresentaram maior revascularização quando comparado ao período de 14 dias mas, alguns fragmentos estavam sendo marginados por

Resultados

muitos osteoclastos e outros envoltos por tecido conjuntivo. Outros fragmentos enxertados exibiram tecido osteóide a partir de suas extremidades, apresentando ao seu redor muitos osteoblastos.

Os cortes histológicos mostraram leve reação inflamatória e todas as extremidades do defeito com formação óssea regular e bem celularizado (fig.10).



Fig. 3- Grupo osso autógeno, 14 dias. O-Osteóide; OP-Osso Pré-existente; E-enxerto. HE. Aumento de 160X.



Fig.4- Idem figura 3 analisada em microscopia de polarização. Picro-Sirius.160X

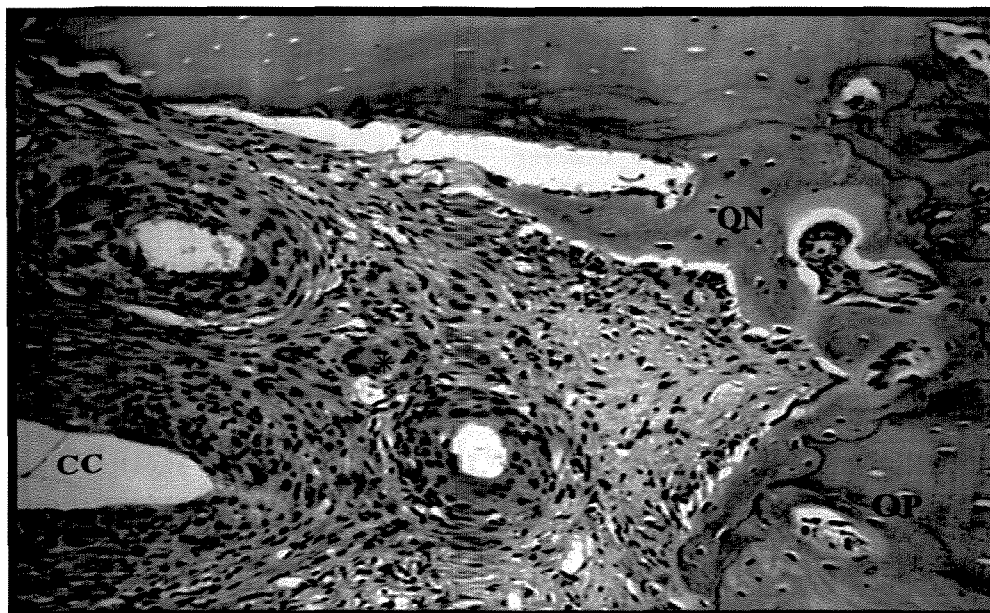


Fig.5-Grupo Carbonato de cálcio, 14 dias. ON-osso neoformado; OP-osso pré-existente; * célula gigante de corpo estranho; CC carbonato de cálcio. HE. Aumento de 160X.

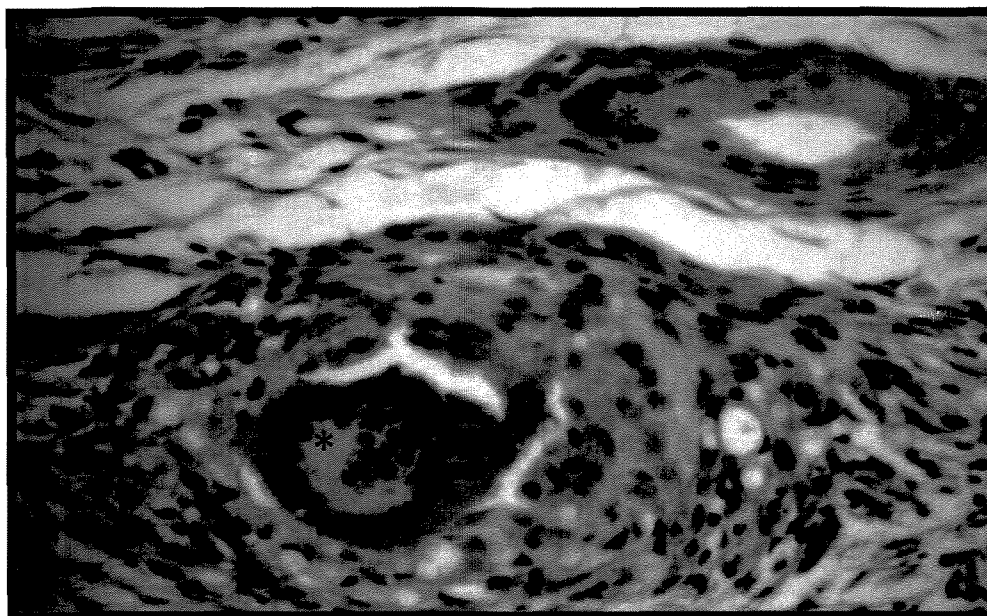


Fig.6- Carbonato de cálcio com reação inflamatória de corpo estranho no período de 14 dias. Células gigantes multinucleadas de corpo estranho(*). HE. Aumento de 800X.

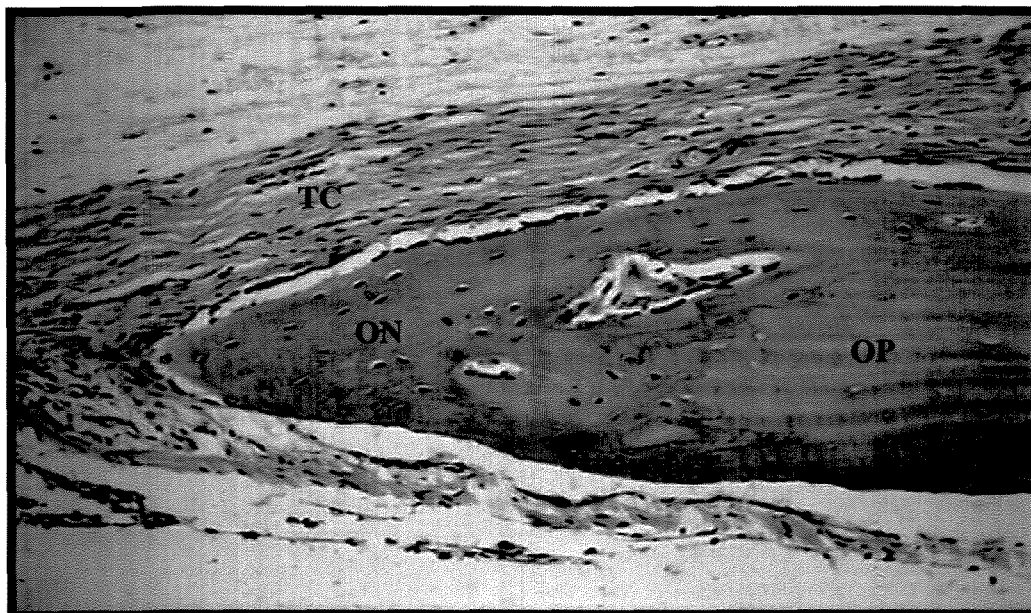


Fig. 7- Grupo controle, período de 28 dias. TC tecido conjuntivo; ON osso neoformado; OP osso pré-existente. HE. Aumento de 160X.

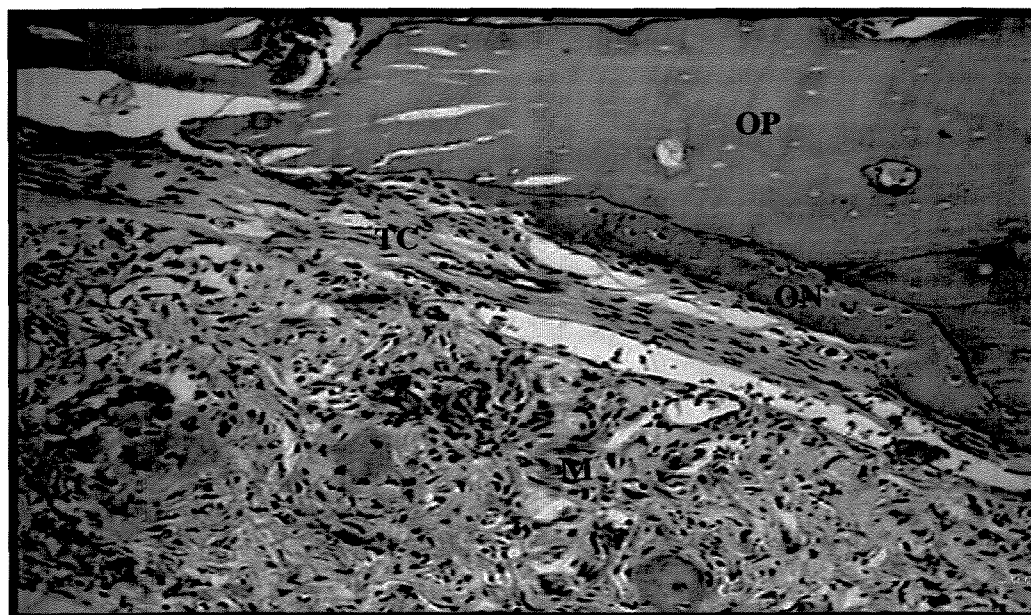


Fig.8 - Membranas, aos 28 dias. ON-osso neoformado;OP-osso pré-existente; TC-tecido conjuntivo; M-membrana. HE. Aumento de 160X.

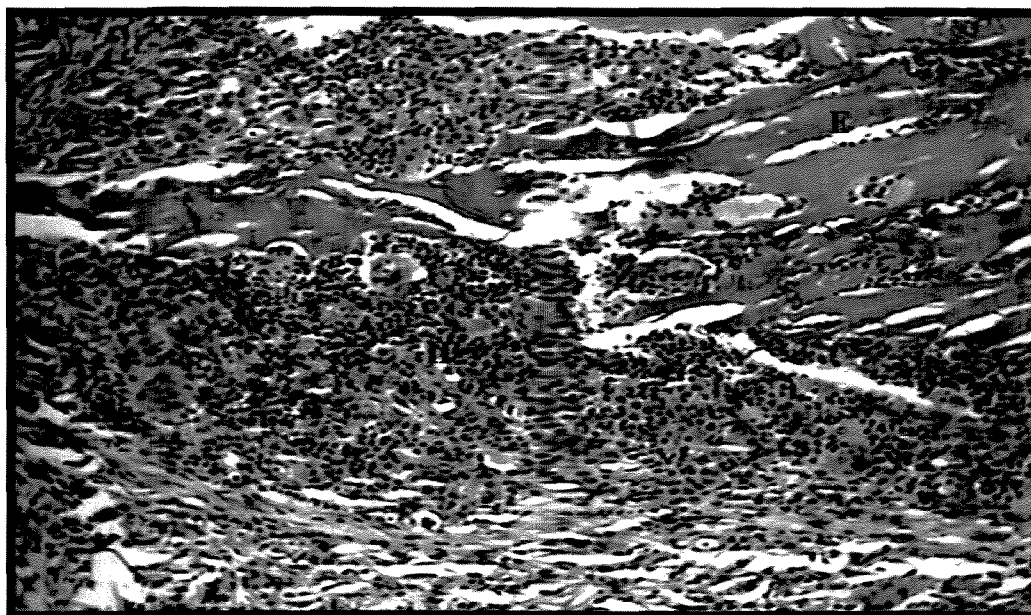


Fig. 9 - Grupo Membranas e osso autógeno, 14 dias. II- Infiltrado inflamatório; E- enxerto de osso autógeno. HE. Aumento de 160X.

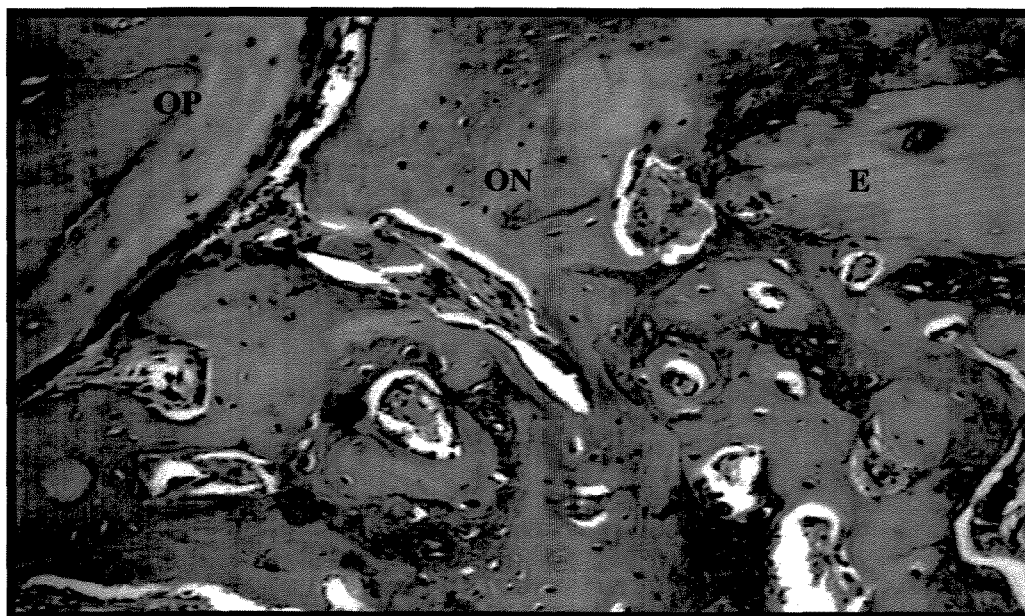


Fig.10 - Grupo membranas e osso autógeno, período de 28 dias; ON-Osso Neoformado; OP-Osso Pré-existente; E- Enxerto de Osso Autógeno. HE Aumento de 320X.

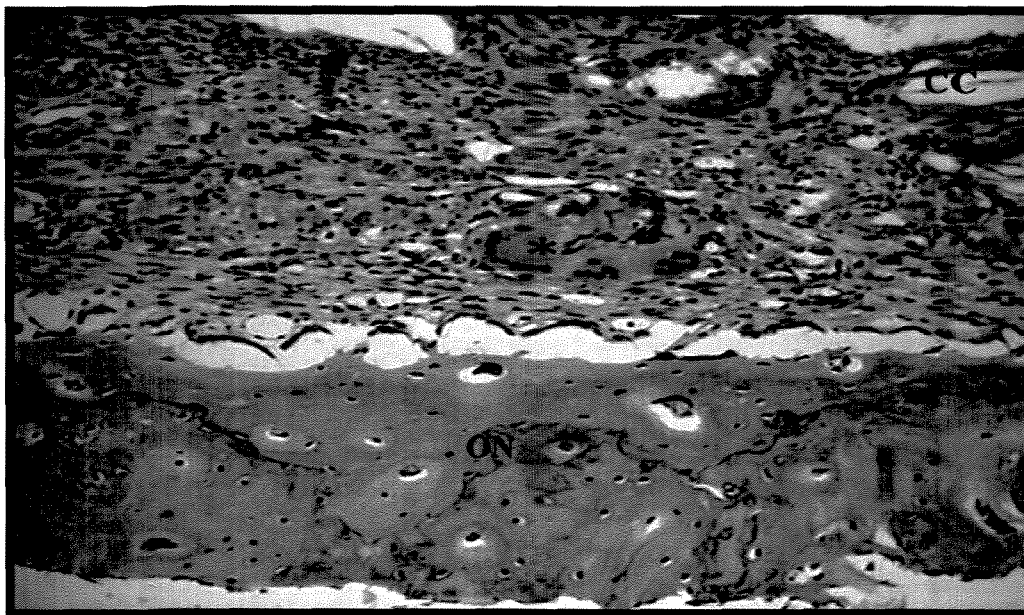


Fig.11 - Grupo Carbonato de cálcio, aos 28 dias. ON-osso neoformado; * célula gigante de corpo estranho; CC-carbonato de cálcio. HE. Aumento de 160X.

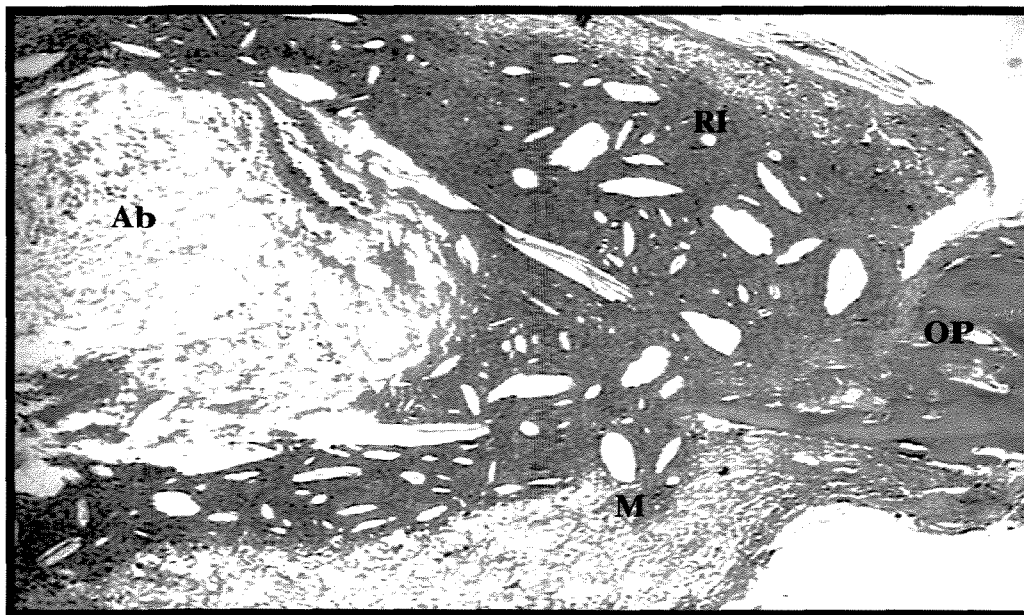


Fig.12 - Membrana e carbonato de cálcio no período de 28 dias, M-membrana, Ab-abcesso, RI-reação inflamatória, OP-osso pré-existente. HE. Aumento de 160X.

Resultados

Análise estatística dos dados histométricos:

*D*e acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, observou-se que todas as fontes de variação foram significativas; os diferentes tratamentos aplicados influenciaram no processo de neoformação óssea. E houve interação significativa entre as fontes de variação período x tratamento, ou seja, a neoformação óssea aumentou com o tempo em todos os grupos analisados.

Tabela 1. Análise de variância para os resultados dos tratamentos nos dois períodos de sacrifício.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	2329,58	265,92	3,08*
Períodos	1	2579,19	2579,19	29,86**
Períodos x tratamentos	5	1829,85	365,97	4,29**
Resíduo	48	4146,68	86,39	

*, **Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade respectivamente, pelo teste F

CV=19,46% Média=47,76 $R^2=0,5805$

FV= fonte de variação; GL= graus de liberdade; SQ= soma de quadrado; QM= quadrado médio; CV= coeficiente de variação, R^2 =coeficiente de determinação do modelo matemático adotado.

Resultados

Estes dados podem ser comprovados através da Tabela 2, em que as médias dos dois períodos de tratamento apresentaram diferenças entre si, atestando que houve maior volume de tecido ósseo neoformado no período de 28 dias, em todos os tratamentos aplicados.

Tabela 2. Médias de tecido ósseo neoformado nos períodos de 14 e 28 dias.

Períodos	Média
Período 1 (14 dias)	41,20 B
Período 2 (28 dias)	54,32 A

Médias seguidas por mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Ao analisarmos a Tabela 3, pode-se afirmar que houve diferença entre o grupo tratado com membrana associada ao enxerto de osso autógeno (MA) e o grupo que recebeu apenas membrana de colágeno (M) nas duas corticais ósseas; isto significa dizer que a neoformação óssea foi mais significativa no grupo (MA), enquanto o (M) apresentou os resultados menos promissores em relação ao volume de tecido ósseo formado. Nos demais grupos autógeno (A), carbonato de cálcio (CC), controle (C) e membrana e carbonato (MC) não se observou diferenças estatísticas. A análise descritiva tornou-se mais fidedigna com a comprovação numérica pois, a técnica de quantificação histométrica está de acordo com os achados histológicos.

Tabela 3. Médias de tecido ósseo neoformado nos defeitos tratados com diferentes biomateriais.

Tratamentos	Média
MA	55,17 A
A	51,41 AB
CC	48,06 AB
C	47,64 AB
MC	43,06 AB
M	41,26 B

Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.



perda óssea é uma preocupação do cirurgião-dentista, assim como a formação de tecido fibroso onde deveria existir tecido ósseo, limitando em muitos casos clínicos a perfeita adaptação de próteses futuras, podendo restringir a função estomatognática do paciente e comprometendo a sua recuperação funcional e estética (RESTREPO et al., 1998). Na tentativa de reconstrução total ou parcial destas estruturas perdidas, técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de recuperar o contorno anatômico original, restaurar sua função, eliminar os espaços mortos, favorecer a cicatrização, prevenir a invasão dos tecidos moles para o interior destas cavidades e reduzir a possibilidade de infecção secundária (MULLIKEN & GLOWACKI, 1980). Evidências histológicas da habilidade de aumentar a reparação óssea é uma pré condição para a aplicação de substâncias osseopromotoras em situações clínicas (BOSCH et al., 1998).

Experimentos realizados em animais têm sido importantes para testar materiais porém, cuidados para extrapolar os resultados aos humanos devem ser tomados pois, o modelo experimental apresenta maiores habilidades regenerativas do que os humanos (GUILLEMIN et al., 1989). Segundo BOSCH et al. (1998), um modelo animal empregado para testar materiais para regeneração óssea deve ser barato, de fácil disponibilidade, fácil manuseio, fácil anestesia, o implante deve ser incluído tanto em osso cortical quanto esponjoso, o defeito ósseo deve ser estável para não permitir mobilidade, o risco de fratura deve ser minimizado, deve permitir preservação acurada e assegurar a regeneração óssea radiograficamente e histologicamente. A calvária de ratos tem sido utilizada como um modelo experimental para a regeneração óssea pois, é relativamente inerte e apresenta

Discussão

características similares aos ossos maxilares como ossificação membranosa e a mesma origem embrilógica. A calvária é um local fácil de receber o enxerto e os tecidos moles podem ser suturados de modo que a ferida cirúrgica fique totalmente protegida, o que diminui o risco de exposição da membrana ou a contaminação (Mc GINNIS et al, 1998). Por estas razões, neste trabalho, o modelo experimental utilizado foi a calvária de ratas, com defeito ósseo de 4mm de diâmetro. O tamanho crítico do defeito ósseo varia de acordo a espécie animal, idade, tamanho e local (BOSCH et al, 1998). Em calvária de ratos este tamanho varia de 8mm (KLEINSCHMIDT, 1990) à 2mm de diâmetro (MULLIKEN & GLOWACKI, 1980). Refere-se à tamanho crítico quando, ao longo de toda a vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito com tecido ósseo neoformado. O que ocorre nos defeitos ósseos críticos que não são tratados adequadamente com materiais ósseos substitutivos é a formação de um tecido conjuntivo cicatricial ao invés de ocorrer a osteogênese. A utilização de defeito crítico nos modelos experimentais para testar materiais de substituição óssea é muito importante pois, qualquer neoformação óssea que ocorra nesta área pode ser atribuída ao material que foi utilizado para o preenchimento (HOLLINGER et al.,1991).

O enxerto ósseo é denominado autógeno quando o doador e o receptor são o mesmo indivíduo, ou seja, é removido do próprio paciente. Neste experimento, o grupo que recebeu o enxerto ósseo autógeno (A), aos 14 dias, verificou-se linha cimentante evidente, inflamação discreta, hemorragia, neoformação óssea advinda da borda lateral do defeito e proliferação de vasos sanguíneos. Presença de grande número de osteoclastos na superfície de alguns fragmentos enxertados, outros poucos apresentaram vitalidade pois, estavam

Discussão

sofrendo revascularização e havia tecido osteóide ao seu redor. Segundo GOLDBERG & STEVENSON (1987), o osso autógeno esponjoso é o melhor tipo de enxerto que existe pois, causa pouca inflamação, sofre revascularização mais rápida, apresenta maior potencial de osseoindução, osseocondução e há uma remodelação em menor espaço de tempo. Conseqüentemente, tem sido a melhor alternativa para as cirurgias faciais reconstrutivas, ortognáticas e implantes osseointegrados (GARCIA,1999). O osso esponjoso tem maior chance de permanecer viável pois, seus osteócitos estariam mais próximos de uma fonte de irrigação (JORGE, 1999). A arquitetura do tecido ósseo pode ser responsável por diferenças na revascularização dos enxertos, ocasionando distintos comportamentos durante sua incorporação; foi demonstrado que o osso cortical, por possuir estrutura mais compacta sofre revascularização tardia e em menor grau que o osso esponjoso (SULLIVAN & SWAJKUN, 1991). Para HOLMES (1979) há duas possíveis razões que justifiquem a substituição incompleta do enxerto autógeno por tecido neoformado: a reabsorção parcial e variável dos ósteons no enxerto, criando um espaço limitado para osteogênese e a reabsorção adequada dos ósteons mas, uma limitada capacidade de regeneração óssea do próprio organismo.

A grande desvantagem do enxerto autógeno é a cirurgia adicional na área doadora do paciente com a possibilidade de causar morbidade e desconforto e, a fonte limitada de osso em quantidade e qualidade (JORGE, 1999). Muitas vezes há a necessidade de hospitalização, intervenção em outra área do organismo, maior período de convalescença, suscetibilidade a infecções e ainda possibilidade de reabsorção progressiva e constante do enxerto (BUCHARDT, 1983).

Discussão

No grupo que recebeu as membranas de colágeno associadas ao enxerto de osso autógeno (MA), alguns fragmentos estavam iniciando o processo de revascularização nos dois períodos de sacrifício. No período pós-operatório de 28 dias havia a presença de osteóide ao redor dos fragmentos ósseos enxertados e alguns apresentavam-se revascularizados. Outros estavam sendo reabsorvidos, apresentando muitos osteoclastos em suas superfícies.

Os osteoclastos são células multinucleadas e fagocíticas que reabsorvem a matriz calcificada (KERR, 2000). As citocinas e os fatores de crescimento, especialmente o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) liberados durante a digestão da matriz, podem agir como uma alça de retroalimentação e induzir a formação e ativação de osteoblastos para sintetizar e depositar uma quantidade equivalente de osso novo no local (ROSENBERG, 1996).

Estamos de acordo com achados de DAHLIN et al. (1991) onde a adição de membranas na superfície interna e externa associadas ao enxerto de osso autógeno resultou em regeneração significativa do defeito cirúrgico, no período de três semanas. A função primária dos fragmentos enxertados pareceu ser a manutenção do espaço, preservando a distância entre as duas membranas e possivelmente o enxerto ósseo esponjoso teria fornecido células osseoprogenitoras e/ou fatores de crescimento para que ocorresse o reparo ósseo.

Observamos ainda neste grupo, aos 28 dias, fragmentos enxertados que exibiram tecido osteóide a partir de suas extremidades, apresentando ao seu redor muitos osteoblastos. Os osteoblastos sintetizam, transportam e distribuem as muitas proteínas da

matriz (ROSENBERG, 1996) regulam a maneira pela qual o osteóide se mineraliza, liberando vesículas da matriz e atuam como locais para centros de nucleação, encorajando a mineralização das fibrilas colágenas (KERR, 2000).

Na tentativa de limitar o uso do enxerto ósseo autógeno, vários materiais estão sendo utilizados como substitutivos ósseos: a hidroxiapatita, o fosfato tricálcio, o vidro bioativo e o carbonato de cálcio (GUILLEMIN et al., 1989). A busca de características ideais de um material de implante osseoindutor é um objetivo constante nas pesquisas das terapias de reparação óssea. A biocompatibilidade, a estocagem sem a perda da viabilidade, a facilidade de obtenção do material, a relação custo-benefício e, principalmente, o potencial osseoindutor, têm sido parâmetros para os variados estudos sobre os substitutos ósseos (GONÇALVES, 1997).

Neste estudo, o grupo do carbonato de cálcio, período de 14 dias, apresentou osteogênese desorganizada e muitas vezes escassa advinda das laterais do defeito e do periósteo, linha cimentante evidente, severa reação inflamatória com grande número de células gigantes multinucleadas de corpo estranho e invasão de muitos macrófagos, plasmócitos e neutrófilos semelhante aos resultados de VUOLA et al. (1996). Contrastando com os achados de YUKNA (1994) que observou uma reação inflamatória mínima e sem a formação de necrose quando empregou o carbonato de cálcio em defeitos periodontais infraósseos. HOLMES (1979) em seu estudo também não observou qualquer reação inflamatória ou células gigantes de corpo estranho quando utilizou este material; resultado que o levou a classificá-lo como biocompatível.

Discussão

Neste mesmo grupo, aos 28 dias, observamos a presença de células inflamatórias de corpo estranho envolvendo o carbonato de cálcio, representado no corte histológico por espaços vazios, as partículas do material foram provavelmente removidas durante o processo de descalcificação. Observamos osteoblastos sobre o tecido ósseo do hospedeiro semelhantes a descrições de estudos anteriores que asseguram que o carbonato de cálcio tem propriedades osteocondutoras por isso, ao mesmo tempo em que há aposição óssea ocorre uma reabsorção progressiva do material por numerosos osteoclastos (NAAMAN BOU-ABBOUD et al., 1993).

FRAICAN et al. (1996) observaram que a reabsorção do carbonato de cálcio ocorreu tanto nos locais em contato com o tecido ósseo quanto nos locais extra-esqueléticos mas, os fatores que governam este fenômeno ainda não são totalmente conhecidos. A degradação é potencialmente dependente de dois fatores biológicos: ação de células fagocitárias e a dissolução de seus subprodutos por fluidos intersticiais. Segundo alguns autores (VUOLA et al., 1996; GUILLEMIN et al., 1989; KESSEL, 1998), o principal fator deste processo é a enzima anidrase carbônica II presente nos osteoclastos, responsável pela degradação de componentes inorgânicos. A reabsorção do material após a neoformação óssea é desejável; após o substituto ósseo atuar como um arcabouço para a osteogênese ele deve sofrer remodelação. O carbonato de cálcio possui esta propriedade porém, a sua taxa de reabsorção é imprevisível podendo ocorrer rapidamente, em meses ou durar até anos quando em contato com o tecido ósseo (VUOLA et al., 1998).

Com o carbonato de cálcio a osteogênese variou de imperceptível até o completo preenchimento do defeito. Em um animal houve osteogênese intensa, aos 28 dias, o tecido

estava bem organizado e com crescimento linear, provavelmente foi uma tentativa de isolar o carbonato de cálcio dos tecidos vitais, atestando um comportamento irregular deste material sobre a osteogênese, neste nosso experimento.

Quando associamos o carbonato de cálcio natural pulverizado com as membranas de colágeno absorvível encontramos pouquíssima osteogênese, presença de grande número de neutrófilos e células gigantes multinucleadas de corpo estranho e formação de abscesso, nos 2 períodos de sacrifício. Este fenômeno também foi encontrado nos trabalhos de VUOLA et al. (1996) que em alguns casos detectaram a presença de reação inflamatória de corpo estranho com formação de granulomas. PIATELLI et al. (1993) observaram que após a implantação de partículas de HA em defeitos infra-ósseos não houve degradação da HA que estava em contato com o tecido ósseo, somente a que estava em contato com os tecidos moles. Isto pode ter ocorrido por causa da pequena quantidade de fluido intersticial presente no tecido mineralizado contrastando com a abundante circulação de fluidos através do tecido conjuntivo (VUOLA et al., 1998) e impedindo assim, a osteogênese (LINDHE et al., 1993) o que poderia explicar porque em nosso trabalho houve a formação de abscesso nestes grupos pois, além da excassa quantidade de fluidos advinda do tecido ósseo houve também a ação seletiva das membranas de colágeno que poderia ter dificultado a troca de nutrientes entre os tecidos e a proliferação vascular no interior do defeito resultando na formação de abscesso e em alguns casos formou-se também fistula.

Os resultados que obtivemos com o carbonato de cálcio, nos 2 períodos de sacrifício, principalmente quando associado às membranas de colágeno, foram desapontadores. Resultados similares foram encontrados por DUPOIRIEUX et al. (1994) que observaram

limitada regeneração óssea com aproximadamente 60% de incorporação do material. KIM et al. (1996) evidenciaram que o carbonato de cálcio não melhorou os efeitos da RTG nos defeitos infraósseos em humanos.

GUILLEMIN et al. (1989) não encontraram os mesmos resultados quando utilizaram o carbonato de cálcio em espécies diferentes de animais, indicando que a taxa de reabsorção e aposição óssea observada nos modelos experimentais não podem ser totalmente extrapolados aos tecidos mineralizados de humanos sem o conhecimento acurado dos parâmetros que governam a atividade celular nas diferentes espécies, especialmente quando estão em contato com material calcáreo estranho.

Estamos de acordo com YUKNA (1994) que afirma que o tamanho e a forma das partículas do carbonato de cálcio quando pulverizados são adequados para manipulação durante os procedimentos operatórios, possuem boas propriedades hemostáticas e permanecem nos defeitos como um complexo carbonato de cálcio/coágulo sangüíneo estável.

O colágeno é provavelmente o material mais adequado para compor a membrana absorvível pois, é o componente mais importante da proteína estrutural do corpo humano (ÜNSAL et al., 1999), é encontrado no tecido conjuntivo, incluindo, pele, osso, ligamentos e cartilagem (MENDIETA & WILLIAMS, 1994) e exerce um papel ativo na formação do coágulo (PARODI et al., 1996).

Como o trabalho de O'BRIEN et al de 1995, onde a retenção da membrana contou com o estabelecimento de ligações entre o colágeno da membrana ao coágulo sangüíneo através da fibrina, neste experimento as membranas também não foram suturadas.

Discussão

As membranas colocadas na superfície interna e externa da calota, sem a interposição de um substituto ósseo, coaptaram-se e conseqüentemente ocorreu pouca osteogênese estando de acordo com os achados de BUSER et al. (1990) que não observaram aumento na espessura do rebordo alveolar quando as membranas foram pressionadas pelos tecidos moles adjacentes contactando-se com o tecido ósseo, atestando claramente a importância da manutenção do espaço adequado para que ocorra a regeneração.

Neste experimento a membrana de colágeno foi identificada histologicamente, nas amostras analisadas nos dois períodos de sacrifício porém, menos evidente aos 28 dias. Segundo SALLUM em 1996, o processo de reabsorção pode, em parte, ser responsável pela falta de resposta do tecido ósseo, o colágeno é degradado enzimaticamente, reação que requer uma resposta tecidual ativa. A composição química das membranas absorvíveis determina sua desintegração, resposta inflamatória e longevidade (LINDE et al., 1993).

O grupo das membranas, do nosso experimento, apresentou infiltrado inflamatório discreto dentro da malha da membrana de colágeno, em alguns cortes estiveram presentes células multinucleadas e hemáceas entre e dentre as membranas estando de acordo com achados de MITCHELL (1992) e COLANGELO et al. (1993) que não evidenciaram a presença de reação inflamatória severa ou extensa quando utilizaram membranas de colágeno em seus respectivos estudos. MOONEY et al. (1996), concluíram que as membranas de colágeno associadas à fixação interna rígida nas osteotomias realizadas no arco zigomático, em coelhos, foram bem toleradas pelos tecidos durante as 4 semanas pós-operatórias observadas. Contrastando com os achados de QUTEISH et al., (1991) que investigaram o potencial da resposta imune celular e humoral, após a implantação de

enxerto de colágeno do tipo I placentar humano e bovino irradiado e não irradiado, na região subcutânea de coxa de ratos. Os autores concluíram que a implantação dos enxertos de colágeno irradiados e não irradiados conduziram a um aumento significativo no nível de anticorpos circulantes e havia também uma elevada resposta linfoblastogênica tanto para o colágeno bovino quanto para o colágeno humano. No trabalho de LIM et al. (2000), a membrana de colágeno mostrou um grande poder de indução da inflamação e recrutamento de macrófagos, ocasionando aumento de fibronectina que por sua vez conduz ao aumento de fibroblastos, sugerindo que parte da regeneração óssea foi suprimida pela absorção da membrana. ÜNSAL et al., (1999) também confirmaram que as membranas de colágeno facilitam a adesão de fibroblastos gengivais humanos.

Não observamos muitos osteoblastos entre as malhas de colágeno como no trabalho de SCHOR (1980) que atesta que o colágeno pode induzir a proliferação de diferentes tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais em vários locais implantados. A utilização do colágeno na ROG facilita a regeneração óssea através de uma série de mecanismos, incluindo: a quimiotaxia, a habilidade de guiar a migração e a adesão de células osteogênicas no local da ferida, as quais repousam sobre as fibrilas colágenas antes que ocorra a mineralização (LOWENBERG et al., 1985), a malha fibrilar atua como um arcabouço para migração e colonização de células regenerativas e, a habilidade de permitir a difusão de nutrientes e fluidos, diminui a probabilidade de necrose e infecção (BLUMENTHAL, 1988).

No grupo controle (C), onde nenhum material foi colocado, os cortes histológicos exibiram um espessamento periosteal na região periférica da cavidade óssea cirúrgica,

Discussão

atividade osteogênica, linha cimentante evidente, presença de osteoblastos sobre o osso neoformado, uma membrana conjuntiva fibrosa sobre o defeito com grande número de fibroblastos orientados paralelamente entre si. Resultados semelhantes aos encontrados nos trabalhos de LOPES em 1999, que mencionou no grupo controle a formação de tecido ósseo imaturo, com espaços intertrabeculares amplos e morfologia irregular, associado à grande quantidade de tecido conjuntivo e linha cimentante bem evidente no período pós-operatório de 8 semanas.

Neste trabalho a análise histológica mostrou que a osteogênese foi mais organizada e regular nos grupos tratados com enxerto de osso autógeno no período pós-operatório de 14 dias e aos 28 dias este tipo de enxerto interposto às membranas de colágeno. E que os resultados menos promissores foram observados no grupo das membranas, nos dois períodos de sacrifício. Esta análise subjetiva é importante porém, não nos fornece dados necessários para uma comparação quantitativa entre os grupos tratados. Optou-se, por fazer a análise histométrica que permitiu quantificar o tecido ósseo neoformado no interior da loja cirúrgica, desta forma os resultados histológicos puderam ser considerados mais fidedignos com a comprovação numérica.

O tecido neoformado foi medido através da objetiva com aumento de 40X, onde o limite entre o osteóide e o osso pré-existente foi facilmente identificado. As imagens histológicas do tecido neoformado selecionadas foram capturadas pelo computador através da câmera de vídeo, sobrepondo-se a elas um retículo de 49 pontos, denominado de área teste, este retículo recaía quase totalmente sobre o defeito cirúrgico confeccionado,

aumentando a fidelidade do método. E, de acordo com GUNDERSEN & JENSEN (1987), foram medidas apenas 2 áreas consecutivas num mesmo corte.

Através dos valores obtidos realizou-se a análise de variância para os tratamentos nos dois períodos de sacrifício e foi observado que houve interação significativa entre as fontes de variação períodos x tratamentos, ou seja, a neoformação óssea aumentou com o intervalo de tempo, em todos os grupos tratados (Tabelas 1 e 2). Pode-se afirmar também que houve diferença entre o grupo tratado com membrana associada ao enxerto de osso autógeno (MA) e o grupo que recebeu apenas membrana de colágeno (M) nas duas corticais ósseas; isto significa dizer que a neoformação óssea foi mais significativa no grupo MA, enquanto o M apresentou os resultados menos animadores em relação ao volume de tecido ósseo formado. Nos demais grupos osso autógeno, carbonato de cálcio, controle e membranas associadas ao carbonato de cálcio (A, CC, C e MC, respectivamente) não houve diferenças estatísticas. A análise descritiva tornou-se mais confiável com a comprovação numérica pois, a técnica de quantificação histométrica está de acordo com os achados histológicos (Tabela 3); exceto em relação ao melhor material aos 14 dias de sacrifício, onde observamos quantidades significativas de tecido osteóide ao redor dos fragmentos ósseos enxertados. A presença deste tecido representa um estágio anterior à fase de mineralização do tecido ósseo (KESSEL, 1998) e nesta fase o tecido não pôde ser mensurado pela análise histométrica mas, foi confirmado através da microscopia de luz polarizada.

As pesquisas sobre os materiais aloplásticos implantares são de extrema importância, constituindo-se seu emprego em mais um recurso a ser aplicado principalmente na clínica cirúrgica especializada; o osso autógeno é o melhor tipo de enxerto a ser utilizado, a

Discussão

conclusão parece ser óbvia, apesar do desgaste a que deva ser submetido este paciente para a remoção do osso, além do alto custo da cirurgia, o que torna o processo restrito a determinadas classes sociais (RESTREPO et al.,1998). Este é o principal fator em que se baseia o estudo destes materiais, para encontrarmos um substituto ósseo que seja biocompatível, osseoindutor e de custo bastante acessível.

Conclusão:

*N*as condições experimentais deste trabalho e baseando-se nos resultados obtidos, concluímos que:

- 1- O enxerto ósseo autógeno apesar de todas as dificuldades na sua obtenção ainda é o melhor tipo de substitutivo ósseo existente. Associado às barreiras físicas.

*Referências bibliográficas**

- 1- ARNAUD, E.; MORIEUX, C.; WYBIER, M.; VERNEJOUL, M.C. Potentiation of transforming growth factor (TGF 1) by natural coral and fibrin in rabbit cranioplasty model. **Calcif Tissue Int**, **54**(6): 493-8, 1993.
- 2- BAJPAI, P.K. Biodegradable scaffolds in orthopedics, oral and maxillo-facial surgery. In: RUBIN, L.R. (Ed.) **Biomaterials in reconstructive surgery**. Saint Louis, Mosby, 1983. p.312-28. *Apud* GUILLEMIN, G. et al. *Op. cit.* Ref.28.
- 3- BLUMNETHAL, N.M. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachments in dogs. **J Periodontol**, **59**(12): 830-6, 1988.
- 4- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the Critical-Size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**, **9**(4): 310-6, 1998.
- 5- BUCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin Orthop**, **174**: 28-42, 1983.
- 6- BUSER, D.; BRÄGGER, U.; LANG, N.P.; NYMAN, S. Regeneration and enlargement of jaw bone using tissue regeneration. **Clin Oral Implant Res**, **19**(1): 22-32, 1990.
- 7- BUSSCHOP, J. & DE BOEVER, J. Clinical and histological characteristics of lyophilized allogenic dura mater in periodontal bony defects in humans. **J Clin Periodontol**, **10**(4): 431-42, 1983.

* De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o "Medline".

*Referências bibliográficas**

- 8- CANCIAN, D.C.J. et al. Avaliação de membranas de colágeno com diferentes períodos de cross-linkage. Estudo histológico em subcutâneo do rato. **Rev Odontol UNESP**, **21**: 181-90, 1992.
- 9- CHUNG, K.M.; SALKIN, L.M.; STEIN, M.D.; FREEDMAN, A.L. Clinical evaluation of biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. **J Periodontol**, **61**(12): 732-6, 1990.
- 10- COLANGELO, P. et al. Bone Regeneration Guided by resorbable collagen membranes in rabbits: a pilot study. **Implant Dent**, **2**(-):101-5, 1993.
- 11- CORMACK, D.H. Osso. In: HAM, A.W. **Ham histology**. 9.ed. Rio de Janeiro, Lippincott, 1991. Cap12, p.216-54.
- 12- CORRENTE, G. et al. Supracrestal bone regeneration around dental implants using a calcium carbonate and a fibrin-fibronectin sealing system: clinical and histologic evidence. **Int J Periodontics Restorative Dent**, **17**(2):171-81, 1997.
- 13- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Crescimento celular e diferenciação . Regulação normal e adaptações. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. **Patologia estrutural e funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. Cap.2, p.31.
- 14- DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J Neurosurg**, **74**(3): 487-91, 1991.
- 15- DAMIEN, C.J. et al. Formation of calcium phosphate-rich layer on absorbable calcium carbonate bone graft substitutes. **Calcif Tissue Int**, **55**(2): 151-8, 1994.

*Referências bibliográficas**

- 16- DOWELL, P.; MORAN, J.; QUTEISH, D. Guided Tissue Regeneration. **Br Dent J**, **171**(5): 125-7, 1991.
- 17- DUPOIRIEUX, L.; COSTES, V.; JAMMET, P.; SOUYRIS, F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. **Int J Oral Maxillofac Surg**, **23**(6 pt 2): 395-8, 1994.
- 18- FLEISHER, N.; DE WALL, H.; BLOOM, A. Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (polylactin 910). **Int J Periodontics Restorative Dent**, **8**: 45-55, 1988.
- 19- FRAICAN, C.H. et al. Influence of the structure of three corals on their resorption kinetics. **J Periodont Res**, **31**(7): 463-9, 1996.
- 20- GAO, T.J. et al. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. **Int Orthop**, **21**(3): 194-200, 1997.
- 21- GARCIA, R.R. **Comparação de matrizes ósseas desmineralizadas sobre o processo de reparação óssea. Estudo histológico em calvária de coelhos.** Piracicaba, 1999. 118p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 22- GARRET, S.; LOOS, B.; CHAMBERLAIN, D.; EGELBERG, J. Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric acid conditioning bone grafting and placement collagenous membrane. **J Clin Periodontol**, **15**(6): 383-9, 1988.

Referências bibliográficas*

- 23- GOISSIS, G. et al. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaldehyde cross-linking. **Biomaterials**, **20**(1): 27-34, 1999.
- 24- GOLDBERG, V.M. & STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop**, **225**: 7, 1987. *Apud* GARCIA, R.R. *Op. cit.* Ref.21.
- 25- GOMES, M.F. **Comparação de matrizes dentinárias homólogas sobre o processo de regeneração tecidual guiada em coelhos**. Bauru, 1998. 143p. [Tese (Doutorado em Patologia Buco-dental) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo].
- 26- GONÇALVES, E.A.L. **Estudo do processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos implantados com matriz dentinária desmineralizada autógena no osso radio de cães**. Bauru, 1997. 141p. [Dissertação (Mestrado em Patologia Buco-dental) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo].
- 27- GOTTLOW, J.; NYMAN, S.; KARRING, T.; LINDHE, J. New attachment formation as result of controlled tissue regeneration. **J Clin Periodontol**, **11**(8): 494-503, 1984.
- 28- GUILLEMIN, G. et al. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. **J Biomed Mater Res**, **23**(7): 765-79, 1989.
- 29- GUNDERSEN, H.J.G. & JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc**, **147**(3): 229-63, 1987.
- 30- HOLLINGER, J.O.; MARK, D.E.; GOCO, P. A comparison of four particulate bone derivatives. **Clin Orthop Relat Res**, **267**: 255-63, 1991.

*Referências bibliográficas**

- 31- HOLMES, R.E. Bone regeneration within a coralline hydroxiapatite implant. **Plast Reonstrutive Surg**, 63(5): 626-33, 1979.
- 32- HÜRZELER, M.B. et al. Evaluation of new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regenration around exposed implant threads. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 27(4): 315-20, 1998.
- 33- HYDER, P.R.; DOWELL, P.; SINGH, G.; DOLBY, A.E. Freezed-dried, Cross-Linked bovine type I collagen: Analysis of properties. **J Periodontol**, 63(7): 182-6, 1992.
- 34- ISSAHAKIAN, S. & OUHAYON, J.P. Evaluation clinique et histologique d'un nouveau matériau de comblement: le corail naturel. **J Paradontol**, 8(3): 251-9, 1989.
- 35- JENSEN, S.S. et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 11(1): 55-66, 1996.
- 36- JORGE, R.S. **Enxerto autógeno de osso ilíaco em defeito de tamanho crítico na mandíbula de rato**. Piracicaba, 1999. 102p. [Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 37- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **HISTOLOGIA básica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. Cap. 8, p.111.
- 38- KERR, J.B. Tecidos Esqueléticos. In: **ATLAS de histologia funcional**. 1.ed. São Paulo, Artes Médicas, 2000. Cap.9, p.165.

*Referências bibliográficas**

- 39- KESSEL, R.G. Connective Tissue: Bone and Bone formation. In: **Basic Medical Histology**. 1.ed. New York, Oxford University Press, 1998. Cap.7, p.138-152.
- 40- KIM, C.K. et al. Periodontal repair in infrabony defects treated with a calcium carbonate implant and Guided Tissue Regeneration. **J Periodontol**, **67**(12): 1301-6, 1996.
- 41- KLEINSCHMIDT, J.C. The critical size defects as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, **1**(1): 60-8, 1990.
- 42- LANE, J.M. & SANDHU, H.S. Current approaches to experimental bone grafting. **Orthop Clin North Am**, **18**(2): 213-25, 1987.
- 43- LIM, S.C.; LEE, M.J.; YEO, H.H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol Int**, **50**(8): 594-602, 2000.
- 44- LINDE, A. et al. Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**, **64**(11): 1116-28, 1993.
- 45- LOPES, M.C.A. **Avaliação da efetividade das membranas de colágeno e de celulose no tratamento de defeitos ósseos tipo fenestração associados a implantes dentais. Análise histológica, histométrica e biomecânica em cães**. Piracicaba, 1999. 141p. [Dissertação (Doutorado) em Clínica Odontológica Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 46- LOWENBERG, B.F.; AUBIN, J.E.; DEPORTER, D.A.; MELCHER, A.H. Attachment, migration and orientation of human fibroblasts to collagen-coated, surface-demineralized, and untreated roots slices. **J Dent Res**, **64**(7): 1106-10, 1985.

*Referências bibliográficas**

- 47- LUNDGREN, D. et al. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. **J Cranio-Maxillo-Facial Surg**, 20(6): 257-260, 1992.
- 48- MCGINNIS, M.; LARSEN, P.; MILOR, O.M.; BECKER, F.M. Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: A preliminary Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 13(1): 30-5, 1998.
- 49- MELCHER, A.H. & DREYER, C.J. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. **J Bone Joint Surg Br**, 44(2): 424-30, 1962.
- 50- MENDIETA, C. & WILLIAMS, R.C. Periodontal regeneration with bioresorbable membranes. **Current Opinion in Periodontology**, : 157-67, 1994.
- 51- MILLER, N. et al. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in rabbit model. **J Clin Periodontol**, 23(12): 1051-9, 1996.
- 52- MITCHELL, R. An evaluation of bone healing in cavities in jaws implanted with a collagen matrix. **British J.OralMaxillofac Surg**, 30(-):180-2,1992.
- 53- MINABE, M. A critical review for the biologic rationale for guided tissue regeneration. **J Periodontol**, 62(3): 171-9, 1991.
- 54- MOHD, H. et al. GCF levels of MMP-3 and MMP-8 following placement of bioresorbable membranes. **J Clin Periodontol**, 26(10): 757-63, 1999.

*Referências bibliográficas**

- 55- MOON, I.S. et al. Effects of polyglactin mesh combined with resorbable calcium carbonate or replainineform hydroxyapatite on periodontal repair in dogs. **J Clin Periodontol**, 23(10): 945-51, 1996.
- 56- MOONEY, M.P. et al. The effects of Guided Tissue Regeneration and fixation technique on osseous wound healing in rabbit zygomatic arch ostetomies. **J Craniofac Surg**, 7(1): 46-52, 1996.
- 57- MORA, F. & OUHAYOUN, J.P. Clinical evaluation of natural coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions: results of a 1-year follow up. **J Clin Periodontol**, 22(11): 877-84, 1995.
- 58- MULLIKEN, J.B. & GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. **Plast Reconstructive Surg**, 65: 553-60, 1980. *Apud* BOSCH, C. et al.. *Op. cit.* Ref.4.
- 59- MUNDELL, R.D.; MOONEY, M.P.; SIEGEL, M.I.; LOSKEN, A. Osseous guidedede tissue regeneration using a collagen barrier membrane. **J Oral Maxillofac Surg**, 51(9): 1004-12, 1993.
- 60- MURRAY, G.; HOLDEN, R.; ROSCHLAU, W. Experimental and Clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg**, 93(3): 385-7, 1957.
- 61- NAAMAN BOU-ABBOUD, N. et al. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniture pigs using undecalcified sections. **Biomaterials**, 15(3): 201-7, 1993.
- 62- NYMAN, S. Bone regeneration using the principle of Guided Tissue Regeneration. **J Clin Periodontol**, 18(5): 494-8, 1991.

Referências bibliográficas*

- 63- NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, 9(4): 290-6, 1982.
- 64- O'BRIEN, W.D. et al. Guidede tissue regeneration using a biodegradable barrier membrane for new attachment: A clinical, histologic, and histometric study in dogs. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 15(5): 447-61, 1995.
- 65- PARODI, R.; SANTARELLI, G.; CARUSI, G. Application of slow-resorbing collagen membrane to periodontal and peri-implant guided tissue regeneration. **Int J Periodontics Restorative Dent**, 16(2): 175-85, 1996.
- 66- PIATELLI, A. et al. Light and laser scanning microscioic analysis of hydroxyapatite used in periodontal osseous defects in man: evidence of a different resorption pattern in bone and soft tissues. **Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol**, 26: 115-20, 1993. *Apud* FRICAIN, C.H. et al. *Op. cit.* Ref.19.
- 67- PITARU, S.; SOLDINGER, M.; AZAR-AVIDAM, O.; NOFF, M. Collagen membrane prevents the migration of ephitelium during periodontal wound healing. **J Periodont Res**, 22(4): 331-3, 1987.
- 68- PITARU, S.; TAL, H.; SOLDINGER, M.; NOFF, M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective attachment during periodontal wound healing in dogs. **J Periodontal Res**, 24(4): 247-53, 1989.
- 69- QUTEISH, D.; SINGRAO, S.; DOLBY, A.E. Light and electron microscopic evaluation of biocompatibility, resorption and penetration characteristics of collagen graft material. **J Clin Periodontol**, 18(5): 305-11, 1991.

*Referências bibliográficas**

- 70- RESTREPO, L.L. et al. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado “Osseobond®” e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. Estudo microscópico em tibia de Ratos (*Wistar albinus*). **Rev Bras Implantod**, 4(1): 8-14, 1998.
- 71- ROSENBERG, A.E. Sistema esquelético e tumores de partes moles. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. **Patologia estrutural e funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. Cap.27. p.1095.
- 72- SALLUM, E.A. **Avaliação histométrica da regeneração periodontal obtida com o uso de membranas reabsorvíveis de ácido polilático em defeitos periodontais em cães**. Piracicaba, 1996. 130p. [Dissertação (Mestrado em Clínica odontológica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
- 73- SAS INSTITUTE. Changes and enhances through realese 6. 12. **SAS/STAT SOFTWARE**: Cary: Statitital analysis System Institute, 1997.1116p.
- 74- SCHLEGEL, A.K.; MÖHLER, H.; BUSCH, F.; MEHL, A, Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). **Biomaterials**, 18(7): 535-8, 1997.
- 75- SCHOR, S.L. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. **J Cell Sci**, 41: 159-75, 1980.
- 76- SISKEN, B.F.; WALKER, J.; ORGEL, M. Prospectes on clinical applications of electrical stimulation for nerve regeneration. **J Cell Biochem**, 52: 404-9, 1993.

*Referências bibliográficas**

- 77- SULLIVAN, W.G. & SWAJKUN, P.R. Revascularization of cranial versus iliac bone grafts in the rat. **Plast Reconstrutive Surg**, **87**(6): 1105-9, 1991. *Apud* JORGE, R.S. *Op. cit.* Ref.36.
- 78- ÜNSAL, B. et al. Evaluation of initial attachment of human gingival fibroblast cells to biodegradable membranes *in vitro* by light and scanning electron microscopy. **J Oral Sci**, **41**(2): 57-60, 1999.
- 79- VAN SWOL, R.L. et al. N:Collagen membrane barrier therapy to guidedede regeneration in class II furcation in humans. **J Periodontol**, **64**(7): 622-9, 1993.
- 80- VUOLA, J.; GÖRANSSON, H.; BÖHLING, T.; ASKO-SELJAVAARA, S. Bone formation marrow induced osteogenesis in hidroxyapatite and calcium carbonate implants. **Biomaterials**, **17**(18): 1761-6, 1996.
- 81- VUOLA, J.; TAURIO, R.; GÖRANSSON, H.; ASKO-SELJAVAARA, S. Compressive strenght of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis. **Biomaterials**, **19**(1-3): 223-7, 1998.
- 82- WEIBEL, E.R.; KISTLER, R.S; SCHERLE, W.F. Pratical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol**, **30**: 23-8, 1966.
- 83- YUKNA, R. Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseus defects. **J Peridontol**, **65**(2): 177-85, 1994.

Referências bibliográficas*

- 84- YUKNA, R.A. Clinical human comparison of expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane and freeze-dried dura mater allografts for guided tissue regeneration of lost periodontal support: I mandibular molar class II furcations. **J Periodontol**, **63**(5): 431-42, 1992.
- 85- ZITZMANN, N.U.; NAEF, R.; SCHÄRER, P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int J Oral Maxillofac Implants**, **12**(6): 844-52, 1997.