

Luciana Asprino

Cirurgiã-Dentista

**COMPARAÇÃO ENTRE SUBSTITUTOS ÓSSEOS DE ORIGEM
BOVINA SOBRE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA EM DEFEITOS PERIMPLANTARES.
ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA EM TÍBIA DE CÃES.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, na Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

PIRACICABA

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Luciana Asprino

Cirurgiã-Dentista

**COMPARAÇÃO ENTRE SUBSTITUTOS ÓSSEOS DE ORIGEM
BOVINA SOBRE O PROCESSO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA
GUIADA EM DEFEITOS PERIMPLANTARES.
ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA EM TÍBIA DE CÃES.**

2. ~~Exemplar~~ foi devidamente corrigido,
2. ~~Exemplar~~ com a Recuperação CPG-036/83
CPG. 14: 04/2003
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, na Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria-Barbosa.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria-Barbosa
Prof. Dr. José Tadeu Tesseroli Siqueira
Prof. Dr. Luis Augusto Passeri

PIRACICABA

2003

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	As68c
V	EX
TOMBO BC/	59300
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/06/03
Nº CPD	

CM00185460-5

BIB ID 293058

Ficha Catalográfica

As68c

Asprino, Luciana.

Comparação entre substitutos ósseos de origem bovina sobre o processo de regeneração óssea guiada em defeitos perimplantares. Análise histológica e histométrica em tibia de cães. / Luciana Asprino. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xiii, 87f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria-Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Implantes dentários. 2. Ossos – Enxerto. 3. Ossos – Defeitos. 4. Ossos – Regeneração. I. Albergaria-Barbosa, José Ricardo de. 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 06 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata LUCIANA ASPRINO aprovada.

1. Prof. Dr. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

2. Prof. Dr. JOSÉ TADEU TESSEROLI SIQUEIRA

3. Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PASSERI

200320684

DEDICATÓRIA

*A Alberto,
meu maior e melhor amigo,
meu único e grande amor,
dedico este trabalho,
que é mais um fruto do seu
incentivo e apoio.*

*A Mônica,
minha mãe,
exemplo de força e amor,
exemplo de fé e caráter,
que me conduziram a
felicidade desta conquista.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A Deus,
pela presença constante em
minha vida e por tudo que me
foi concedido.*

*Ao meu pai, Luiz Carlos
(in memorian), em cuja
memória busco inspiração.*

*Ao meu irmão, Luiz Fernando
(in memorian), pelo
companheirismo, cumplicidade
e proteção imprescindíveis na
minha infância e adolescência,
inesquecíveis por toda vida.*

*Aos meus irmãos,
Patrícia e Pedro,
e minhas sobrinhas Milena e
Lila pelo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela estrutura física e científica oferecidas para realização desta etapa da minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria-Barbosa, Livre Docente da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela orientação deste trabalho e pela amizade cultivada neste período.

Ao Prof. Dr. Luis Augusto Passeri, Livre Docente e responsável pela Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, por nos ensinar a honrar e respeitar a nossa especialidade, pela dedicação a nossa formação, pela amizade, atenção e zelo ao meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Renato Mazzonetto, Livre Docente da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos, e colaboração na qualificação deste trabalho. Pela amizade e maneira construtiva de nos fazer as críticas necessárias.

Ao Prof. Dr. Márcio de Moraes, Livre Docente da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos, colaboração na qualificação deste trabalho. E sobretudo pela amizade e maneira paciente e atenciosa de nos transmitir seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira, Assistente Doutor da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pelos ensinamentos, incentivo e pela maneira acolhedora que me recebeu na minha primeira visita a esta Faculdade e no meu ingresso neste curso.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, coordenadora geral dos Cursos de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo A. Gomes, coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

À Área de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes e Prof. Dr. José Merzel pela disponibilidade da estrutura e equipamentos necessários.

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, Assistente Doutor da Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela excelente contribuição na qualificação deste trabalho.

Às Sras. Ivani Odas Demétrio e Maria Aparecida Santiago Varella, técnicas do laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio no preparo e processamento histológico das peças deste estudo.

Ao Sr. Wanderlei Francisco Vieira, técnico em bioterismo da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pelos cuidados dispensados aos animais e pela ajuda e atenção disponibilizadas sempre que solicitadas, de maneira tão cordial.

Aos colegas e amigos do Curso de Pós-graduação: Adriano, Aleysson, Rubens, Sandra, Wagner, André Luis, Botelho, Gustavo, Julio, Petrus e Rodrygo,

pelos conhecimentos compartilhados, companheirismo e amizade, que amenizaram os momentos difíceis e a distância da minha família.

As funcionárias Sueli Cristina Scarassatti Teixeira da Cruz e Edilaine Cristina Mendes Felipe, e a estagiária Daiana Tonin pela paciência, carinho e ajuda no atendimento aos pacientes.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, pela minha formação profissional, em especial àqueles que me ensinaram a dar os primeiros passos na vida acadêmica: Profa. Graça Alonso, Profa Dra. Gisela Rapp, Prof. Dr. Roberto Azevedo e principalmente ao Prof. Onaldo Aguiar mestre e amigo, que muito me ensinou.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, que foram meus colegas de disciplina e com paciência atenderam às minhas dúvidas de principiante.

Ao Prof. Carlos Elias de Freitas pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança e amizade e sobretudo pelo incentivo a minha formação profissional.

À Baumer, na pessoa do Dr. Roberto Parpaiolli, pela atenção e pelos biomateriais cedidos para realização deste estudo.

Ao INP – Sistemas de Implantes Nacionais e de Próteses Comércio Ltda., na pessoa do Dr. José Tadeu Tesseroli Siqueira, pela atenção disponibilizada e implantes cedidos para realização deste trabalho.

Ao engenheiro agrônomo Marcelo Correia Alves pela ajuda no processamento dos dados para análise estatística deste trabalho.

Aos meus padrinhos, Jorge e Norma Gonçalves, aos meus tios e primos, cujo amor e carinho sempre me confortaram.

Aos amigos Celso Cabo, Carla Lopes, Carlos e Nájila Gomes, Ana Carolina Fragoso Motta, Maria Isabel Soares, Aurea Abensur, Thelma Batinga, pela sinceridade dos sentimentos que nos unem a tantos anos.

Aos novos amigos de Piracicaba, Alessandra Gomes, Érica Freire, Fabrício Serra e Silva, Grace Mendonça, Graziela Denardin, Juliana Bittar e Samira Souza.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste trabalho meu muito obrigada.

*“Pedi e se vos dará;
buscai e achareis;
batei à porta e se vos abrirá;
pois todo aquele que pede
recebe, e quem procura acha,
e se abrirá àquele
que bater à porta.”*

Mateus, 7:7 a 11

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1- INTRODUÇÃO	3
2- REVISÃO DA LITERATURA	7
3- PROPOSIÇÃO	25
4- MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1- MATERIAL	26
4.1.1- IMPLANTES UTILIZADOS	26
4.1.2- MEMBRANA E SUBSTITUTOS ÓSSEOS UTILIZADOS	27
4.2- METODOLOGIA	28
4.2.1- ANIMAIS E ANESTESIA	28
4.2.2- PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	29
4.2.3- SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO HISTOLÓGICO	37
4.2.4- ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
4.2.5- ANÁLISE HISTOMÉTRICA	41
4.2.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5- RESULTADOS	47
5.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
5.1.1- PERÍODO DE 21 DIAS PÓS-OPERATÓRIO	47
5.1.2- PERÍODO DE 42 DIAS PÓS-OPERATÓRIO	55
5.2- ANÁLISE HISTOMÉTRICA	61
6- DISCUSSÃO	68
7- CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	84

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através de análise histológica e histométrica a interferência da matriz óssea bovina desmineralizada e da proteína óssea morfogenética no processo de regeneração óssea guiada em defeitos perimplantares. Para isso foram instalados três implantes em cada tibia de quatro cães, sendo que dois cães foram sacrificados no 21º, e dois no 42º dias pós-operatório. Foi confeccionado um defeito perimplantar a cada implante, que foram preenchidos e recobertos com membrana de colágeno. No grupo controle o defeito foi preenchido com osso autógeno particulado, no grupo MOB com matriz óssea bovina e no grupo BMP com um “pool” de BMPs adsorvido à hidroxiapatita. A análise histológica mostrou neoformação óssea preenchendo totalmente os defeitos perimplantares no período pós-operatório de 21 dias, com maior maturação óssea no período pós-operatório de 42 dias, nos três grupos estudados. Os dados histométricos revelaram que a média de neoformação óssea no período de 42 dias foi significativamente superior a média de neoformação óssea no período de 21 dias. Entre os grupos houve maior neoformação óssea para o Grupo BMP, nos dois períodos. Porém só houve diferença estatística significativa em relação ao Grupo MOB no período pós-operatório de 21 dias. Diante da metodologia empregada, a BMP induziu maior neoformação óssea do que os outros grupos e que a BMP e MOB empregadas comprovaram sua efetividade como substitutos ósseos.

UNITERMOS: Regeneração óssea guiada, materiais de preenchimento ósseo, defeitos perimplantares de fenestração.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate histologically and histometrically the effect of a bovine demineralized bone matrix and bone morphogenetic protein on guided bone regeneration process in bone fenestration defects associated with dental implants. Therefore, three titanium implants were placed in each tibia of four dogs and the defects were filled with autogenous bone, bovine demineralized bone matrix (BBM) and a “pool” of bone morphogenetic protein bound to hidroxyapatite. All defects were protected with collagen membranes. After the periods of three and six weeks the animals were sacrificed. The histological results showed bone neoformation filling totally the defects at three weeks, and greatest bone maturation at six weeks in all groups. The histometric results revealed better scores of bone deposition at six weeks with estatistical difference at three weeks, in all samples. Among the groups, BMP group was the one that showed the best results, in both periods. However, there was only estatistical difference to the MOB group at the period of three weeks. Within the limits of the present study, the BMP provided better scores of bone deposition, and that the BMP and BBM can be used like bone substitutes.

UNITERMS: Bone guided regeneration, bone grafting materials, fenestration defects.

1. INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegrados representaram, um grande avanço na reabilitação bucal. A odontologia moderna empenha-se em restituir a função, conforto, estética, e saúde dos pacientes. Desta forma, os implantes dentais revolucionaram os planejamentos restauradores.

Originalmente, os implantes dentais osseointegrados foram desenvolvidos como tratamento alternativo dos pacientes desdentados totais. Principalmente em: 1) indivíduos que não apresentavam suporte ósseo suficiente para colocação de uma prótese total convencional; 2) não aceitavam a substituição dos dentes naturais por próteses convencionais; ou 3) aqueles que apresentavam distúrbios funcionais com a utilização destas próteses, por exemplo náuseas (BRÄNEMARK *et al.*, 1977; ADELL *et al.*, 1981).

Atualmente, o aumento do uso de tratamentos associados a implantes resultam do efeito combinado de diversos fatores, incluindo envelhecimento da população e perda dentária associada à idade, conseqüências anatômicas do edêntulismo, desempenho insatisfatório das próteses removíveis, aspectos psicológicos da perda dental, resultados previsíveis a longo prazo e vantagens das próteses implantossuportadas (MISCH, 2000).

Contudo, um pré-requisito para o uso de implantes é a quantidade de osso suficiente para cobri-lo totalmente e para permitir que suporte uma restauração protética fixa. Um processo alveolar estreito ou com concavidade por vestibular pode resultar na exposição de roscas na crista alveolar ou fenestração óssea (DAHLIN, 1996).

A capacidade de controlar ou influenciar o crescimento ósseo tornou-se mais previsível nos últimos anos. Os materiais de aumento do volume ósseo podem ser incorporados, a fim de estimular o crescimento ósseo em áreas onde ele foi perdido. Eles podem ser classificados de acordo com seu modo de ação em osteogênicos, osteocondutores ou osteoindutores.

A osteogênese que é a síntese de novo osso por células do enxerto, refere-se ao crescimento ósseo derivado de células viáveis, transferidas dentro do enxerto (MISCH, 2000).

A osteocondução é a oferta de um arcabouço ou estrutura, aumentando a base para deposição óssea. Portanto, os materiais osteocondutores devem ser bioinertes ou bioativos, e de forma e dimensões que favoreçam o crescimento tecidual e deposição óssea. Idealmente, o material deve ser substituído por osso na fase de remodelagem do tecido ósseo (SCHENK, 1994).

A osteoindução envolve a formação de osso novo a partir das células osteoprogenitoras, derivadas das células mesenquimais primitivas, sob a influência de um ou mais agentes indutores que emanam da matriz óssea. Neste processo as células mesenquimais do hospedeiro são recrutadas e diferenciadas em osteoblastos (GLOWACKI & MULLIKEN, 1985; COVEY & ALBRIGHT, 1989).

A busca de um material para enxerto, que reduza ou elimine um sítio doador tem conduzido a avanços na área de biomateriais e tornado vários substitutos ósseos populares. Entre eles os enxertos alógenos, xenógenos e implantes aloplásticos, que têm sido usados isoladamente ou associados a enxerto autógeno, nas pesquisas de regeneração óssea.

A regeneração é comumente compreendida como reposição de componentes perdidos no organismo por elementos iguais ao tecido de origem e altamente organizados. A regeneração ocorre quando os tecidos são perdidos devido a lesão ou doença. O osso tem um potencial único para restaurar sua estrutura original e suas propriedades mecânicas (SCHENK, 1996). Desta forma devemos empregar regeneração ou reparo ósseo, e não cicatrização óssea.

No entanto a capacidade de reparo ósseo tem suas limitações se enfrentar condições como falhas de vascularização, instabilidade mecânica e competição com tecidos de alta atividade proliferativa.

Na implantodontia a necessidade de controlar a regeneração óssea se faz presente nos casos em que são criados defeitos ósseos perimplantares tipo deiscência ou fenestração ou ainda na instalação de implantes imediatos. Nestes casos têm-se aplicado a técnica de regeneração óssea guiada (R.O.G.) (SPAGNOLI *et al.*, 2001).

A técnica de R.O.G refere-se a aplicação de uma membrana como proteção contra a invasão de tecidos competidores não osteogênicos. Com esta finalidade os defeitos são cobertos por uma barreira de membrana de permeabilidade definida e compatibilidade tecidual excelente (SCHENK, 1996).

O tratamento dos defeitos perimplantares têm sido descrito na literatura pela associação de R.O.G. e o uso de preenchimento por enxerto autógeno e/ou substitutos ósseos, associados ou isoladamente. (DAHLIN *et al.*, 1995; MASSIMO *et al.*, 1997).

Desta forma associando-se R.O.G ao preenchimento dos defeitos ósseos favorece-se a regeneração óssea pela oferta de um arcabouço para deposição óssea (osteocondução); osteoindução, quando o material de preenchimento for osteoindutor; e pela imposição de barreira a tecidos competidores, como o tecido conjuntivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nos dias atuais implantes dentais são sinônimo de osseointegração. O conceito de osseointegração e sua aplicação clínica tem impulsionado positivamente a odontologia e revolucionado a habilidade de reconstruir a dentição e o complexo crânio-facial (TRIPLETT *et al.*, 2000).

Entre as vantagens das próteses implantossuportadas podemos citar a manutenção do osso alveolar em altura e largura (ZARB & SCHMITT, 1996), melhora da saúde psicológica, aumento da estabilidade e retenção protética, aumento do índice de sucesso da prótese e tempo de sua duração e maior conforto do paciente em relação à redução de flanges e/ou palato da prótese.

BRÅNEMARK *et al.* (1969) foram os primeiros a sugerir a possibilidade de uma ancoragem direta do osso ao metal e denominaram este fenômeno de osseointegração. ALBREKTSSON *et al.* (1981) redefiniram o termo osseointegração como conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vital e o implante, sob microscopia óptica, sobre ação de carga funcional.

A interface implante/tecido, que é definida como uma zona de interação entre esses dois materiais é uma região extremamente dinâmica, modificando completamente de caráter enquanto parte de sua gênese, inserção

do implante no local ósseo preparado, até a finalização do reparo (MISCH, 2000). As pesquisas mostram que se o implante está estável no osso no momento da inserção, é mais provável que a interface resulte em osseointegração (BRUNSKI, 1979; PILLIAR *et al.*, 1986).

Uma quantidade óssea é pré-requisito essencial para o sucesso a longo prazo de implantes endósseos. A instalação de implantes em sítios em que o volume ósseo é igual ou menor do que o tamanho do implante resulta em parte da superfície do implante descoberta por osso, gerando a possibilidade de haver irritação dos tecidos moles perimplantares, diminuição do contato ósseo e aumentando o potencial de falha na osseointegração (TAWIL *et al.*, 2001).

A descoberta de um material substituto ósseo ideal para enxerto tem sido o objetivo de pesquisadores por muitos anos, com variados graus de sucesso. Vários substitutos ósseos têm sido frequentemente usados com o objetivo de aumentar o rebordo alveolar e reconstruir defeitos ósseos (RUHAIMI, 2001).

Materiais para enxertos ósseos podem agir por três diferentes mecanismos: Osteogênese, osteoindução e osteocondução. Além de se enquadrarem em três classificações: enxertos autógenos, alógenos e implantes aloplásticos. Nos últimos anos têm-se introduzido vários substitutos ósseos, estes

materiais podem modificar a estrutura óssea do paciente previamente à instalação dos implantes ou tratar complicações perimplantares (MISCH & DIETSH, 1993).

Os enxertos autógenos possuem capacidade osteogênica osteoindutiva e osteocondutiva, sendo o material mais previsível. Contudo, buscando evitar um procedimento cirúrgico adicional, criação de um sítio doador, e reduzir dor pós-operatória e o tempo cirúrgico, têm-se aumentado o uso de materiais alternativos para enxertos ósseos (AL RUHAIMI, 2001).

O princípio da regeneração tecidual guiada (R.T.G.) foi inicialmente proposto visando a regeneração periodontal. Este princípio baseia-se na capacidade dos diferentes tecidos periodontais em promover a regeneração, e foi estabelecido ao longo de uma série de estudos que visaram avaliar a participação destes tecidos no processo de cura (KARRING *et al.*, 1980; NYMAN *et al.*, 1980). Sua base racional surgiu dos postulados de MELCHER (1976), o qual estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal.

A R.O.G. foi desenvolvida seguindo os princípios da R.T.G., com o objetivo de promover formação óssea em defeitos anteriores ou associado a instalação de implantes endósseos. Os defeitos ósseos consistem principalmente em sítios de exodontias, deiscências ou fenestrações, e deformidades alveolares localizadas. A aplicação da técnica de R.O.G. consiste na interposição de uma

barreira entre o tecido conjuntivo gengival e o osso, visando prevenir o crescimento de células não osteogênicas, derivadas do tecido conjuntivo, permitindo o crescimento de células angiogênicas e osteogênicas, vindas do espaço medular, possibilitando a regeneração do defeito ósseo (MELLONIG & NEVINS, 1995).

LINDE *et al.* (1993) realizaram defeitos em calvária de ratos e aplicaram a técnica de R.O.G., testando membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) e membranas reabsorvíveis de ácido polilático/poliglicólico (PLA/PGA), quanto a capacidade de promover neoformação óssea. A análise histológica mostrou uma quantidade variável de formação de novo osso sobre a superfície da calvária, que foi relacionada a espessura e porosidade da membrana e período pós-operatório.

No tratamento dos defeitos ósseos perimplantares as membranas também devem manter espaço para formação óssea, suportando seu próprio peso e resistindo à pressão exercida pelos tecidos suprajacentes, e forças externas, como a mastigação. Os defeitos ósseos podem ser do tipo mantenedores de espaço e não mantenedores de espaço. O defeito mantenedor de espaço promove suporte adequado para barreira física, prevenindo o colapso da mesma no seu interior. Os defeitos não mantenedores de espaço apresentam suporte inadequado das paredes ósseas para prevenir o colapso da barreira, interferindo com a organização do coágulo e diminuindo o espaço para neoformação óssea.

Os defeitos perimplantares do tipo fenestração e deiscência, quando de grande amplitude não mantêm espaço, necessitando de materiais de preenchimento com finalidade de evitar o colapso da membrana (MELLONIG & NEVINS, 1995).

Os defeitos mantenedores de espaço podem ser tratados com sucesso associando-se o uso de materiais de preenchimento ao uso de membranas, ou usando-se somente membranas. Já os defeitos não mantenedores de espaço requerem a associação de preenchimento e uso de barreira (MELLONIG & TRIPLETT, 1993; ROMINGER & TRIPLETT, 1994).

O uso de R.O.G. na implantodontia pode ser separado de acordo com a fase do tratamento, previamente a instalação dos implantes, na fase da instalação dos implantes, ou após a osseointegração. Defeitos tipo deiscência podem ocorrer na instalação de implantes em rebordos alveolares atróficos ou reparo desfavorável da crista óssea após a instalação de implantes imediatos, por exemplo. Na literatura, o uso de membranas associado ou não ao preenchimento destes defeitos apresenta altos índices de sucesso. Já os defeitos tipo fenestração ocorrem frequentemente quando da inserção do implante em rebordos alveolares com atrofia vestibular. Sendo preferencialmente tratados por associação de preenchimento do defeito e sua cobertura com membranas (SPAGNOLI *et al.*, 2001 e GRAY & HANCOCK, 1998).

DAHLIN *et al.* (1995) realizaram um estudo prospectivo multicêntrico com o objetivo de avaliar a eficácia do uso de membrana de e-PTFE junto a defeitos perimplantares tipo fenestração e deiscência. O estudo foi baseado em 40 deiscências e 15 fenestrações perimplantares a implantes Brånemark sem o preenchimento dos defeitos. Seus resultados sugerem que o uso de membranas em defeitos perimplantares é favorável devido a manutenção do espaço abaixo da membrana.

MASSIMO *et al.* (1997) avaliaram a eficácia de membranas reabsorvíveis de PLA/PGA associadas a enxerto autógeno para tratamento de defeitos perimplantares tipo deiscência e fenestração, comparando-as a membrana de e-PTFE. Neste estudo foram realizados 18 defeitos, sendo 9 deiscências e 9 fenestrações, que foram preenchidos por osso autógeno, extraído de sítios bucais. Dos 18 defeitos, 9 foram cobertos por membrana de PLA/PGA (Grupo Teste), e 9 por membranas de e-PTFE (Grupo Controle). O Grupo Controle apresentou uma porcentagem de preenchimento ósseo de 98,2%, comparada a 88,56% para o Grupo Teste. Contudo este resultado não revelou diferença estatisticamente significativa.

Membranas não reabsorvíveis de e-PTFE têm sido usadas com sucesso desde 1980. Contudo, este material tem três desvantagens. Primeiro pode ocorrer exposição pós-operatória da membrana e comprometer o processo regenerativo. Segundo, é necessário novo procedimento cirúrgico para remover a

membrana. Terceiro, quando a membrana é removida, após seis meses, o osso neoformado pode reagir à exposição com reabsorção. Para evitar estas desvantagens das membranas não reabsorvíveis, membranas reabsorvíveis têm sido introduzidas na R.O.G. (TAWIL *et al.*, 2001).

No entanto para ocorrer regeneração óssea, com o emprego de membranas reabsorvíveis, os seguintes requisitos devem ser satisfeitos: ser bioabsorvível, ausência de reação de corpo estranho, e função eficiente de barreira (GOTTLOW, 1993; MELLONING & TRIPLETT, 1993).

A membrana de colágeno é uma barreira bioabsorvível, que possui ótima integração tecidual e promove regeneração. Porém apresenta como desvantagens a incapacidade de manter um espaço e potencial de antigenicidade (HÜRZELER & STRUB, 1995). O problema da manutenção de espaço pode ser resolvido pelo uso de preenchimentos ósseos no interior do defeito, e a antigenicidade pode ser prevenida, pelo controle de qualidade na fabricação (TAWIL *et al.*, 2001).

TAWIL *et al.* (2001) realizaram um estudo para avaliar a eficácia da membrana de colágeno (Bio-Gide), usada em conjunto com osso autógeno, para o tratamento de defeitos tipo fenestração, deiscência, ou pequenos defeitos verticais. Após um período de seis meses a regeneração óssea foi mensurada, tendo atingido um percentual de 87,5% de ganho ósseo em volume.

LOPES (1999) avaliou, por análise histológica e histométrica, a efetividade das membranas de colágeno e celulose no tratamento de defeitos perimplantares tipo fenestração. Foram colocados três implantes de titânio de 9,0 X 3,5mm, em ambas as tíbias de seis cães, e confeccionados defeitos circulares, na face medial da tibia, de forma a expor a superfície dos implantes. Os dois primeiros defeitos foram tratados com membranas de colágeno e celulose, respectivamente, sendo que o terceiro defeito serviu apenas como controle. Após os períodos de três e oito semanas os animais foram sacrificados as peças submetidas a processamento histológico. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as formas de tratamento, com maior neoformação óssea nos defeitos tratados com membranas de colágeno seguidos pelos defeitos tratados por membrana de celulose.

O enxerto ósseo autógeno tem sido amplamente empregado na implantodontia. É o tipo de tratamento descrito como padrão em função das vantagens biológicas que oferece, quando comparado aos materiais de preenchimento, pois é altamente biocompatível, é facilmente reabsorvido e substituído por tecido ósseo neoformado, em função de suas propriedades de osseocondução, osseoindução e osteogênese, esta última pela transferência de células osteoblásticas e fatores de crescimento incorporados à matriz. Além de ser capaz de manter espaço prevenindo o colapso da barreira física (SIMION *et al.*, 1994; BECKER *et al.*, 1995).

Os principais sítios intrabucais doadores de enxerto autógeno são sínfise mandibular, tuberosidade maxilar, área retromolar, as exostoses ou mesmo os debris ósseos, resultantes das perfurações do leito do implante. Nos casos em que um maior volume ósseo se faz necessário, sítios doadores extrabucais como: crista ilíaca, calvária, costela, tíbia e fíbula, têm sido utilizados (MISH & DIETSCH, 1993).

Os materiais de preenchimento ou substitutos ósseos possuem vantagens, quando comparados ao enxerto autógeno por sua maior disponibilidade, eliminação de uma cirurgia adicional, e consequentemente do tempo cirúrgico, quantidade de anestesia, perda sanguínea e a morbidade do procedimento.

Em 1965, URIST descreveu o potencial osteoindutivo do osso desmineralizado após implantação intramuscular deste. Nos períodos pós-operatórios de 4 e 16 semanas ele observou formação óssea em 50 a 90% dos animais. Três anos depois, URIST *et al.* (1968) revelaram que a alteração química e a descalcificação da matriz óssea provê maior neoformação óssea do que osso somente desmineralizado.

PIATTELLI *et al.* (1996) compararam o uso de matriz óssea mineralizada (FDBA) e desmineralizada (DFDBA) como enxerto alógeno. Neste estudo quatro pacientes receberam FDBA, e outros quatro DFDBA, ambos

associados a membrana de e-PTFE, para cobertura de implantes imediatos. Após o período de seis meses foi realizada biópsia. Como conclusões principais obtiveram que a FDBA promoveu maior osteocondução, e que FDBA e DFDBA não apresentaram efeitos osteoindutivos.

Um outro estudo realizado por HÄMMERLE *et al.* (1998) testou o efeito do osso desproteínizado bovino (DBBM) na R.O.G. em defeitos perimplantares tipo deiscência. Para isto utilizaram três macacos (*Macaca fascicularis*) dos quais foram extraídos os primeiros e segundos molares e pré-molares inferiores, de ambos os lados. Três meses após procedeu-se com a instalação de oito implantes cilíndricos de cada lado e confeccionados defeitos tipo deiscência perimplantares. Foram então criadas quatro situações experimentais diferentes: dois sítios em cada macaco foram tratados com membrana de e-PTFE (M); dois foram preenchidos com DBBM; dois foram preenchidos com DBBM e cobertos com a membrana (M+DBBM); e dois sítios serviram de controle, sem preenchimento ou recobrimento. Os resultados mostraram que DBBM exibiu propriedades osteocondutivas e pode ser usado em R.O.G. para o tratamento de defeitos perimplantares tipo deiscência.

RABÊLO (2001) realizou um estudo comparativo de preenchimentos ósseos sobre o processo de R.O.G. em defeitos perimplantares do tipo fenestração. Foram colocados 40 implantes de titânio de 2,6 x 6mm, bilateralmente, em fêmur de coelhos. Defeitos circulares de 2,6mm de diâmetro

foram confeccionados na face medial do fêmur, de forma a expor a superfície do implante. Os defeitos foram preenchidos de acordo com o grupo estudado, com vidro bioativo (grupo Perioglas), matriz óssea humana liofilizada (grupo Dembone), osso autógeno (grupo osso) e preenchimento por coágulo (grupo coágulo). Todos os defeitos foram protegidos com membrana de celulose. Os animais foram sacrificados em períodos de 3 e 6 semanas. Dados histométricos revelaram melhores resultados de neoformação óssea nos grupos Dembone e no grupo osso.

OLIVEIRA *et al.* (1999) avaliaram o efeito da desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular, e sua biocompatibilidade. Concluindo-se que o osso cortical bovino quer desproteínizado a 100°C ou a 1000°C promovem uma resposta tecidual semelhante à implantação de osso autógeno, podendo portanto, serem usados como material de preenchimento ósteo-substituto e como proteínas carreadoras das proteínas morfogenéticas do osso.

URIST (1965) visando estudar a teoria de indução de neoformação óssea no interior de implantes de matriz óssea descalcificada, desenvolveu um experimento em que implantou matriz óssea descalcificada e liofilizada originada de coelhos e humanos em tecido muscular de 250 coelhos, 20 ratos, 10 camundongos e 5 porcos da índia; em defeitos ósseos na ulna de 10 coelhos e vértebras de 3 cães e em defeitos ósseos de 21 humanos. Obteve-se

neoformação óssea nos sítios heterotópicos e ortotópicos, concluindo-se através deste estudo e da revisão da literatura, disponível naquela época, que a neoformação óssea que ocorria não era decorrente dos osteoblastos presentes no enxerto e sim da ativação da proliferação de células pluripotenciais e sua diferenciação em osteoblastos.

Em 1971, URIST & STRATES, denominaram de Proteína Óssea Morfogenética (BMP), componentes químicos da matriz óssea, dentina e outros tecidos duros, que são isoladas pela desmineralização e intimamente associadas as fibras colágenas. Sendo até esta data a suposta responsável pela propriedade osteoindutiva dos enxertos destes tecidos.

Em 1984, URIST *et al.*, finalmente isolaram e purificaram uma proteína morfogenética de osso bovino desmineralizado, a proteína óssea morfogenética e comprovaram a sua capacidade osteoindutora com a indução da formação de osso em animais e humanos.

As BMPs são um grupo de glicoproteínas ácido hidrofóbicas, membros da família de fatores de crescimento, que existem na matriz óssea extracelular, e têm sido extraídas de diferentes tecidos, como dentina, osteossarcoma, e de várias espécies como coelho, boi, cabra, rato, babuíno e humanos. Com o desenvolvimento da biologia molecular, substâncias conhecidas como BMP tem

se tornado uma família de proteínas (BMP 2-15) com comportamentos biológicos diferentes (SUWA *et al.*, 1998).

A proteína morfogenética do osso existe na matriz óssea e age em células mesenquimais imaturas na iniciação de indução óssea por meio de diferenciação óssea endocondral, e por esta razão tem sido estudada como substituto ósseo (URIST *et al.*, 1982).

As BMPs são proteínas difusíveis, para iniciar o processo osseoindutivo *in vivo* é necessário um carreador, que permita sua liberação gradual, assegure sua distribuição uniforme, seja seguro biocompatível e reabsorvido a medida que vai ocorrendo a formação óssea. A hidroxiapatita, polímeros PLA e PGLA, colágeno e fibrina de colágeno são alguns carreadores, que preenchem estes requisitos (MIKI *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1990).

UEDA (1999) realizou um estudo para verificar a capacidade de osseoindução do composto BMP-HA em tíbias de 12 coelhos. Foram utilizados 24 implantes de titânio puro de 3,75 x 7mm, inseridos dois em cada metáfise da tíbia esquerda. A seguir confeccionou-se um defeito ósseo de aproximadamente 4mm de altura e 2,55mm de largura, expondo as roscas dos implantes, que foram preenchidos com osso autógeno, colhido da osteotomia de preparação do leito do implante, e pelo composto BMP-HA. No grupo, que recebeu BMP-HA, sacrificado no 42º dia pós-operatório, notou-se substituição do enxerto por osso

neoformado. Constatou-se uma justaposição íntima do osso neoformado à superfície dos implantes em ambos os grupos, concluindo-se que o composto BMP-HA apresenta excelente comportamento biológico como agente osseoindutor e que a hidroxiapatita microgranular utilizada possui características viáveis de ser carreador da BMP na neoformação óssea.

A primeira demonstração de indução de formação óssea em aposição a implantes metálicos, foi publicada em 1992 por RUTHERFORD *et al.* uma preparação de proteína osteogênica bovina associada a matriz de colágeno ósseo foi usada para promover crescimento ósseo na presença e ausência de implantes.

WANG *et al.* (1993) avaliaram a osseointegração de implantes endósseos cilíndricos em combinação com BMP de origem bovina (BMPb) e Albumina Sérica Bovina (BSA) em cães edêntulos. Observações histológicas mostraram que neoformação óssea foi marcadamente aumentada pela BMPb. A superfície do implante em combinação com BMPb exibiu aparente aposição óssea direta com o osso, sem evidência de cápsula de tecido conjuntivo, em 4 semanas após implantação. Uma fina camada de tecido conjuntivo estava presente no outro grupo. Oito semanas após a implantação, havia um justo contato entre o osso e o implante no grupo BMPb, e o osso ao redor estava arranjado de maneira regular. Enquanto no outro grupo (BSA) havia ainda poucas áreas de tecido conjuntivo fibroso ao redor dos implantes. Estes

resultados indicam que o índice de osseointegração foram aumentados pela BMPb.

Um estudo feito por WANG *et al.*, em 1994, investigou o potencial de implantes de titânio tratados com BMP e com Albumina Sérica Bovina (BSA), sob análise de microscopia eletrônica de varredura produzir osseointegração em mandíbulas de cão. Os resultados deste estudo sugerem que implantes tratados com BMP são capazes de formar novo osso com estrutura normal e em íntimo contato com a superfície do implante mais rápido que BSA e o grupo controle.

SAILRER (1994) concluiu que o grande potencial demonstrado em concentrar e purificar BMP é um contraste aos efeitos atribuídos aos materiais ósseos desmineralizados na literatura, anteriormente. A estrutura das BMPs de origem humana e bovina são idênticas, por isso as BMPs de origem bovina são toleradas sem causar reações adversas.

O estudo de YAN *et al.*, 1994, estabeleceu um método para combinar BMP bovina com titânio e avaliar a formação precoce de osso induzida pelo complexo BMPb/ titânio em cães edêntulos. Seus resultados mostraram que houve formação de novo osso na interface osso/implante duas semanas após a implantação e precoce osseointegração com quatro semanas. Este estudo indica que osseointegração pode ser acentuada pela osseoindução da BMPb.

O maior problema do osso desmineralizado é que a atividade osseoindutora presente nos enxertos é insuficiente para induzir a neoformação óssea de maneira satisfatória na maioria dos defeito ósseos. Provavelmente porque a BMP está presente em quantidade insuficiente (BECKER *et al.*, 1995). O advento das técnicas de biologia molecular, em particular a tecnologia de recombinação genética aumentou o entendimento da osteoindução e dos fatores de crescimento. Estas técnicas permitiram a produção de grandes quantidades de BMP. Várias BMPs foram clonadas e tiveram sua ação celular e atividade osseoindutora caracterizadas, *in vitro* e *in vivo* (BARBOSA *et al.*, 1999).

Treze proteínas foram purificadas e clonadas, são chamadas BMP 1-13. WANG *et al.* (1990), foram os primeiros a reproduzir BMP-2 recombinante humana, introduzindo o código genético da BMP-2 humana em células do ovário de hamster chineses.

BARBOSA *et al.* (1999) descreveram a estrutura, mecanismos de ação, carreadores, vantagens, segurança e recentes estudos clínicos importantes, colocando a rhBMP-2 como um potencial substituto ósseo. Sendo as principais vantagens a redução significativa de transmissão de doenças infecto-contagiosas, a produção em grandes quantidades, com um produto de alta qualidade e uniforme.

A habilidade da BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) de osteoindução em estimular formação óssea aposicional a um implante de superfície porosa foi testada, no músculo quadríceps de rato. Implantes com e sem hidroxiapatita foram usados para comparar os efeitos na formação óssea de duas doses diferentes de rhBMP-2 recombinante humana e controles. Os implantes tratados com rhBMP-2 formaram muito mais osso do que no grupo controle independente da dose ou presença de hidroxiapatita (COLE *et al.*, 1997).

SIGURDSSON *et al.* (1997), avaliaram a indução de regeneração óssea em defeitos perimplantares supra-alveolares pela rhBMP-2, em mandíbula de cão. Os resultados sugeriram que há um potencial para rhBMP-2 induzir regeneração óssea e osseointegração em defeitos cirúrgicos perimplantares.

Conforme relatado, o complexo BMP-Hidroxiapatita (BMP-HA) é mais efetivo em induzir formação óssea subperiosteal do que hidroxiapatita isoladamente (HORISAKA *et al.*, 1991). SUWA *et al.* (1998), implantaram o complexo BMP-HA em defeitos ósseos no fêmur de ratos e a cicatrização foi acompanhada de 1 a 8 semanas. O complexo BMP-HA aparentemente estimulou células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em angioblastos e osteoblastos.

BESSO *et al.* (1999), avaliaram, através de análise de torque e histológica, a estimulação do osso adjacente ao implante de titânio, pela BMPb.

Os resultados mostraram que após três meses de implantação, a força de torque, foi maior para os implantes estimulados por BMPb e os valores histomorfométricos indicaram uma porcentagem mais alta de contato ósseo com os implantes estimulados por BMPb, que foi estatisticamente significativa. Então este estudo concluiu que o uso de BMPb tem significado efetivo no aumento da força de adesão na interface osso/implante em um curto período, quando comparado a implantes sem uso de BMPb.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi a realização de um estudo comparativo por meio de análise histológica e histométrica da influência de enxerto de osso autógeno, matriz óssea bovina desmineralizada e proteína óssea morfogenética adsorvida a hidroxiapatita, associados a técnica de regeneração óssea guiada no reparo de defeitos perimplantares, realizados em tíbias de cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi devidamente submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, e aprovado de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO 1).

4.1. MATERIAL

4.1.1. IMPLANTES UTILIZADOS

Foram utilizados 24 implantes¹ do tipo parafuso autorroscante com hexágono externo, de 9,0mm de comprimento por 3,5mm de diâmetro, de superfície usinada.

¹INP – Sistemas de Implantes Nacionais e de Próteses Comércio Ltda. São Paulo-SP, Brasil.

4.1.2. MEMBRANA E SUBSTITUTOS ÓSSEOS UTILIZADOS

A membrana² empregada é um produto natural composto por colágeno ósseo desnaturado obtido da matriz orgânica de osso cortical de bois jovens, passando por processos bioquímicos de purificação e liofilizado posteriormente.

Os substitutos ósseos utilizados são proteínas morfogenéticas do osso³ (BMPs) e matriz orgânica de osso bovino⁴(MOB). As BMPs utilizadas, segundo o fabricante, são glicoproteínas naturais de baixa massa molecular, extraídas da matriz orgânica de osso cortical fetal bovino, através de processos bioquímicos, que resulta num “pool” de BMPs e a este é adsorvido à hidroxiapatita (HA) microgranular, que funciona como carreador, na proporção de 1:20 cc (BMP:HA). A MOB empregada, segundo o fabricante, foi extraída da cortical óssea bovina livre de osso medular, passando por lavagens e remoção química de todos os resíduos tissulares e gordura. Após isto a matriz óssea descalcificada e neutralizada é liofilizada a fim de preservar o potencial osseocondutor intrínseco à matriz orgânica do osso.

² Gen-derm® - Genius®- Divisão de Biomateriais - Baumer S.A. Mogi Mirim-SP. Brasil.

³ Gen-pro® - Genius®- Divisão de Biomateriais - Baumer S.A. Mogi Mirim-SP. Brasil.

⁴ Gen-ox® – Genius®- Divisão de Biomateriais - Baumer S.A. Mogi Mirim-SP. Brasil.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 ANIMAIS E ANESTESIA

Foram utilizados para esta pesquisa quatro cães, sem distinção de raça, de porte médio, fêmeas em boas condições de saúde geral. Os animais foram divididos em dois grupos, com dois animais em cada grupo, de acordo com o período de sacrifício de 21 ou 42 dias, e mantidos durante o período experimental com alimentação sólida⁵ e água a vontade.

Uma hora antes dos procedimentos cirúrgicos os animais receberam por injeção intramuscular a suspensão⁶ de 600.000 UI de Benzilpenicilina benzatina, 300.000 UI de Benzilpenicilina procaína, 300.000 UI de Benzilpenicilina procaína, 250mg de Eritromicina e 250mg de Diidroestreptomicina.

Foi injetado sulfato de atropina⁷ na dose de 0,25mg/Kg, via subcutânea, cerca de dez minutos antes da anestesia, com a finalidade de evitar a ocorrência de eventuais bradicardias devido a administração de xilazina⁸.

⁵ Ração Sítios e quintais – Purina Nutrimentos. São Paulo-SP. Brasil.

⁶ Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte – Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas-SP. Brasil.

⁷ Sulfato de Atropina – Fagra.

⁸ Rompum® – Bayer S.A. - Saúde Animal. São Paulo-SP. Brasil.

A via intramuscular profunda foi utilizada para indução anestésica, por meio da associação de solução aquosa a 2% de Cloridrato de 2 - (2,6-xilidino) - 5,6 - dihidro - 4 - H - 1, 3 - tiazina (xilazina), na dosagem de 3mg/kg de peso do animal, e cloridrato de quetamina⁹, na dosagem de 20mg/kg de peso do animal, conforme recomendações do fabricante. Logo após a indução anestésica os animais receberam flunixin meglumine¹⁰, via intramuscular, na dosagem de 1,1mg/kg de peso do animal, com a finalidade de analgesia pós-operatória.

4.2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após anestesia, foi realizada tricotomia seguida de antissepsia da região ventral da tibia com solução alcoólica de P.V.P.I.¹¹ a 10%, e posterior isolamento da área por meio da aposição de campos estéreis.

Bilateralmente, com uma lâmina intercambiável número 15¹², montada em cabo de bisturi número 3, foi feita uma incisão na pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 5 cm de comprimento, na região correspondente à face medial da tibia em seu terço proximal (FIG. 1).

⁹ Francotar® – Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda. Roseira-SP. Brasil.

¹⁰ Banamine* - Schering-Ploug Veterinária. Rio de Janeiro-RJ. Brasil.

¹¹ Riodeíne Tintura. Industria Farmacêutica Rioquímica Ltda. São José do Rio Preto-SP. Brasil.

¹² Beckton-Dickison. Industrias Cirúrgicas Ltda. Curitiba-PR. Brasil.

Por meio de divulsão romba, o tecido muscular subjacente foi afastado, expondo-se o periósteo que também foi incisado para dar início às perfurações. Para realização das perfurações foi utilizado um motor elétrico¹³ com controle de torque e velocidade, além de um contra-ângulo redutor 16:1¹⁴ acoplado a esse motor. A velocidade de trabalho foi de aproximadamente 1000 rpm, com torque de 36Ncm e abundante irrigação externa com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%¹⁵, feita manualmente, utilizando seringa descartável (FIG. 2).

O preparo dos leitos para a introdução dos implantes foi feito por perfurações seriadas, utilizando as brocas¹⁶ na seguinte seqüência: broca lança com 1,8mm de diâmetro, que tem a função de guiar as perfurações subsequentes e, duas brocas com formato de espada com diâmetros de 2,6 e 3,2mm. Três leitos foram confeccionados na superfície ventral de cada tibia e distaram 10mm entre si (FIG. 3).

¹³ BLM 300 – VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda.

¹⁴ NSK E 16R Nakanishi Dental MFG. C.O – Japan

¹⁵ GLICOLABOR – Industria Farmacêutica. Ribeirão Preto-SP. Brasil.

¹⁶ Kit Cirúrgico INP – Sistemas de Implantes Nacionais e de Próteses Comércio Ltda. São Paulo-SP. Brasil.

Antes da colocação dos implantes, foram confeccionados, com uma broca trefina¹⁷ de 3,75mm de diâmetro, defeitos ósseos circulares na faces mediais das tíbias, perpendiculares ao longo eixo dos leitos dos implantes, com o objetivo de simular defeitos perimplantares do tipo fenestração (FIG. 4).

Após o término das perfurações, os defeitos foram irrigados para remover esférolas ósseas que pudessem interferir na adaptação dos implantes e por consequência no processo de osseointegração. Na sequência, o implante foi removido de seu invólucro e inserido manualmente, através de um dispositivo plástico, que permitiu o início da colocação sem o contato manual com o mesmo. Posteriormente, quando o implante já possuía alguma estabilidade no seu leito receptor, o dispositivo plástico foi removido, e adaptava-se uma chave de catraca¹⁸ à cabeça do implante para finalizar sua inserção (FIG. 5).

Na etapa cirúrgica subsequente realizamos o preenchimento dos defeito ósseos circulares e posterior recobrimento com membrana de colágeno. Cada tíbia teve um defeito preenchido por osso autógeno, um defeito preenchido por BMP e o outro por MOB, de modo que cada cão recebeu dois implantes de cada grupo, um em cada tíbia (FIG. 6).

¹⁷ Implantes – Biomateriais Dentoflex Instrumentos Cirúrgicos. São Paulo-SP. Brasil.

¹⁸ Kit Cirúrgico INP – Sistemas de Implantes Nacionais e de Próteses Comércio Ltda. São Paulo-SP. Brasil.



FIGURA 3. Três leitos receptores dos implantes, confeccionados na superfície ventral da tíbia, distantes 10mm entre si.

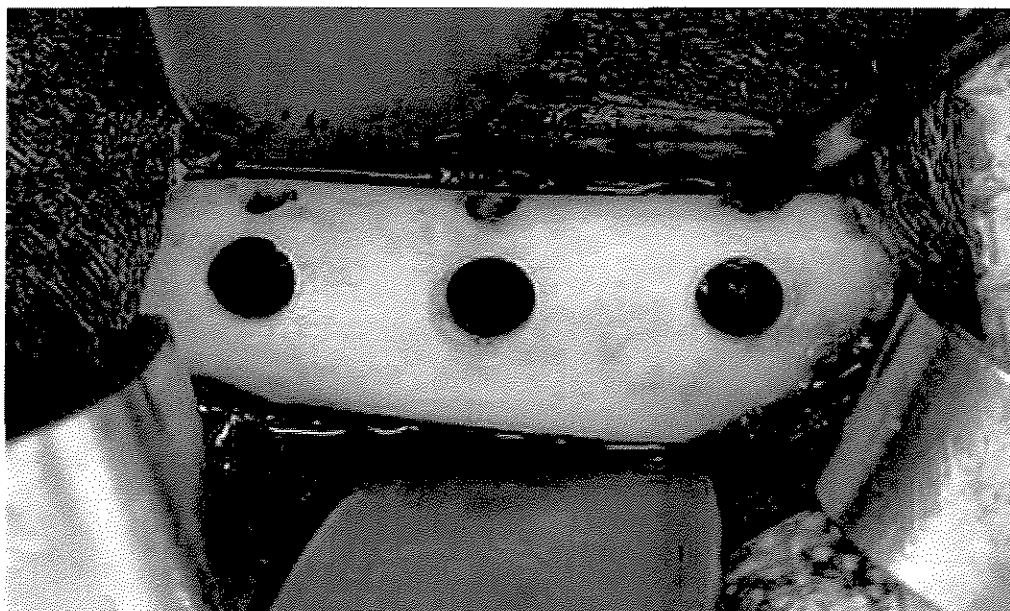


FIGURA 4. Defeitos circulares confeccionados na face medial da tíbia, localizados perpendicularmente ao longo eixo dos implantes.

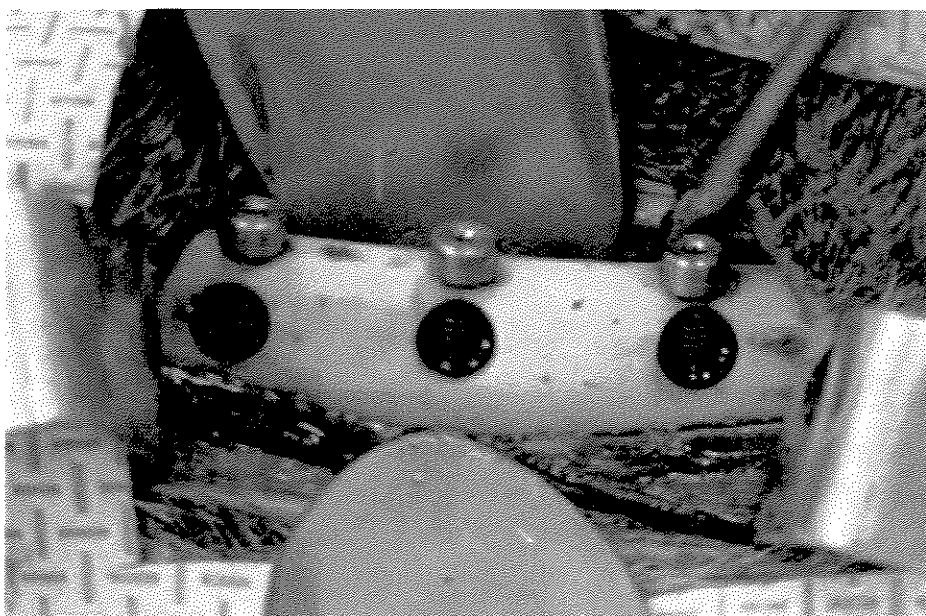


FIGURA 5. Implantes instalados.

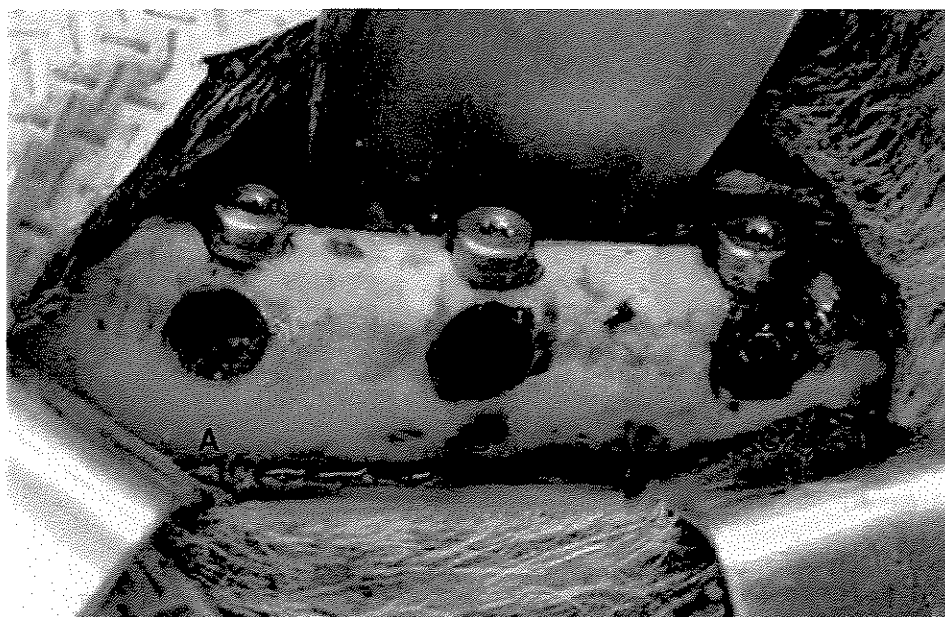


FIGURA 6. Defeitos ósseos preenchidos por: A- BMP; B- MOB; C- AUT.

A localização dos diferentes preenchimentos foi definida por sorteio, para não influenciar nos resultados caso a localização distal, proximal ou central tenha influência sobre o reparo ósseo. Tendo sido feito um sorteio para cada cão. O osso autógeno, de característica córtico-medular, foi colhido durante o uso da trefina para confecção dos defeitos e particulado manualmente com osteótomo. Após o preenchimento as membranas foram posicionadas de forma a cobrir toda a área do defeito, estendendo-se cerca de 4mm sobre as margens ósseas (FIG. 7).

Os implantes que receberam osso autógeno como material de preenchimento do defeito foram chamados de Grupo AUT. Os implantes que receberam BMP como material de preenchimento do defeito foram chamados de Grupo BMP. Os implantes que receberam MOB como material de preenchimento do defeito foram chamados de Grupo MOB. Os implantes foram vedados com parafusos de cobertura, os retalhos reposicionados e suturados por planos com fio de sutura mononylon 4-0¹⁹ (FIG. 8).

¹⁹ Ethicon – Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda

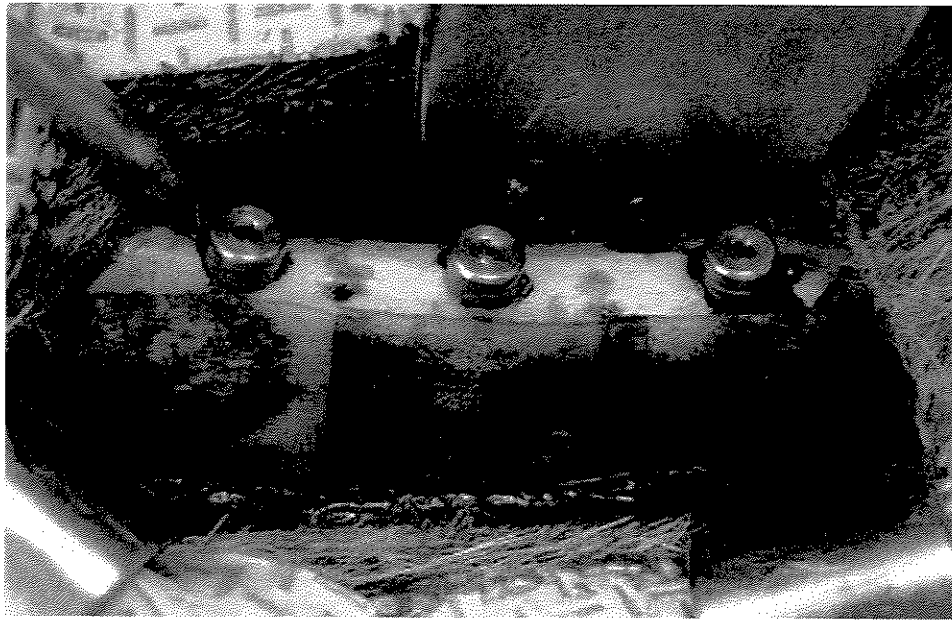


FIGURA 7. Defeitos circulares devidamente preenchidos e recobertos por membrana de colágeno.



FIGURA 8. Sutura realizada com fio mononylon 4-0.

4.2.3. SACRÍFICIO DOS ANIMAIS E PREPARO HISTOLÓGICO

Para o sacrifício os animais foram divididos em dois grupos com dois animais cada. O primeiro grupo foi sacrificado no período pós-operatório de 21 dias e o segundo grupo no período pós-operatório 42 dias. Para isso os cães foram novamente submetidos a anestesia geral, do modo já descrito para a cirurgia e então sacrificados, por injeção intra-cardíaca, de dose letal da solução Cloreto de Potássio 19,1%²⁰.

Em seguida ao sacrifício, foram obtidos segmentos ósseos das tíbias contendo os implantes e os defeitos circulares, por seccionamento transversal do osso com broca tronco-cônica 702 e discos de carborundum, montados em baixa rotação sob abundante irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (FIG. 9, 10). As osteotomias foram feitas distando cerca de 5mm de cada implante. As peças foram fixadas em solução de formol a 10%²¹ durante 48 horas em temperatura ambiente.

²⁰ Reagentes Analíticos ECIBRA. Nuclear. Casa da Química. Diadema-SP. Brasil.

²¹ Formol a 10% - Synth. Diadema-SP. Brasil.

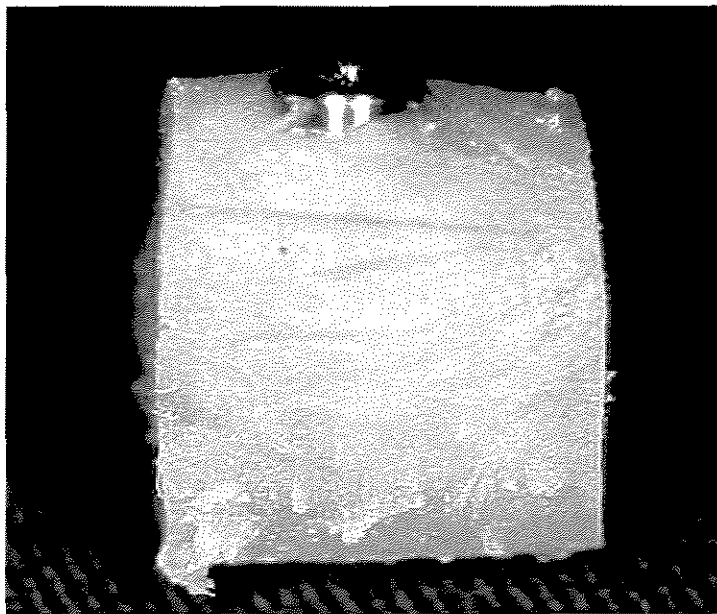


FIGURA 9. Fragmento de osso da tíbia contendo o implante (visão frontal).

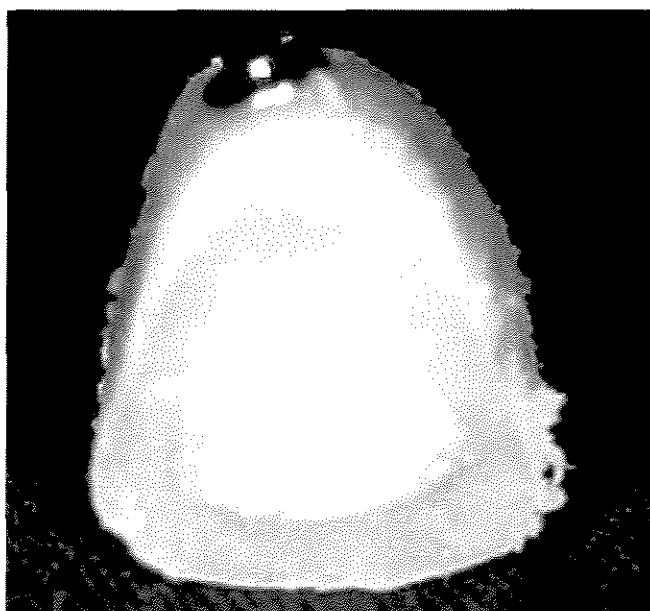


FIGURA 10. Fragmento ósseo da tíbia contendo o implante (visão transversal).

Posteriormente as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de citrato de sódio a 20%²² e ácido fórmico a 50%²³ em partes iguais (MORSE, 1945), durante o período de quatro meses, com troca diária da solução.

Ao final deste processo cada fragmento de tíbia foi seccionado longitudinalmente ao implante, com o corte passando pelo meio da área do implante, deixando os defeitos intactos. Os implantes foram então removidos delicadamente de seus respectivos sítios (FIG. 11). A partir daí as peças foram novamente seccionadas, com o corte passando pelo meio do defeito (FIG. 12), para que os cortes histológicos nos oferecessem lâminas mostrando a parte central dos defeitos e região de interface defeito/implante. Procedeu-se a tramitação laboratorial de rotina, com lavagem em água corrente, desidratação em solução crescente de álcool etílico²⁴, diafanização em xilol²⁵ e inclusão em parafina²⁶.

²² Citrato de Sódio – Synth. Diadema-SP. Brasil.

²³ Ácido Fórmico – Chemco Indústria e comércio. Campinas-SP. Brasil.

²⁴ Comercial de Álcool Santa Cruz Ltda.

²⁵ Xilol (P.A.) - Chemco – Indústria e Comércio Ltda. Campinas-SP. Brasil.

²⁶ Paraplast plus – Labware – St. Louis – USA

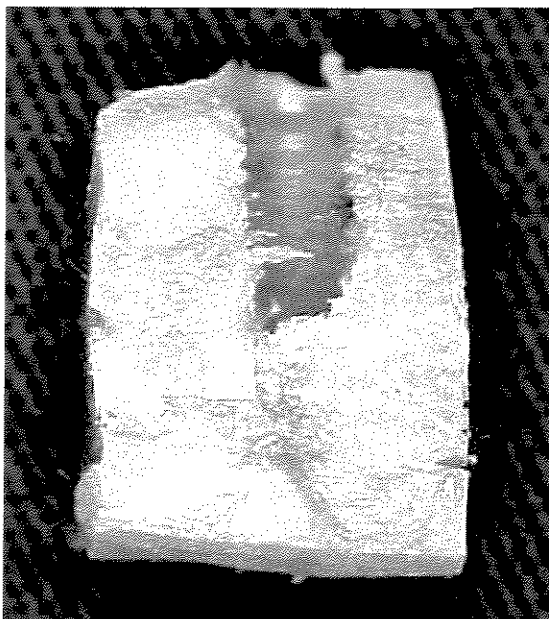


FIGURA 11. Fragmento ósseo após descalcificação em solução de Morse, seccionamento e remoção do implante.

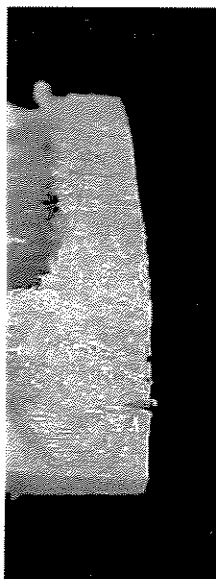


FIGURA 12. Peça seccionada para inclusão.

4.2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cortes seriados com 6µm de espessura foram feitos longitudinalmente à região dos defeitos ósseos, e em seguida corados com hematoxilina-eosina²⁷ e analisados em microscópio óptico comum²⁸.

Na análise histológica descritiva foi avaliada a intensidade de reação inflamatória, bem como a sequência de eventos que envolvem a reparação óssea, tais como necrose, hemorragia, atividade osteoclástica, presença de tecido conjuntivo, aposição de tecido ósseo neoformado, enfim o padrão de regeneração óssea junto à superfície dos implantes de titânio.

4.2.5. ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Para análise histométrica, foi utilizado o microscópio óptico²⁹, com objetiva para aumento de 200 vezes, adaptado a uma câmara de vídeo³⁰.

²⁷ E. Merck. Ag. Damarsta dt – Germany

²⁸ Carl Zeiss Products – Germany

²⁹ Axiolab - Zeiss

³⁰ Sony – Hyper had – model DXC-151^A, Japan

As imagens capturadas foram transferidas para a tela do computador³¹ e analisadas por meio de um *software* específico³².

Foi criada uma macro, que significa um conjunto de funções que permite executar automaticamente a seleção das imagens, definindo as condições da morfometria e a execução da medida, por meio do analisador de imagens.

A imagem da lâmina foi captada pelo sistema e visualizada no monitor, que pelo *software*, normalizou e congelou a mesma. Uma vez pronta, foi sobreposto à imagem um retículo de 100 pontos de 10 x 10 µm, denominado de grade de intersecção.

Procedemos então a contagem de pontos que recaiam sobre o osso neoformado nas áreas de intersecções das linhas horizontais e verticais do retículo.

³¹ Pentium 166Mhz.

³² Kontron Elektronik – KS 400 version 2.0 – 0400743.

A determinação do número de pontos a serem contados em cada grupo foi estabelecida pelo sistema teste de 100 pontos, por meio da fórmula para erro padrão relativo (HALLY, 1964.):

$$EPR = \sqrt{\frac{(1-V_v)}{N}}$$

EPR = Erro Padrão Relativo

V_v = Densidade de volume da estrutura em análise

N= Número de pontos a serem contados

Para as condições experimentais, a densidade de volume (V_v), ou seja, fração de volume ocupada por um objeto numa determinada estrutura foi igual a 100%. Como em bioestatística o índice de significância aceito (α) é de 0,05 (probabilidade de 95%), este valor foi atribuído ao EPR. Desta forma:

$$0,05 = \sqrt{\frac{(1-V_v)}{N}}$$

$$0,0025 = \frac{9}{N} \quad N = 3600$$

Os 3600 pontos são os que deveriam ser contados, utilizando-se de cálculo, do número de pontos corrigido, uma vez que a densidade de volume da estrutura em análise foi de 10, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$N \text{ corrigido} = \frac{N_{\text{calculado}}}{V_v}$$

$$N \text{ corrigido} = \frac{3600}{10} = 360$$

Realizou-se a histometria de três lâminas de cada bloco ósseo contendo o defeito perimplantar. Todas as lâminas tinham cortes seriados de 6 μ m de espessura. Foram analisados os terceiros sulcos em "V", das lâminas, contidos na área dos defeitos, onde 1200 pontos de intersecções foram contados para cada grupo nos diferentes períodos de sacrifício, avaliando-se a formação do tecido ósseo nestas região (FIG. 13).

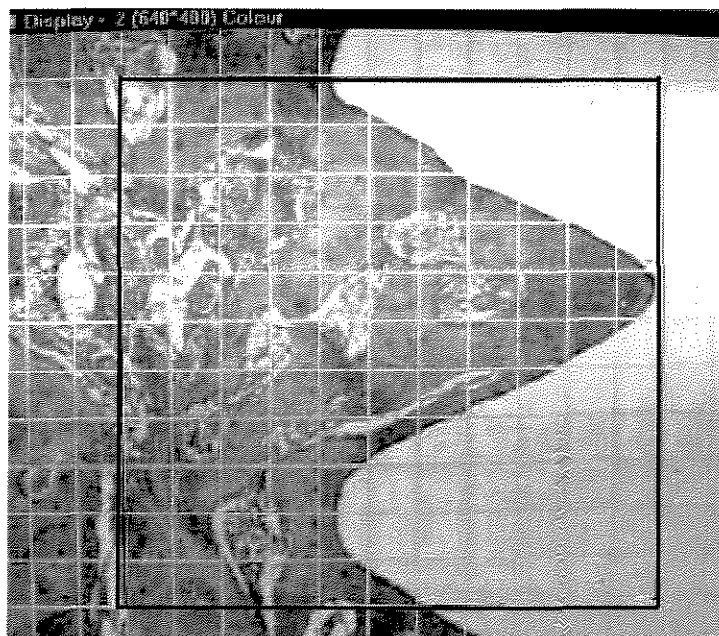


FIGURA 13. Terceiro sulco, contido na área do defeito ósseo, tendo sobreposto sobre si a grade de intersecção.

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi tirada uma média aritmética dos dados da análise histométrica de três lâminas para cada implante, a fim de diminuir a influência de erros de técnica histológica e contagem histométrica.

A análise foi feita com base em um modelo apropriado para análise de dados oriundos de um experimento casualizado em blocos com arranjo fatorial dos níveis dos fatores Grupo e Período.

O fator grupo contou com 3 níveis (AUT, BMP, MOB) e o fator período contou com dois níveis (21 e 42). Além dos fatores principais, o modelo contou com a interação entre estes dois fatores e com o efeito de Cão dentro do período, necessário em vista da forma como o experimento foi casualizado.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.1.1. PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO DE 21 DIAS

Os cortes histológicos deste período exibiram um espessamento na região periosteal, não havendo definição nítida entre as camadas de tecido conjuntivo e periósteo, com formação óssea de característica imatura (FIG. 14, 15, 16).

Os defeitos encontravam-se totalmente preenchidos por trabéculas ósseas neoformadas, contendo tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos em seus espaços lacunares, sendo nítida a diferença entre este tecido e o osso preexistente que apresentava padrão compacto com sistemas de Havers e lamelas concêntricas (FIG. 17, 18, 19). Observamos, entre as trabéculas ósseas neoformadas, a presença de partículas do material de preenchimento que apresentavam coloração mais basofílica quando comparada ao osso neoformado. (FIG. 20, 21, 22).

Em todas as amostras desse período observamos que a neoformação óssea partia sempre da região do endóstio, não havendo aposição de tecido ósseo nas margens dos defeitos. Margens essas, que permaneciam com seus limites nítidos.

Junto à interface osso/implante observamos neoformação óssea trabecular de superfície ondulada devido aos sulcos em “V” do implante. Este trabeculado ósseo neoformado continha tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos em seus espaços lacunares e, na região de contato com o implante observamos a presença de uma delgada lâmina de tecido conjuntivo fibroso. Em algumas áreas notamos a presença de material osteóide (FIG. 23, 24, 25). Em uma amostra, do grupo BMP, observamos que os dois sulcos em “V” da região mais cervical do implante, apresentavam-se preenchidos somente por tecido conjuntivo fibroso.



Figura 14. (10x). Grupo AUT – 21 dias pós-operatório. Observamos espessamento da região periosteal (EP) e neoformação óssea (ON).

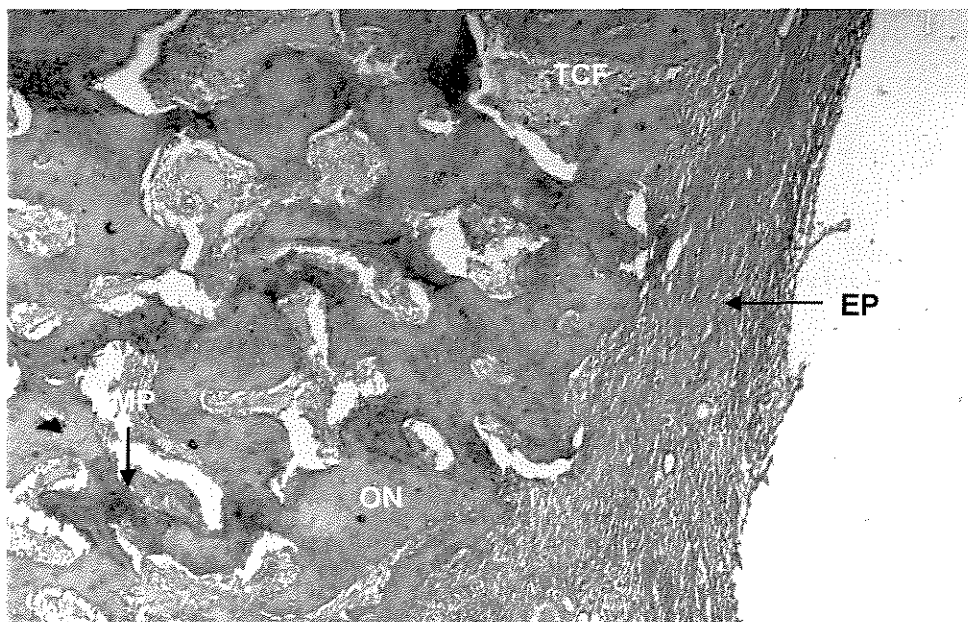


FIGURA 15. (25x). Grupo BMP – 21 dias pós-operatório. Espessamento da membrana periosteal (EP) e presença de tecido ósseo neoformado (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) em seus espaços lacunares. Observamos presença de partículas da BMP (BMP).

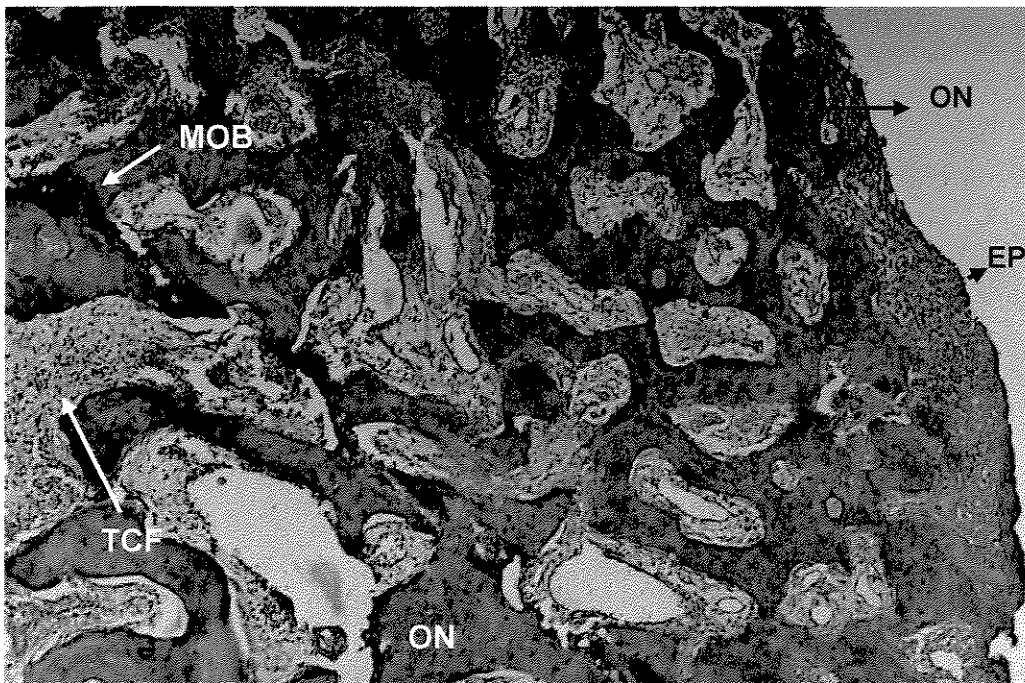


FIGURA 16. (25x) Grupo MOB - 21 dias pós-operatório. Notamos espessamento da região periosteal (EP) e a presença de neoformação óssea (ON), contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) em seus espaços lacunares. Observamos a presença de material enxertado (MOB).

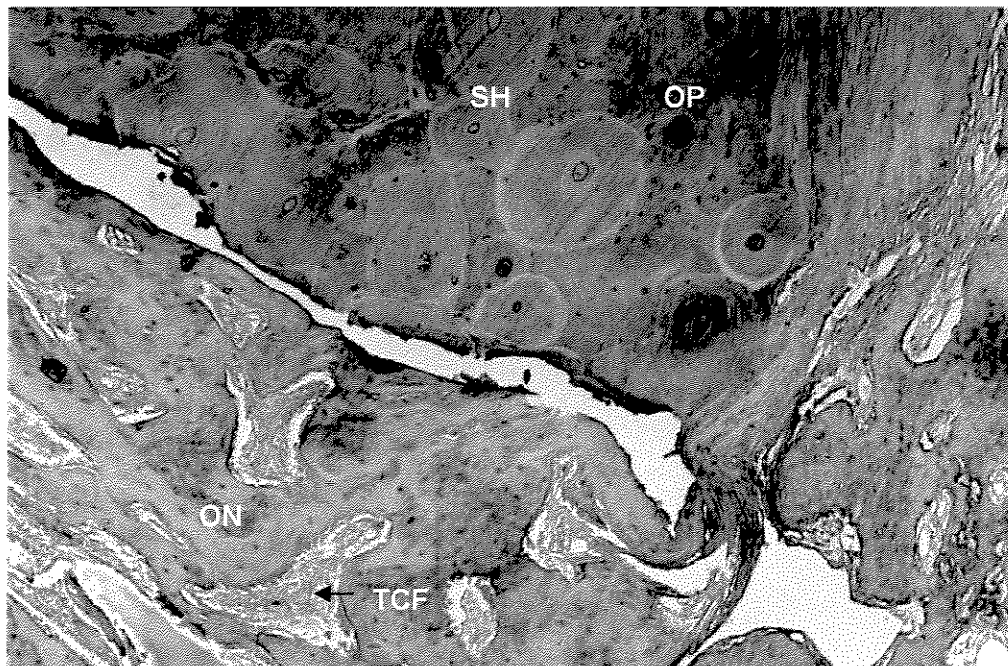


FIGURA 17. (25x) Grupo AUT - 21 dias pós-operatório. Neoformação óssea (ON) com características de osso imaturo, quando comparado ao osso preexistente (OP), com seus sistemas de Havers (SH). Observar tecido conjuntivo frouxo (TCF) no interior dos espaços lacunares.

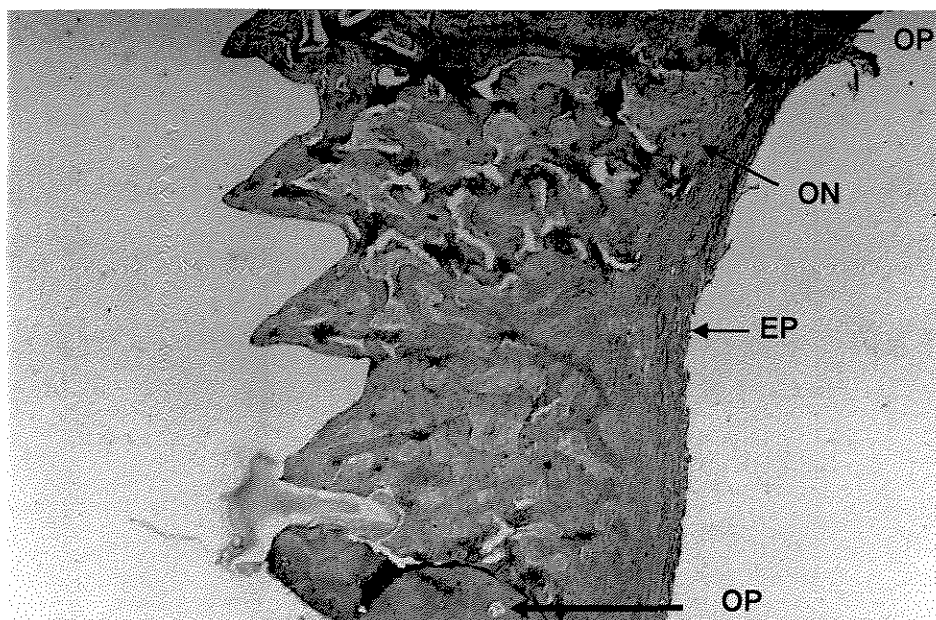


FIGURA 18. (10x). Grupo BMP – 21 dias pós-operatório. Visão panorâmica do defeito ósseo. Observamos espessamento da região periosteal (EP) e o defeito preenchido por osso neoformado (ON). Nas bordas superiores e inferiores observamos osso pré-existente (OP).

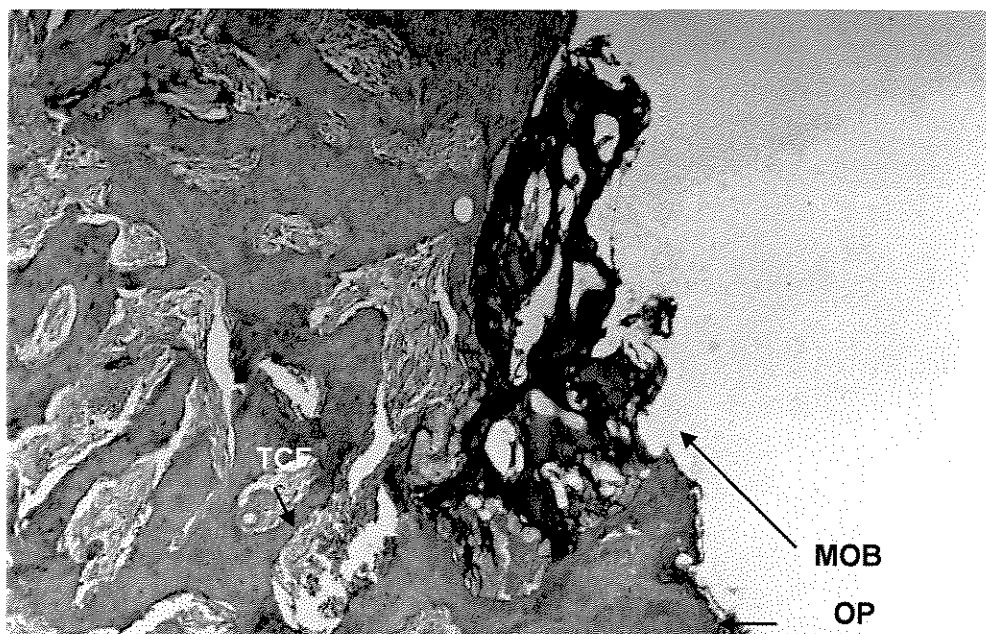


FIGURA 19. (25x) Grupo MOB - 21 dias pós-operatório. Neoformação óssea (ON) contendo em seus espaços lacunares tecido conjuntivo frouxo (TCF). Observamos a presença de material enxertado (MOB).

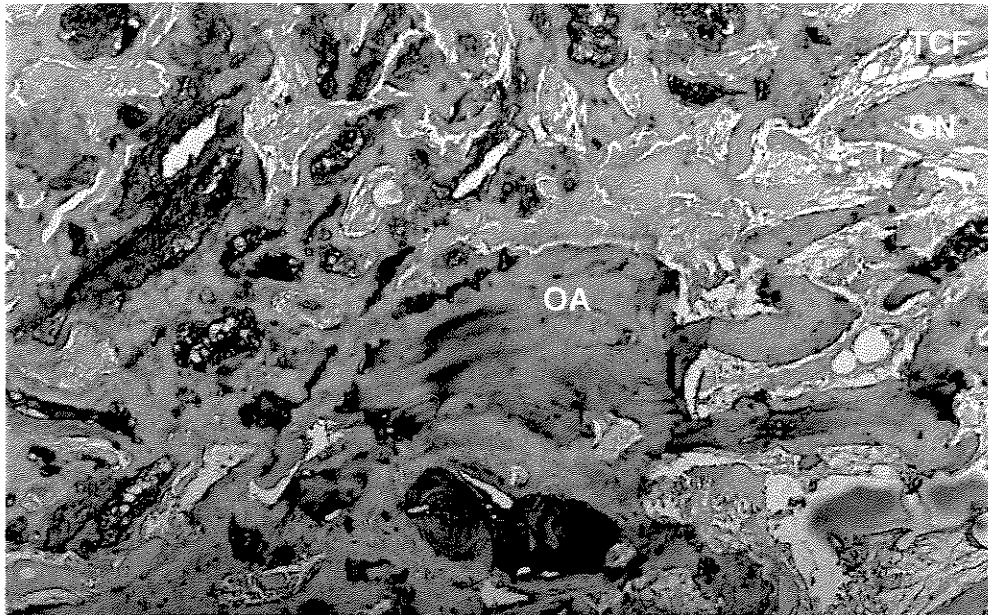


FIGURA 20. (25x). Grupo AUT – 21 dias pós-operatório. Neoformação óssea (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) em seus espaços lacunares. Observamos a presença de osso autógeno enxertado (OA).

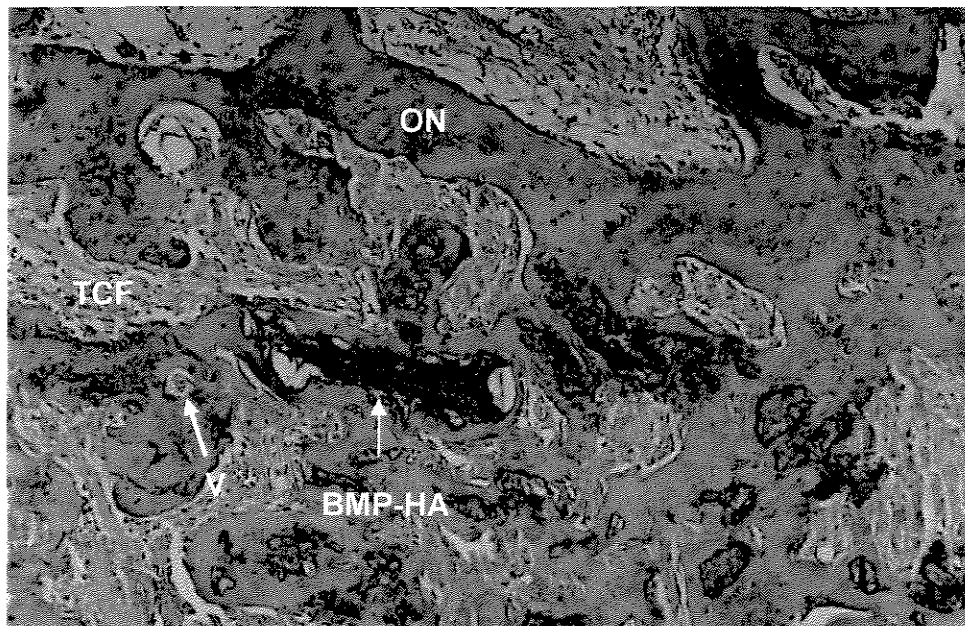


FIGURA 21. (25X) Grupo BMP – 21 dias pós-operatório. Notamos a presença de tecido ósseo neoformado (ON), contendo em seus espaços lacunares tecido conjuntivo frouxo (TCF). Observamos a presença de vasos sanguíneos (V) e de material implantado (BMP-HA).

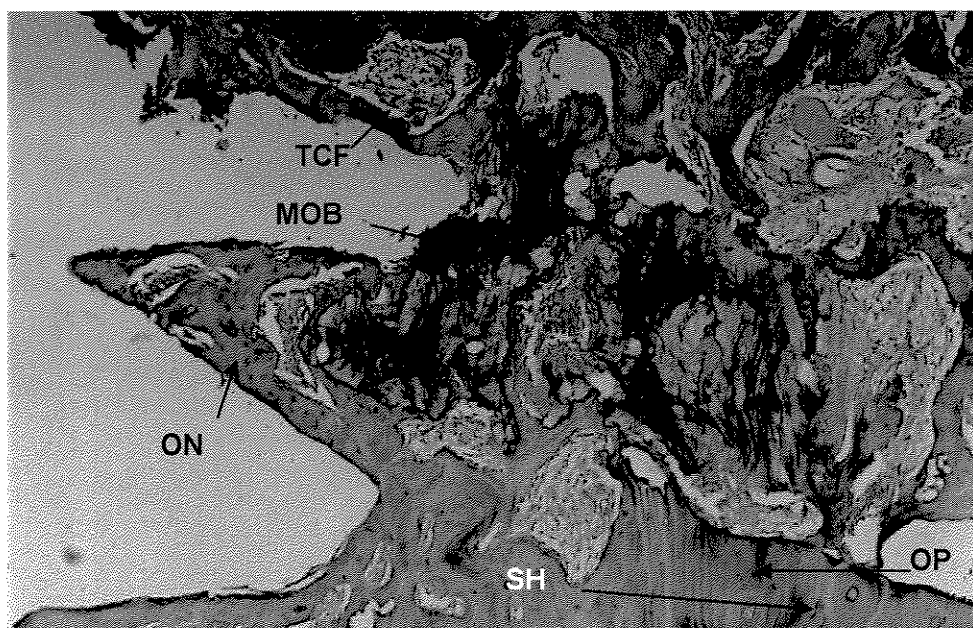


FIGURA 22. (25X) Grupo MOB – 21 dias pós-operatório. Tecido ósseo neoformado (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) em seus espaços lacunares. Observamos a presença de material enxertado (MOB). Na região mais inferior notamos osso pré-existente (OP) com seus sistemas de Havers (SH).

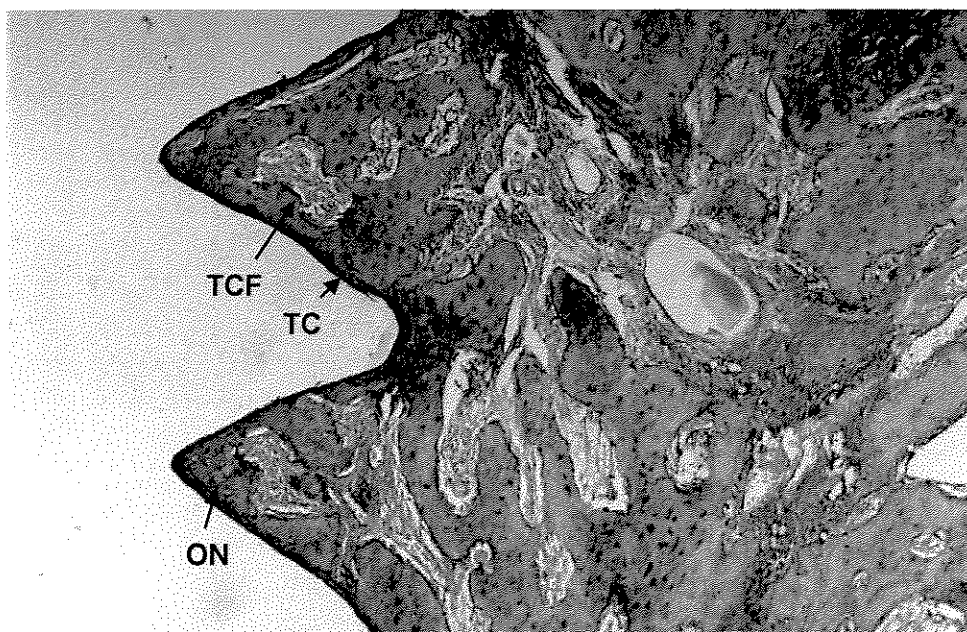


FIGURA 23. (25x) Grupo AUT – 21 dias pós-operatório. Presença de tecido ósseo neoformado (ON), contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) em seus espaços lacunares. Notamos uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso (TC) junto à interface osso/implante.

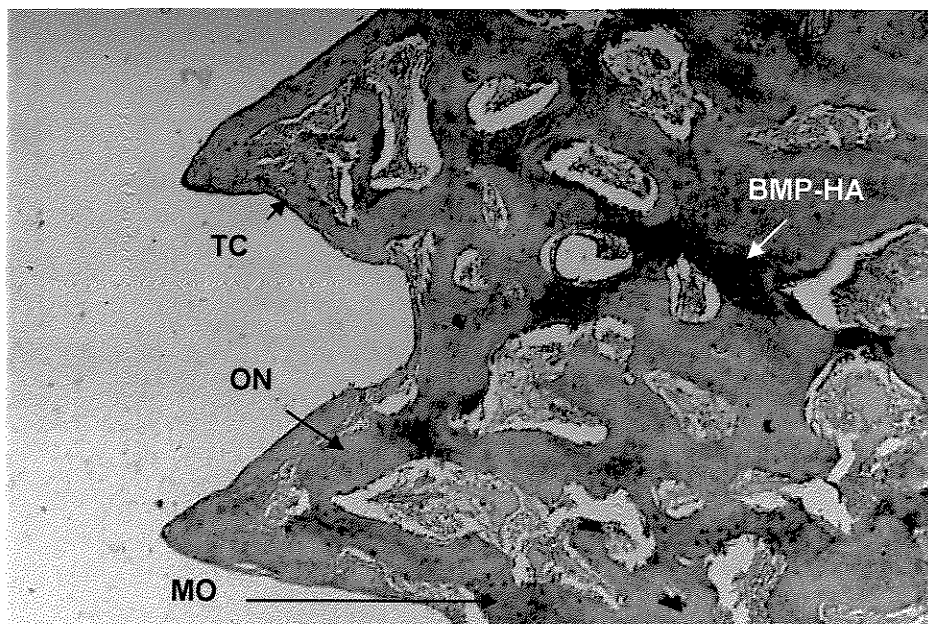


FIGURA 24. (25x) Grupo BMP - 21 dias pós-operatório. Tecido ósseo neoformado (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) e material osteóide (MO) em seus espaços lacunares. observamos a presença de material enxertado (BMP-HA).

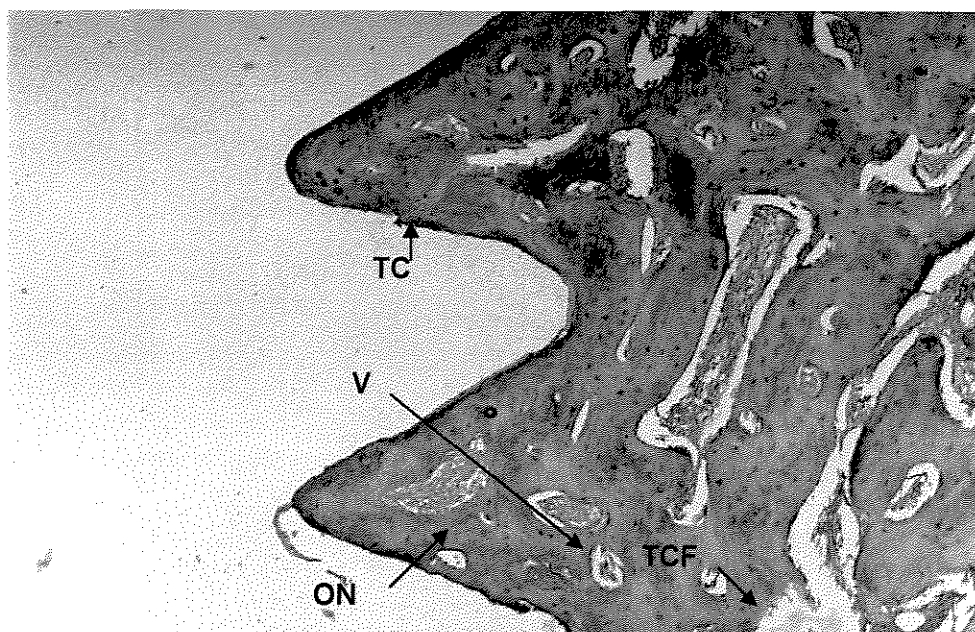


FIGURA 25. (25x) Grupo MOB - 21 dias pós-operatório. Presença de tecido ósseo neoformado (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF) e vasos sangüíneos (V) em seu interior. Junto á interface osso implante verificamos a existência de uma delgada lâmina de tecido conjuntivo fibroso (TC).

5.1.2. PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO DE 42 DIAS

Os cortes histológicos apresentaram amostras em que foi possível observar um espessamento da região periosteal, com limites indefinidos entre as camadas de tecido conjuntivo e do periósteo, porém de espessura menor quando comparado ao período anterior.

Os defeitos apresentavam-se totalmente preenchidos por trabéculas ósseas neoformadas com características de maior maturidade quando comparadas ao período anterior e, demonstrando um padrão mais compacto e com espaços lacunares mais reduzidos, embora ainda fosse possível observar a presença de tecido conjuntivo frouxo e vasos sangüíneos em seus interiores e, osteoblastos na periferia das trabéculas (FIG. 26, 27, 28, 29, 30).

Notamos que quanto mais próximo a porção externa do defeito, o trabeculado ósseo neoformado apresentava seus espaços lacunares contendo maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo (FIG. 31).

Observamos entre o trabeculado ósseo neoformado algumas partículas do material enxertado (osso autógeno), sendo substituídas pela neoformação óssea (FIG. 32).

Junto à interface osso/implante observamos a presença de tecido ósseo neoformado com características mais maduras, apresentando padrão mais compacto quando comparado ao período anterior e, de superfície ondulada devido aos sulcos em “V” do implante. Na região de contato com o implante observamos a presença de uma delgada lâmina de tecido conjuntivo fibroso (FIG. 33, 34).

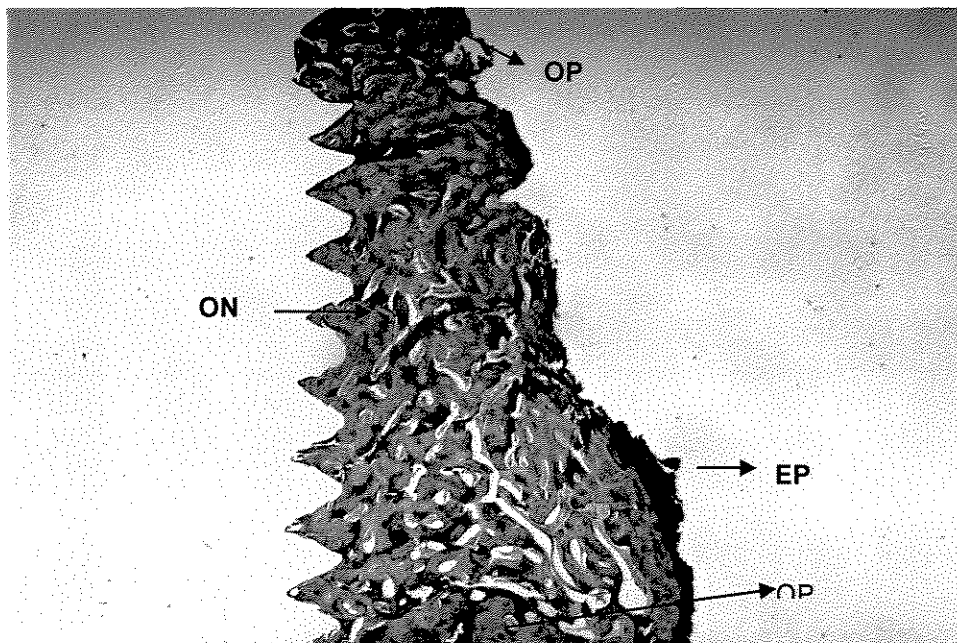


FIGURA 26. (4x) Grupo AUT - 42 dias pós-operatório. Visão panorâmica. Notamos espessamento periosteal (EP). Presença de tecido ósseo neoformado (ON) no defeito, tecido ósseo preexistente (OP).

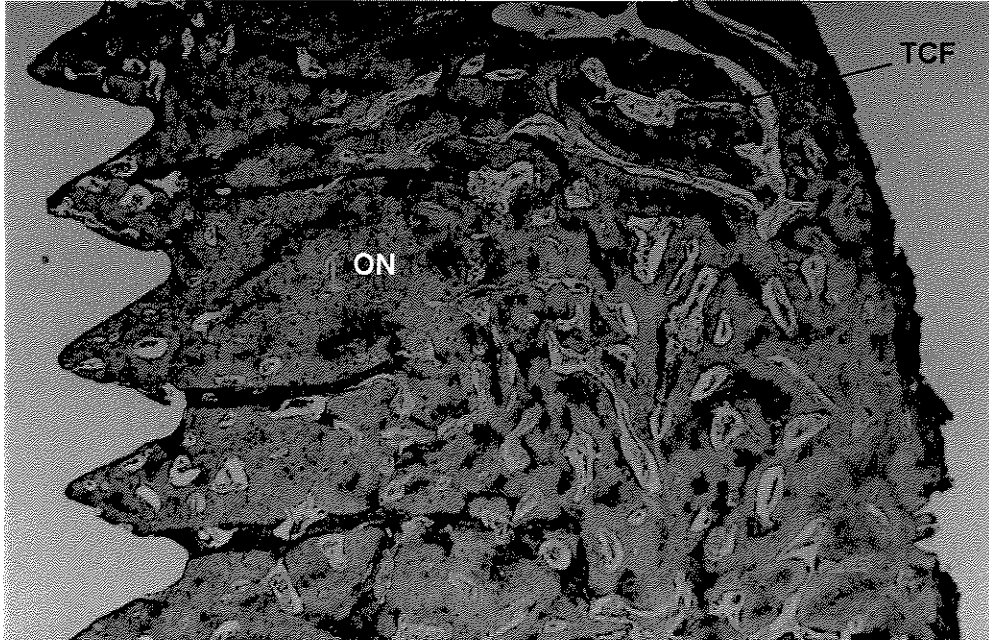


Figura 27. (25x). Grupo AUT - 42 dias pós-operatório. Presença de osso neoformado (ON) com tecido conjuntivo frouxo no seu interior (TCF).

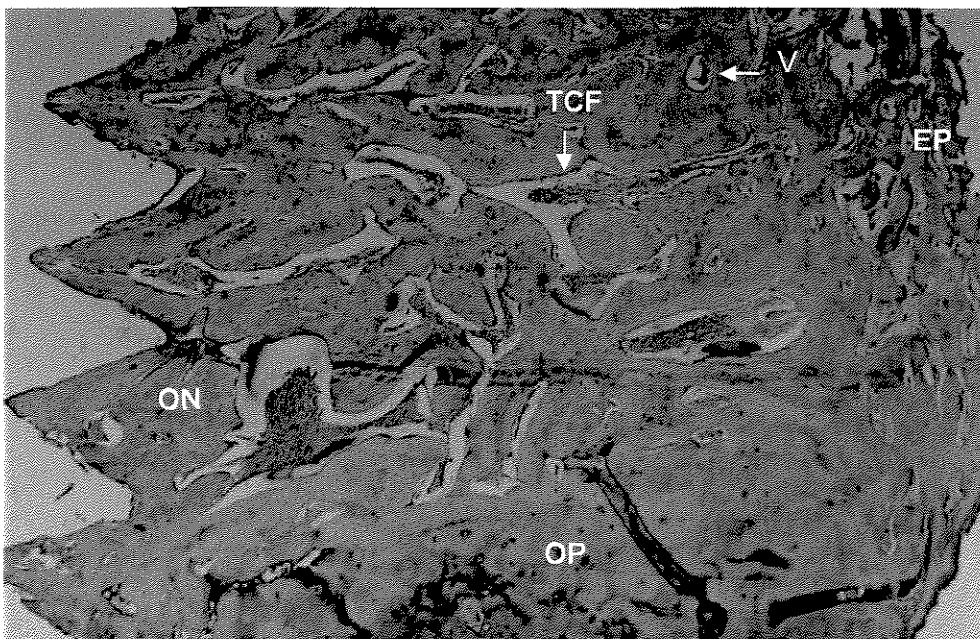


FIGURA 28. (10x). Grupo BMP - 42 dias pós-operatório. Espessamento da região periosteal (EP). Tecido ósseo neoformado (ON). Osso preexistente (OP). Observamos a presença de tecido conjuntivo frouxo (TCF) e vasos sangüíneos (V), no trabeculado ósseo.

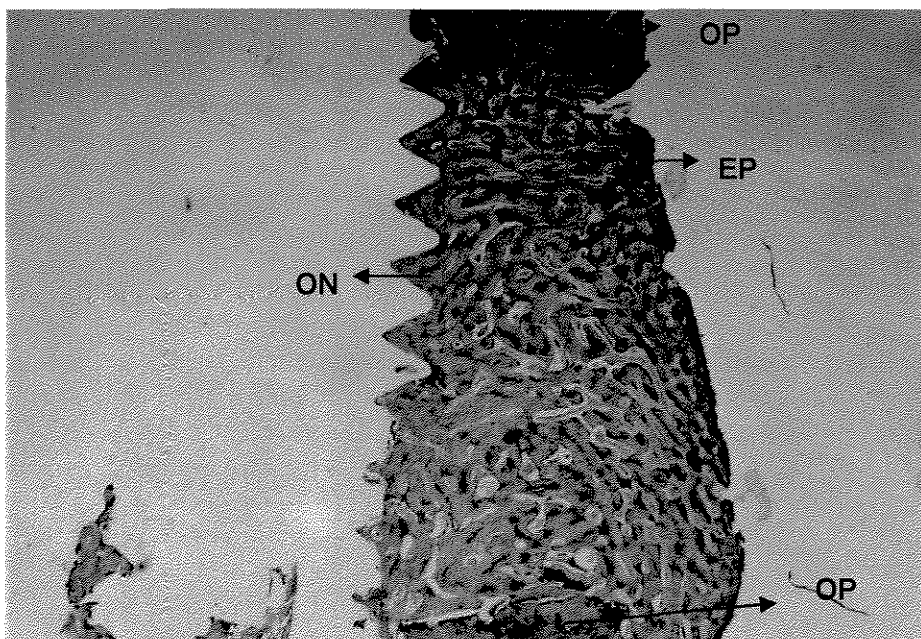


FIGURA 29. (4x) Grupo MOB - 42 dias pós-operatório. Visão panorâmica. Espessamento entre camadas de tecido e periósteo (EP). Preenchimento com osso neoformado (ON), junto a interface osso/implante, com características de maior maturidade. Osso preexistente (OP).

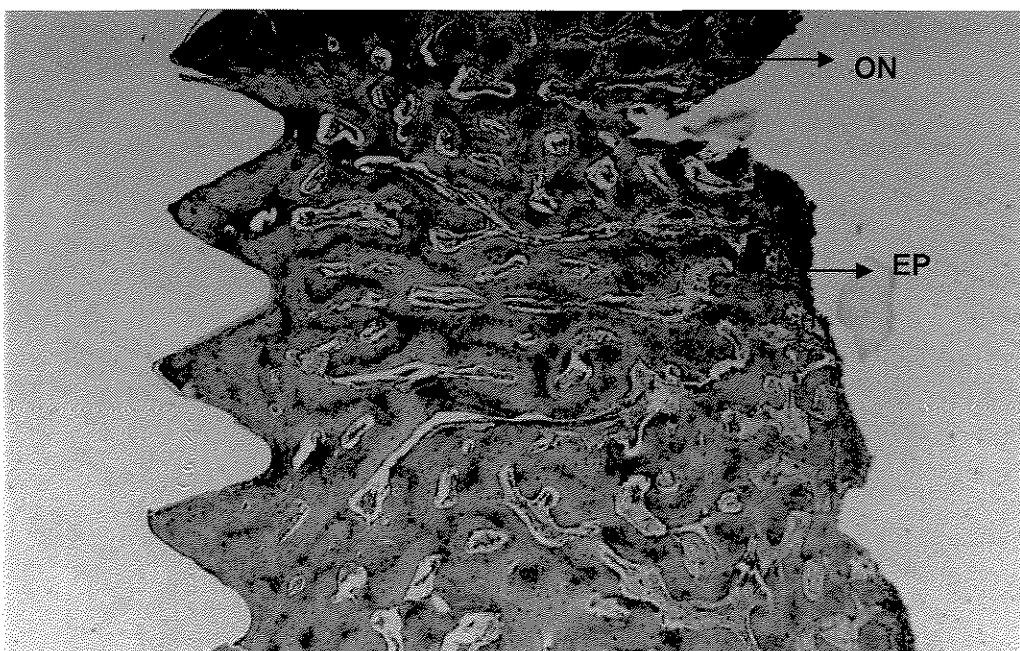


FIGURA 30. (10x). Grupo MOB - 42 dias pós-operatório. ON- neoformação óssea. EP- Espessamento periosteal.

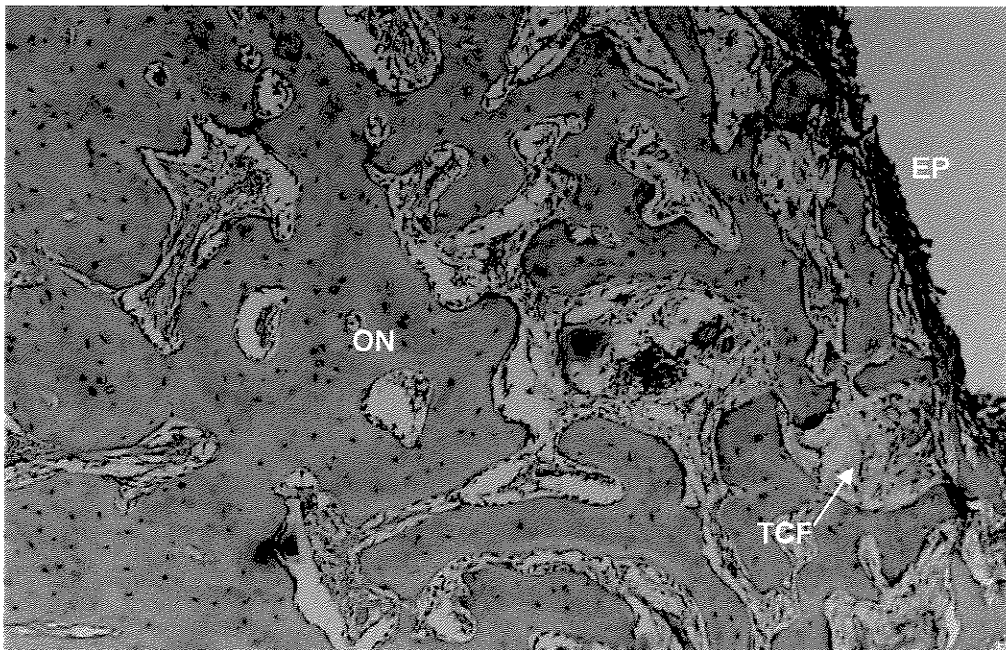


FIGURA 31. (25x) Grupo BMP - 42 dias pós-operatório. Observamos espaços lacunares do osso neoformado (ON) contendo tecido conjuntivo frouxo (TCF).

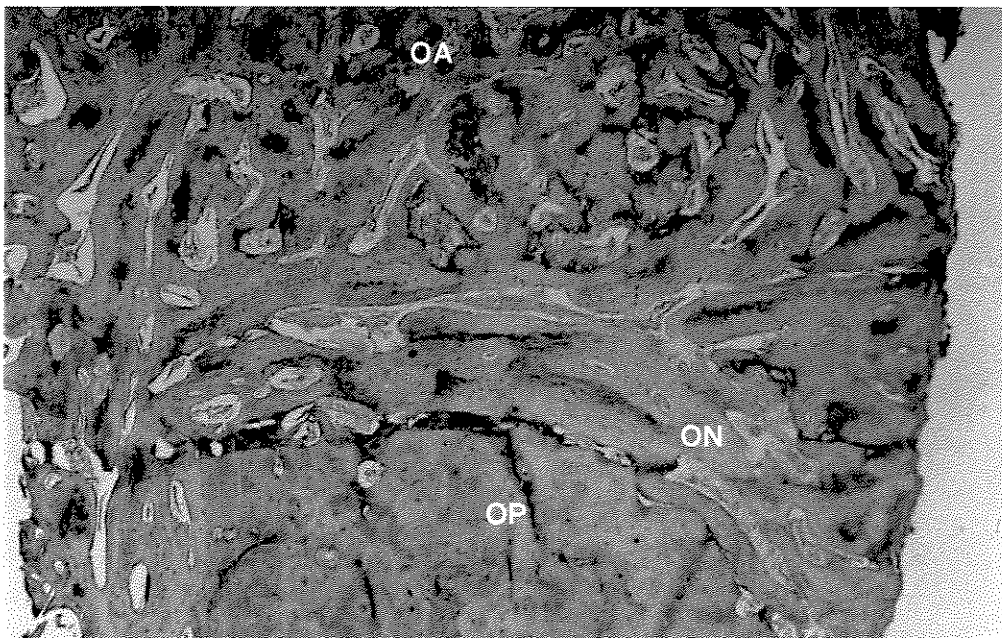


FIGURA 32. (25x). Grupo AUT - 42 dias pós-operatório. Note presença de osso neoformado preenchendo o defeito. Osso preexistente (OP), e osso autógeno enxertado (OA).



FIGURA 33. (25x). Grupo AUT - 42 dias pós-operatório. Presença de tecido ósseo neoformado (ON), apresentando junto à interface osso/implante uma delgada lâmina de tecido conjuntivo fibroso (TC). No trabeculado ósseo observamos partículas de osso enxertado, sendo substituído por neoformação óssea (OA).

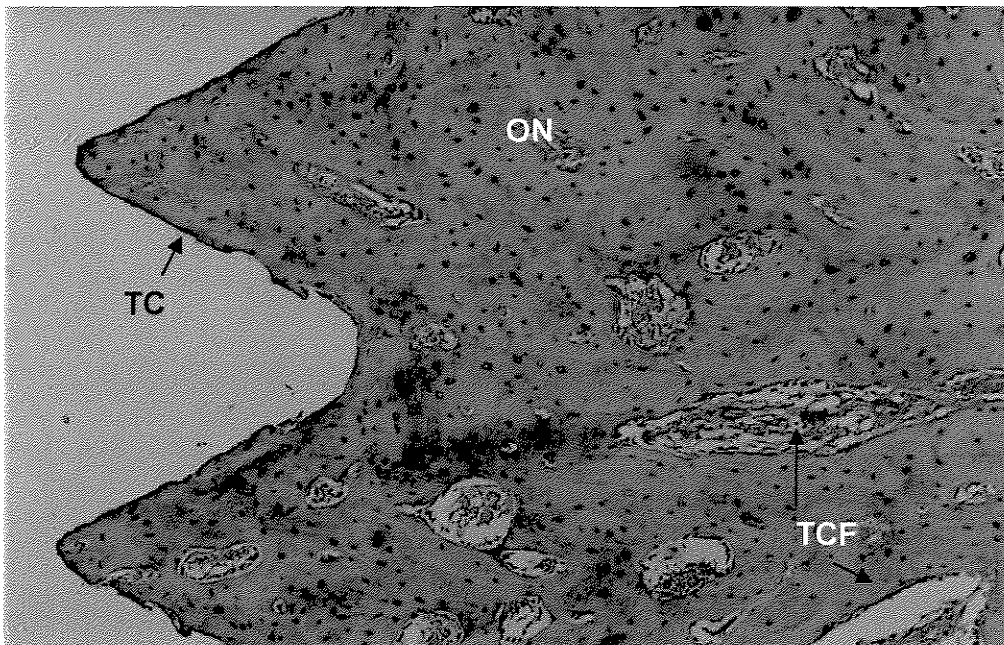


FIGURA 34. (25X) Grupo BMP - 42 dias pós-operatório. Junto a interface notamos osso neoformado (ON), com tecido conjuntivo frouxo (TCF), nos espaços lacunares e presença de delgada camada de tecido conjuntivo fibroso (TC).

5.2. ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Foi tirada uma média aritmética dos dados da análise histométrica de três lâminas para cada implante, a fim de diminuir a influência de erros de técnica histológica e contagem histométrica. A partir desses dados procedeu-se a análise estatística (ANEXOS 2 E 3).

Uma vez detectados indícios para se utilizar a análise de variâncias, partiu-se para o quadro de análise de variâncias e os respectivos testes de hipóteses apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Quadro de análise de variâncias adequado para um experimento casualizado em blocos com arranjo fatorial do fator tratamento e do fator períodos.

Causa de variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados médios	Estatística F	valor-p
Blocos(Períodos)	2	45.814815			
Tratamentos	2	190.527778	95.263889	7.11	0.0062**
Períodos	1	2128.166667	2128.166667	158.81	<.0001**
Tratamentos*Períodos	2	188.694444	94.347222	7.04	0.0064**
Residuo	16	214.407407	13.400463		
Total corrigido	23	2767.611111			
Coeficiente de determinação (R^2): 92,25%		Coeficiente de Variação (CV): 7,91			

A análise da tabela se iniciou pelos parâmetros que permitiram avaliar a validade do modelo. O coeficiente de determinação (R^2) indicou que 92,25% da variação de neoformação óssea (nfo) foram explicadas pelo modelo o que nos deu indícios de um excelente ajuste do modelo aos dados.

Todas as causas de variação não controladas (erros experimentais) foram responsáveis por menos de 10% da variação dos dados, o que é um excelente resultado.

O Coeficiente de Variação (C.V.) indicou que a relação entre o desvio padrão e a média é inferior a 10%, um valor muito baixo e que nos deu indícios da validade dos processos de comparação de médias.

Em seguida, analisamos o valor-p que deve ser comparado com o nível de significância previamente estabelecido, neste caso, com 5%.

Especificamente no caso da Tabela 1, foram encontrados indícios que conduzem à rejeição das três hipóteses de nulidade testadas e, neste caso, deve-se efetuar o desdobramento das análises de um fator dentro do outro já que as conclusões gerais não são válidas.

Uma vez detectados indícios para a rejeição da hipótese de nulidade do fator material ou da interação, aplicamos um teste para comparações múltiplas de médias que permitam definir quais foram as médias que efetivamente diferem entre si.

Dentre estes testes, um foi selecionado “a priori” e um teste recomendado para fatores com um número pequeno de níveis é o teste de Tukey.

Ao se definir a construção de um teste de Tukey deve ser especificado um nível de significância. Neste estudo, foi considerado um nível de significância alfa de 5% ($\alpha=0,05$).

A Tabela 2 complementa a análise através de um teste para comparações múltiplas de médias, neste caso foi eleito o teste de Tukey como o mais apropriado.

Tabela 2. Médias, desvio padrão, desvio padrão da média e intervalos de confiança de Neoformação óssea (nfo) calculados com base nos dados originais e teste de Tukey com nível de significância alfa de 5% ($\alpha=0,05$) para comparações múltiplas de médias de Períodos dentro dos tratamentos.

Tratamento	Periodo	Média	Desvio padrão	Desvio padrão da média	Limites do intervalo de confiança da média (95%)		Grupos de Tukey
AUT	21	37.917	4.954	2.477	45.800	30.033	A
	42	51.417	2.846	1.423	55.946	46.887	B
BMP	21	42.000	4.363	2.182	48.943	35.057	A
	42	58.417	4.606	2.303	65.745	51.088	B
MOB	21	30.583	2.515	1.257	34.585	26.582	A
	42	57.167	2.742	1.371	61.530	52.804	B
<i>Médias com letras iguais não diferem entre si</i>							

O teste de Tukey nos permitiu concluir que a média verdadeira de Neoformação óssea (nfo) no tempo 42 é significativamente superior à média de nfo do período 21, conforme ilustra o Gráfico 1.

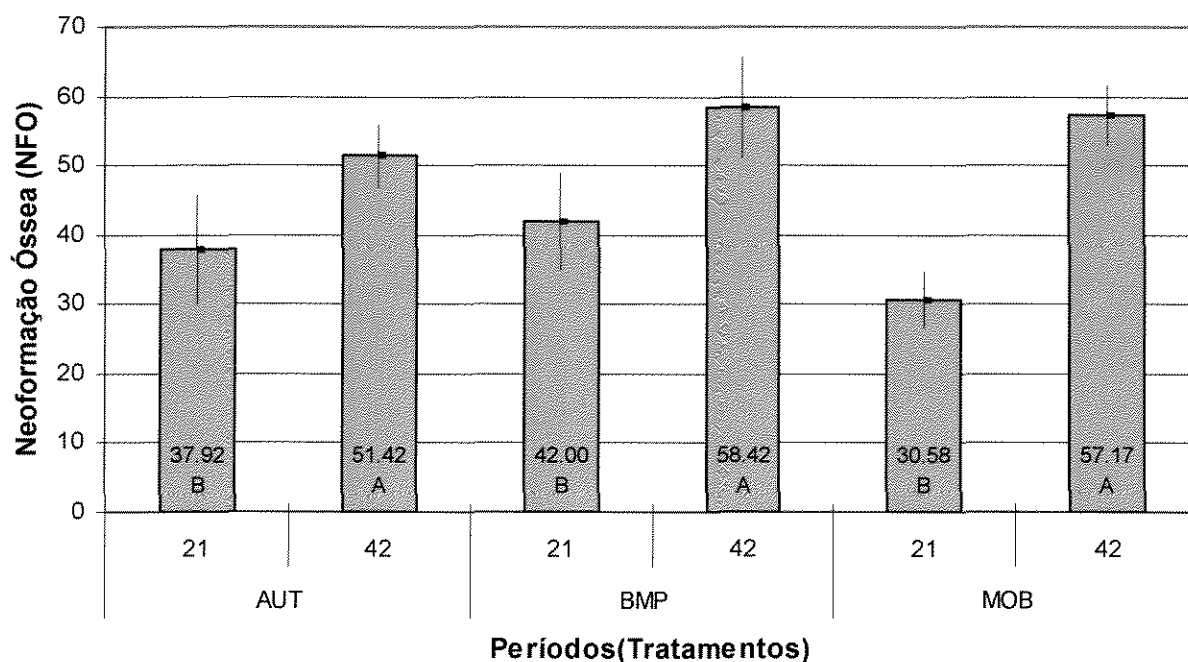


Gráfico 1. Comparação de médias e intervalos de confiança de Neoformação Óssea (nfo) nos diferentes períodos estudados. Barras com letras iguais indicam médias verdadeiras de NFO que não diferem entre si dentro de um mesmo tratamento, pelo teste de Tukey com nível de significância alfa de 5% ($\alpha = 0,05$).

No período pós-operatório de 42 dias a avaliação histológica revelou preenchimento ósseo de todos os defeitos perimplantares, com maior maturação óssea, nos três grupos estudados. A avaliação histométrica revelou um maior índice de neoformação óssea no período de 42 dias, com diferença estatística significativa para os três grupos, quando comparados aos resultados do primeiro período. Além de evidenciar maior índice de neoformação óssea para o grupo BMP, quando comparado aos outros grupos neste período, porém sem diferença estatística significativa.

Também houve necessidade de se comparar o efeito de tratamento dentro do fator Período, e o resultado é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Médias, desvio padrão, desvio padrão da média e intervalos de confiança de Neoformação óssea (nfo) calculados com base nos dados originais e teste de Tukey com nível de significância alfa de 5% ($\alpha=0,05$) para comparações múltiplas de médias de Tratamentos dentro dos Períodos.

Período	Tratamento	Média	Desvio padrão	Desvio padrão da média	Limites do intervalo de confiança da média (95%)		Grupos de Tukey
21	AUT	37.917	4.954	2.477	45.800	30.033	A B
	BMP	42.000	4.363	2.182	48.943	35.057	A
	MOB	30.583	2.515	1.257	34.585	26.582	B
42	AUT	51.417	2.846	1.423	55.946	46.887	A
	BMP	58.417	4.606	2.303	65.745	51.088	A
	MOB	57.167	2.742	1.371	61.530	52.804	A
<i>Médias com letras iguais não diferem entre si</i>							

O teste de tukey dos tratamentos dentro dos períodos nos deu indícios de diferença entre as médias de neoformação óssea (nfo) dos níveis BMP e MOB dentro do período pós-operatório de 21 dias

O Gráfico 2 ilustra a comparação de médias da Tabela 3.

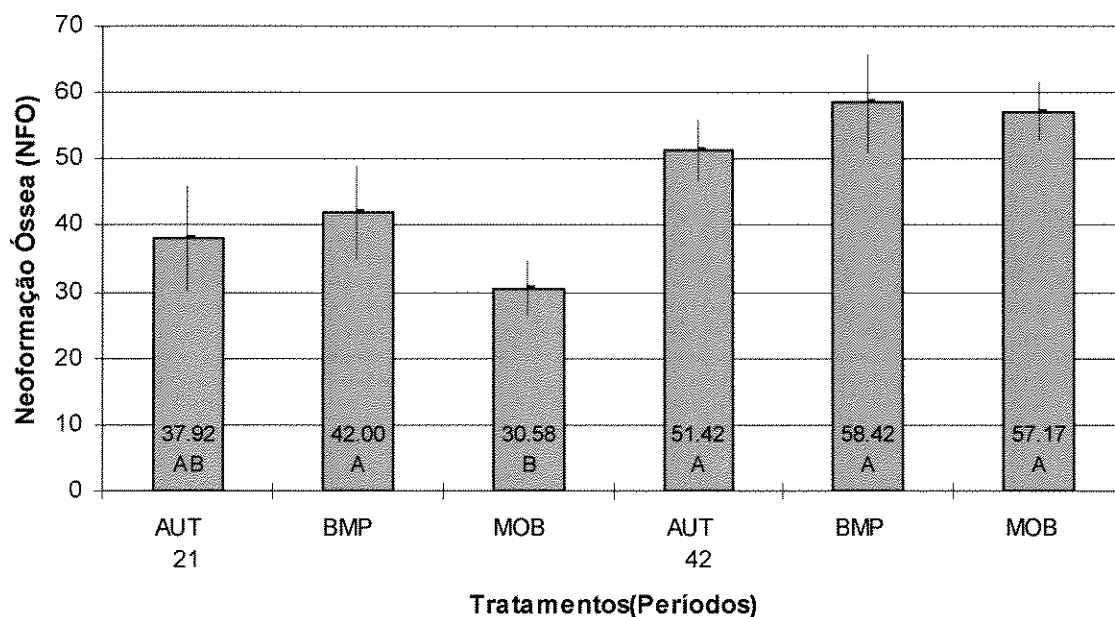


Gráfico 2. Comparação de médias e intervalos de confiança de Neoformação Óssea (nfo) nos diferentes tratamentos estudados. Barras com letras iguais indicam tratamentos cujas médias verdadeiras de NFO não diferem entre si dentro de um mesmo período pelo teste de Tukey com nível de significância alfa de 5% ($\alpha=0,05$).

No período de 21 dias pós-operatório, a avaliação histológica revelou que houve preenchimento ósseo de todos os defeitos perimplantares, dos três grupos estudados. A avaliação histométrica revelou um maior índice de neoformação óssea para o grupo BMP, porém com diferença estatística somente em relação ao grupo MOB. No período de 42 dias pós-operatório ao grupo BMP também apresentou maior índice de neoformação óssea, porém sem diferenças estatisticamente significantes.

O estudo de regressão permitiu o desenvolvimento de um modelo matemático que representa a associação entre a variável de resposta Neoformação Óssea (nfo) e a variável preditora Período.

Da mesma forma que o teste de Tukey teve que sofrer um processo de desmembramento, também a regressão linear simples (indicada em vista de somente existirem dois pontos), foi feita de maneira desmembrada.

O Gráfico 3 ilustra a análise de regressão linear.

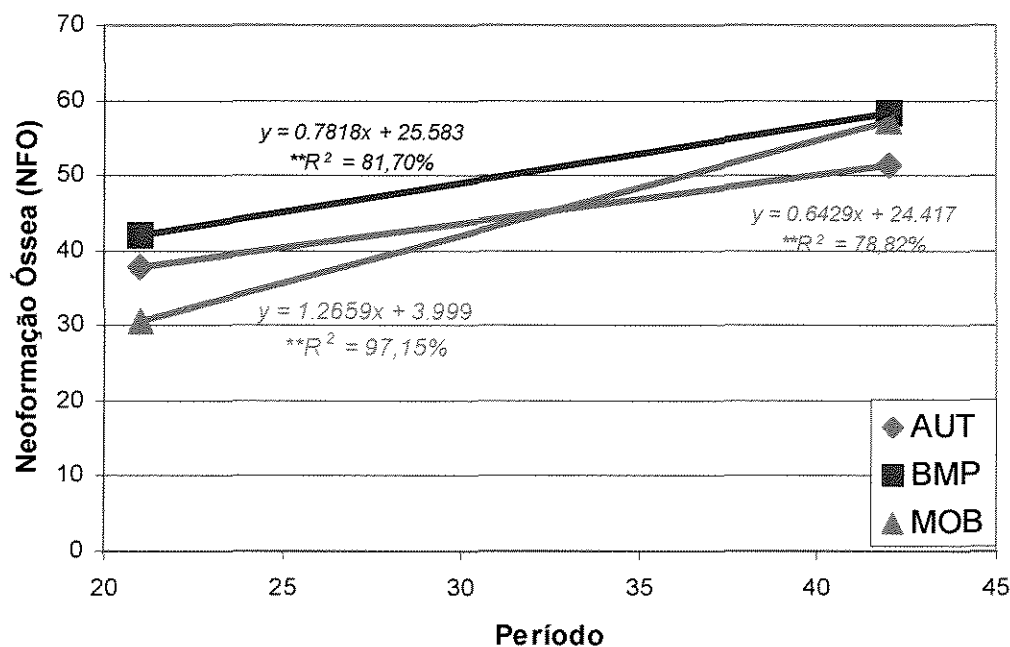


Gráfico 3. Estudo de regressão polinomial da Neoformação Óssea (NFO) em função dos Períodos estudados.

6. DISCUSSÃO

Visto que os defeitos ósseos perimplantares são um achado frequente e podem levar ao comprometimento do implante (MELLONIG & NEVINS, 1995), a proposta deste estudo foi realizar uma análise comparativa, entre dois materiais substitutos ósseos e osso autógeno, histológica e histométrica, do tratamento de defeitos perimplantares tipo fenestração, criados cirurgicamente em cães, através da técnica de regeneração óssea guiada.

Em nosso trabalho foi avaliada a regeneração óssea de defeitos do tipo fenestração por se tratarem de defeitos comuns no ato da instalação de implantes, quando a espessura do rebordo é insuficiente. No presente estudo avaliou-se a interferência de matriz óssea bovina desmineralizada e da proteína óssea morfogenética, como substitutos ósseos, no processo de regeneração óssea guiada em defeitos perimplantares do tipo fenestração, realizados em tíbias de cães. Para tanto usamos osso autógeno como grupo controle, por sabermos da sua capacidade de osteogênese, sendo considerado o material de maior previsibilidade (AL RUHAIMI, 2001). Partindo deste princípio, consideramos, que a avaliação comparativa do composto BMP-HA e MOB e sua efetividade como substitutos ósseos como material de preenchimento, é mais esclarecedora se comparada ao próprio osso autógeno, ao qual estes biomateriais visam substituir, do que se comparada a coágulo.

Na literatura os defeitos tipo fenestração são preferencialmente tratados por associação de preenchimento do defeito e sua cobertura com membranas. Nos estudos experimentais é importante a criação e manutenção do espaço pelo tempo necessário para a regeneração óssea (GRAY & HANCOCK, 1998; SPAGNOLI *et al.*, 2001). Assim foi realizado no nosso experimento, e a associação de preenchimento e membrana de colágeno demonstrou-se capaz de manter o espaço necessário, para a regeneração óssea dos defeitos criados.

Para evitar as desvantagens já citadas (TAWIL *et al.*, 2001), das membranas não reabsorvíveis, utilizamos membranas reabsorvíveis de colágeno, que apresentou os pré-requisitos de ser reabsorvível, não causar reação de corpo estranho, também já citados (GOTTLOW, 1993; MELLONING & TRIPLETT, 1993).

LOPES (1999) testou o uso de membrana de colágeno e celulose na regeneração óssea guiada de defeitos perimplantares criados em tibia de cão, com metodologia muito similar a do presente estudo. Obteve como resultado, que a membrana de colágeno promoveu R.O.G., com índice de neoformação óssea maior que a membrana de celulose e do que o grupo controle (somente defeito). Este resultado confirma o favorecimento do princípio da osteopromoção, pelo uso da membrana de colágeno, neste modelo experimental.

Neste experimento a membrana não foi identificada, histologicamente, em nenhuma das amostras analisadas, nos dois períodos pós-operatórios. Este fato, provavelmente ocorreu pela interação tecidual entre o material e o retalho. Do ponto de vista clínico esta interação é importante para atenuar micromovimentos da membrana, que poderiam interferir negativamente na neoformação óssea e/ou aumentar os riscos de exposição da membrana, o que poderia repercutir negativamente nos índices de regeneração óssea guiada. (MELLONIG & NEVINS, 1995).

Esta propriedade do colágeno de integrar ao tecido se deve à ação quimiotática, que o mesmo exerce sobre os fibroblastos, provocando a migração de células sobre a barreira (TAWILL *et al.*, 2001). Além desta explicação para a não visualização da membrana, também podemos aceitar que a membrana tenha sofrido reabsorção ou mesmo tenha sido deslocada juntamente ao periósteo durante a obtenção dos segmentos ósseos, para processamento histológico.

Todos os defeitos foram protegidos com o mesmo tipo de membrana com o intuito de compararmos unicamente o efeito do preenchimento sobre o processo de regeneração óssea guiada, sem a interferência da natureza da barreira física.

Num trabalho de metodologia similar a esta, RABÊLO (2001) realizou um estudo comparativo de preenchimentos ósseos sobre o processo de R.O.G.

em defeitos perimplantares do tipo fenestração, em fêmur de coelhos. Os defeitos foram preenchidos de acordo com o grupo estudado, com vidro bioativo (grupo Perioglas), matriz óssea humana liofilizada (grupo Dembone), osso autógeno (grupo osso) e preenchimento por coágulo (grupo coágulo). Todos os defeitos foram protegidos com membrana de celulose. Os animais foram sacrificados em períodos de 3 e 6 semanas. Dados histométricos revelaram melhores resultados de neoformação óssea nos grupos Dembone e osso. Este resultado, demonstra que os grupos que receberam preenchimento apresentaram melhores índices de neoformação óssea, do que o controle (somente coágulo), e isto nos dá indícios de que em nosso experimento os índices de neoformação óssea se devem aos tratamentos aplicados e não a capacidade regenerativa das lesões criadas.

Nossos resultados da análise histológica revelaram total preenchimento ósseo dos defeitos, nos três grupos do experimento, ou seja, tanto para o preenchimento dos defeitos com osso autógeno, como para BMP e para MOB, indo ao encontro dos dados encontrados na literatura (MASSIMO *et al*, 1997; UEDA *et al*, 1999). No período pós-operatório de 21 dias a avaliação histológica revelou preenchimento ósseo de todos os defeitos perimplantares, com maior maturação óssea, no período pós-operatório de 42 dias, nos três grupos estudados e a avaliação histométrica revelou um maior índice de neoformação óssea no período de 42 dias, com diferença estatística significativa para os três grupos, quando comparados aos resultados do primeiro período. Além disso ainda

havia existência de espaços medulares e disposição superficial dos osteoblastos indicando que a atividade osteogênica continuava presente. Estes aspectos histológicos, embasados nos trabalhos de LINDE *et al.* (1993), nos permite afirmar que o período de seis semanas pode ter sido insuficiente para que observássemos a completa regeneração óssea.

Outro aspecto relevante da análise histológica foi a presença de tecido conjuntivo fibroso na região da interface osso/implante, que diminuiu de espessura no final do segundo período pós-operatório, sugerindo que sua presença se justifica por termos estudado períodos pós-operatórios curtos para que se observasse a osseointegração. Este fato também foi constatado no trabalho de RABÊLO (2001).

OLIVEIRA *et al.* (1999) avaliaram a mesma marca comercial de MOB utilizada neste estudo. Concluíram que o osso cortical bovino desproteínizado promove uma resposta tecidual semelhante à implantação de osso autógeno, podendo portanto, ser usado como material de preenchimento ósteo-substituto e como carreador das proteínas morfogenéticas do osso.

No período pós-operatório de 21 dias a avaliação histométrica revelou um maior índice de neoformação óssea para o grupo BMP, porém com diferença estatística somente em relação ao grupo MOB. Também foi observada uma maior variação dos índices de neoformação óssea, dentro dos períodos de sacrifício,

para o grupo MOB, que no primeiro período apresentou o menor índice, mas ao final do período de 42 dias, superou o grupo controle e se igualou ao grupo BMP. Este resultado pode sugerir atividade osseoindutora da BMP e osso autógeno no período inicial, causando maior neoformação óssea neste período.

Os resultados histométricos deste trabalho também evidenciaram maior índice de neoformação óssea para o grupo BMP, quando comparado aos outros grupos no período pós-operatório de 42 dias, porém sem diferença estatística significativa. Indo ao encontro dos resultados encontrados por UEDA (1999), que constatou uma justaposição íntima do osso neoformado à superfície de implantes em que tratou defeitos tipo fenestração, com o mesmo composto BMP-HA, que utilizamos, e concluiu que o composto BMP-HA apresenta excelente comportamento biológico como agente osseoindutor e que a hidroxiapatita microgranular utilizada possui características viáveis de ser carreador da BMP na neoformação óssea.

7. CONCLUSÃO

A avaliação histológica e histométrica do tratamento de defeitos ósseos perimplantares tipo fenestração, através da utilização de matriz óssea bovina desmineralizada e proteína óssea morfogenética, associadas a técnica de regeneração óssea guiada, com membranas reabsorvíveis, diante da metodologia empregada, permite afirmar que:

1. A Proteína óssea morfogenética induziu maior neoformação óssea no período inicial do reparo (21 dias) do que a matriz óssea bovina desmineralizada.
2. A Proteína óssea morfogenética e a matriz óssea bovina desmineralizada empregadas comprovaram sua eficiência como substitutos ósseos, uma vez que apresentaram resultados similares ao osso autógeno.
3. O índice de neoformação óssea no período de 42 dias foi superior com diferença estatística significativa para os três grupos, quando comparados aos resultados do primeiro período.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADELL R. *et al.* A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v. 10, n. 6, p. 387-416, Dec. 1981.

ALBREKTSSON T. *et al.* Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthop Scand**, Oslo, v. 52, n. 2, p.155-70, 1981.

AL RUHAIMI K.A. Bone Graft substitutes: A comparative Qualitative Histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 16, n. 1, p. 105-114, 2001.

BARBOSA E.P. *et al.* Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 bone regeneration. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 8, n. 134, p. 360–367, 1999.

BECKER W. *et al.* A comparison of e-PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1 or demineralized freeze drier bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J Periodont**, Chicago, v. 63, n. 11, p. 929-940, nov. 1992.

BECKER W. *et al.* Human demineralized freeze-dried bone: Inadequately induced bone formation in athymic mice. **J Periodontol**, Chicago, v. 66, p. 822-832, 1995.

*Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BESSHO *et al.* Comparison of bone Matrix-Derived Bone morphogenetic proteins from various animals. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 50, p. 360–367, 1999.

BRÅNEMARK, P.I. *et al.* Intra –osseous anchorage of dental prothesis. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v. 3, p. 81-100, 1969.

BRÅNEMARK, P.I. *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10–year period. **Scand J Plast Reconstr Surg**, Stockholm, v. 11 (supplement, 16), 1977.

BRUNSKI J.B. *et al.* The influence of functional use of endosseous dental implants on the tissue-implant interface. II Clinical aspects. **J Dent Res** Washington, v. 58, n. 10, p. 1970-1980, 1979.

COLE B.J. *et al.* Use of Bone Morphogenetic Protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. **Clin Orthop**, Philadelphia, v. 345, p. 219-288, 1997.

COVEY D.C., ALBRIGHT J.A. Clinical induction of bone repair with demineralized bone matrix or a bone morphogenetic protein, **Orthop Rev**, Lawrenceville, v. 18, p. 857-863, 1989.

DAHLIN C.A. *et al.* Treatment of Fenestration and Dehiscence Bone Defects Around Oral Implants Using the Guided Tissue Regeneration Technique: A Prospective Multicenter Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 10, n. 3, p 312-318, 1995.

DAHLIN, C.A. Origem Científica da Regeneração óssea guiada. In: **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: São Paulo, 1996, cap. 2, p. 31-48.

GLOWACKI J., MULLIKEN J.B. Demineralized bone implants, **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 12, p. 223-241, 1985.

GOTTLOW, J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-reabsorbable devices: Initial healing and long term results. **J Periodontol**, Chicago, v. 64, p. 1157-1165, 1993.

GRAY J.L; HANCOCK E.B. Guided tissue regeneration. Non surbable. **Dent Clin North America**, Philadelphia, v. 42, p. 523, 1998.

HALLY A. *et al.* A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. **Quarterly J Microsc Sci**, v. 105, p. 503, 1964. *Apud* MANDARIM, C.A.L. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Eduerj, 1995. cap 3, p. 86.

HÄMMERLE C.H.F. *et al.* The effect of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. **Clin Oral Impl Res** Copenhagen, n. 9, p. 151-162, 1998.

HÜRZELER M.B.; STRUB J. R. Guidede bone regeneration around exposed implants: A new bioresorbable device and bioresorbable membrane pins. **Pract Periodontics Aesthet Dent**, New York, v. 7, n 9, p. 37-47, 1995.

KARRING T. *et al.* Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **J Clin Periodont**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 96-105, feb. 1980.

LINDE, A. *et al.* Creation of new bone by na osteopromotive membrane technique: na experimental study in rats. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 51, n. 8, p. 892-897, Aug. 1993.

LOPES M.C. A. Avaliação da efetividade das membranas de colágeno e celulose no tratamento de defeitos ósseos tipo fenestração associados a implantes dentais. Análise Histológica, Histométrica e Biomecânica em cães. Piracicaba, 1999.136p. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas.

MASSIMO S. *et al.* Treatment of Dehiscences and Fenestrations Around Dental Implants Using Resorbable and Nonresorbable Membranes Associated With Bone Autografts: A Comparative Clinical Study **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 12, n. 2, p. 159–167, 1997.

MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodont**, Chicago, v. 47, n. 5, p. 256-260, 1976.

MELLONING J.; NEVINS M. Guided bone regeneration of bone defects associated withimplants: An evidence-based outcome assessment **Int J Periodont Rest Dent**, Chicago, v.15, n. 2, p.169-185, 1995.

MELLONING, J.; TRIPLETT, R.G. Guided bone regeneration and endosseous dental implants. **Int J Periodont Rest Dent**, Chicago, v.13, p. 109-119, 1993.

MIKI, T. *et al.* Effect of freeze-dried poly-L-lactic acid discs mixed with bone morphogenetic protein on the healing of rat skull defects.

J Oral Maxillofac Surg, Philadelphia, v. 52, p. 387–391, 1994.

MISCH C.; DIETSH F. Bone grafting materials in implant dentistry.

Implant Dentistry, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.

MISCH C. E.: **Implantes Dentários Contemporâneos**.(ed 2) São Paulo, Santos. p. 452-455, 2000.

MISCH C E. Reações do osso às cargas mecânicas. In: RIGSBY D F, BIDEZ MW, MISCH C E; **Implantes Dentários Contemporâneos**.(ed 2) São Paulo, Santos. 2000. p. 317.

MORSE A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J Dent Res**, Washington, v. 24, p. 143-153, 1945.

NYMAN S. *et al.* Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. **J Clin Period**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 394-401, oct. 1980.

OLIVEIRA R.C. *et al.* Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos, **Rev FOB**, Bauru, v. 7, n.3/4, p. 85-93, 1999.

PIATELLI A. *et al.* Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. **Biomaterials**, Oxford, v 17, n. 11, p. 1127-1131, 1996.

PILLIAR R.M. *et al.* Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. **Clin Orthop**, Philadelphia, v.208, p. 108-113, 1986.

RABÊLO L.R.S. Estudo comparativo de preenchimentos ósseos sobre o processo de regeneração óssea guiada em defeitos perimplantares. Análise histológica e histométrica em fêmur de coelhos. Piracicaba, 2001. 127p. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial) Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas.

ROMINGER J.W., TRIPLETT R.G. The use of guided tissue regeneration to improve implant osseointegration. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 54, p. 106-112, 1994.

RUTHEFORD R.B. *et al.* Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 7, n. 3, p. 297-301, jul. 1992.

SAILRER H.F. Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in craniomaxillo-facial surgery. BMP in compromised surgical reconstructions using titanium implants. **J Cranio-Maxillo-facial Surg**, Livingston, v. 22, p. 2-11, 1994.

SCHENK R.K. Regeneração Óssea: Bases Biológicas. *In: Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia.* São Paulo: São Paulo, cap. 3, p. 49-100, 1996.

SIGURDSSON T.J. Bone morphogenetic protein-2 peri-implant bone regeneration and osseointegration. **Clin Oral Implant Res**, Copenhagen, v. 8, p. 367-374, 1997.

SIMION M. *et al.* Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration: A controlled clinical study. **Int J Periodont Rest Dent**, Chicago, v. 14, p. 199-215, 1994.

SPAGNOLI D.B.; MAZZONETTO R.; MARCHENA J.M. Clinical Procedures currently using bone grafting with guided bone grafting guided tissue regeneration techniques. **Oral Maxillofac surg Clin of North America**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 423-436, 2001.

SUWA F. *et al.* SEM study on microvascular changes following implantation of bone morphogenetic protein combined with hydroxyapatite into experimental bone defects. **J Osaka Dent Univ**, Osaka, v. 32, n. 1, p. 27-34, 1998.

TAWIL *et al.* Clinical Evaluation of bilayered Collagen Membrane (Bio-Gide) supported by autografts in the treatment of bone defects around implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 16, n. 6, p. 857-863, 2001.

TRIPLETT R.G. *et al.* Oral and Maxillofacial Surgery Advances in Implant Dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 15, n. 1, p. 47-55, 2000.

UEDA J.K. Estudo comparativo da substituição óssea, frente a enxertos de proteína morfogenética óssea e osso autógeno, ao lado de implantes de titânio: análise histológica. Bauru, 1999. p. 196. Dissertação (Mestrado em Dentística). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São paulo.

URIST M. R. Bone: Formation by autoinduction. **Science**, Washington, 150:193,1965.

URIST M. R. *et al.* Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop** Philadelphia, v. 59, p. 59, 1968.

URIST M. R. *et al.* Bone Morphogenetic Protein. **J Dent Res**, Washington, v.50, supplement n. 6, p. 1394-1407, 1971.

URIST M. R. *et al.* A bovine low molecularweight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. **Clinical Orthop**, Philadelphia,. v. 162, p. 219-232, 1982.

URIST M.R. *et al.* Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proc. Natl Acad Sci USA**, Washington, v.81, p. 371, 1984.

WANG E.A. *et al.* A recombinant human bone morphogenetic protein induce bone formation. **Proc. Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 87, p. 2220-2224, 1990.

WANG X. *et al.* The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. **J Oral Maxillofac Surg.**, Philadelphia, v. 51, p. 647-651, 1993.

WANG X *et al.* Tissue reactions to titanium implants containing bovine morphogenetic protein: a scanning electron microscopic investigation. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Denmark, v. 23, p. 115-119, 1994.

YAN J *et al.* Early histologic response to titanium implants complexed with bovine bone morphogenetic proteins. **J Prosthetic Dent** , St. Louis, v.71, n. 3, p. 289-293, March 1994.

ZARB G.A., SCHMITT A Edentulous Predicament. I. A Prospective study of the effectiveness of implant supported fixed prosthesis, **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 127, p. 59-72, 1996.

ANEXO 1



84

ANEXO 2

No	CÃO	TÍBIA	GRUPO	PEÇA	COUNT/#
1	1	D	AUT 21	1b	42
2	1	D	AUT 21	1b	40
3	1	D	AUT 21	1b	45
4	1	E	AUT 21	1f	30
5	1	E	AUT 21	1f	32
6	1	E	AUT 21	1f	34
7	2	D	AUT 21	1x	41
8	2	D	AUT 21	1x	42
9	2	D	AUT 21	1x	42
10	2	E	AUT 21	1	33
11	2	E	AUT 21	1	40
12	2	E	AUT 21	1	34
13	1	D	BMP 21	2p	46
14	1	D	BMP 21	2p	41
15	1	D	BMP 21	2p	41
16	1	E	BMP 21	2v	40
17	1	E	BMP 21	2v	33
18	1	E	BMP 21	2v	34
19	2	D	BMP21	2k	42
20	2	D	BMP 21	2k	47
21	2	D	BMP 21	2k	44
22	2	E	BMP 21	2q	43
23	2	E	BMP 21	2q	47
24	2	E	BMP21	2q	46
25	1	D	MOB 21	3i	33
26	1	D	MOB 21	3i	26
27	1	D	MOB 21	3i	29
28	1	E	MOB 21	3c	30
29	1	E	MOB 21	3c	28
30	1	E	MOB 21	3c	25
31	2	D	MOB 21	3r	30
32	2	D	MOB 21	3r	32
33	2	D	MOB 21	3r	35
34	2	E	MOB 21	3g	32
35	2	E	MOB 21	3g	35
36	2	E	MOB 21	3g	32
37	3	D	AUT 42	4j	50
38	3	D	AUT 42	4j	50
39	3	D	AUT 42	4j	42
40	3	E	AUT 42	4a	54
41	3	E	AUT 42	4a	50
42	3	E	AUT 42	4a	55
43	4	D	AUT 42	4v	53
44	4	D	AUT 42	4v	52
45	4	D	AUT 42	4v	50
46	4	E	AUT 42	4n	55

No	CÃO	TÍBIA	GRUPO	PEÇA	COUNT/#
47	4	E	AUT 42	4n	55
48	4	E	AUT 42	4n	51
49	3	D	BMP 42	5o	59
50	3	D	BMP 42	5o	68
51	3	D	BMP 42	5o	68
52	3	E	BMP 42	5h	56
53	3	E	BMP 42	5h	54
54	3	E	BMP 42	5h	53
55	4	D	BMP 42	5t	59
56	4	D	BMP 42	5t	58
57	4	D	BMP 42	5t	56
58	4	E	BMP 42	5s	54
59	4	E	BMP 42	5s	57
60	4	E	BMP 42	5s	59
61	3	D	MOB 42	6l	54
62	3	D	MOB 42	6l	54
63	3	D	MOB 42	6l	54
64	3	E	MOB 42	6m	59
65	3	E	MOB 42	6m	58
66	3	E	MOB 42	6m	55
67	4	D	MOB 42	6e	61
68	4	D	MOB 42	6e	59
69	4	D	MOB 42	6e	62
70	4	E	MOB 42	6d	57
71	4	E	MOB 42	6d	58
72	4	E	MOB 42	6d	55

ANEXO 3

No	CÃO	GRUPO	Período	nfo
1	1	AUT	21	42,333
4	1	AUT	21	32,000
7	2	AUT	21	41,667
10	2	AUT	21	35,667
13	1	BMP	21	42,667
16	1	BMP	21	35,667
19	2	BMP	21	44,333
22	2	BMP	21	45,333
25	1	MOB	21	29,333
28	1	MOB	21	27,667
33	2	MOB	21	32,333
36	2	MOB	21	33,000
39	3	AUT	42	47,333
42	3	AUT	42	53,000
45	4	AUT	42	51,667
48	4	AUT	42	53,667
51	3	BMP	42	65,000
54	3	BMP	42	54,333
57	4	BMP	42	57,667
60	4	BMP	42	56,667
63	3	MOB	42	54,000
66	3	MOB	42	57,333
69	4	MOB	42	60,667
72	4	MOB	42	56,667