

***FRANCISLEY ÁVILA SOUZA***

**APLICAÇÃO DO COPOLÍMERO PLA/PGA  
ADICIONADO AO FOSFATO DE CÁLCIO AO  
REDOR DE IMPLANTES  
OSSEOINTEGRÁVEIS INSTALADOS SEM  
ESTABILIDADE PRIMÁRIA EM TÍBIA DE  
COELHOS. ESTUDO BIOMECÂNICO,  
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

**ARAÇATUBA, SP  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

***FRANCISLEY ÁVILA SOUZA***

**APLICAÇÃO DO COPOLÍMERO PLA/PGA  
ADICIONADO AO FOSFATO DE CÁLCIO AO  
REDOR DE IMPLANTES  
OSSEOINTEGRÁVEIS INSTALADOS SEM  
ESTABILIDADE PRIMÁRIA EM TÍBIA DE  
COELHOS. ESTUDO BIOMECÂNICO,  
HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

**ARAÇATUBA, SP  
2006**

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Souza, Franciley Ávila

L Aplicação do copolímero pla/pgs adicionado ao fosfato de cálcio ao redor de implantes osseointegráveis instalados sem estabilidade primária em tíbia de coelhos. Estudo biomecânico, histométrico e imunoistoquímico

/ Franciley Ávila Souza - Araçatuba : [s.n.],

2006

60 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2006

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

1. Reparo ósseo 2. Implantes 3. Imunoistoquímica  
4. Matriz óssea

Black D5  
CDD 617.601

# Dados Curriculares

## *FRANCISLEY ÁVILA SOUZA*

Nascimento: 27/11/71 - Alfenas - MG

Filiação: Leila Ávila Souza  
Francisco de Paulo Souza

1991/1994: Graduação - UNILAVRAS –  
Unidade da Universidade do  
Estado de Minas Gerais.

2005/2007: Curso de Pós Graduação em  
Odontologia, Área de  
concentração Cirurgia e  
Traumatologia Buco-Maxilo-  
Facial – Nível mestrado –  
FOA – UNESP.

# **Dedico este trabalho...**

*A Deus, criador do céu e da terra, senhor, pai e soberano da vida.*

*Aos meus pais **Francisco** e **Leila**, pela formação moral que me deram, tornando plenas minhas conquistas pessoais e profissionais.*

*A minha filha **Ingridy**, por transmitir paz e felicidade, pelo carinho de sempre mesmo em meus momentos de ausência.*

*Aos meus irmãos **Nayara**, **Iguaratay** e **Araguacy**, pelo incentivo de sempre e constante retaguarda oferecida.*

*Vocês participaram ativamente desta conquista. Este título lhes pertence também.*

# AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

À minha orientadora, **Prof. Dra. ROBERTA OKAMOTO**, que soube ser orientadora e cúmplice neste e em outros trabalhos, com sabedoria, dedicação, paciência e acima de tudo carinho. Obrigado pela acolhida e transmissão de conhecimentos seguros e precisos durante todo meu desenvolvimento no curso de mestrado. Receba meu profundo respeito e minha sincera consideração pelo profissionalismo e dedicação com que realiza suas atribuições.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. EDUARDO HOCHULI VIEIRA**, pela sua disposição de me ajudar sempre. O meu muito obrigado e sincera gratidão pelo estímulo permanente nestes dois anos de convívio, em que fez semear em meu coração respeito e admiração.

Ao **Prof. Dr. RENATO SUSSUMU NISHIOKA**, responsável pela minha iniciação na vida acadêmica, e principalmente pela preparação ao meu ingresso à pós-graduação. Não existem palavras para expressar minha gratidão e profundo respeito. Receba minha admiração pela competência e por seu exemplo de justiça, conhecimento e conduta ilibada. Muito obrigado pela feliz convivência nestes últimos cinco anos.

Ao **Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR**, por servir de modelo em minha vida acadêmica e profissional. Um profissional completo e acima de tudo um cirurgião com um imenso lado humano. Receba minha sincera gratidão e meu profundo respeito pela oportunidade da feliz convivência nestes três anos, e por guiar minha formação e desenvolvimento no âmbito científico e profissional. O meu muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. OSVALDO MAGRO FILHO**, profissional dedicado, competente, exemplar, e acima de tudo perfeccionista, o mestre amigo. Obrigado pela oportunidade da feliz convivência nestes últimos dois anos. Receba meu profundo respeito e sincera gratidão pelos ensinamentos transmitidos, estímulo no aprendizado e orientações nas tarefas científicas e profissionais da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. PAULO SÉRGIO PERRI DE CARVALHO E Dr<sup>a</sup>. MARILIZA COMAR ASTOLPHI DE CARVALHO** pelo feliz convívio, amizade, ensinamentos e informações transmitidas. Recebam os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade oferecida, orientando em muitos trabalhos clínicos e científicos no decorrer destes dois últimos anos.

Ao **Prof. Dr. MICHEL SAAD NETO**, por mostrar-me que experiência e juventude podem caminhar juntas. A minha sincera gratidão pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência. O senhor é um exemplo concreto de que pós-graduação é educação, mudança de comportamento.

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

Ao **Prof. Dr. WILSON ROBERTO POI**, pelo caráter, competência e extrema dedicação. Minha gratidão pelos conhecimentos transmitidos tanto na área didática quanto profissional. O senhor é o exemplo clássico de “que não basta ser professor, tem que ser mestre”.

Ao **Prof. Dr. MÁRIO JEFFERSON QUIRINO LOUZADA** pelo incentivo de sempre e por ceder prontamente seu biotério. Receba o meu muito obrigado por ser sempre prestativo.

Ao amigo e colega, aluno do Pós Doutorado **Prof. Dr. ANSELMO COLOMBO DE ALENCAR** pela disponibilidade em ajudar sempre e por contribuir na realização deste trabalho. Receba meu muito obrigado pelas capturas das imagens da superfície dos implantes em MEV.

À secretária do Departamento e Cirurgia e Clínica Integrada **CLEIDE LEMES DA SILVA**, meu respeito pelo carinho, torcida, doação, amizade, ajuda e preocupação constante. Agradeço a Deus pela oportunidade de conhecer uma pessoa tão prestativa como você.

Aos **FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO DE CIRURGIA E AMIGOS:** Bernadete, Dirce e Gilmar pela ajuda em diversas etapas da dissertação. Obrigado pelo feliz convívio nos dois últimos anos. Meus agradecimentos por sempre me ajudarem nos trabalhos laboratoriais. Recebam minha profunda admiração por sempre auxiliarem nos trabalhos logísticos, permitindo o atendimento clínico à população.

À minha amiga e companheira de todos os momentos da pós-graduação **THALLITA PEREIRA QUEIROZ**, por sua simplicidade e simpatia. Obrigado pela acolhida, partilha de conhecimentos e ensinamentos transmitidos durante todo o período que

convivemos juntos. Nos momentos mais difíceis que enfrentamos, se não fosse sua insistência certamente o resultado não seria o mesmo. Receba minha admiração por sua competência e dedicação e honestidade.

À minha colega de pós-graduação e amiga **JÉSSICA LEMOS GULINELLI**, pelo companheirismo e ajuda de sempre de forma disposta. Receba minha admiração pela sua determinação em seguir seus sonhos sem medo do insucesso.

À colega de mestrado e amiga e companheira de plantão **CAMILA BENEZ RICIERI**, pelo companheirismo, dedicação, e feliz convívio. Agradeço pela paz que me transmitiu em momentos de ansiedade. Receba minha admiração pelo seu conceito de família e determinação com que o procura, abdicando de projetos profissionais importantes.

Ao grande amigo e colega **NORI ALBERO KOJIMA**, pela ajuda constante nos trabalhos clínicos e científicos realizados, pelo convívio leal e ético nestes últimos cinco anos. Obrigado por ter me ajudado na preparação ao ingresso à pós-graduação.

Aos amigos da graduação: **ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM E LEONARDO PEREZ FAVERANI** pelo auxílio nos trabalhos clínicos e científicos, pela dedicação e determinação com que realizam suas tarefas, sempre com muita disposição. Recebam o meu muito obrigado.

Aos meus amigos **LEANDRO ARAÚJO FERNANDES E DANIELA COELHO DE LIMA**, colegas e amigos do dia a dia. Obrigado pelo feliz e fácil convívio nestes dois últimos anos, pela lealdade, e por ouvir meus desabafos em momentos de dificuldade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de imunistoquímica **ELOÁ LUVIZUTO E THALYTA NEVES RIBEIRO**, pela ajuda constante e sempre. Recebam o meu muito obrigado pelos inúmeros favores realizados em nome do laboratório de imunistoquímica em tecido ósseo.

# AGRADECIMENTOS...

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP**, sob direção do Prof. Dr. Paulo Botacin e vice-direção do Prof. Dr. Célio Percinoto pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Aos **AMIGOS DO CURSO DE DOUTORADO EM CIRURGIA**: André Dotto Sottovia, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Eleonor Álvaro Garbin, Leandro de Carvalho Cardoso, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Natasha Magro Érnica, Thais da Silveira Rodrigues e Walter Betoni Júnior pelos ensinamentos transmitidos de forma sincera e didática não somente nas semanas de plantão, mas no decorrer do curso de pós-graduação. Agradeço pelo profundo respeito com que nos trataram nas atividades hospitalares, mesmo estando numa escala hierárquica acima.

Aos **AMIGOS DO CURSO DE MESTRADO EM CIRURGIA**: Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Flávia Priscila Pereira, Jéssica Lemos Gulinelli e Marcos Heidy Guskuma, Thallita Pereira Queiroz. Aprendi muito com cada um de vocês. Obrigado pelos conhecimentos compartilhados, pela ajuda e competência com que a executaram. Aprendi muito com vocês de uma forma muito simples e tranqüila.

Ao aluno de Doutorado em Periodontia da UNESP – Araraquara: **RAFAEL SILVEIRA FAEDA**, pela paciência, disponibilidade e grande ajuda na utilização do Exakt para o corte das peças deste experimento, mesmo em momento inoportuno.

Aos **DOCENTES DA DISCIPLINA DE CIRURGIA**: Professores Doutores Alessandra Marcondes Aranega, Cristiane Mara Ruiz Souza Fattah, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Osvaldo Magro Filho, Michel Saad Neto, Paulo Sérgio Perri de Carvalho pela paciência em ensinar, disponibilidade e grandes ensinamentos transmitidos durante as clínicas de cirurgia no decorrer destes dois últimos anos.

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

Aos **Professores Doutores ALAÍDE GONÇALVES, EDILSON ERVOLINO E ROELF JUSTINO CRUZ RIZZOLO** pelas orientações oferecidas durante a fase de captura das imagens em microscopia. Recebam minha gratidão pelos ensinamentos transmitidos.

Aos **Professores Doutores RONALDO DE CARVALHO E RENATO BARBOSA** docentes de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do Centro Educacional de Lavras, Unidade da UEMG, por terem me formado cirurgião, e pelos ensinamentos transmitidos sempre com grande disposição em todas disciplinas que participaram durante meu curso de graduação.

Ao **Prof. Dr. ÉLCIO MARCANTONIO** pelo exemplo de competência, humildade e dedicação à Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Obrigado pela intervenção junto a Conexão - Sistema de Próteses para obtenção dos implantes osseointegráveis usados neste trabalho, sem mesmo me conhecer.

Ao **Prof. Dr. ÉLCIO MARCANTONIO JÚNIOR** pela confiança, credibilidade, pelo incentivo e pela gentileza em permitir a utilização do Laboratório do Exakt da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

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

À **CONEXÃO – SISTEMA DE PRÓTESES**, em nome do Dr. Rodolfo Cândida Alba Júnior pela gentileza e disponibilidade em ceder os implantes e chaves utilizadas no experimento deste trabalho, bem como pela confiança em nós depositada.

À **CAPES**, pela concessão da Bolsa de Mestrado, indispensável para realização de trabalhos de pós-graduação e para progresso da ciência no Brasil.

# EPÍGRAFE

*“Uma história é capaz de iluminar nossa relação com os outros, de fortalecer nossa compaixão, de transformar o olhar com que contemplamos os nossos semelhantes, confirmando a crença de que estamos todos juntos na tarefa de viver”.*

Ruth Stotter

# Sumário

Lista de Abreviaturas.	16
Lista de Tabelas e Gráficos	17
Lista de Figuras do Procedimento Cirúrgico	18
Lista de Figuras dos Resultados	19
1- Justificativa	22
2- Aplicação do co-polímero PLA/PGA adicionado ao Fosfato de Cálcio ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária em tíbia de coelhos. Estudo biomecânico, histométrico e imunoistoquímico.	
• Resumo.	25
• Abstract	27
• Introdução.	29
• Material e método.	31
• Resultado.	36
• Discussão	41
• Referências bibliográficas.	46
3- Anexos	
• Anexo A – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal.	52
• Anexo B – Tabelas e Gráficos	53
• Anexo C – Ilustrações do Procedimento Cirúrgico	55
• Anexo D – Ilustrações dos Resultados	57
• Anexo E – Normas para publicação	62

# Lista de Abreviaturas

**DAB** = diaminobenzidina

**EDTA** = Ácido etileno-diamino-tetracético

**HE** = Hematoxilina e eosina

**MEV** = Microscopia eletrônica de varredura

**OPG** = Osteoprotegerina

**PBS** = tampão fosfato de sódio

**PGA** = Ácido Poliglicólico

**PLA** = Ácido Polilático

**PLA/PGA** = Copolímero de ácido polilático e poliglicólico

**PMMAL** = Polimetil-metacrilato lento

**RANK** = Receptor Ativador Nuclear Kappa-B

**RANKL** = Receptor Ativador Nuclear Kappa-B Ligante

**TNF** = Fator de Necrose Tumoral

**µm** = Micrometros

# Lista de Tabelas e Gráficos

- Figura 1:** Tabela dos valores de torque-reverso dos implantes do grupo controle e do grupo tratado, nos períodos de 40 e 60 dias. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos considerados. 53
- Figura 2:** Tabela dos valores de torque reverso entre os períodos de 40 e 60 dias. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos considerados. 53
- Figura 3:** Freqüências porcentuais de médias de marcações de médias de marcações de células de expressão de proteínas. 54

# Lista de Figuras Procedimento Cirúrgico

<b>Figura 1:</b> Antissepsia	55
<b>Figura 2:</b> Incisão dermoperiosteal	55
<b>Figura 3:</b> Acesso cirúrgico	55
<b>Figura 4:</b> Fresagem do leito receptor	55
<b>Figura 5:</b> Visão superior do leito receptor	55
<b>Figura 6:</b> Instalação do implante (Grupo Tratado)	55
<b>Figura 7:</b> Implante instalado (Grupo Tratado)	55
<b>Figura 8:</b> Sutura em plano superficial	55
<b>Figura 9:</b> Implante instalado (Grupo Tratado) – comparativo	56
<b>Figura 10:</b> Implante após 60 dias (Grupo Tratado) – comparativo	56
<b>Figura 11:</b> Preparo do leito ósseo (Análise biomecânica – Grupo Tratado)	56
<b>Figura 12:</b> Remoção do implante por contra-torque	56
<b>Figura 13:</b> Área negativa onde foi instalado o implante	56

# Lista de Figuras Resultados

- Figura 1:** Tecido ósseo neoformado ao redor da área ocupada anteriormente pelo implante. HE. Original 63x – 40 dias (Grupo Tratado). 57
- Figura 2:** Imunomarcção para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 57
- Figura 3:** Imunomarcção para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado). 57
- Figura 4:** Imunomarcção baixa para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 160x.- 5 dias (Grupo Tratado). 57
- Figura 5:** Imunomarcção moderada para RANK em pré-macrófagos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 57
- Figura 6:** Imunomarcção para RANK em pré-macrófagos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado). 57
- Figura 7:** Imunomarcção para RANK em células da linhagem osteoblástica. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo controle). 57
- Figura 8:** Imunomarcção para RANK em células de linhagem osteoblástica DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado). 57
- Figura 9:** Imunomarcção de OPG em tecido ósseo (TO) formado ao redor da área ocupada anteriormente pelo implante. DAB original 160x-40 dias (Grupo Tratado). 58
- Figura 10:** Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 58
- Figura 11:** Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado). 58

- Figura 12:** Imunomarcção para OPG em osteócitos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 58
- Figura 13:** Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo controle). 58
- Figura 14:** Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado). 58
- Figura 15:** Imunomarcção para OPG em osteócitos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo tratado). 58
- Figura 16:** Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical inferior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo controle). 58
- Figura 17:** Imunomarcção de RANKL em linfócitos no canal medular. DAB original 160x-5 dias (Grupo Controle). 59
- Figura 18:** Imunomarcção de RANKL em linfócitos no canal medular. DAB original 160x-60 dias (Grupo Tratado). 59
- Figura 19:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 59
- Figura 20:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado). 59
- Figura 21:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Controle). 59
- Figura 22:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado). 59
- Figura 23:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical inferior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle). 59
- Figura 24:** Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical inferior. DAB,

original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado).	59
<b>Figura 25:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel - 4x – 60 dias (Grupo Controle).	60
<b>Figura 26:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel 4x – 60 dias (Grupo Tratado).	60
<b>Figura 27:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Controle).	60
<b>Figura 28:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Tratado).	60
<b>Figura 29:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante nas roscas. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Controle).	60
<b>Figura 30:</b> Tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante (roscas). Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Tratado).	60
<b>Figura 31:</b> Tecido ósseo aderido na superfície do implante. MEV 56x- 60 dias (Grupo Tratado).	61
<b>Figura 32:</b> Tecido ósseo aderido na superfície do implante MEV 1.00 k x - 60 dias (Grupo Tratado)	61

## INTRODUÇÃO GERAL

O avanço tecnológico que a odontologia sofreu no século XX foi bem significativo, no entanto, seguramente nenhum abriu mais horizontes e perspectivas de tratamento que o bem sucedido uso de implantes na clínica odontológica.<sup>1</sup> O interesse por parte dos odontólogos aumentou a cada dia, e isso ocorreu devido à disponibilidade de pesquisas embasadas cientificamente e o elevado nível de segurança e sucesso alcançado com a osseointegração.

Branemark et al<sup>2</sup> definiram osseointegração como a conexão direta, estrutural e funcional entre o osso ordenado e saudável com a superfície do implante, em nível de microscopia óptica, estável e capaz de suportar as forças mastigatórias. Entretanto biologicamente não existe evidência de contato completo entre o osso e a superfície do titânio, mas sim maior ou menor quantidade de tecido conjuntivo, sem que clinicamente haja falha ou perda do implante.<sup>3</sup>

Do ponto de vista clínico, osseointegração foi definida como o processo pelo qual a fixação rígida e assintomática de um material aloplástico no osso é obtida e mantida durante carga funcional.<sup>4</sup> Ducheyne & Healy<sup>5</sup> afirmaram que o sucesso de qualquer tipo de implante depende de seu tamanho, propriedades de superfície, trauma tecidual durante a implantação, do movimento na interface entre osso e implante e do sítio de implantação, ou seja, da qualidade e quantidade de tecido ósseo.

O processo de reparação na interface entre osso e implante ocorre pela migração de células osteogênicas derivadas da camada medular óssea, incluindo células mesenquimais indiferenciadas, osteócitos e osteoblastos, direto para um arcabouço fornecido pelo coágulo sanguíneo.<sup>6,7,8</sup> A modelagem anabólica parece ser a primeira resposta de reparação óssea após a instalação de um implante no osso cortical, similar ao processo ocorrido na cicatrização de uma fratura.<sup>9</sup>

Recentemente, com a descoberta das proteínas da superfamília dos TNF, estudos vêm mostrando seu papel na dinâmica do tecido ósseo.<sup>10,11,12,13</sup> Entre estas proteínas, destacam-se a OPG, RANK e RANKL que estão presentes nas células ósseas,<sup>10</sup> controlando o processo de neoformação e reabsorção óssea,<sup>14</sup> e consequentemente o metabolismo do cálcio.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- 1) HIGUCHI KW: Ortho-Integration: The Alliance Between Orthodontics and Osseointegration. In: HIGUCHI K.W: Orthodontic Application of Osseointegrated Implants (ed 1). Hong Kong, Quintessence Publishing Co., 2000, p1.
- 2) BRÄNEMARK PI, ZARB GA, ALBREKTSSON T: Tissue integrated protheses: Osseointegration in clinical dentistry (ed 1). Chicago, Quintessence, 1985, p 350.
- 3) CARVALHO PSP, PONZONI D: Aspectos biológicos da osseointegração. In: GOMES LA: Implantes osseointegrados: técnica e art (ed 1). São Paulo, Santos, 20002, p 1.
- 4) ZARB GA, ALBREKTSSON T: Osseointegration: A requiem for the periodontal ligament? Int. J. Periodont. Restorative Dent 11: 88, 1991.
- 5) DUCHEYNE P, HEALY KE: Surface spectroscopy of calcium phosphate ceramic and titanium implant materials. In: RATNER B: Surface characterization of biomaterials (ed 1). Amsterdam, Elsevier, 1988, p 175.
- 6) DAVIES JE: Bone engineering ( es 1). Toronto, 2000, p 656.
- 7) DAVIES JE: Understanding peri-implant endosseous healing. J. Dent. Educ 67: 932, 2003.

- 8) WATZEK G, ZECHNER W, ULM C, et al: Histologic and histomorphometric analysis of three types of dental implants following 18 months of occlusal loading: A preliminary study in baboons. *J Clin Oral Impl. Res.* 16: 408, 2005.
- 9) ROBERTS WE, GARETTO LP: Fisiologia e metabolismo ósseo. In: MISCH CE *Implantes Dentários Contemporâneos* (ed 2). 2002, p 225.
- 10) SUDA T, TAKAHASHI N, UDAGAWA N: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 3: 345, 1999.
- 11) YANFEI L, CAIN RL, HALLADAY DL, et al: Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 142: 4047, 2001.
- 12) KHOSLA S: Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5051, 2001.
- 13) STEJSKAL D, BARTEK J, PASTORKOVA RL et al: Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers* 145: 61, 2001.
- 14) KANEDA T, NOJIMA T, NAKAGAWA M: Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-Kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol* 165: 4254, 2000.

Este artigo foi escrito de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico:  
**JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY.**

**RESUMO:**

“Aplicação do copolímero PLA/PGA adicionado ao fosfato de cálcio ao redor de implantes osseointegráveis sem estabilidade primária instalados em tibia de coelhos. Estudo biomecânico, histométrico e imunoistoquímico.”

Proposição: O objetivo do presente trabalho foi avaliar comportamento mecânico e biológico do tecido ósseo ao redor de implantes associados ao copolímero ácido polilático/poliglicólico adicionado ao fosfato de cálcio.

Materiais e Métodos: Para tal foram usados vinte e cinco coelhos *Albinus*. Após procedimento cirúrgico os animais foram divididos em 4 períodos, sendo o último período, 60 dias, composto por 10 animais. Os animais tiveram perfurações realizadas com sobrefresagem na porção medial das tíbias direita e esquerda. Na tibia direita o leito cirúrgico foi preenchido com coágulo sanguíneo e na tibia esquerda com o copolímero. Em ambos leitos cirúrgicos a instalação dos implantes osseointegráveis ocorreu imediatamente após a fresagem. Nos períodos de 5, 15, 40 e 60 dias os animais foram anestesiados e sofreram eutanásia por meio de perfusão de Formaldeído 4% no ventrículo esquerdo. Nos períodos de 40 e 60 dias realizou-se o torque reverso para remoção dos implantes. As peças dos 5 animais restantes do período de 60 dias foram levadas ao micrótomo Exakt para realização de cortes histológicos com os implantes. Nas demais peças, realizou-se análise imunoistoquímica mediante a utilização dos anticorpos primários contra as proteínas OPG, RANK e RANKL.

Resultados: As médias de torque para o grupo controle foram de 10,2 e 5,6 N/cm nos períodos de 40 e 60 dias respectivamente, enquanto para o grupo tratado foram de 7,6 e 7,0 N/cm nos mesmos períodos. Houve um balanço na expressão das proteínas com leve predomínio de RANKL. Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto a extensão linear do contato entre tecido ósseo e implante.

Conclusão: Conclui-se que o material foi biocompatível permitindo o crescimento ósseo ao redor dos implantes e que houve osseointegração em ambos grupos mesmo sem estabilidade primária dos implantes.

***ABSTRACT***

Application of PLA/PGA copolymer added to calcium phosphate around osseointegrated implants with no primary stability in rabbits's tibia. A biomechanical, histometric and immunohistochemistry study.

***Purpose:*** The aim of the present study was to evaluate the mechanical and biological behaviour of bone tissue formed around the implants associated to copolymer polilactic/poliglicolic acids added to calcium phosphate.

***Materials and Methods:*** In the present study, twenty five Albinus rabbits, divided in 4 periods, and the last period, referred to 60 days, was composed by 10 animals. The animals had perforations performed with osteotomy in the medial portion of right and left tibias. In the right tibia, the surgical bed was filled with blood clot and in the left tibia, the copolymer was used. In the same way in both surgical beds, the osseointegrated implants installation occurred immediately after the osteotomy. In the periods of 5, 15, 40 and 60 days, the animals were anesthetized and were sacrificed by perfusion with 4% formaldehyde, in the left ventricle. In the periods of 40 and 60 days, the reverse torque was performed in order to remove the implants. The pieces of the 5 remaining animals of the 60 days period were processed in the Exakt microtome in order to realize undecalcified histological sections with the implants. In the other pieces, the immunohistochemical analysis was performed in order to detect the presence of the OPG, RANK and RANKL proteins in the bone tissue.

***Results:*** The mean of torque for the control group were 10.2 and 5.6 N/cm in the periods of 40 and 60 days respectively, while in the treated group were 7.6 and 7.0 N/cm in

the same periods. There was a balance in the expression of the proteins with moderate predominance of RANKL protein. There were no statistically differences between the groups in relation to the linear extension of contact between bone and implant.

**Conclusion**: The results of this study allow us to conclude that the material was biocompatible allowing the formation of bone tissue around the implants and there was osseointegration in both groups even with no primary stability of implants.

## INTRODUÇÃO

O processo de reparação da interface formada entre osso e implante tem sido largamente estudado e discutido nos últimos anos. Para promover uma melhor reparação ao redor de implantes osseointegráveis e enxertos ósseos em situações desfavoráveis, várias medidas vêm sendo sugeridas, buscando sempre um maior contato entre osso e implante, mas quase sempre relacionadas com as características de superfície do implante,<sup>1</sup> mais precisamente material, topografia e química da superfície.<sup>2</sup>

Outro fator que deve ser mencionado na reparação do tecido ósseo ao redor de implantes é a ancoragem primária. Ela é determinada pelo contato direto entre o osso e a superfície do implante. Altos índices de fracassos na osseointegração têm sido associados a implantes instalados em osso de qualidade ruim e conseqüentemente ancoragem primária diminuída.<sup>3</sup> A ancoragem primária ocorre no momento de instalação do implante e está relacionada com o contato ósseo primário, enquanto a ancoragem secundária está relacionada com as respostas teciduais ocorridas no decorrer do processo de reparação.<sup>4</sup>

No intuito de melhorar o processo de reparação em casos específicos como sobre fresagem, fenestrações, complemento de um alvéolo em casos de implantes instalados imediatamente após uma exodontia ou osso de baixa densidade, substitutos ósseos homogêneos vem sendo usados a fim de melhorar as condições do leito cirúrgico.<sup>5,6</sup> Com este mesmo propósito podemos lançar mão de outros substitutos ósseos como os materiais aloplásticos, que são exclusivamente sintéticos e biocompatíveis. Neste grupo incluem o fosfato de cálcio e os polímeros.

O fosfato de cálcio é uma cerâmica bioativa, exclusivamente osteocondutora, similar a hidroxiapatita, muito embora não seja um componente natural do osso.<sup>7,8,9</sup> Já

os polímeros são compósitos microporosos, com uma superfície de hidróxido de cálcio que lentamente vão sendo reabsorvidos e substituídos por tecido ósseo.<sup>7</sup> Os polímeros degradáveis mais comuns são os poli  $\alpha$  hidroxi-ésteres, derivados dos ácidos polilático e poliglicólico, amplamente utilizados em engenharia tecidual.<sup>10,11,12,13,14,15</sup> O fosfato de cálcio pode ser incorporado ao ácido polilático/poliglicólico na proporção de 30%, para promover efeitos benéficos nas propriedades mecânicas e controle do pH.<sup>16</sup>

Atualmente com a recente descoberta das proteínas da superfamília dos TNF, estudos vêm mostrando seu papel no controle da remodelação óssea,<sup>17,18,19,20,21,22</sup> entretanto esta é controlada e ajustada também por fatores bioquímicos e físicos.<sup>19</sup> Dentre as proteínas que controlam o metabolismo ósseo podemos destacar a RANK, a RANKL e a OPG como marcadores da atividade celular. A RANK é uma proteína receptora que controla a osteoclastogênese e o metabolismo do cálcio, e está presente na membrana dos osteoclastos e células dendríticas.<sup>18,19,22</sup> Já o ligante da RANK, chamada RANKL, também conhecida como OPG ligante é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo e pelos linfonódos T ativados, e quando ligada a RANK pode promover a reabsorção óssea.<sup>18,19,22</sup> Sua expressão é limitada às áreas de reabsorção óssea e linfonodos.<sup>17,23,24,25</sup> Por outro lado a OPG inibe a formação osteoclástica no estágio do desenvolvimento, impedindo a ligação da RANKL à RANK.<sup>21,26,27</sup>

Embora a OPG e a RANKL apresentem muitas outras funções no organismo, estas proteínas vêm sendo estudadas principalmente com a finalidade de analisar a dinâmica do processo de remodelação/reabsorção que ocorre na homeostasia óssea.<sup>18,19,22</sup> O metabolismo ósseo em condições fisiológicas apresenta um equilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica, sem que o processo de reparação e remodelação óssea seja prejudicado. Portanto o objetivo do presente trabalho foi estudar

o papel da associação do copolímero ácido polilático/poliglicólico adicionado ao fosfato de cálcio no comportamento mecânico e biológico durante a reparação ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária em tíbias de coelhos por meio de análises imunoistoquímica, histométrica e biomecânica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Animais e Grupos Experimentais:*

Para a realização deste trabalho foram utilizados 25 (Vinte e cinco) coelhos (Nova Zelândia) machos, adultos, variação *albinus*, com aproximadamente 5 (cinco) meses de idade, peso em torno de 3.1 a 4.3 Kg, mantidos em gaiolas unitárias, ambiente climatizado, alimentados com ração sólida (Ração Procoelho, Primor) e água *ad libitum*, durante todo o experimento. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP sob protocolo 069/05. Os mesmos animais foram enquadrados em dois grupos experimentais:

**Grupo Controle:** Animais que tiveram o implante instalado sem estabilidade primária em leito receptor criado artificialmente na tíbia direita preenchido com coágulo sanguíneo.

**Grupo Tratado:** - Os animais tiveram o implante instalado sem estabilidade primária em leito receptor criado artificialmente na tíbia esquerda preenchido com o biomaterial ácido polilático/poliglicólico (70%) adicionado ao fosfato de cálcio (30%),

além de coágulo sangüíneo.

*Procedimento Cirúrgico:*

Anestesia:

Os animais foram mantidos em jejum oito horas antes do procedimento cirúrgico. Para todos os procedimentos cirúrgicos foi realizada anestesia geral por infiltração intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação anestésica na região a ser operada com a infiltração de Cloridrato de mepivacaína ( 0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França).

Acesso Cirúrgico:

A região anterior das tíbias direita e esquerda foram tricotomizadas e posteriormente realizou-se a antisepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante e tópico (PVP-I 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto). O acesso cirúrgico foi realizado através de uma incisão dermo-periosteal por meio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Feather, Feather Safety , Japan) montada em cabo de bisturi nº 3 ( Hu-Friedy, German) na margem anterior da tíbia, iniciada a um centímetro abaixo da articulação tíbio-femural, medindo aproximadamente 6 (seis) centímetros de comprimento. Em seguida foi realizada a exposição da porção medial da tíbia onde foram realizados os alvéolos artificiais.

Osteotomia para instalação dos implantes:

Após a exposição da porção medial da tíbia, foi realizada osteotomia de 3,0mm de diâmetro e 6,0 mm de comprimento, iniciando-se o preparo do leito receptor do

implante com a broca em forma de lança, para romper a cortical óssea. Em seguida foi utilizada a fresa helicoidal de 2.0mm, piloto de 2.0/3.0mm e fresa helicoidal de 3.0mm montadas em um motor elétrico a uma velocidade de 1600 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil).

Instalação dos Implantes:

Os implantes foram confeccionados especificamente para este estudo, com as dimensões de 2,6mm de diâmetro e 6,0mm de comprimento (Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil), e módulo de rebordo com encaixe para o torquímetro analógico (15-BTG, Tonich, Japan) para realizar a análise de torque reverso. Os implantes foram instalados com auxílio de pinça de titânio (Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil) no leito receptor. Na perfuração da tíbia direita (Grupo Controle) o implante foi inserido no leito receptor preenchido apenas com coágulo sangüíneo, enquanto na perfuração da tíbia esquerda (Grupo Tratado) o implante foi inserido no leito receptor preenchido com os biomateriais ácido Polilático/Poliglicólico adicionado ao Fosfato de Cálcio.

Sutura:

O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos. A sutura muscular foi realizada com fio absorvível de Poliglactina 910 (Vicryl 5.0, Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada em pontos simples isolados com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil).

Prescrição Pós-Operatória:

No pós-cirúrgico foi administrado via intra-muscular Dipirona Sódica no total de três doses,(1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas LTDA, São Paulo, Brasil), e Pentabiótico (0,1 ml/kg, Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil).

### *Eutanásia e Coleta do Material:*

Os animais foram anestesiados por infiltração intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil). Foi realizada a eutanásia por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 (dez) minutos, e em seguida de Formaldeído 4% (Paraformaldeído 4% - Acros Organics) durante 40 minutos, usando uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – Parmer Instrument Company), em grupo de cinco animais por período. Os períodos de eutanásia ocorreu aos 5, 15, 40 e 60 dias após a instalação dos implantes. As tíbias direita e esquerda foram removidas e o tecido mole excedente eliminado. A pós-fixação foi realizada em solução de Formaldeído 4% a 4°C, durante um período de 6 horas.

### *FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS*

#### *Análise Biomecânica de Torque Reverso:*

Após anestesia geral e antes da eutanásia dos animais, os implantes do grupo controle e do grupo tratado foram removidos por torque reverso por meio de torquímetro analógico (15-BTG, Tonich, Japan) e foi medido o valor necessário para remoção dos implantes. Esta análise foi realizada nos períodos de 40 dias e 5 animais do período de 60 dias. Os valores do grupo controle como do grupo tratado foram levados à análise estatística por meio do teste de análise de variância. Alguns implantes dos períodos de 40 e 60 dias foram levados a análise de microscopia eletrônica de varredura

para visualização do tecido ósseo aderido à superfície do implante.

#### Análise Qualitativa Imunoistoquímica:

As tíbias direita e esquerda de cada animal foram descalcificadas em EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético, Merck) a 5% dissolvida em água deionizada por um período de 60 a 90 dias em temperatura ambiente.

Após o término da etapa de descalcificação, o tecido ósseo ao redor do leito receptor do implante foi reduzido com margens de 10mm ao redor de todo o negativo do implante. Em seguida a peça foi crioprotégida em sacarose 30% (Merck) por 48 horas a temperatura de 4°C para possibilitar o corte em criostato. Obteve-se assim cortes transversais com espessura de 14 µm, montados em lâminas previamente gelatinizadas.

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina – OPG (Goat anti-opg – Santa Cruz Biotechnology), RANK (Goat anti-rank – Santa Cruz Biotechnology) e RANKL (Goat anti-rankl – Santa Cruz Biotechnology). O método de detecção usado foi imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA).

Padronizou-se a realização de coloração por Hematoxilina e Eosina (HE – Merck & Co., Inc.), no corte seguinte em que foram preservadas as reações imunoistoquímicas.

As análises foram realizadas em microscopia de luz para a observação da citoarquitetura do tecido ao redor do implante nos dois grupos estudados, bem como a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL. A imunomarcagem das proteínas foram quantificadas por porcentagem, conforme apresentado abaixo:

Ausência de marcação; (0%)

Marcação positiva; (20%)

Marcação superpositiva; (60%)

Marcação hiperpositiva; (90%)

Os dados, porcentagens foram levados à análise estatística por meio dos testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%.

Análise Histométrica:

As peças dos 5 animais restantes do período de 60 dias foram obtidas e após a fixação foram levadas direto a uma seqüência de alcoois de concentração crescente com troca de solução a cada 24 horas, seguido de um banho de acetona por 24 horas. Após o banho de acetona as peças foram imergidas em polimetil metacrilato lento com trocas diárias durante 3 dias. A seguir, as peças receberam 2 banhos de Metil Metacrilato. Na seqüência do processamento, foi realizada a inclusão das peças em Metil Metacrilato associado ao catalisador, Peróxido de Benzoila 1%, aguardando-se o período de polimerização da resina. Após obtenção dos blocos em resina acrílica contendo as peças, estas foram levadas ao micrótomo (Exakt Cutting System Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) e obtidos assim cortes com espessura em média de 70 $\mu$ m. As lâminas foram coradas usando vermelho de alizarina e azul de Stevenel. As lâminas foram levadas à microscopia óptica convencional, onde foi medido o perímetro de osso calcificado e o perímetro de tecido conjuntivo (pré-osso). Os dados foram levados à análise estatística usando o teste paramétrico pareado *t* de Student.

## **RESULTADOS**

#### Análise Clínica:

Após instalação dos implantes nas tíbias dos coelhos os animais evoluíram com ganho de peso durante o experimento. Após reabertura das tíbias para realização do torque de remoção, observou-se que os implantes estavam estáveis devido a neoformação óssea. Houve neoformação óssea cobrindo o módulo de rebordo do implante. O implante do grupo tratado apresentava-se na posição mais próxima a de instalação, já o implante do grupo controle apresentava-se numa posição mais inclinada comparada a posição inicial de instalação. Foi necessária a remoção de tecido ósseo em volta do módulo de rebordo do implante para melhor adaptação da chave intermediária para encaixe do torquímetro analógico.

#### Análise Biomecânica:

Na tabela 1(Figura 1 da lista de gráficos e tabelas) são dados os valores de torque-reverso, em N/cm, para os grupos Controle e Tratado, de acordo com o período de avaliação. São expostas também as médias e desvios padrão de torque-reverso. O tratamento estatístico da avaliação de torque-reverso foi efetuado pela análise de variância com a correção de Welch, procedimento recomendado quando está presente heterogeneidade das variâncias. As médias de torque-reverso, em N/cm, estão representadas graficamente (Figura 2 da lista de gráficos e tabelas), juntamente com intervalos de 95% de confiança para as médias populacionais. A dispersão dos valores na avaliação de torque-reverso aos 40 dias é maior do que a dispersão na avaliação de 60 dias, sugerindo que com o passar do tempo se perde precisão nas medidas. Entretanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados nem entre os períodos de 40 e 60 dias.

### Análise Qualitativa Imunoistoquímica:

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas OPG, RANK e RANKL, analisadas durante o processo de reparo da interface formada entre osso e implante aos 5, 15, 40 e 60 dias pós-operatórios. As análises foram realizadas na cortical superior, no canal medular e na cortical inferior das tíbias, para o entendimento das alterações celulares de maneira mais uniforme.

Ao analisarmos as imunomarcações contra a proteína RANK tanto no grupo controle como no tratado, os resultados mostram baixa expressão desta proteína nas corticais superiores e inferiores em todos os períodos analisados, ou seja, 5, 15, 40 e 60 dias. Já ao analisarmos as imunomarcações contra a proteína RANK no canal medular da tíbia dos coelhos podemos observar expressão desta proteína nos períodos de 5 e 15 dias em células com morfologia semelhante a macrófagos, ou seja osteoclastos, diminuindo as imunomarcações progressivamente nos períodos de 40 e 60 dias.

Ao analisarmos as reações imunoistoquímicas realizadas para a identificação da proteína OPG, notamos marcações específicas para osteócitos nos grupos controle e tratado localizadas na cortical superior e inferior no período de 5 dias, diminuindo esta expressão aos 15 dias e quase não existindo nos períodos de 40 e 60 dias após instalação dos implantes. Já ao analisarmos as imunomarcações para Osteoprotegerina no canal medular da tíbia de coelhos notamos uma expressão positiva nos períodos de 5 e 15 dias, aumentando aos 40 dias, e chegando a uma expressão maior ainda no período de 60 dias.

Nas reações realizadas para a evidenciação da proteína RANKL, observamos marcações específicas nos grupos controle e tratado de células com citoarquitetura de linhagem osteoblástica nas corticais superiores e inferiores em grande expressão aos 5 dias após instalação de implantes. Esta expressão diminuiu aos 15 e 40 dias e quase não

existiu aos 60 dias. Para a imunomarcação de RANKL no canal medular da tíbia de coelhos observamos grande expressão em células com morfologia semelhante a linfócitos. Essa expressão diminuiu aos 15 e 40 dias e voltou a aumentar aos 60 dias.

Estas expressões foram quantificadas em porcentagem como explicado anteriormente, ou seja, as marcações de células de expressão das proteínas RANK, RANKL, OPG, de acordo com o período de avaliação 5, 15, 40 e 60 dias para os grupos Controle e Tratado foram representadas por médias percentuais (0, 20, 60 e 90). Essas medidas foram obtidas em seis porções do implante de três a cinco animais em cada grupo experimental. As aplicações do teste de Kruskal-Wallis para cada proteína e período não evidenciaram diferenças relevantes na marcação de células entre essas porções. Então os seis valores de marcações de células foram considerados indistinguíveis e utilizados para a avaliação pretendida, tentando-se aumentar o poder da análise em identificar diferenças quanto à marcação de células.

Em seguida, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para a comparação de médias percentuais de marcações de células considerando-se as proteínas e períodos. Tanto para o grupo controle como o grupo tratado houve evidência de diferenças significativas quanto à marcação de células, mas não foi possível definir um padrão de comportamento, com pouca evidência de diferença entre os períodos.

Após este passo, os valores de marcações de células foram agrupados para se realizar a comparação entre as proteínas independentemente dos períodos. A aplicação do teste de Kruskal-Wallis indicou haver evidência de diferença significativa entre proteínas quanto à marcação de células tanto para o grupo controle ( $p < 0,001$ ) como para o grupo tratado ( $p = 0,002$ ). Na figura 4 (lista de gráficos e tabelas), são mostradas as frequências percentuais de médias de marcações de células de expressão de proteínas, independentemente do período de avaliação, para os grupos: Controle e Tratado. É

possível por essas frequências avaliar as diferenças entre os centros das distribuições de marcações de células apontadas pelo teste de Kruskal-Wallis. A proteína RANK apresentou valores mais baixos de marcação de células, predominando a ausência de marcação. Para as outras proteínas, em relação ao grupo tratado houve um equilíbrio entre a ausência de marcação e score de 20 em diante, mas nessas marcações prevaleceu o 20. No controle prevaleceram os score de 20 e 60 das proteínas RANKL e OPG, sendo o score de 20 praticamente a metade das medidas.

Análise por Microscopia eletrônica de varredura:

Nos implantes removidos no período de 40 dias observam-se áreas de tecido ósseo aderidas à superfície do metal, já no período de 60 dias os implantes encontraram-se quase totalmente recobertos por tecido ósseo neoformado em ambos os grupos.

Análise Histométrica:

Foram analisadas as porcentagens de extensão linear de contato entre tecido ósseo e implante e tecido conjuntivo e implante. O teste pareado t de Student não revelou evidências de diferenças estatísticas entre grupo controle e tratado ( $p= 1,32$ ).

A análise qualitativa da interface revelou a presença de áreas de tecido ósseo neoformado (coradas pelo vermelho de alizarina) em toda extensão de implante, em ambos os grupos, principalmente na área de módulo de rebordo, tendo em vista que esta área estava localizada em osso cortical enquanto as roscas do implante encontravam-se no canal medular. Já as áreas remanescentes da interface apresentavam-se em contato com o tecido conjuntivo, corados pelo azul de Stevenel. As médias percentuais de contato entre tecido ósseo neoformado e implante foram de 35,36% e 21,44%, respectivamente para os grupos controle e tratado. Para a interface entre tecido

conjuntivo e implante as médias foram de 64,64% e 78,56% respectivamente para os grupos controle e tratado. Estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Não foram observados neste período remanescentes do biomaterial implantado. O tecido ósseo neoformado apresentou-se bastante celularizado com a presença de inúmeros osteócitos. Em algumas áreas adjacentes ao implante observou-se o tecido conjuntivo celularizado em contato direto com o osso formado, sugerindo sua maturação em tecido ósseo.

## **Discussão**

A realização deste trabalho iniciou pela determinação do modelo animal a ser empregado. A escolha foi pelo coelho por ser um animal largamente utilizado em pesquisas de implantes realizadas anteriormente a esta, bem como pelo seu porte físico, constituindo-se num animal experimental capaz de receber implantes de comprimento e diâmetro compatíveis aos implantes de uso clínico rotineiro,<sup>28,29,30</sup> muito embora os implantes usados neste trabalho não fossem compatíveis com os de uso clínico rotineiro, mas apresentavam-se bem próximos aos implantes de menor diâmetro e comprimento utilizados atualmente na clínica implantodôntica.

No presente estudo, implantes osseointegráveis foram instalados em defeitos ósseos maiores que o diâmetro da fixação, levando a ausência de estabilidade primária. Este tipo de cavidade experimental usada no presente modelo de trabalho pareceu ser eficiente para estudo mecânico e biológico de materiais biocompatíveis no processo de reparação da interface formada entre osso e implante.

A força necessária para remoção de implantes por torque reverso tem sido largamente utilizada nos últimos anos em estudos animais para avaliar mesmo que

indiretamente o processo de formação óssea ao redor de implantes.<sup>4,31</sup> Neste presente estudo observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores medidos de torque reverso nos grupos controle e tratado, bem como nos períodos experimentais de 40 e 60 dias. Entretanto pode-se observar que o torque partiu de um valor zero, já que os implantes foram instalados numa cavidade experimental maior que o diâmetro do implante e foram atingidos valores semelhantes tanto nos períodos experimentais de 40 como 60 dias, demonstrando que houve neoformação óssea, propiciando assim uma estabilidade secundária aos implantes. Porém durante a análise clínica na fase de eutanásia dos animais pode-se observar que os implantes do grupo tratado estavam em uma posição mais próxima à posição inicial de instalação. Este fato pode ser explicado pela manutenção do posicionamento do implante, proporcionada pelo biomaterial no ato da instalação dos mesmos no leito cirúrgico devido a sua consistência em forma de gel.

A estabilidade primária em implantodontia é um dos principais fatores que influenciam as taxas de sobrevivência do implante. É considerada um pré-requisito para estabelecer um suporte mecânico, essencial para não perturbar o processo de osseointegração.<sup>29,32,33</sup> Lioubavina-Hack et al<sup>4</sup> avaliaram a importância da estabilidade inicial para a osseointegração em um modelo experimental de membrana de teflon fixada no ramo mandibular de ratos para o aumento ósseo, utilizando implantes de 2,8mm instalados com e sem estabilidade primária. Os autores concluíram que a estabilidade primária é pré-requisito para o sucesso da osseointegração e que implantes instáveis resultaram em encapsulação fibrosa. Em nosso estudo verificamos a presença de neoformação óssea ao redor de implantes instalados sem estabilidade primária, confirmado pela análise biomecânica, MEV e pela análise histométrica por meio do corante de vermelho de Alizarina que corou o tecido ósseo calcificado em íntima

aposição com a superfície do implante. Entretanto os diferentes resultados encontrados estão relacionados às inúmeras variáveis, destacando-se como fator fundamental a ausência de leito receptor intra-ósseo para os implantes instalados sem estabilidade primária.

Os defeitos ósseos experimentais criados neste estudo apresentaram dimensão de 3.0mm de diâmetro e 6.0mm de comprimento. Foi observada a presença de neoformação óssea em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária. Botticelli et al<sup>34,35,36,37</sup> demonstraram que amplos defeitos periimplantares, de 1,0 até 2,25 mm associados ou não à remoção intencional da parede vestibular podem ser preenchidos com tecido ósseo neoformado, fornecendo alto grau de osseointegração. Além disso, estes autores concluíram que este reparo é influenciado pelas características de superfície do implante. Contudo, em todos os estudos realizados por estes autores os implantes apresentavam-se travados na porção apical, e portanto, com estabilidade primária.

Outro fator que pode ter interferido neste trabalho foi o copolímero PLA/PGA que é um material osteocondutor, Ele vem sendo rotineiramente pesquisado nos últimos anos para regeneração óssea guiada,<sup>38</sup> regeneração de tecido nervoso<sup>39,40</sup> e engenharia tecidual.<sup>13,40</sup> Este copolímero pode ser utilizado em diferentes consistências para cirurgia, sendo que na forma gelificada apresenta inúmeros poros pequenos, em torno de 3µm,<sup>39</sup> que contribuem com a neoformação óssea por osteocondução.

O intuito de adicionar um composto básico inorgânico, ou seja, o Fosfato de Cálcio ao copolímero ácido Polilático/Poliglicólico foi de melhorar as propriedades mecânicas do ácido Polilático,<sup>41,42,43</sup> e controle do pH do copolímero.<sup>42,44</sup> Além disto, o Fosfato de Cálcio atua diretamente no processo de degradação do biomaterial pelo organismo, diminuindo a proporção de absorção do ácido Polilático bem como do

Poliglicólico.<sup>16,43,44</sup> Entretanto Ara et al<sup>16</sup> salienta que a incorporação de aditivos nos polímeros absorvíveis é um processo complexo, necessitando avaliar muitos critérios e ser investigado com mais detalhes no futuro próximo.

A imunistoquímica é uma ferramenta metodológica que foi introduzida recentemente no estudo do processo de reparo ósseo.<sup>45,46</sup> Esta técnica necessita de uma padronização que vai desde a eutanásia do animal, de todo o preparo da peça até a obtenção dos cortes congelados. A principal preocupação foi quanto ao processo de descalcificação, para que este não tornasse os cortes histológicos inviáveis para as reações imunistoquímicas, ou seja, sem os epítomos disponíveis para a ligação do anticorpo primário.

O objetivo do estudo imunistoquímico foi expressar as proteínas OPG, RANK e RANKL no tecido ósseo ao redor de implantes instalados em defeitos ósseos de diâmetro maior que o corpo do implante, preenchidos com ácido Polilático/Poliglicólico adicionado ao Fosfato de Cálcio na proporção de 30%. Os estudos relacionados à expressão destas proteínas iniciaram-se a partir de 1997, quando foram descritas pela primeira vez.<sup>18,19,20</sup> A expressão destas proteínas reflete a dinâmica do tecido ósseo, uma vez que a presença de OPG e RANKL em concentrações similares, indicam o equilíbrio do tecido ósseo, onde a taxa de reabsorção equivale à taxa de neoformação óssea. Entretanto, o predomínio de OPG, sinaliza a neoformação óssea, bem como o predomínio de RANKL sinaliza a reabsorção óssea.<sup>18,19,20,21,24,25</sup> Os resultados mostraram que as proteínas expressam-se de formas diferentes durante os períodos pós-operatórios analisados e a forma como elas se expressaram deram uma idéia da dinâmica do processo de remodelação óssea. A expressão destas proteínas ocorreu em células da linhagem óssea. Sendo assim as proteínas OPG e RANKL expressaram-se em osteoblastos, osteócitos e células de revestimento, conforme resultados encontrados em

outros estudos.<sup>18,19</sup> Já para a proteína receptora RANK, estudos mostraram que ela expressou-se em macrófagos da linhagem osteoclástica, ou seja, pré osteoclastos, além de células dendríticas e fibroblastos.<sup>19</sup> Nos resultados analisados no grupo tratado, foi possível observar principalmente no período de 05 dias, muitas células com aspecto semelhante a macrófagos osteoclásticos com imunomarcção para a RANK. Este fato comprova que o material utilizado no defeito ósseo no intuito de promover estabilização ao implante estava sendo absorvido pelo organismo, não causando reação de corpo estranho, comprovando sua biocompatibilidade. No entanto no grupo controle a expressão desta proteína foi em menor intensidade, mesmo não havendo diferenças estatisticamente significantes da porcentagem no grupo controle e grupo tratado. Este fato pode ser explicado pela ausência do biomaterial, por exigir menor número de células da linhagem osteoclástica, pois coágulo sangüíneo interferiu menos nas respostas dos tecidos quando comparado ao biomaterial.

Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos foi possível concluir que ocorreu a expressão das proteínas Osteoprotegerina, RANK e RANKL durante a deposição óssea em implantes osseointegráveis sem estabilidade primária instalados em defeitos ósseos preenchidos com o biomaterial ácido Polilático/Poliglicólico adicionado ao Fosfato de Cálcio.

Após análise qualitativa ordinal, podemos notar que ocorreu um balanço na presença destas proteínas, sendo a maior expressão da OPG aos 40 e 60 dias pós-operatórios e da RANK aos 05 dias pós-operatórios. A RANKL, semelhante à OPG, apresentou-se com maior expressão, principalmente aos 40 e 60 dias pós-operatórios.

Conclui-se que o copolímero de ácido polilático/poliglicólico incorporado ao fosfato de cálcio foi biocompatível no tecido ósseo, e permitiu neoformação óssea ao redor dos implantes instalados com ausência de estabilidade primária em defeitos ósseos

de 3.0mm de diâmetro e 6.0mm de comprimento. Além disso, houve o processo de osseointegração em ambos os grupos, mesmo na ausência de estabilidade primária dos implantes.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. Meyer U, Buchter U, Wiesmann HP, et al: Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater* 9: 39, 2005.
2. Joos U, Wiesmann HP, Szuwart T, et al: Mineralization at the interface of implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 25: 783, 2006.
3. Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM et al: A prospective clinical study in humans of an endosseous dental implant partially covered with a powder-sintered porous coating: 3- to 4-year results. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 11: 87, 1996.
4. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T: Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Cin. Oral Impl. Res* 17: 244, 2006.
5. Carvalho PSP, Garcia-Júnior IR, Consolaro A, et al: Estudo experimental sobre matriz natural de osso esponjoso em cavidades ósseas. *Innovations Magazine* 2: 13, 1998.
6. Zechner W, Tangi S, Tepper G et al: Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: A histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*,18: 15, 2003.
7. Carvalho PSP, Luppino F, Mendes VC: Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA FJ *Terapia clínica avançada em*

- implantodontia (ed 1). São Paulo, Artes Médicas, 2002, p 17.
8. Schliephake H, Sharnweber D, Dard M, et al: Biological performance of biomimetic calcium phosphate coating of titanium implants in the dog mandible. *J Biomed Mater Res* 64A: 225, 2003.
  9. Simank HG, Stuber M, Frahm R, et al: The influence of surface coatings of dicalcium phosphate (DCPD) and growth and differentiation factor-5 (GDF-5) on the stability of titanium implants in vivo. *Biomaterials* 27: 3988, 2006.
  10. Lo H, Kadiyala S, Guggino SE et al: Poly (L-lactic acid) foams with cell seeding and controlled-release capacity. *J Biomed Mater Res* 30: 475, 1996.
  11. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ et al: Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 19: 1405, 1998.
  12. Hasegawa Y, Sakano S, Iwase T et al: The long-term behavior of Poly-L-Lactide screws in a minipig fracture model: Preliminary report. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 63: 679, 2002.
  13. Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, et al: Three dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 64: 465, 2003.
  14. Haiyan L, Chang G: Preparation and characterization of bioactive and biodegradable wollastonite/poly(D,L-lactic acid) composite scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15: 1089, 2004.
  15. Grayson ACR, Cima MJ, Langer R: Size and temperature on poly(lactic-co-glycolic acid) degradation and microreservoir device performance. *Biomaterials* 26: 2137, 2005.

16. Ara M, Watanabe M, Imai Y: Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials* 23: 29, 2002.
17. Suda T, Takahashi N, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Ver* 13: 66, 1992.
18. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al: modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endroc Rev* 3: 345, 1999.
19. Khosla S: Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5051, 2001.
20. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova RL, et al: Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers* 145: 61, 2001.
21. Yanfei L, Cain RL, Halladay DL et al: Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 142: 4407, 2001.
22. Evans, CE, Mylchreest S, Andrew JG: Age of donor the effect of cyclic hydrostatic pressure on production by human macrophages and osteoblasts of sRANKL, OPG and RANK. *BMC Musculoskeletal Disorders* 7: 21, 2006.
23. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al: Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17: 875, 1995.
24. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597, 1998.
25. Takahashi N, Udagawa N, Suda T: A new member of tumor necrosis factor

- ligand family, ODF/ OPGL/ TRANCE/ RANKL , regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 449, 1999.
26. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 137, 1997.
  27. Shalhoub V, Faust J, Boyle W.J, et al: Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem* 72: 251, 1999.
  28. Johansson CB, Albrektsson TA: Integration of screws implants in the rabbit. A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2: 69, 1987.
  29. Johansson CB, Albrektsson TA: A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clin Oral Impl Res* 2: 24, 1991.
  30. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M et al: The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant. Dent* 12: 333, 2003.
  31. Morya K, Maruo Y, Minagi S: Does rotational strain at screw tightening affect the attainment or maintenance of osseointegration? *Clin. Oral Impl. Res.* 17: 451, 2006.
  32. Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U: Influence of mono-and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int. J. Oral Maxillofac Surg* 24: 229, 1996.
  33. Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U: Influence of mono-and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int.*

- J. Oral Maxillofac Surg 24: 229, 1996.
34. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, et al: The jumping distance revisited: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 14: 35, 2003.
35. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J: Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 31: 309, 2004.
36. Botticelli D, Berglundh T, Persson LG et al: Bone regeneration at implants with turned or rough surfaces in self-contained defects. An experimental study in dog. *Journal of Clinical Periodontology* 32: 448, 2005.
37. Botticelli D, Persson LG, Lindhe J, et al: Bone tissue formation adjacent to implants placed in fresh extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 17: 351, 2006.
38. Stavropoulos A, Sculean A, Karring T: GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss). *Clin Oral Invest* 8: 226, 2004.
39. Luciano RM, Zavaglia CAC, Duek EAR et al: Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: Studies in vivo and in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14: 87, 2003.
40. Silva CP, Madison P, Dikkes T, et al: *Brain Research* 342: 307, 1985.
41. Vert M, Mauduit J, Li SM: Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials* 15: 1209, 1994.
42. Vert M, Li S, Garreau H, et al: Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters. *Angew Makromol chem.* 247: 239, 1997.
43. Verheyen CCPM, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA, et al: Evaluation of

- hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: mechanical behavior. *J Biomed Mater Res* 26: 105, 1997.
44. Agrawal CM, Athanasiou KA: Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 38: 105, 1997.
45. Devlin H, Hoyland J, Newall JF, et al: Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *J Bone Miner Res* 12: 2061, 1997.
46. Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, et al: Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology* 44: 751, 1999.

# ANEXO “A” – COMITE DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "APLICAÇÃO DO COPOLÍMERO PLA/PGA ADICIONADO AO FOSFATO DE CÁLCIO AO REDOR DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS INSTALADOS SEM ESTABILIDADE PRIMÁRIA EM TÍBIA DE COELHOS. ESTUDO BIOMECÂNICO, HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO." sob responsabilidade de ROBERTA OKAMOTO, FRANCISLEY ÁVILA SOUZA, IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR E EDUARDO HOCHUU VEIEIRA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 16 de junho de 2005, de acordo com o protocolo n<sup>o</sup> 69/05.

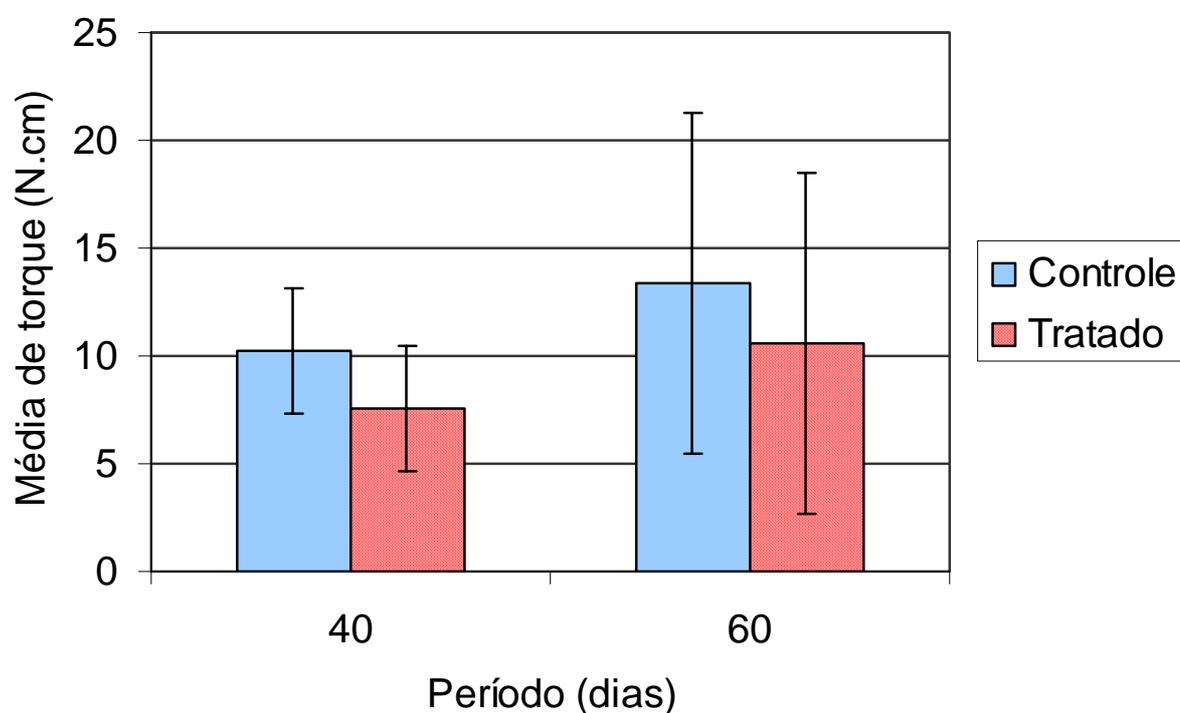
Araçatuba, 11 de julho de 2005.

Prof.<sup>a</sup> Ass. Dr.<sup>a</sup> Maria Gisela Laranjeira  
Presidente

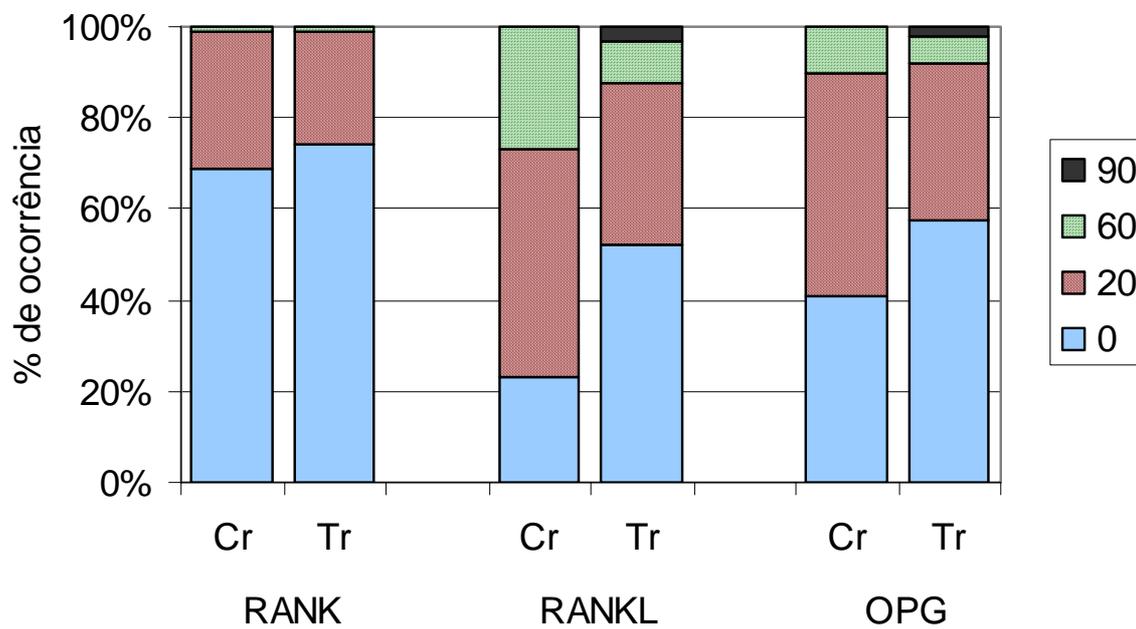
## ANEXO “B” - TABELAS E GRÁFICOS

Estatística	Período (dias)			
	40		60	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	11	8	22	5
2	10	3	11	5
3	8	7	10	22
4	10	9	16	9
5	12	11	8	12
Média	10,2	7,6	5,6	7,0
Desvio padrão	1,5	3,0	42,1	66,2

**Figura 1:** Tabela dos valores de torque-reverso dos implantes do grupo controle e do grupo tratado, nos períodos de 40 e 60 dias.



**Figura 2:** Representação gráfica de médias amostrais de torque reverso (colunas), em N.cm, e de intervalos de 95% de confiança para as médias populacionais (barras verticais)



**Figura 3:** Representação gráfica de % de ocorrências de médias de marcações de células de expressão de proteína, independentemente do período de avaliação, para os grupos: Controle (Cr) e Tratado (Tr)

## ANEXO “C” - FIGURAS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO



Fig 1 - Antissepsia



Fig 2 - Incisão

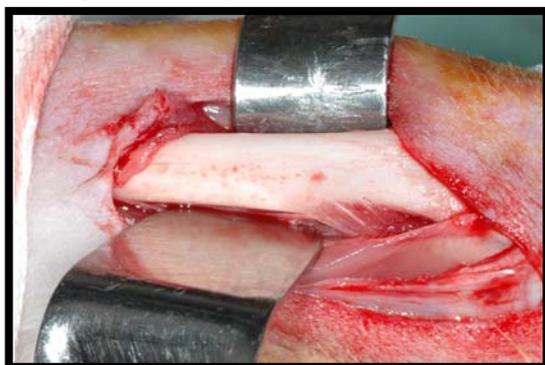


Fig 3 - Acesso cirúrgico



Fig 4 - Fresagem

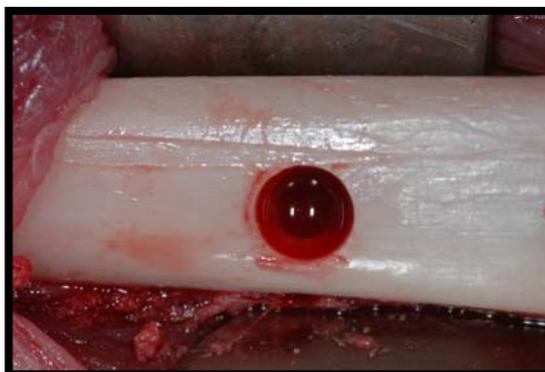


Fig 5 - Leito receptor



Fig 6 - Instalação do implante



Fig 7 - Implante instalado



Fig 8 - Sutura



Fig 9 - Implante instalado com o biomaterial (Grupo Tratado)

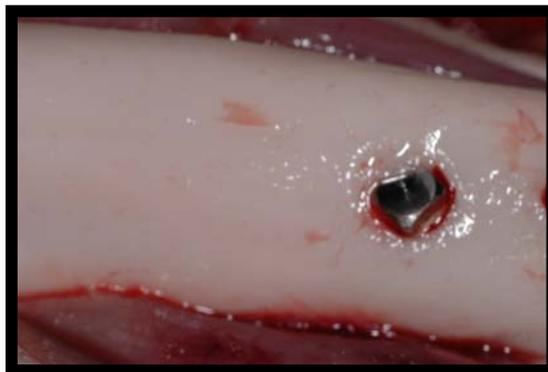


Fig 10 - Posição do implante após 60 dias de instalação

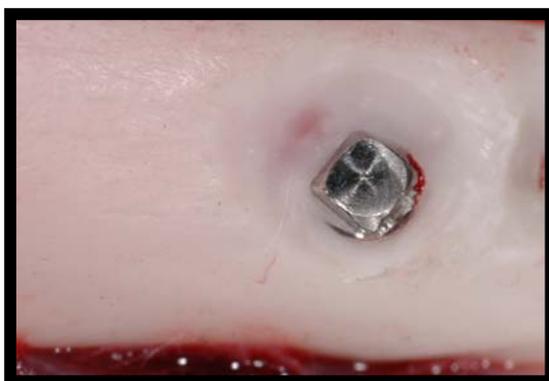


Fig 11 - Preparo do tecido ósseo para encaixe de chave para torquímetro manual

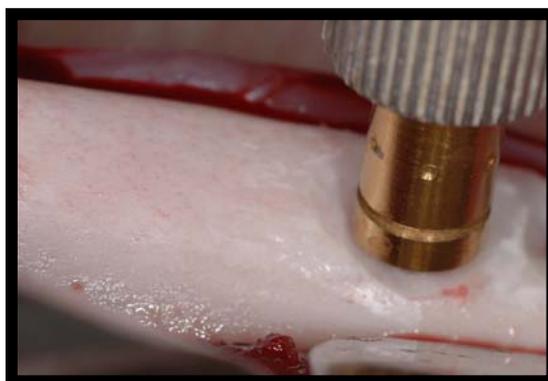


Fig 12 - Remoção do implante por contra torque



Fig 13 - Negativo da área onde foi instalado o implante

## ANEXO “D” - FIGURAS DOS RESULTADOS

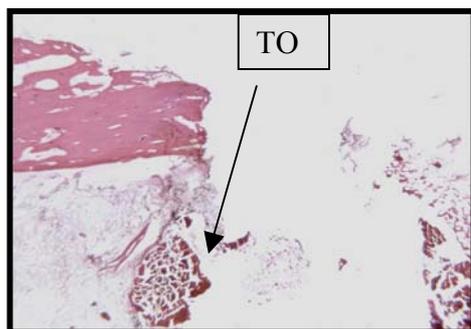


Fig. 1 – tecido ósseo (TO) formado ao redor da área ocupada anteriormente pelo implante (I). HE, original 63x-40 dias (Grupo Tratado)

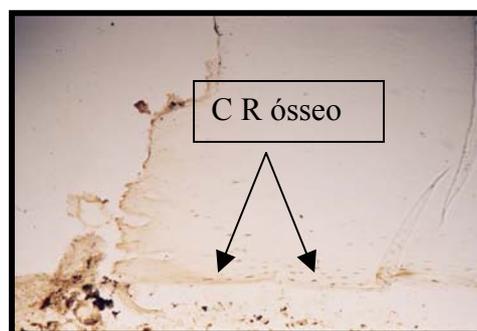


Fig. 2 – Imunomarcção para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

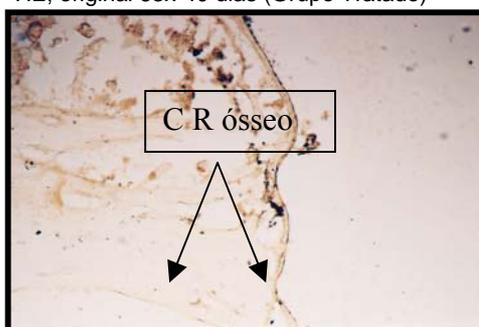


Fig. 3 – Imunomarcção para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado)

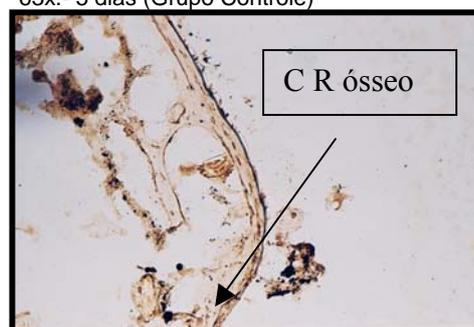


Fig.4 – Imunomarcção baixa para RANK em células de revestimento ósseo. DAB, original, 160x.- 5 dias (Grupo Tratado)

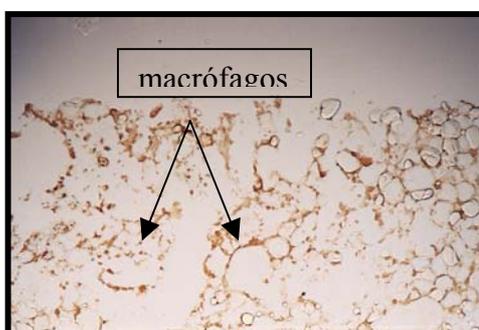


Fig. 5 – Imunomarcção moderada para RANK em pré-macrófaos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

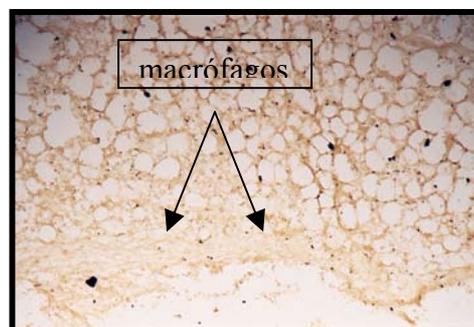


Fig. 6 – Imunomarcção para RANK em pré-macrófaos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado)

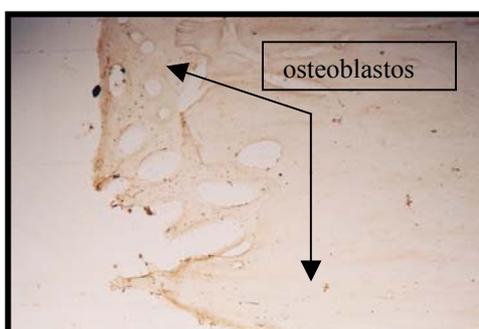


Fig. 7 – Imunomarcção para RANK em células da linhagem osteoblástica. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo controle)

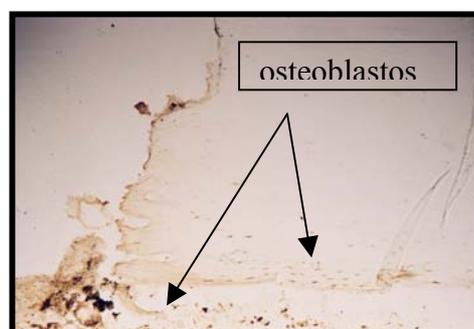


Fig. 8 – Imunomarcção para RANK em células de linhagem osteoblástica. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado)

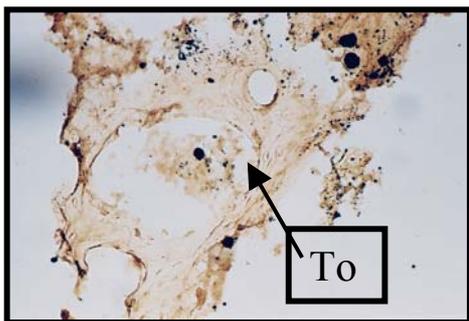


Fig. 9 –Imunomarcção de OPG em tecido ósseo (TO) formado ao redor da área ocupada anteriormente pelo implante. DAB original 160x-40 dias (Grupo Tratado)

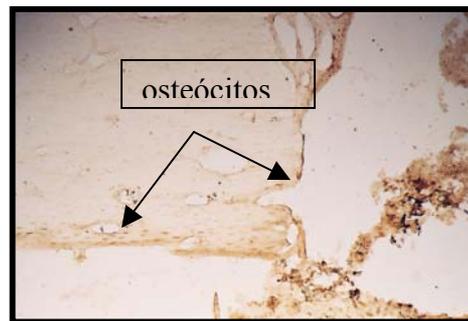


Fig. 10 – Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

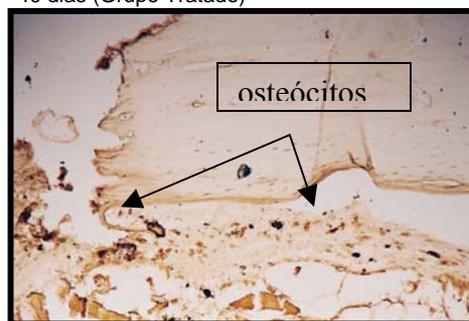


Fig. 11 – Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado)

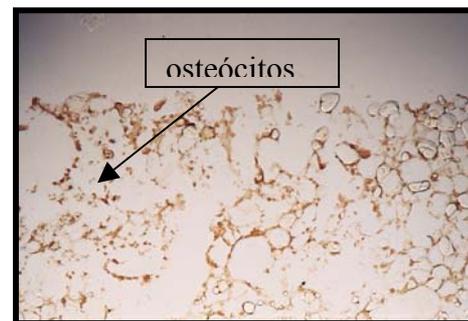


Fig. 12 – Imunomarcção para OPG em osteócitos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

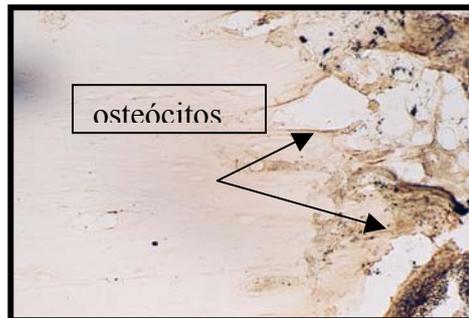


Fig. 13 – Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo controle)

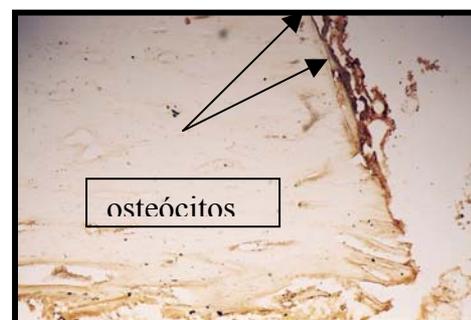


Fig. 14 – Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado)

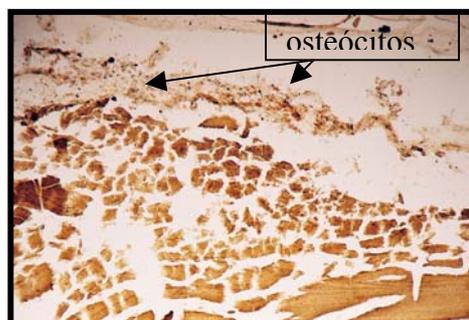


Fig. 15 – Imunomarcção para OPG em osteócitos no canal medular. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo tratado)



Fig. 16 – Imunomarcção para OPG em osteócitos na cortical inferior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo controle)

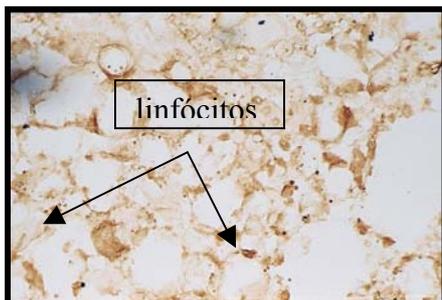


Fig.17– Imunomarcção de RANKL em linfócitos no canal medular. DAB original 160x-5 dias (Grupo Controle)

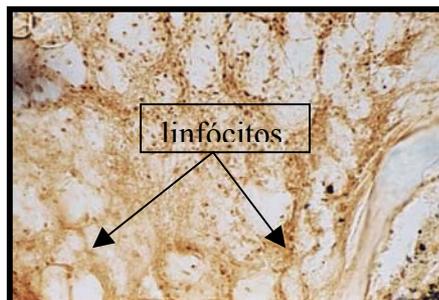


Fig.18– Imunomarcção de RANKL em linfócitos no canal medular. DAB original 160x-60 dias (Grupo Tratado)

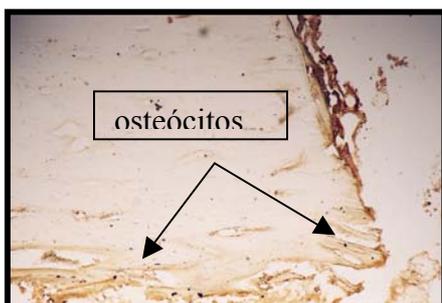


Fig. 19 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

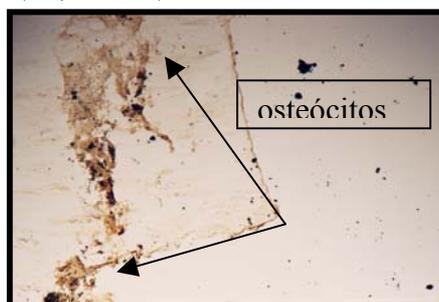


Fig. 20 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Tratado)

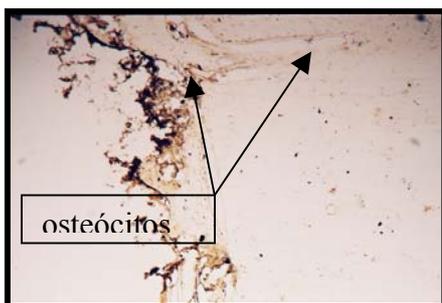


Fig. 21 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Controle)

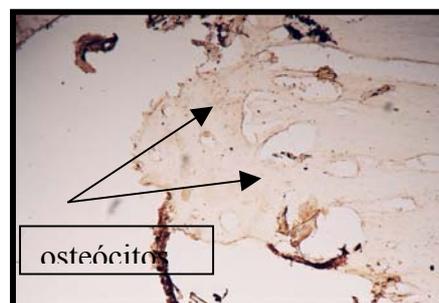


Fig. 22 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical superior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado)

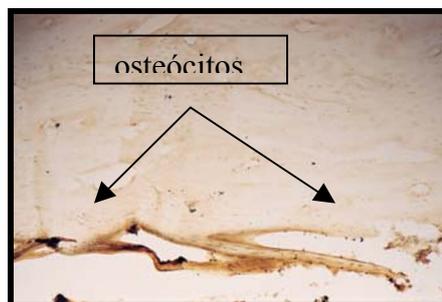


Fig. 23 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical inferior. DAB, original, 63x.- 5 dias (Grupo Controle)

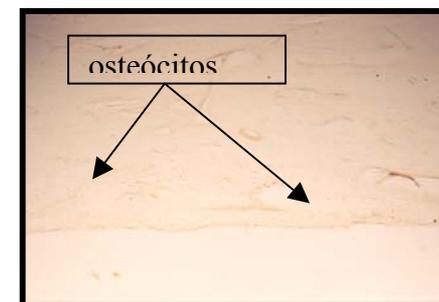


Fig. 24 – Imunomarcção para RANKL em osteócitos na cortical inferior. DAB, original, 63x.- 60 dias (Grupo Tratado)

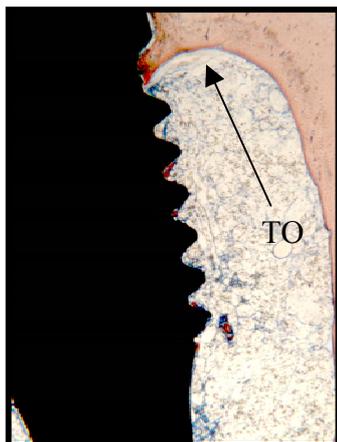


Fig. 25 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel 4x – 60dias (Grupo Controle)

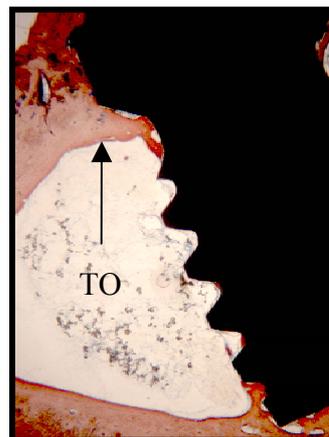


Fig. 26 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel 4x – 60 dias (Grupo Tratado)

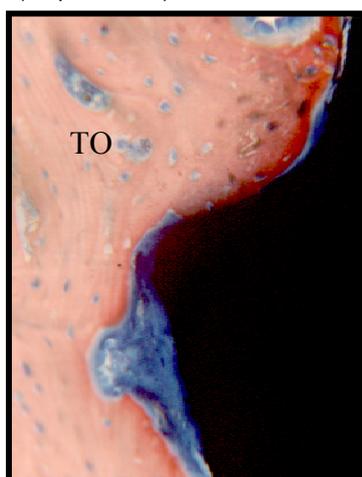


Fig. 27 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Controle)

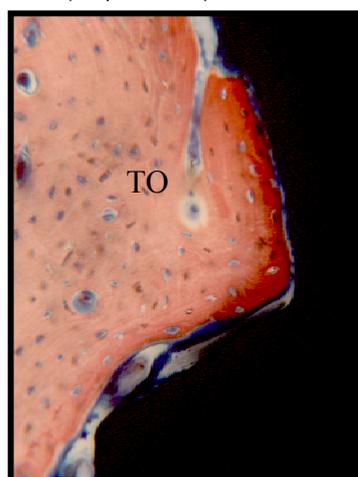


Fig. 28 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante. Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Tratado)

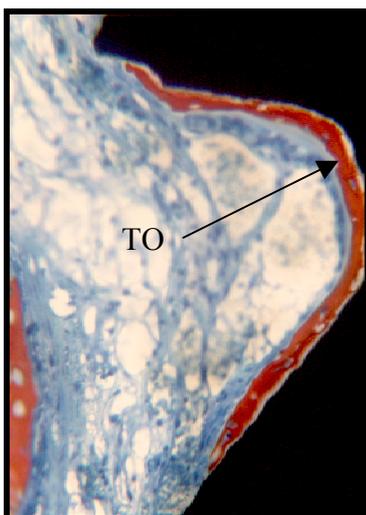


Fig. 29 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante (roscas). Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Controle)

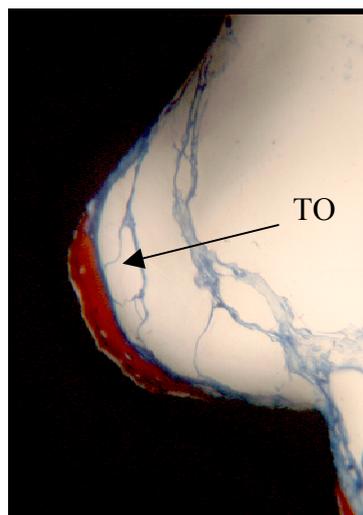


Fig. 30 – tecido ósseo (TO) formado ao redor do implante (roscas). Vermelho de alizarina e azul de Stevenel-160x (Grupo Tratado)

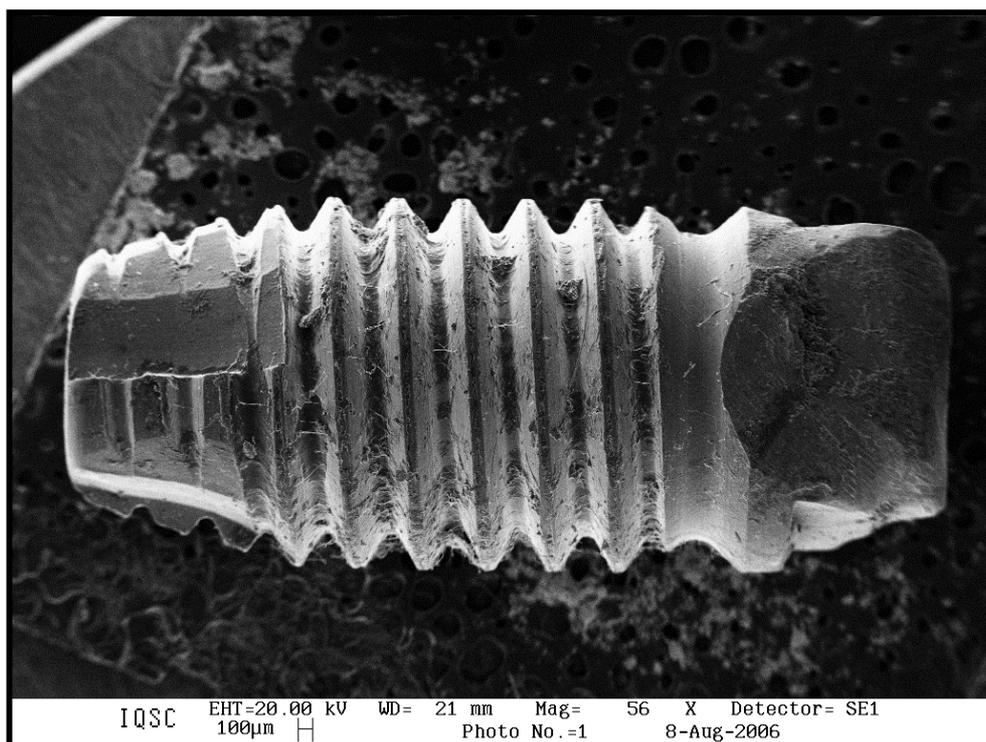


Fig. 31 – Tecido ósseo aderido na superfície do implante. MEV 56x- 60 dias (Grupo Tratado).

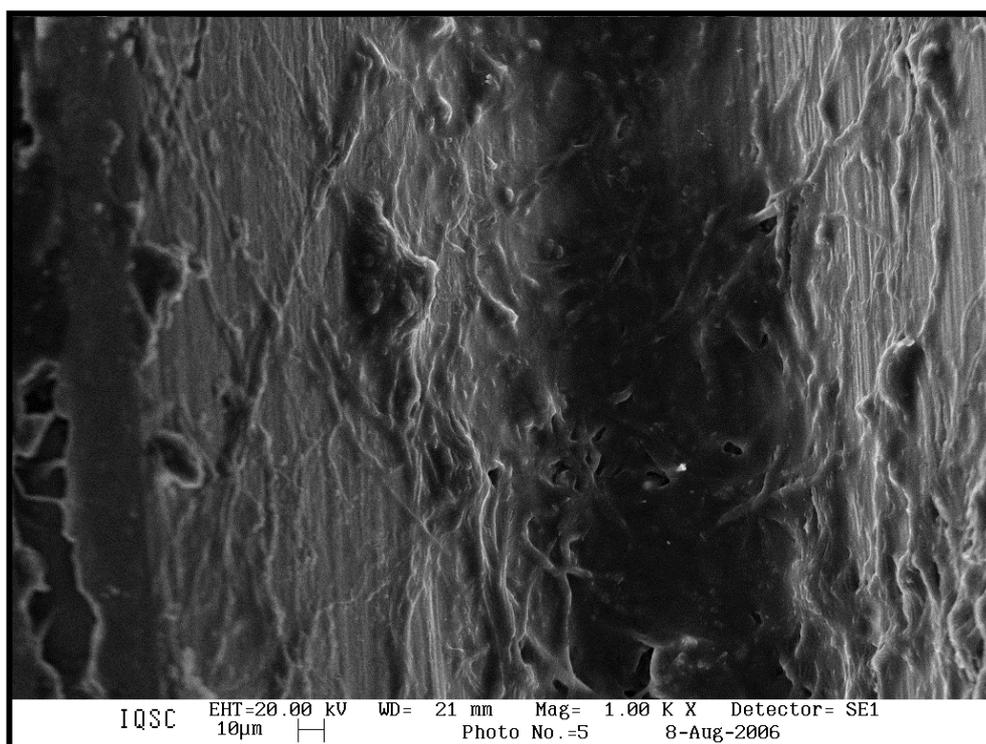


Fig. 32 – Tecido ósseo aderido na superfície do implante. MEV 1.00 k x - 60 dias (Grupo Tratado).

## ANEXO “E” – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

### Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

#### Guide for Authors

#### Notice to Contributors

Reprints of the notice are available from the Editor-in-Chief and are also available at [www.joms.org](http://www.joms.org). The JOURNAL publishes articles reflecting a wide range of opinions and techniques, provided they are original, contribute new information, and meet the standards of scientific thought, rational procedure, and literary presentation.

*Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/joms>, authors will be guided through the electronic submission process; original source files (text documents in Word, image files in TIFF or EPS) are required. The author should specify a category designation for the manuscript (original investigation, review article, letter to the editor, etc) and choose a set of classifications from the list provided online. All authors must download and fill out the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office ([juliush@ohsu.edu](mailto:juliush@ohsu.edu)). All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be sent via e-mail.

**All author correspondence may be directed to the Editorin- Chief:**

Dr Leon A. Assael

Oral and Maxillofacial Surgery

School of Dentistry?SD-522

Oregon Health & Science University

611 SW Campus Dr

Portland, OR 97239

Phone: (503) 494-0293

Fax: (503) 494-0294

E-mails: [assaell@ohsu.edu](mailto:assaell@ohsu.edu), [juliush@ohsu.edu](mailto:juliush@ohsu.edu)

**Original articles are considered and accepted for publication on the condition that they have not been published, or submitted for publication, elsewhere.** The Editor reserves the right to edit manuscripts to fit articles within the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. A title page should be included with each article that lists the title, the authors' names, degrees, affiliations, complete mailing address (including street number), and the telephone number, fax number, and e-mail address for the corresponding author. Titles of articles should be descriptive but as concise as possible. A structured abstract (introductory summary) of no more than 250 words should be included. It should be divided into four sections labeled *Purpose*, *Materials (or Patients) and Methods*, *Results*, and *Conclusions*.

All Contributors to *JOMS* should refer to the Consort statement on clinical research design and the Helsinki statement on medical protocols and ethics.

Consort statement:

<http://www.consort-statement.org/statement/revisedstatement.htm>

Helsinki:

<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>

**References.** Type with double spacing. All references given must be cited in numerical order in the text. Bibliographies and reading lists are not used. For journal references, give the author's name, article title, journal name as abbreviated in Index Medicus, volume, pagination, and year.

1. Regezi JA, Batsakis JG, Courtney RM: Granular cell tumors of the head and neck. *J Oral Surg* 37:402, 1979

For books, give the author's name, book title, location and name of publisher, and year of publication (exact page numbers are required for direct quotations):

1. Skinner EW, Phillips RW: *Science of Dental Materials* (ed 5). Philadelphia, PA, Saunders, 1960, p 246

**Figures.** All figures must be numbered and cited in the text in order.

**Legends.** All submitted figures require a legend. For photomicrographs, magnification and stain should be specified.

**Photographs.** Photographs should be high-quality, sharp images. Color art and color photography submissions are encouraged. Images must be high-resolution digital illustrations (EPS or TIFF files); Powerpoint is acceptable for review purposes, but not of sufficient quality for publication. Authors may contact Elsevier for more information or should download a copy of the Specifications for Supplying Digital Artwork from [www.us.elsevierhealth.com/subguide](http://www.us.elsevierhealth.com/subguide).

**Tables.** Each table should be logically organized and should supplement the article.

Each table should be numbered consecutively and cited in the body of the text in order.

Title and footnotes should be on the same page with the table. Do not draw vertical rules in tables.

**Acknowledgments.** Only persons who have made significant contributions to an article can be acknowledged.

**Permission and Waivers.** These should accompany the manuscript when it is submitted for publication. Include the following statement in the covering letter: In consideration of the *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in the event that such work is published in the JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. Permission of original author and publisher must be obtained for direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that is not your own. (Up to 100 words of prose material usually can be quoted without getting permission, provided the material quoted is not the essence of the complete work.) **Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Waivers must be obtained for full-face photographs unless eyes are masked to prevent identification. Waiver forms are available from the Editor-in-Chief.**

**Financial Interests.** As specified in the AAOMS disclosure statement regarding dual commitment, any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors. A covering letter at the time of submission should inform the Editor about pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is

accepted, the Editor will discuss with the authors how best to disclose the relevant information.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)