

RESUMO

SOUZA, R.G.B. Avaliação histomorfométrica do reparo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou motor piezoelétrico preenchidos com hidroxiapatita. Faculdade de Odontologia de Barretos.UNIFEB. 2012.

O propósito do presente estudo foi avaliar do ponto de vista histométrico o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico criados na calota craniana de ratos. Quarenta animais sofreram a criação de defeitos ósseos com 5 mm de diâmetro, realizados com broca trefina - **grupo T** (20 animais) ou com instrumento piezoelétrico - **grupo P** (20 animais), que foram preenchidos ou não com hidroxiapatita. Os animais de ambos grupos foram divididos em 2 subgrupos que receberam os seguintes tratamentos: **T** - os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com uma membrana de cortical óssea bovina; **T + Ha** - os defeitos foram preenchidos com hidroxiapatita e protegidos com uma membrana de cortical de osso bovino; **P** - os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com uma membrana de cortical óssea bovina; **P + Ha** - os defeitos foram preenchidos com hidroxiapatita e protegidos com membrana de cortical óssea bovina. Cinco animais de cada subgrupo foram submetidos à eutanásia nos períodos de 30 e 45 dias. A análise histométrica, realizada com software de análise de imagem, permitiu avaliar a quantidade de osso

neoformado, que foi calculada em porcentagem, em relação a área total do defeito criado. Testes estatísticos foram aplicados (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na formação de tecido ósseo no período de 30 dias. Aos 45 dias o grupo T evidenciou maior formação óssea ($37,73 \pm 15,21$), estatisticamente significativa, quando comparado com os grupos P ($14,26 \pm 3,88$) ($p < 0,05$), T + Ha ($10,05 \pm 3,37$) e P + Ha ($9,58 \pm 3,11$) ($p < 0,01$) no período de 30 dias. Os resultados obtidos permitiram concluir que o melhor tratamento foi observado quando os defeitos ósseos foram criados com broca trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo, protegidos com membrana de cortical óssea bovina.

Unitermos : Biomateriais, Piezocirurgia, reparação de feridas, regeneração óssea, hidroxiapatita.

ABSTRACT

SOUZA, R.G.B. Histomorphometric evaluation of the repair in critical-size defects created in rat calvaria, performed with a burr or trephine piezoelectric motor filled with hydroxyapatite. Barretos Dental School. UNIFEB. 2012.

The purpose of this study was to evaluate in terms of histometric bone repair in critical-size defects created in rat calvaria. Forty animals were the creation of bone defects with 5 mm in diameter, made with drill trephine - T group (20 animals) or instrument piezoelectric - P group (20 animals), which were filled with hydroxyapatite or not. The animals of both groups were divided into two subgroups that received the following treatments: T - the defects were filled with blood clot and protected with a membrane of bovine cortical bone, T + Ha - the defects were filled with hydroxyapatite and protected with a membrane cortical bovine bone, P - the defects were filled with blood clot and protected with a membrane of bovine cortical bone, P + Ha - the defects were filled with hydroxyapatite and protected with bovine cortical bone membrane. Five animals of each group were euthanized for the time periods of 30 and 45 days. Histometric analysis, carried out with image analysis software, allows to evaluate the amount of newly formed bone which was calculated as a percentage, relative to the total area of the created

defect. Statistical tests were applied (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). There was no statistically significant difference between groups in the formation of bone tissue within 30 days. At 45 days the T group showed greater bone formation (37.73 ± 15.21), statistically significant when compared to group P (14.26 ± 3.88) ($p < 0.05$), T + Ha (10.05 ± 3.37) and P + Ha (9.58 ± 3.11) ($p < 0.01$) within 30 days. The results showed that the best treatment was observed when the bone defects were created with drill trephine, filled with blood clot protected with bovine cortical bone membrane.

Keywords: Biomaterials, Piezosurgery, wound repair, bone regeneration, hydroxyapatite.

1 – INTRODUÇÃO

É reconhecidamente uma situação clínica relevante, principalmente na implantodontia, áreas que apresentam ausência ou insuficiência na quantidade de tecido ósseo, quer em sua largura e ou na altura. Esta condição dificulta a correta indicação do procedimento clínico, que para solucioná-la, requer o uso de substitutos ósseos.

O uso do enxerto de osso autógeno ainda é considerado o “padrão ouro” e, por esta razão, é o material de primeira escolha. No entanto o risco de contaminação do material, a necessidade de criação de duas áreas cirúrgicas, a necessidade, para alguns casos, de ambiente hospitalar, o elevado grau de reabsorção pós-operatória e a morbidade da área doadora, levaram os profissionais à seleção de outros substitutos ósseos, como os biomateriais (Kalish et al., 2008, Potyjanayakul et al., 2010).

Biomateriais podem ser definidos como uma substância isolada ou associada que pode ser natural ou sintética, inerte aos tecidos e que são utilizados para aumentar ou substituir, de modo parcial ou integral, tecidos e ou órgãos (Williams, 1987). Biomateriais como o osso homogêneo, xenógeno, materiais sintéticos ou aloplásticos tem sido utilizados com maior frequência nos últimos anos. Várias vantagens contribuem para o aumento do uso destes na prática clínica, principalmente por serem de fácil obtenção e possibilidade de obtenção em quantidades significativas, e principalmente,

porque não requerem a criação de uma segunda área cirúrgica (Topazian et al., 1971). Pesquisas comprovaram a efetividade de diferentes biomateriais como o vidro bioativo (Furlaneto et al., 2007), sulfato de cálcio (Furlaneto et al., 2007) osso seco congelado desmineralizado (DFDB) (Lim et al., 2000; Turonis et al., 2006; Kalish et al., 2008), plasma rico em plaquetas (Messora et al., 2008a, 2008b; Nagata et al., 2009, 2010); proteína morfogenética óssea recombinante humana (Pang et al., 2004); materiais cerâmicos como o fosfato de cálcio bifásico (Park et al., 2010), fosfato beta-tricálcio (Yun et al., 2010); matriz derivada de esmalte (Potijanyakul et al., 2010); hormônio da paratireóide (Yun et al., 2010); associação de componentes orgânicos e osso mineral bovino - PepGen p-15 (Artzi et al., 2008), osso bovino (Matzenbacher et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Ramírez-Fernandez et al., 2011) e associação de compostos de fosfato de cálcio (Park et al., 2009).

Segundo Mavropoulus et al. (2011) a hidroxiapatita possui características especiais além da sua biocompatibilidade. Possui semelhança com os constituintes inorgânicos do tecido ósseo, radiopacidade, resistência mecânica, não é tóxica, possui limitada reação tecidual além de ter a capacidade de adsorver proteínas na sua superfície. Por ser um biomaterial que tem a capacidade de osteocondução (do Carmo et al., 2011) a hidroxiapatita destaca-se entre os biomateriais disponíveis para a realização de procedimentos de reconstrução óssea. Juntamente com o Beta-fosfato tricálcio - TCP têm se constituído objeto de pesquisas em diferentes

condições experimentais (Monroe et al. 1971, Horch et al., 2006, Souza, 2010, Martins, 2010, do Carmo et al., 2011).

Por outro lado procedimentos cirúrgicos em implantodontia que envolvem o corte do tecido ósseo (osteotomia) requer cuidados especiais para evitar danos nos tecidos moles como também efeitos adversos no reparo ósseo. A necrose óssea induzida pelo aquecimento decorrente do uso de brocas é relatada na literatura. Estudos relataram que a temperatura próximo de 47°C durante 60 segundos constitui um limiar para a sobrevivência do tecido ósseo tratado (Eriksson & Albrektson 1982, 1983).

Mais recentemente estudos documentaram o uso do ultrassom piezoelétrico. Trata-se de uma instrumento que pode alcançar, com eficácia, regiões anatômicas delicadas, e com menor risco de danos aos tecidos moles e nervos. A piezocirurgia possibilita realizar com eficiência e segurança diferentes procedimentos como a coleta de osso autógeno, elevação da membrana sinusal, lateralização do nervo alveolar inferior e a remoção de implantes fraturados (Kfoury et al., 2009). Alguns estudos evidenciaram como vantagens do uso do instrumento piezoelétrico quando comparado com brocas convencionais; o menor dano em membrana sinusal (Barone et al., 2008), elevado índice de sucesso, próximo de 98% (Vercellotti et al., 2004) além do maior conforto ao paciente (Leclercq et al., 2008). Estas vantagens desta técnica tem despertado o interesse dos clínicos e pesquisadores.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – SUBSTITUTOS ÓSSEOS

A ausência de tecido ósseo nos rebordos alveolares tem sido uma situação clínica de difícil recuperação estético-funcional. Pode ser em decorrência de infecções, de traumatismos dento-alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita e de patologias que envolvem maxila e mandíbula. Doença periodontal avançada, cirurgias traumáticas ou por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada contribuem para este quadro (Fardin et al., 2010).

Um ponto que merece atenção do cirurgião e que deve ser considerado na escolha do substituto ósseo é a interação deste no leito receptor. Três diferentes formas de interação poderá ocorrer (Urist, 1977, Marcantônio Jr. 1997): *Osteocondução*, o biomaterial atuará como um substrato para possibilitar a formação de novo osso. O material não terá capacidade de induzir modificações celulares e a formação de células formadores de osso (osteoblastos). Implantes cerâmicos são considerados osteocondutores; *Osteoindução*, o biomaterial quando implantado em sítios, ósseos e não ósseos, induzem a transformação de células indiferenciadas do tecido conjuntivo em condroblastos, pré-osteoblastos ou

osteoclastos, levando a formação de tecido mineralizado e *Osteogênico* possuem células viáveis no seu conteúdo (osteoblastos) e, conseqüentemente promovem rápida formação e ossificação da área.

Os substitutos ósseos podem ser classificados quanto a sua origem em: *autógenos* (mesmo indivíduo) *homógenos* (mesma espécie), *heterógenos* (espécies diferentes) e *aloplásticos* (sintéticos). Os enxertos autógenos podem ser obtidos de fontes doadoras intra ou extrabucal e constituem o material de escolha enquanto que os enxertos homógenos são obtidos de parentes do receptor ou em bancos de tecidos e órgãos. Estes possuem diferentes apresentações como o osso congelado de ilíaco, o FDBA (osso liofilizado, congelado) e DFDBA (osso liofilizado, congelado e desmineralizado) (Marcantonio Jr., 1997).

Por outro lado os biomateriais aloplásticos são substitutos sintéticos facilmente encontrados em quantidade ilimitada para o seu uso clínico. Entre suas vantagens destaca-se a dispensa de necessidade de um segundo sítio cirúrgico do paciente. São encontrados em diferentes grupos como metais, polímeros e cerâmicos (Cunha et al. 2007).

As cerâmicas de fosfato de cálcio, entre as quais são incluídas o alfa fosfato-tricálcio, beta fosfato-tricálcio, ortofosfato de cálcio, fosfato bifásico e a hidroxiapatita, tem sido muito estudadas. A hidroxiapatita sendo um dos constituintes de maior grau entre os componentes minerais do

tecido ósseo e dos dentes, tem despertado atenção e sido muito estudada (Zenóbio et al., 1998; Canettieri, 2006; Sousa, 2010, Martins, 2010).

2.2 - HIDROXIAPATITA

O estudo do uso de materiais cerâmicos como biomateriais para estimular a osteogênese é relatada desde 1920 (Albee, 1920). Por ser um biomaterial que possui elevada biocompatibilidade, ser constituinte da fase inorgânica do tecido ósseo e similaridade com componentes do tecido ósseo e dentes, a hidroxiapatita (Ha) tem despertado o interesse para diferentes estudos (Costa et al. 2009). A hidroxiapatita é um dos mais importantes materiais a base do fosfato de cálcio para a substituição do tecido ósseo (Sponer et al., 2011). Estudos revelaram ainda que a hidroxiapatita não possui efeitos citotóxicos tanto locais quanto sistêmicos (Canettieri, 2006).

A Hidroxiapatita pode ser obtida por processos que utilizam altas e baixas temperaturas. Em decorrência do processo de sintetização, há características diferenciais entre estas. As obtidas por processo de baixa temperatura possuem cristais de pequenos tamanhos que quando precipitados por umidade adquirem características próximas ao tecido ósseo. Já as obtidas por altas temperaturas os cristais são de dimensões maiores (Fulmer et al., 1992). Estudo recente avaliou a hidroxiapatita sintética porosa sintetizada com diferentes temperaturas (150° C e 700° C) com apatita

biológica (osso bovino, Bio-Oss) com grânulos porosos de 0,6 a 1.0 mm de diâmetro implantados em defeitos ósseos criados em tibia com 3,7 mm de diâmetro e 8 mm de profundidade. Concluíram que as propriedades bioativas da hidroxiapatita sintetizada em baixa temperatura (150° C) são comparáveis com a apatita biológica (Sponer et al., 2011).

O uso clínico da hidroxiapatita está indicado em procedimentos não só da área odontológica (Legeros, 1988; Boeck-Neto et al., 2002) como na área médica (Uchida et al., 1990, Aoki, 1991, Bursteins et al. 1997, Costa et al. 2010). Na área odontológica há relatos do seu uso para preenchimento de alvéolos pós exodontia, áreas de reabsorção óssea, defeitos periodontais, em implantodontia e preenchimento de cavidades em rebordo alveolar (Legeros, 1988, Boeck et al., 1999). Porém um dos questionamentos que surge quando se utiliza biomateriais particulados, além da sua baixa resistência mecânica é o deslocamento de grânulos do material para outras regiões (Borges et al., 2000, E´gues, 2005, Rigo et al., 2007; Jimenez et al., 2009). Alia-se ainda a estes questionamentos o tamanho da partícula do biomaterial pois esta poderá interferir diretamente no extensão da superfície disponível para reagir com células e fluídos biológicos. A porosidade do biomaterial também tem a sua importância. A porosidade superficial do biomaterial possibilita maior conexão mecânica deste com o tecido ósseo (Teixeira, 2009, Sponer et al., 2011). Estudos atestam que biomateriais porosos oferecem regiões adicionais para o crescimento ósseo

interno, possibilitando maior integração do material com o tecido promovendo em contrapartida uma estabilização mecânica (Teixeira, 2009).

A hidroxiapatita pode ser encontrada em diferentes apresentações: granular ou em bloco, podendo ser densa ou porosa. Relatos encontrados na literatura atestaram que a forma densa dificulta a neoformação óssea no seu interior enquanto que a forma de blocos além de apresentar-se frágil quando submetida à carga é de difícil remodelamento no leito receptor. (Guirro, 1995, Burstein et al., 1997).

Uma vantagem da hidroxiapatita é a possibilidade de associação com outros biomateriais como osso desmineralizado em pó (Lew et al., 1997), com células da medula óssea (Cristoline et al., 1999), proteínas morfogenéticas (Ferreira et al., 2004), antibióticos (Kim et al., 2005), alendronato (Canettieri, 2006), matriz óssea orgânica (Braz et al., 2003), quitosano (Li et al., 2005), beta-tricálcio fosfato (Sousa, 2010, Martins, 2010), estrôncio (do Carmo et al., 2011) como também esta pode se ligar a constituintes do hospedeiro. Estudos recentes avaliaram a hidroxiapatita associada a diferentes substâncias como a lignina (Vital et al., 2008) e histatinas, proteinases que se ligam à hidroxiapatita e proporcionam a esta uma maior resistência à degradação proteolítica (McDonald et al., 2011). Sem dúvida o uso clínico dos biomateriais cerâmicos tem ganho o interesse dos clínicos e pesquisadores nos últimos anos.

2.3 - PIEZOCIRURGIA

O sistema o qual fundamentou o "efeito piezoelétrico" foi apresentado pela primeira vez em 1880 por Jean e Marie Curie (Pavliková et al. 2011). Os pesquisadores observaram que certas cerâmicas e cristais sofriam deformações quando havia a passagem por eles, de corrente elétrica. Observaram também a formação de oscilações em frequência ultrassônica. Estas vibrações obtidas eram amplificadas e transferidas para uma ponta a qual quando aplicada sob ligeira pressão sobre o tecido alvo resultava em cavitações, resultando em corte mecânico exclusivamente sobre tecido mineralizado (Crosetti et al., 2009).

O instrumento piezoelétrico foi desenvolvido em 1988 pelo cirurgião italiano, Tomaso Vercellotti (Vercellotti et al., 2001). Utiliza uma frequência modulada de ultrassom, que permite corte altamente precisos e seguros do tecido mineralizando. Nervos, vasos e tecidos moles não são lesados pela microvibração (60 a 200 mm / seg), que são ajustados para atingir apenas tecido mineralizado (Stubinger et al., 2005). Estudos revelaram que pressão da ponta piezoelétrica de 100 g no modo contato é suficiente para obtenção de corte com profundidade adequada (Parmar et al., 2011).

As pontas ultrassônicas constituem um efetivo instrumento de corte para cirurgias experientes em várias situações: como coletor ósseo,

em osteotomias sagitais mandibulares, na remoção de implantes fraturados, na lateralização de nervo alveolar inferior, no acesso para cirurgias de seios maxilares, distrações ósseas, na divisão de crista de rebordo alveolar, extração de raízes com anquilose alveolodental, corticomia de precisão para movimentação dental, osteotomias de segmentação de maxila e expansão rápida cirurgicamente assistida e obtenção de osso autógeno para enxerto entre outras (Kfourri et al., 2009, Peivandi et al., 2007, Silva et al., 2010).

A principal vantagem da piezocirurgia é que uma vez em contato com tecidos moles, o dispositivo de corte tem sua atividade diminuída ou cessada, preservando a integridade dos tecidos, vasos e nervos. Além destas, destaca-se ainda, a reduzida produção de calor e reduzido sangramento com perda sanguínea mínima (Robiony et al., 2004, Pavliková et al., 2011).

Estudo recente avaliou a produção de calor durante osteotomia para instalação de implantes utilizando-se de método convencional (brocas) e dois tipos de instrumentos piezoelétricos. Concluíram que o uso de instrumento piezoelétrico o tempo cirúrgico de osteotomia é maior e que a hipertermia no tecido ósseo é maior que broca convencionais. Porém quando utilizado com boa irrigação é um método igualmente seguro (Rashad et al., 2011). Estudo comparativo do instrumento piezoelétrico com método convencional para instalação de implantes comprovaram similar estabilidade primária dos implantes, independente da técnica (Baker et al.,

2012). A piezocirurgia tem despertado grande interesse mas requer o desenvolvimento de pesquisas para fortalecer ainda mais o uso clínico desta técnica.

3 - PROPOSIÇÃO

Constitui propósito do presente estudo avaliar do ponto de vista histométrico a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente com broca trefina ou com instrumento piezoelétrico em calvária de ratos, preenchidos ou não com hidroxiapatita.

4 - MATERIAL E MÉTODO

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Campus de Araçatuba - UNESP (Processo 1201/2011) (Anexo 1).

Animais

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) com peso aproximado entre 300 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental, em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada uma, separados de acordo com o grupo experimental, alimentados com ração adequada e água *ad libitum* durante todo período experimental, e em sala climatizada com temperatura entre 22 - 24°C e com ciclo de 12 horas de luz dia.

Procedimentos experimentais

De modo aleatório os animais foram divididos em dois grupos com 20 animais cada um: grupo **T** e grupo **P**. Todo procedimento cirúrgico foi realizado na calvária dos animais. Nos animais do grupo **T** foram criados com instrumentos rotatórios (broca trefina) defeitos de tamanho crítico

(DTCs) com 5 mm de diâmetro e nos do grupo **P** os DTCs foram realizados com instrumento piezoelétrico.

Criação do defeito com broca trefina - grupo T (Figura 1).

Os animais dos grupos **T** foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (0,7 mg/100g do peso corporal) associado a xylazina (0,6 mg/100g do peso corporal). Nos animais do grupo **T** após tricotomia e antissepsia da região da calota craniana dos animais, foi realizado o procedimento de criação do defeito de tamanho crítico (DTC) que seguiu o descrito por Furlaneto (2007) e Messora et al., (2008a, 2008b). Resumidamente o procedimento constou de uma incisão em formato de "U", com sua base voltada para a região anterior da calvária seguido do levantamento de um retalho de espessura total. A seguir, um defeito de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro foi criado nos ossos parietais, envolvendo a sutura sagital. O defeito foi realizado utilizando uma broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (Dentoflex Sistemas de Implante, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma peça de mão em motor em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. A seguir, foram criadas duas marcações em formato de "L" que foram preenchidas com amálgama, uma na porção posterior do defeito e outra na porção anterior. Estas marcações, realizadas distando 2 mm da margem do defeito, serviram para

localizar o centro do defeito durante o processamento laboratorial e, também, como referência para determinar a margem óssea original do defeito durante a análise histométrica (Furlaneto et al., 2007; Messoria et al., 2008a, 2008b, Santinoni, 2012).

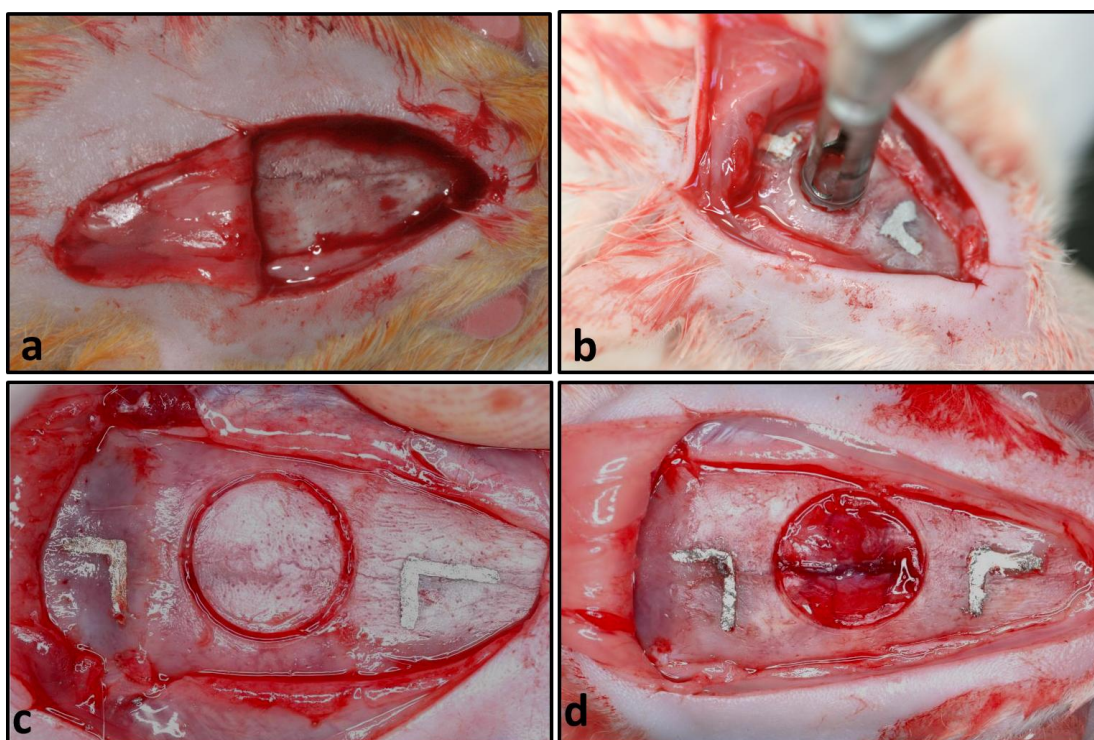


Figura 1. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico realizado com broca trefina. a) calota craniana exposta; b) broca trefina em posição; c) osteotomia realizada ; d) defeito ósseo concluído.

Criação do defeito com instrumento Piezoelétrico – grupo P (Figura 2)

Os animais do grupo **P** foram anestesiados nas mesmas condições utilizadas nos animais do grupo **T**. Após tricotomia e anti-sepsia

da região da calota craniana dos animais, foi justaposto ao tecido ósseo da calota craniana, um guia cirúrgico (Figura 2 b) criado especialmente para esta finalidade, o qual apresentava diâmetro interno de 5 mm. Para a osteotomia foi utilizado uma ponta do instrumento piezoelétrico (ponta ES009) acoplada à peça de mão do equipamento piezoelétrico (Piezosonic Esacrom, VK Driller São Paulo, SP, Brasil), sob irrigação abundante com solução salina estéril. A seguir, foram criadas duas marcações em formato de “L” que foram preenchidas com amálgama, uma na porção posterior do defeito e outra na porção anterior. Estas marcações foram realizadas nas mesmas condições descritas para os defeitos provocados com broca trefina.

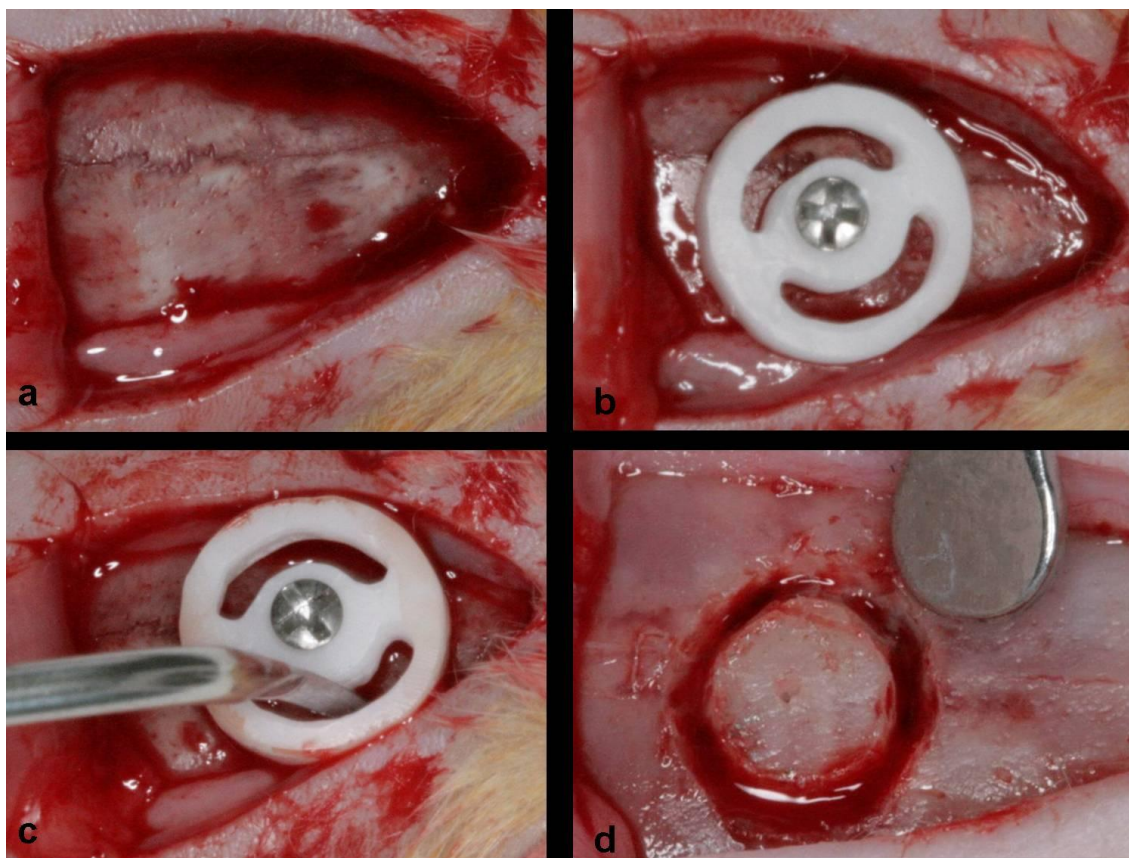


Figura 2. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico com instrumento piezoelétrico. a) calota craniana exposta; b) guia cirúrgico fixado na calota craniana; c) ponta do instrumento piezoelétrico em posição para osteotomia; d) defeito ósseo concluído.

Grupos e tratamentos

Os animais dos grupos **T** e **P** foram aleatoriamente divididos em dois subgrupos com 10 animais cada um. Desta forma tínhamos no estudo 4 grupos de 10 animais que receberam os seguintes tratamentos: **T** - os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com uma membrana de cortical óssea bovina posicionada sobre os mesmos; **T + Ha** - os defeitos foram preenchidos com hidroxiapatita (Hidroxiapatita®),

Bionnovation, São Paulo, Brasil) (Figura 3 e 5) e protegidos com uma membrana de cortical óssea bovina posicionada sobre os defeitos **P** - os defeitos foram preenchidos somente coágulo sanguíneo e protegidos com uma membrana de cortical de osso bovino posicionada sobre os mesmos; **P + Ha** - os defeitos foram preenchidos com hidroxiapatita (Hidroxiapatita®, Bionnovation, São Paulo, Brasil) e protegidos com uma membrana de cortical de osso bovino posicionada sobre os mesmos.

O volume do biomaterial foi padronizado para todos os defeitos criados experimentalmente nos espécimes dos grupos **T + Ha** e **P + Ha** e permitiu o preenchimento de toda cavidade cirúrgica.

Em todos os espécimes de todos os grupos foi utilizada uma membrana de cortical de osso bovino (GenDerm®, Baumer, São Paulo, Brasil) (Figura 4); recortada com diâmetro superior à do defeito ósseo provocados na calvária, mantida em posição por intermédio de suturas realizadas a partir dos tecidos moles marginais.



Figura 3. Hidroxiapatita utilizada

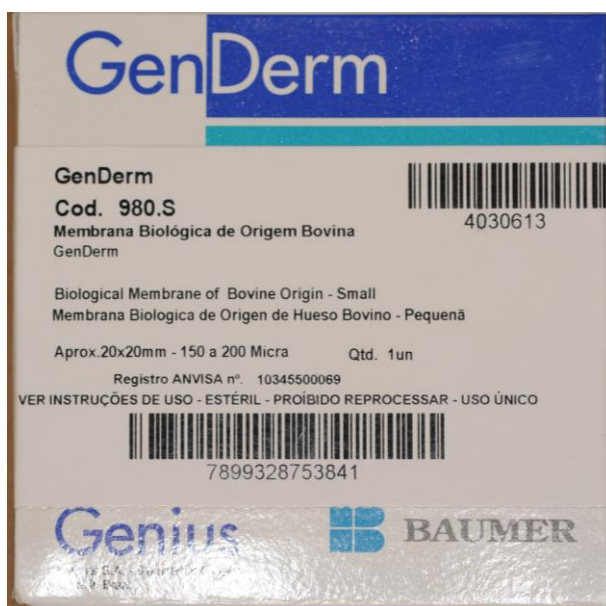


Figura 4. Membrana de cortical de osso bovino
utilizada (GenDerm®)

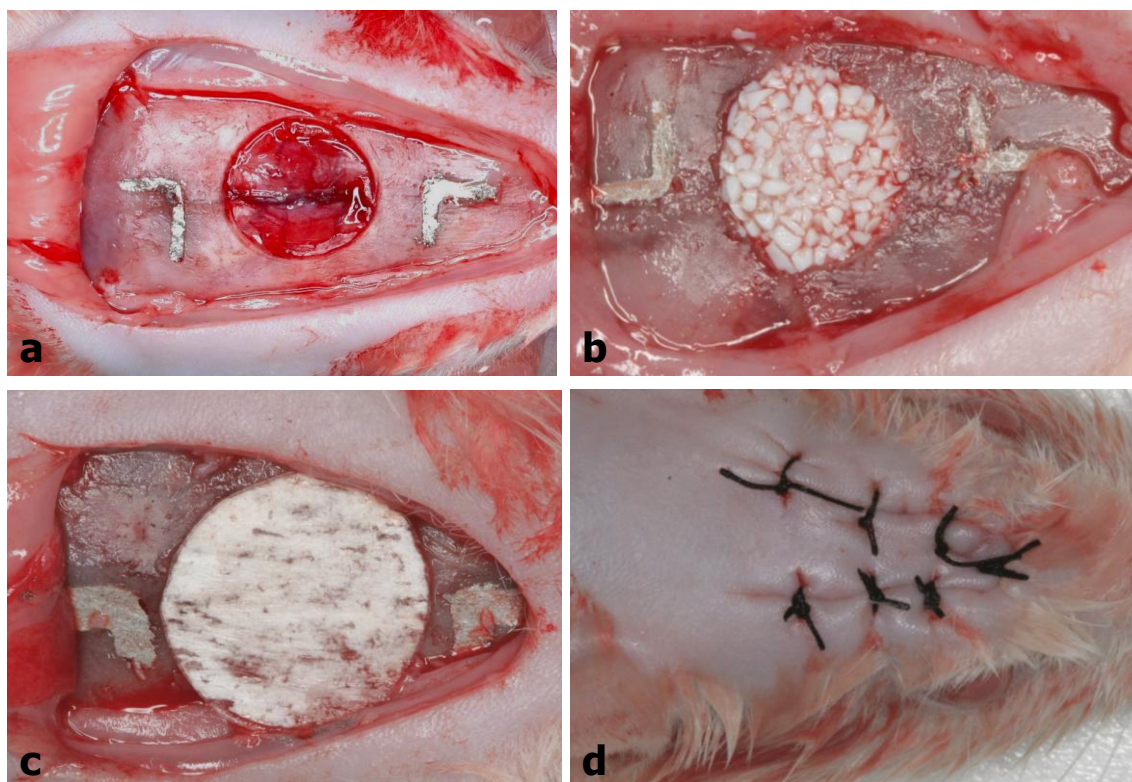


Figura 5. Preenchimento do DTC com hidroxiapatita. a) defeito ósseo criado; b) preenchimento com o biomaterial c) Membrana de cortical de osso bovino em posição; d) retalho posicionado mantido com suturas.

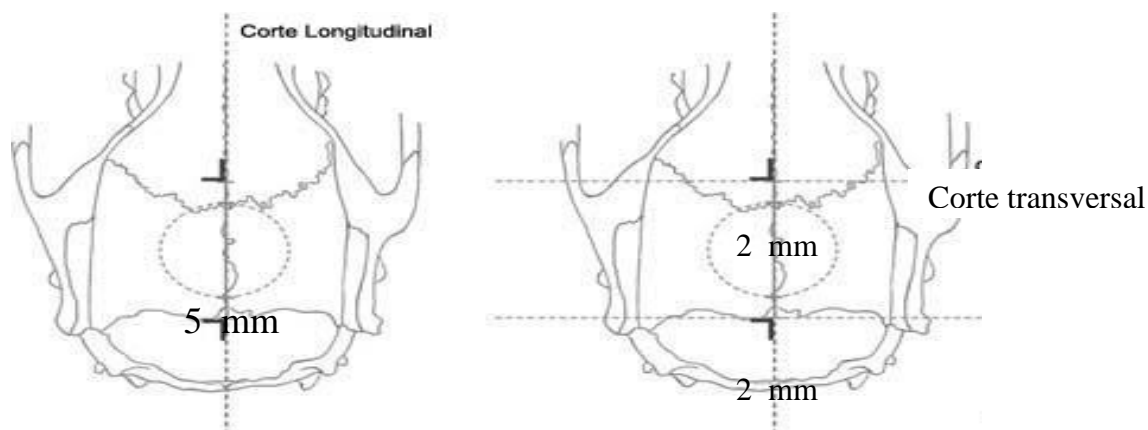
Períodos experimentais

Decorrido 30 e 45 dias de pós-operatórios, cinco animais de cada subgrupo experimental foram sacrificados. A eutanásia foi realizada através de dose excessiva de anestésico (Thiopental, 150 mg/kg peso corporal).

Processamento laboratorial

Concluída a eutanásia a área do defeito cirúrgico realizado e os tecidos moles da calota craniana de cada animal foram removidos em uma única peça anatômica. As peças obtidas foram fixadas em formoldeído a 4% por um período mínimo de 48 horas. Após este período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 16%. Após descalcificação inicial, cada peça foi cortada no sentido longitudinal, seguindo o eixo maior da marcação de amálgama em "L" obtendo-se assim duas hemicalotas, proporcionado a obtenção de cortes histológicos do centro do defeito. Cortes transversais distantes 2 mm da margem do defeito foram realizados seguindo a marcação do eixo menor do "L". Com a realização dos cortes transversais, os espécimes tiveram uma extensão longitudinal padronizada de 9 mm, que corresponde a 5 mm do defeito ósseo criado acrescido de 2 mm em cada uma das margens do defeito (Figura 6). A seguir as peças seguiram o processo para a completa descalcificação.

Concluído a descalcificação, as peças foram lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Cortes seriados com 6 μ m de espessura foram realizados os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.) para análise histométrica.



Modificado de Furlaneto et al. (2007); Messora et al. (2008a, 2008b)

Figura 6. Recorte da peça anatômica. Corte longitudinal e transversal realizados nas peças da calota craniana dos animais após descalcificação inicial.

Análise histométrica

Foram selecionados 2 cortes histológicos de cada espécime, correspondentes à região central do defeito criado cirurgicamente para a análise histométrica. Esta foi realizada por um examinador cego ao experimento e previamente calibrado. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de câmera digital acoplada a microscópio de luz, com aumento original de 5 X que foram transferidas para um computador. As imagens digitalizadas foram analisadas por um software (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging BmbH, 07740 Jena Germany) que permitiu a análise histométrica de todos os espécimes.

O seguinte critério foi utilizado para padronizar a análise histométrica da imagem digitalizada, de acordo com Messoria et al. (2008a, 2008b):

1. Delineamento da Área Total (**AT**) do defeito, que correspondente à área do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada da seguinte forma: a espessura do osso original da calota foi medida à direita e à esquerda do defeito cirúrgico (2 mm de extensão em cada extremidade); essas duas extremidades de osso original da calota foram então unidas com duas linhas, uma traçada seguindo a superfície interna da calota e outra seguindo a superfície externa da mesma, reproduzindo a ligeira curvatura dessa estrutura anatômica. A Área Total (**AT**) foi medida em mm² e foi considerada 100%.
2. Dentro da **AT** foi delineada a Área de Osso Neoformado (**AON**) nos grupos.

O valor atribuído a **AON** de cada animal foi representado pela porcentagem obtida pela histometria dos cortes histológicos examinados. A área de osso neoformado (**AON**) foi determinada empregando a seguinte fórmula :

$$\text{AON (\%)} = \text{AON} \times 100 \text{ dividido pela AT do defeito}$$

Análise estatística

Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA ($p < 0,05$) para avaliar as diferenças significativas entre os grupos em relação à AON. Quando o teste ANOVA indicou diferença significativa, foi então aplicado o post-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Industria Brasileira, Manaus, AM, Brasil).

5 – RESULTADO

Análise histométrica

As lâminas obtidas foram submetidas a uma avaliação prévia. Algumas estavam insatisfatórias e foram descartadas. Além disso houve morte de animal de alguns grupos. Estes fatos reduziram para quatro animais, o número de amostras por grupo/período que foram submetidos a análise histométrica.

Os dados obtidos foram avaliados quanto a normalidade e a homogeneidade das variâncias. As médias e desvios padrão da quantidade de novo osso formado foram descritos em porcentagem de área de osso neoformado (% AON) para cada grupo em cada período, bem como a análise comparativa entre os grupos nos períodos de 30 e 45 dias de pós-operatório foram realizadas e estão representados na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa na formação de tecido ósseo, entre os grupos, no período de 30. Aos 45 dias o grupo **T** evidenciou maior formação óssea, estatisticamente significante, quando comparado com os grupos **P** ($p < 0,05$) e **T + Ha**, **P + Ha** ($p < 0,01$). Os DTC criados com instrumento rotatório, preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com membrana de cortical bovina foi o melhor tratamento. No final da pesquisa nenhum dos espécimes de todos os grupos demonstraram

completa formação de tecido ósseo nos DTC criados experimentalmente em calotas cranianas de ratos.

Tabela 1 - Média e Desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos, descritos em porcentagem de área de osso neoformado (% AON) nas calota de acordo com cada grupo (T, P, T + Ha, P + Ha) nos períodos de 30 e 45 dias.

Grupos		
Períodos/Dias	30 DIAS	45 DIAS
Tratamentos		
T	19,87±6,47	37,73±15,21
P	14,26±3,88 ⁺	23,60±14,45
T + Há	10,05±3,37 [*]	23,56±5,02
P + Há	9,58±3,11 [*]	23,23±7,86

⁺ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o Grupo T aos 45 dias (Análise de Variância a dois critérios - ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

^{*} Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) com o grupo T aos 45 dias (Análise de Variância a dois critérios - ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

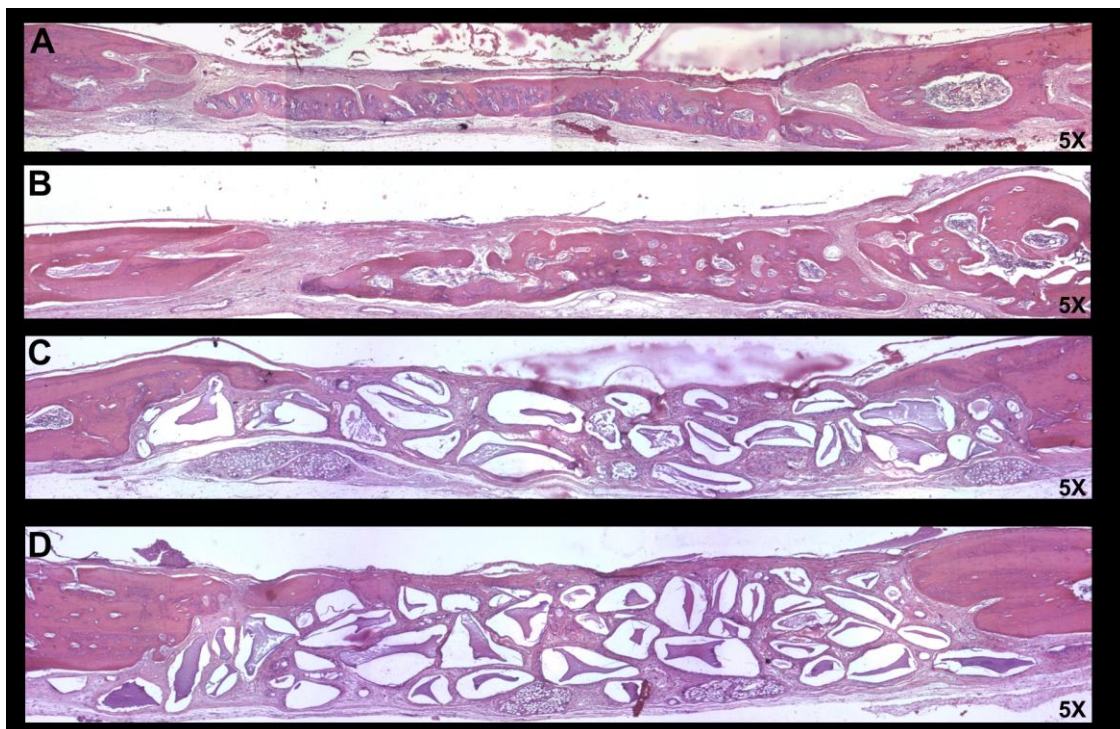


Figura 7. Vista Panorâmica dos defeitos criados em calvária de ratos.

45 dias. A) - Grupo trefina (T); B) - Grupo Piezoeétrico (P); C) - Grupo trefina e Hidroxiapatita (T + Ha); D) - Grupo Piezoeétrico e Hidroxiapatita (P + Ha). Aumento original 5X.

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo defeitos ósseos com 5 mm de diâmetro foram criados na calota craniana de ratos realizados com broca trefina ou com instrumento piezoelétrico. Os defeitos cirúrgicos foram preenchidos ou não com hidroxiapatita e protegidos com membrana de cortical de osso bovino. Os espécimes foram avaliados histometricamente após 30 e 45 dias de pós-operatório.

Os resultados do presente estudo demonstraram que nenhum DTC demonstrou completa formação de tecido ósseo, e que não houve formação de tecido ósseo, estatisticamente significante entre os grupos, no período de 30 dias; que no período final do experimento (45 dias) o grupo em que os defeitos foram criados com instrumento rotatório (broca trefina) sem preenchimento com o biomaterial (grupo T) evidenciou maior formação óssea, estatisticamente significante, quando comparado com os grupos P ($p < 0,05$), T + Ha e P + Ha ($p < 0,01$).

Diferentes fatores podem ser contribuído para os resultados obtidos neste estudo como o modelo experimental utilizado, aporte vascular da área, tamanho das partículas do biomaterial empregado e o período de avaliação.

Defeitos de tamanho crítico tem sido relatado em calvária em mandíbula usando ratos, suínos e cães (Wikesjö & Nilvéus, 1991; Huh et

al., 2005; Schlegel et al., 2006; Messori et al., 2008a, 2008b; Nagata et al., 2009, 2010; Almeida et al., 2010, Santinoni, 2012). Este modelo de estudo utilizado nesta pesquisa foi apresentado por Frieman & Turnbull (1973) e tem sido muito utilizado ao longo dos anos por várias razões como, ser realizado em uma área anatômica de reduzido stress mecânico, possibilitar estabilidade das estruturas vizinhas além de permitir avaliação da interação do novo osso formado com o osso original (Mankani et al., 2006). Outros pesquisadores relataram vantagens deste modelo sobre defeitos criados em ossos longos; este elimina os efeitos de possível movimentação do local da área cirúrgica do defeito (Wang et al., 1998). Além disso trata-se de um modelo consagrado na literatura face às várias pesquisas que utilizaram este modelo experimental (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Furlaneto et al., 2007; Messori et al., 2008a, 2008b; Oliveira et al., 2008; Artzi et al., 2008; Kalish et al., 2008; Honma et al., 2008; Nagata et al., 2009, 2010; Park et al., 2009; Potijanyakul et al., 2010; Yun et al., 2010; Santinoni, 2012).

Outro fato que poderia ter contribuído é o tamanho do defeito realizado. Embora a literatura não apresenta uma padronização do tamanho ideal do defeito crítico que deve ser realizado, no presente estudo foi realizado defeitos de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro baseado em pesquisas anteriores (Turonis et al. 2006; Furlaneto et al., 2007; Artzi et al., 2008; Nagata et al., 2009). Os resultados do nosso estudo poderá ser corroborado pelos relatos de Frota (2006). Este autor ressalta que o osso

parietal apresenta duas corticais compactas, interna e externa, com uma faixa intermediária que possui limitada quantidade de osso medular, com ossificação intramembranosa. Assim, o aporte sanguíneo e a deficiência de osso medular desta área provavelmente tenham contribuído para a limitada formação óssea observada no presente estudo, e segundo Prolo et al. (1982), estas são condições importantes para o reparo desta área.

O tamanho e forma das partículas, porosidade, composição físico-química podem interferir na reação inflamatória, absorção, interface óssea e na neoformação óssea (Misiek et al., 1984; Boss et al., 1995; Zenóbio, 1996; Marcantonio Jr, 1997). O tamanho da partícula pode interferir diretamente na área da superfície do biomaterial que irá interagir com constituintes da área receptora. Por outro lado quanto maior o tamanho da partícula maior o tempo de reabsorção do biomaterial (Lemons & Misch-Dietshl, 2008; Teixeira, 2009). No presente estudo foi utilizado hidroxiapatita obtida a partir do hidróxido de cálcio e ácido fosfórico, com partículas radiopacas e uniformes com dimensões de 0,50 a 0,80 mm. Estudos comprovaram que partículas de dimensões reduzidas promoveram reparação óssea mais favorável (Moreira et al., 2003) enquanto que partículas pequenas, irregulares e pontiagudas induzem a reações inflamatórias indesejáveis (Boss et al., 1995).

Outro fator que merece a atenção quando da seleção do biomaterial é a sua porosidade. Relatos documentaram que a porosidade da

hidroxiapatita é de fundamental importância pois constitui um reservatório para neoformação vascular e óssea. Embora possa interferir mecanicamente na resistência do biomaterial, poros maiores contribuem para o repovoamento celular e vascular, importantes para a formação óssea (Orr et al., 2001).

Como no presente estudo foi avaliado apenas o uso da hidroxiapatita como material de preenchimento, avaliando histometricamente a quantidade de osso formado, há a necessidade de novos estudos, tanto do ponto de vista histológico como também com uso de marcadores osteoimunológicos capazes de clarificar melhor os resultados obtidos na presente pesquisa.

7 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, com a metodologia utilizada, permitem concluir que:

- 1) Os defeitos ósseos criados com broca trefina preenchidos com coágulo sanguíneos e protegidos com membrana de cortical bovina foram os que demonstraram maior formação óssea no período de 45 dias;

- 2) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, na quantidade de osso formado, no período de 30 dias.

8 - REFERÊNCIAS*

ALBBE FH. Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. *Ann of Surg* 1920;**71**:32-36

ALMEIDA JM, SANTOS MR, FERNANDES LA, THEODORO LH, GARCIA VG. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímero de mamona. *Rev Odont Araçatuba* 2010; **31**:22-27.

AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. *Japan Assoc Apatite Sci.* 1991.

ARTZI Z, KOOZLOVSKY A, NEMCOVSKY CE, MOSES O, TAL H, ROHRER MD, PRASAD HS, WEINREB M. Histomorphometric evaluation of natural mineral combined with a synthetic cell-binding peptide (P-15) in critical-size defects in the rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implant* 2008; **23**:1063-1070.

BAKER JA, VORA S, BAIRAM L, KIM H, DAVIS EL, ANDREANA S. Piezoelectric vs. Conventional implant site preparation: ex vivo implant primary stability. *Clin Oral Impl Res* 2012;**23**:433-437.

BARONE A, SANTINI S, MARCONCINI S, GIACOMELLE L. Osteotomy and membrane elevation during the maxillary sinus augmentation procedure. A comparative study: piezoelectric device vs. conventional rotative instruments. *Clin Oral Implants Res* 2008; **19**:511-515.

* Elaborada segundo Norma Vancouver

BOECK EM, PANSANI CA, OKAMOTO T, FOISSIS G, BOECK NETO RJ, MARCANTONIO JR, E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em ratos. *Rev Odontol UNESP* 1999; **28**:83-96.

BOECK-NETO RJ, GABRIELLI M, LIA R, MARCANTONIO E, SHIBLI JA, MARCANTONIO JR E. Histomorphometrical analysis of bone formed after maxillary sinus floor augmentation by grafting with a combination of autogenous bone and demineralized freeze-dried bone allograft or hydroxyapatite. *J Periodontol* 2002; **73**:266-270.

BORGES APB, REZENDE CMF, RIBEIRO MB, NOBREGA NETO, PIN. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos em microscopia eletrônica de transmissão. *Arq Brás Méd Vet Zoot* 2000; **52**:616-620.

BOSS JH, SHAJRWA J, ARENULLAH J, MENDES DG. The relativity of biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility. *J Med Sei* 1995; **31**:203-209.

BRAZ F, RAHAL SC, ROCHA NS, TAGA E, BIASI F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir Bras* 2003; **18**:19-24.

BURSTEINS FD, COHEN SR, HUDGINS R, BOYDSTON W. The use of poros granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1997; **100**:869-874.

CANNETIERI ACV. Reparação óssea em fêmures de ratas ovariectomizadas sob a ação local de alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com hidroxiapatita. 2006. Tese (Doutoramento). Faculdade de Odontologia. São José dos Campos. 144p.

COSTA ACFM, LIMA MG, LIMA LHMA, CORDEIRO VV, VIANA KMS, SOUZA CV, LIRA L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Rev Eletr Mat Proc* 2009; 4:29-28.

CHISTOLINI P, RUSPANTINI I, BIANCO P, CORSI A, CANCEDDA R, QUARTO R. Biomechanical evaluation of cell-loaded and cell-free hydroxyapatite implants for the reconstruction of segmental bone defects. *J Mater Sci Mater Med*. 1999;10:739-742.

COSTA AM, KOBAYASHI GS, BUENO DF, MARTINS MT, FERREIRA M, PASSOS-BUENO MR, ALONSO N. An experimental model for the study of craniofacial deformities. *Acta Cir Bras* 2010;25:264-268.

CROSETTI E, BATTISTON B, SUCCO G. Piezosurgery in head and neck oncological and reconstructive surgery: personal experience on 127 cases. *Acta Otorhinolaringol Ital* 2009; 29:1-9.

CUNHA LC, BALDUCCI-ROSLINDO E, MINARELLI-GASPAR AM. Efeito do fosfato tricálcio na reparação de deito ósseo em tíbias de ratos. *Rev Odontol UNESP* 2007; 36:293-298.

DO CARMO ABX, REIS DB, ALVES ATN, ROSSI AM, GRANJEIRO JM, MAIA MDC. Avaliação histológica da nano-hidroxiapatita contendo

5% de estrôncio em defeitos não críticos de calvária de ratos. *ImplantNews* 2011;8:69-75.

E´GGES MA. Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia. Dissertação (Mestrado). 2005. Instituto de Química. USP. São Carlos.

ERIKSSON RA, ALBREKTSSON T. Thermal injury to bone: a tital microscopic description of heat effects. *Int J Oral Surg* 1982;11:115-121.

ERIKSSON RA, ALBREKTSSON T. Temperature threshold levels for heat introduced bone tissue injury: a vital microscopic study in rabbit. *J Prost Dent* 1983; 50:101-107.

FARDIN AC, JARDIM ECG, PEREIRA FC, GUSKUMA MH, ARANEGA AM, GARCIA JÚNIOR IR. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. *Innov Implant J, Biomater Esthet*, 2010;5:48-52.

FERREIRA GR, CESTARI TM, GRANJEIRO JM, TAGA R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J*. 2004;15:175-180.

FREEMAN E, TURNBULL RS. The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont Res* 1973;8:229-236.

FROTA R. Estudo da radiopacidade e avaliação morfológica da reparação óssea utilizando-se B-tricálcio fosfato e polímero de mamona como

implante. 2006. Camaragibe. Tese (Doutoramento) Faculdade de Odontologia de Pernambuco. 113 p.

FULLMER MT, MARTIN RI, BROW NPW. Formation of calcium deficient hidroxyapatite at near-physiological temperature. *J Mat Sci: Mat and Med* 1992;**3**:299-305.

FURLANETO FAC, NAGATA MJH, FUCINI SE, DELIBERADOR TM, OKAMOTO T, MESSORA MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulphate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Impl Res* 2007;**18**:311-318.

GUIRRO RR. O uso de hidroxiapatita associado a estimulação ultrassônica de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos. 1995. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos. São Paulo.

HOLLINGER JO, KLEINSCHMIDT JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;**1**:60-68.

HONMA T, ITAGAKI T, NAKAMURA M, KAMAKURA S, TAKAHASHI I, ECHIGO S, SASANO Y. Bone formation in rat calvaria cases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis* 2008;**14**:457-464.

HORCH HH, SADER R, PAUTKE C, NEFF A, DEPPE H, KOLK A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; **35**:708-713.

HUH JY, CHOI BH, KIM BY, LEE SH, ZHU SJ, JUNG JH. Critical size defect in the canine mandibule. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol Endod* 2005;100:296-301.

JIMENEZ HT, ANGEL FG, BENITEZ JMT. Estudio de hidroxiapatita natural vs sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelo animal. *Oral Rev* 2009; 10:533-536.

KALISH BP, SCHUSTER GS, PEACOCK ME, CUENIN MF, SWIEC GD, POTTER BJ, BUXTON TB, McPHERSON III JC. Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (*Rattus norvegicus*) calvarium. *J Oral Impl* 2008; 34:83-89

KFOURI FA, DUALIBI MT, BRETOS JLG, FERREIRA LM., DUALIBI SE Cirurgia piezoelétrica em implantodontia: aplicações clínicas. *RGO* 2009; 57:121-126.

KIM HW, KNOWLES JC, KIM HE. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:189-195.

LECLERCQ P, ZENATI C, DOBAN DM. Ultrasonic bone cut. Part 2: State-of-art specific clinical applications. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:183-188.

LEGEROS RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv in Dent Res* 1988; 2:164-180.

LI Z, YUBAO L, AIPING Y, XUELIN P, XUEJIANG W, XIANG Z. Preparation in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:213-219.

LIM SC, LEE MJ, YEO HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Path Intern* 2000; 50:594-602.

LEMONS JE, MISCH-DIETSH F. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. Implantes dentais contemporâneos. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008;p 511-542.

LEW D, FARRELL B, BARDACH J, KELLER J. Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite cement. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1441-1449.

MANKANI MH, KUZNETSOV SA, WOLFE RM, MARSHALL GW, ROBEY PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandibule. *Stem Cells* 2006; 24:2140-2149.

McDONALD EE, GOLDBERG HA, TABBARA N, MENDES FM, SIQUEIRA WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res* 2011; 90:268-272.

MARCANTONIO JÚNIOR E. Utilização e desenvolvimento de biomateriais em Periodontia. Contribuição ao estudo. Araraquara. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Odontologia, UNESP. 1997.191p.

MARTINS ACO. Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com B-fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + B-fosfato tricálcio e osso autógeno. 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia. Bauru.

MATZENBACHER SA, MAILHOT JM, McPHERSON JC, CUENIN MF, HOKETT SD, SHARAWY M, PEACOCK ME. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodont* 2003;74:1641-1646.

MAVROPOULOS E COSTA AM, COSTA LT, ACHETE CA, MELLO A, GRANJEIRO JM, ROSSI AM. Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface. *Colloids Surf B. Biointerfaces* 2011;83:1-9.

MESSORA MR, NAGATA MJH, DORNELLES RCM, BONFIM SRM, FURLANETO FAC, de MELO LGN, DELIBERADOR TM, BOSCO AF, GARCIA VG, FUCINI SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008a; 43:723-729.

MESSORA MR, NAGATA MJH, MARIANO RC, DORNELLES RCM, BONFIM SRM, FUCINI SE, GARCIA, VG, BOSCO AF. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008b; 43:217-223.

MISIEK DJ, CARR RF. Soft tissue response to hydroxyapatite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac Surg* 1984; 42:156-160.

MONROE EA, VOTAVA W, BASS DB, McMULLEN J. New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *J Dent Res* 1971; **50**:860-862.

MOREIRA ASB, PATORELLI MT, DAMASCENO LHF. Estudo experimental da influência da dimensão dos grânulos de hidroxiapatita na interação óssea. *Acta ortop Bras* 2003; **11**:240-250.

NAGATA MJH, MELO LGN, MESSORA MR, BONFIM SRM, FUCINI SE, GARCIA VG, BOSCO AF, OKAMOTO T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009; **36**:775-783.

NAGATA MJH, MESSORA MR, POLA N, CAMPOS N, VIERIA R, ESPER LA, SBRANA M, FUCINI SE, GARCIA VG, BOSCO AF. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res* 2010; **28**:468-473.

OLIVEIRA RC, OLIVEIRA FHG, CESTARI TM, TAGA R, GRANJEIRO JM. Morphometric evaluation of repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Impl Res* 2008; **19**:749-754.

ORR TE, VILLARS PA, MITCHELL SL. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxiapatite. *Biomater* 2001; **22**:1953-1959.

PANG EK, IM SU, KIM CS, CHOI SH, CHAI J.K, KIM CK, HAN SB, CHO KS. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2004;**75**:1364-1370.

PARK JW, JANG JH, BAE SR, AN CH, SUH JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Impl Res* 2009; **20**:372-378.

PARK JW, KIM ES, JANG JH, SUH JY, PARK KB, HANAWA T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Impl Res* 2010; **21**:268-276.

PARMAR D, MANN M, WALMSLEY AD, LEA SC. Cutting characteristics of ultrasonic surgical instruments. *Clin Oral Impl Res* 2011; **22**:1385-1390.

PAVLIKOVÁ G, FOLTÁN R, BURIAN M, HORKÁ E, ADÁMEK S, HEJCL A., HANZELKA T, SEDÝ J. Piezosurgery prevents brain tissue damage: an experimental study on a new rat model. *Int J Maxillofac Surg* 2011;**40**:840-844.

PEIVANDI A, BUGNET R, DEBIZE E, GLEIZAL A, DOHAN DM. L'osteotomie piézoélectrique: applications en chirurgie parodontolase et implantare. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2007;**108**:431-440.

POTIJANI AKUL P, SATTAYASANS AKUL W, PONGPANICH S, LEEPONG N, KINTARAK S. Effects of enamel matrix derivate on bioactive glass in rat calvarium defects. *J Oral Impl* 2010;**36**:195-204.

PROLO DJ, PEDROTTI PW, BURRE S KP, OKLUND S. Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop* 1982;**168**:230-242.

RAMÍREZ-FERNÁNDEZ MP, CALVO-GUIRADO JL, DELGADO-RUIZ RA, DEL VAL JEMS, GÓMEZ-MORENO G, GUARDIA J. Experimental modelo of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon®): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Impl Res* 2011;**22**:727-734.

RASHAD A, KAISER A, PROCHNOW NIE, SCHMITZ I, HOFMANN MAURER P. Heat production during different ultrasonic and conventional osteotomy preparations for dental implants. *Clin oral Impl,Res.* 2011;**22**:1361-1365.

RIGO ECS, GEHRKE SA, CARBONARI M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev Dental Press* 2007;**1**:39-50.

ROBIONY M, POLINI F, COSTA F, VERCELLOTTI T, POLITI M. Piezoelectric bone cutting in multipiece maxillary osteotomies. *J Oral Maxxilofac Surg* 2004;**62**:759-761.

SANTINONI CS. Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação

de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia. Araçatuba. 2012.

SCHLEGEL KA, LANG FJ, DONATH K, KULOW JT, WILTFANG J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **102**:7-13.

SILVA LMC, PEREIRA FILHO VA, GABRIELLI MAC, VIEIRA EH, MORAES M. Expansão rápida de maxila assitida cirurgicamente por meio da piezocirurgia: relato de caso. *Odonto* 2010;**18**:107-112.

SOUSA CFS. Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (Hidroxiapatita + B tricalciofosfato). 2010. João Pessoa. Monografia (Graduação). Universidade Federal da Paraíba.

SPONER P, STRNADOVÁ M, URBAN K. In vivo behavior of low-temperature calcium-deficient hydroxyapatite: comparison with deproteinised bovine bone. *Int Orthop* 2011; **35**:1553-1560.

STUBINGER S, KUTTENBERGE J, FILIPPI A, SADER R, ZEILBOFER H.F. Intraoral piezosurgery: preliminary results of a new technique. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;**63**:1283-1287.

TEIXEIRA LJC. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos. 2009. Duque de Caxias. Dissertação (Mestrado). Universidade do Grande Rio. 71p.

TOPAZIAN RG, HAMMER WB, BOUCHER LJ, HULBERT SF. Use of alloplastic for ridge augmentation. *J Oral Surg* 1971; **29**:792-798.

TURONIS JW, McPHERSON JC, CUENIN MF, HOKETT SD, PEACOCK ME, SHARAWY M. The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical- sized defect in the rattus norvegicus calvarium. *J Oral Implant 2006* 2006. **32**:2:55-62.

UCHIDA A, ARAKI N, SHINTO Y, YOSHIKAWA H, KURISAKI E, ONO K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br* 1990;**72**:298-302.

URIST MR. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. *Arch Surg* 1977; 112:612.

VERCELLOTTI T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol* 2004; **53**:207-214.

VERCELLOTTI T, CROVACE A, PALERMO A. The piezoelectric osteotomy in orthopedics: clinical and histological evaluations (pilot study in animals) *Med J Surg Med* 2001;**9**:8-9.

VITAL CC, BORGES APB, FONSECA CC, CAMACHO BG, NEGREIROS RM. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental em tibia de coelhos. *Rev Ceres* 2008;**55**:9-14.

WANG J, MAH J, GLIMCHER M, SALIH E. Biochemical changes during new bone formation in the cranial and subcutaneous tissue environments. *EBSCO Media. Birmingham, Alabama.* 1998;**1**:123-132.

WIKESJO UME, NILVÉUS R. Periodontal repair in large circumferencial periodontal defects. *J Clin Periodontol* 1991;**18**:49-59.

WILLIAMS DF. Definitions biomaterials. Progress in biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier, *CRC Press.* 1987.

YUN JI, WIKESJO UME, BORKE JL, BISCH FC, LEWIS JE, HEROLD RW, SWIEC GD, WOOD JC, McPHERSON III JC. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a B-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvaria defect model. *J Clin Periodontol* 2010;**37**:419-426.

ZENÓBIO EG, MARCANTONIO RAC, MARCANTONIO JR E, FERREIRA, BA, OKAMOTO, T. Avaliação do comportamento biológico de dois materiais sintéticos à base de fosfato de cálcio após implantação em alvéolos de cães. *Rev Odontol UNESP* 1998; **27**:73-85.

9 – ANEXOS


9.1. COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO CRIADOS EM CALVÁRIA DE RATOS, REALIZADOS COM BROCA TREFINA OU INSTRUMENTO PIEZOELÉTRICO, PREENCHIDOS COM HIDROXIAPATITA*" sob responsabilidade do(a) *Pesquisador(a) Valdir Gouveia Garcia* e o colaborador *Ricardo Guanaes Barbosa de Souza* está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela CEUA em 01/07/2011 de acordo com o Processo 1201/2011.

Araçatuba, 04 de Julho de 2011


João Eduardo Gomes Filho
Presidente da CEUA

FAC/wbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

9.2 – AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DESTE TRABALHO

AUTORIZO a reprodução total ou parcial deste trabalho,
desde que seja citada a fonte.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Barretos abril de 2012.

Ricardo Guanaes Barbosa de Souza

