

RESUMO

MUNIZ, Y. S. Avaliação histomorfométrica do reparo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico, preenchidos com biomaterial (Fosfato tricálcio). Faculdade de Odontologia de Barretos. UNIFEB. 2012.

O propósito deste estudo foi avaliar do ponto de vista histométrico, o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária com broca trefina ou instrumento piezoelétrico e preenchidos com fosfato tricálcio. Defeitos ósseos com 5 mm de diâmetro foram criados na calota craniana de 40 ratos. Em vinte destes animais os defeitos foram criados com broca trefina (**Grupo Tre**) e, nos demais, os defeitos foram criados com instrumento piezoelétrico (**Grupo Pie**). A seguir os animais foram divididos em 2 subgrupos que receberam os seguintes tratamentos: **Tre** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com membrana de cortical óssea bovina; **Tr + TCP** – os defeitos foram preenchidos com beta fosfato tricálcio e protegidos com uma membrana de cortical de osso bovino; **Pie** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com membrana de cortical óssea bovina ; **Pie + TCP** – os defeitos foram preenchidos com fosfato tricálcio e protegidos por uma membrana de cortical de osso bovino. Após 30 e 45 dias de pós-operatório cinco animais de cada grupo foram sacrificados. Imagens dos cortes histológicos obtidos foram submetidos à análise histométrica utilizando software de análise de imagem. A quantidade de osso neoformado foi calculado em porcentagem em relação à área total do defeito criado. Os dados obtidos

foram avaliados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). O grupo **Tre** no período de 45 dias evidenciou maior formação óssea ($37,73 \pm 15,21$) estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo **Pie** ($14,26 \pm 3,88$) e **Pie + TCP** ($13,59 \pm 3,26$) aos 30 dias. Aos 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Pode ser concluído que os espécimes do grupo **Tre** demonstraram maior formação de osso neoformado, demonstrando que defeitos ósseos realizados com broca trefina preenchidos com coágulo e protegidos com membrana de cortical de osso bovino foram os que demonstraram o melhor tratamento entre os grupos estudados.

Unitermos – Biomateriais, Piezocirurgia, modelo em calvária, regeneração óssea, fosfato de cálcio.

ABSTRACT

MUNIZ, Y. S. Histomorphometric evaluation of the repair in critical-size defects created in rat calvaria, performed with a burr or trephine instrument piezoelectric filled with biomaterials (tricalcium phosphate). Barretos Dental School. UNIFEB. 2012.

The purpose of this study was to evaluate the histometric point of view, bone repair in critical-size defects in calvaria created with a burr or trephine instrument piezoelectric beta and filled with tricalcium phosphate (TCP). Bone defects with 5 mm diameter were created in the calvaria of 40 rats. In twenty of these animals the defects were created with trephine drill (Group Tre) and the others, the defects were created with piezoelectric instrument (Pie Group). Then the animals were divided into two subgroups that received the following treatments: Tre - the defects were filled with blood clot and protected with bovine cortical bone membrane, Tr + TCP - the defects were filled with tricalcium phosphate and protected with a membrane of cortical bovine bone; Pie - the defects were filled with blood clot and protected membrane of bovine cortical bone; Pie + TCP - the defects were filled with tricalcium phosphate and protected by a membrane of cortical bovine bone. After 30 and 45 days after surgery five animals from each group were sacrificed. Images of histological sections were subjected to histomorphometric analysis using image analysis software. The amount of new bone formation was calculated as percentage relative to the total area of the defect created. The data were statistically

evaluated (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). The group Tre during the period of 45 days showed increased bone formation (37.73 ± 15.21) was statistically significant ($p < 0.05$) when compared with the group Pie (14.26 ± 3.88) and Pie + TCP (13.59 ± 3.26) at 30 days. At 30 days there was no statistically significant difference between groups. It can be concluded that the specimens of the group demonstrated higher Tre formation of new bone formation, demonstrating that bone defects performed with drill trephine filled with clot and protected cortical membrane of bovine bone were those that showed the best treatment among the groups.

Uniterms : Biomaterials, Piezosurgery, calvaria model, bone regeneration, calcium phosphate.

1 – INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado, a matriz óssea (Junqueira & Carneiro, 1995). No entanto este tecido pode ser comprometido ocorrendo perda da sua massa óssea em decorrência de diferentes condições. Além de deformidades naturais a doença periodontal e injúrias traumáticas podem provocar perda do seu volume o que compromete o restabelecimento morfofuncional da área para a instalação de implantes. Diferentes procedimentos são relatados na literatura para o restabelecimento destas condições. Sem dúvida o enxerto de osso autógeno por possuir propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas é considerado o “padrão ouro” para o procedimento de regeneração óssea (Hjerting-Hansen, 2002). Porém a limitada quantidade obtida, reabsorção imprevisível, morbidade da área doadora e a necessidade de uma segunda área cirúrgica induziram os pesquisadores a procurar alternativas viáveis (Jensen & Terheyden, 2009).

Os substitutos ósseos segundo Tay et al. (1999) devem ser : a) biocompatíveis; b) osteogênicos; c) bioreabsorvíveis; d) capazes de servirem de arcabouços estruturais; e) de fácil utilização clínica, como também capazes de serem submetidos à esterilização sem sofrerem alterações em suas propriedades (Murashima et al.2002). Estes podem ser agrupados em 3 grandes tipos: a) **alógenos**,

obtidos de um outro indivíduo da mesma espécie (irmãos, parentes); b) **xenógenos**, obtidos de uma outra espécie (osso bovino); 3) **aloplásticos** os quais são sintetizados. O uso de substitutos ósseos alógenos e xenógenos embora tenham sido muito utilizados também apresentam certas limitações como o risco de transmissão de doença ou de rejeição ao material (Precheur, 2007).

O uso de biomateriais sintéticos tem se mostrado como opção relevante como substituto ósseo pois reduzem riscos de contaminações, são biocompatíveis e são disponibilizados em quantidades (Williams, 1987). Diferentes substitutos tem sido avaliados para atender as necessidades morfo-funcionais em decorrência da perda do tecido ósseo, como vidro bioativo (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., 2009a, 2009b); proteína morfogenética óssea recombinante humana (Pang et al., 2004), matriz derivada de esmalte (Potijanyakul et al., 2010); hormônio da paratireóide (Yun et al., 2010); associação de componentes orgânicos e osso mineral bovino – PepGen P15 (Artzi et al., 2008) e osso bovino (Matzenbacher et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Ramírez-Fernandez et al., 2011) e materiais cerâmicos como hidroxiapatita (Park et al., 2009, 2010), sulfato de cálcio (Furlaneto et al., 2007), fosfato de cálcio bifásico (Park et al., 2010) e o beta-fosfato tricálcio (Yun et al., 2010).

Por outro lado procedimentos cirúrgicos que requer o corte do tecido ósseo, principalmente na implantodontia, utilizam-se de instrumentos rotatórios. Embora efetivos são potencialmente prejudiciais pois produzem elevação local da temperatura durante a perfuração óssea e conseqüentemente podem interferir no processo de reparo ósseo (Ericksson & Albrektsson, 1982, 1983, Kerawala et al. 1999) sugerindo também que a redução da área de contato entre broca e tecido ósseo pode reduzir a temperatura local (Oh et al., 2011).

Mais recentemente surgiu uma nova opção para procedimentos de osteotomia, o instrumento piezoelétrico que o seu uso na prática cirúrgica é denominado de "Piezocirurgia" (Robiony et al., 2004). Foi utilizado pela primeira vez para cirurgia preprotética, expansão da crista óssea e cirurgia em seio maxila (Vercellotti, 2000). O uso de piezocirurgia em cirurgias do complexo craniomaxilofacial é uma nova idéia (Pavliková et al. 2011). O seu uso tem sido documentado em sua grande maioria, em publicações de relatos de casos clínicos na área médica-odontológica (Robiony et al., 2004, Hoigne et al., 2006, Gleizal et al., 2007, Leclerq et al. 2008, Kfoury et al., 2009, Sammartino et al., 2011, Baldi et al., 2011), em menor número material humano coletado (Chiriac et al., 2005, Berengo et al., 2006) e em experimentos com animais (Vercellotti et al., 2001, Gleizal et al., 2006; Pavliková et al. 2011). Embora a literatura apresenta como desvantagem o maior tempo

cirúrgico para o corte do tecido ósseo e sua ineficiência em tecido ósseo muito denso (Vercellotti et al., 2004; Eggers et al., 2004), muitas vantagens são creditadas à esta tecnologia como corte preciso, menor sangramento da área, menor injúria aos tecidos moles e melhor visualização da área (Gleizal et al., 2007). Estes estudos comprovam a efetividade desta nova tecnologia cirúrgica; no entanto há a necessidade de pesquisas para fortalecer ainda mais as suas vantagens clínicas.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – BIOMATERIAIS CERÂMICOS

Cerâmicas são materiais sintetizados em elevadas temperaturas que podem ser classificadas em: bioativas (vidro bioativo), bioreabsorvível (fosfato de cálcio) e bioinertes (zircônia, alumina).

Muito utilizado nos últimos anos (Driessens et al., 1992, Legeros, 2002) o tricálcio fosfato tem despertado o interesse pelo seu uso na Odontologia. Por serem de fácil obtenção, custo reduzido e obtidos em larga escala estes tem despertado o interesse não só dos clínicos como dos pesquisadores. Estes podem ser naturais ou sintéticos e possuem propriedades importantes que torna-os biomateriais de relevância clínica. Dentre suas propriedades destaca-se sua biocompatibilidade (Chow et al., 2003), capacidade osteocondutora e similaridade com alguns componentes do tecido ósseo, além de ser considerado uma substância bioativa (Trisi et al. 2003).

Diferentes biomateriais cerâmicos tem sido estudados como substitutos ósseos como o sulfato de cálcio, a hidroxiapatita (Ha) e o fosfato tricálcio – TCP (Kim et al., 1998, Orsini et al., 2001, Trevisan Jr et al., 2006, Furlaneto et al., 2007, Shi et al., 2008, Park et al., 2010, Yun et al., 2010, Ghanavati et al., 2011, Frota et al., 2011).

Estes biomateriais foram introduzidos como substitutos ósseos, pesquisas demonstraram que são osteocondutores e apresentam grau diferenciado de reabsorção, sendo mais lenta para a Ha do que o TCP (Klein et al., 1983, Nagahara et al., 1992).

O sulfato de cálcio é o biomaterial cerâmico mais antigo e ficou conhecido como "Gesso Paris". Foi utilizado como substituto ósseo por Dreesmann (1892) e tem sido utilizado para cirurgia bucais e ortopédicas (Dreesmann, 1892, Peltier, 1961) Por ser um material biocompatível e reabsorvível pode ser utilizado como barreira ou como carreador de outros materiais (Sottosanti 1992, 1993).

Estas cerâmicas motivaram muitos os pesquisadores por apresentarem composição relativamente similar aos componentes da fase mineral do tecido ósseo (Muddugangadhar et al., 2011). Dentre suas vantagens estes autores incluem: a) composição química é altamente pura e as substâncias são similares aos constituintes biológicos dos tecidos biológicos (cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio; b) Excelente biocompatibilidade; c) Mínima condutibilidade térmica e elétrica; d) capacidade de atuar como barreira física e química para o transporte de íons (íons metálicos) entre outras.

Além destas suas propriedades e, por constituírem biomateriais com elevada utilização, requer a realização constante de pesquisas para contribuir e dirimir dúvidas do uso destes na prática clínica.

2.2 – PIEZOCIRURGIA

A cirurgia óssea utilizando instrumento piezoelétrico foi apresentada na literatura por um italiano em meados de 2000 (Vercellotti 2000). A partir deste momento começaram a surgir na literatura instrumentos utilizando os mesmos princípios como o equipamento “Mectron Piezosurgery” apresentado por Robiony et al. (2004). Este equipamento apresentava multifunções que combinava a função de ultrassom piezoelétrico com vibrações micrométricas com variações de frequência e de energia de corte. Os autores relataram diferentes situações clínicas que foi utilizado o instrumento e atestam um elevado grau de segurança na execução da técnica, com precisão de corte, relataram ainda a utilidade da técnica em áreas de dificuldades anatômicas, de visibilidade da área operatória ou presença de estruturas anatômicas como nervos, vasos e tecido mole

Nos últimos anos tem aumentado a documentação científica com a utilização deste instrumento em diferentes condições da área médica e odontológica (Hoigne et al., 2006, Gleizal et al., 2007, Leclerq et al., 2008, Kfoury et al., 2009, Camargo Filho, 2010, Bacci et al., 2011, Sammartino et al., 2011, Baldi et al., 2011). No Brasil tem crescido o interesse pelo uso desta tecnologia mesmo porque fabricantes nacionais se interessaram na fabricação do equipamento, tornando viável sua utilização pelos cirurgiões. No entanto pesquisas necessitam ser realizadas para contribuir com esta nova tecnologia.

3 - PROPOSIÇÃO

Constitui propósito do presente estudo avaliar histometricamente a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvária de ratos, com broca trefina ou com instrumento piezoelétrico e preenchidos ou não com beta-fosfato tricálcio.

4 - MATERIAL E MÉTODO

Animais

O presente estudo projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Campus de Araçatuba – UNESP **(Processo 1202/2011) (Anexo 1)**.

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) com peso aproximado entre 300 g. Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e estavam em condições de serem submetidos ao experimento. Todos animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura entre 22 - 24°C e com ciclo de 12 horas de luz dia. Os animais foram locados em gaiolas plásticas com cinco animais cada uma, separados de acordo com o grupo experimental. Durante todo período experimental os animais foram alimentados com ração adequada e água *ad libitum*.

Procedimentos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com 20 animais cada um: **grupo Tre** - os animais foram submetidos à criação de defeitos de tamanho crítico na calvária com broca trefina com 5 mm de diâmetro e **grupo Pie** no qual os animais foram

submetidos à criação dos defeitos de tamanho crítico na calvária com 5 mm de diâmetro utilizando um equipamento piezoelétrico.

Criação do defeito em calvária com broca trefina - Ter (Figura 1)

Os animais dos grupos **Tre** 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). 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) que 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 para implante 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).

Criação do defeito em calvária com instrumento Piezoelétrico – Pie (Figura 2)

Os animais do grupo **Pie** foram anestesiados nas mesmas condições utilizadas nos animais do grupo **Tre**. Após tricotomia e anti-sepsia da região da calota craniana dos animais, foi justaposto ao tecido ósseo da calota craniana, um guia cirúrgico (Fig. 2 b) criado especialmente para esta finalidade, o qual apresentava diâmetro interno de 5 mm criando um defeito de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro envolvendo os ossos parietais, sutura sagital e em condições semelhantes para todos os animais. Para a osteotomia com sistema piezoelétrico foi utilizado a 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, 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., 2008, 2008).

Grupos e tratamentos

Os animais dos grupos **Tre** e **Pie** foram aleatoriamente divididos em dois subgrupos de 10 animais cada um, cujos defeitos criados na calvária receberam os seguintes tratamentos : **Tre** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e, a seguir, uma membrana de cortical de osso bovino foi posicionada sobre os mesmos; **Tre + TCP** – os defeitos foram preenchidos com fosfato tricálcio (Beta TCP Bionnovation®, Bionnovation São Paulo, Brasil) (Figura 3 e 5) e, a seguir, uma membrana de cortical de osso bovino foi posicionada sobre os defeitos **Pie** – os defeitos foram preenchidos somente coágulo sanguíneo e, a seguir, uma membrana de cortical de osso bovino foi posicionada sobre os mesmos; ; **Pie + TCP** – os defeitos foram preenchidos com fosfato tricálcio (Beta TCP Bionnovation®, Bionnovation São Paulo, Brasil) e, a seguir, uma membrana de cortical de osso bovino foi posicionada sobre os mesmos.

O volume do biomaterial foi padronizado para todos os defeitos criados experimentalmente nos espécimes dos grupos Tre + TCP e Pie + TCP e permitiu o preenchimento de toda cavidade cirúrgica.

Em todos os espécimes foi utilizada a membrana reabsorvível 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.

Períodos experimentais

Após os períodos de 30 e 45 dias de pós-operatórios, 5 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

Concluído a eutanásia a área do defeito cirúrgico realizado e os tecidos moles da calota craniana de cada animal foram removidos em um só bloco. 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 (E.D.T.A.) 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 no 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 correspondente a 5 mm do defeito ósseo criado e acrescido de 2 mm em cada uma das margens do defeito (Figura 6).

Concluído a descalcificação as peças foram submetidas ao trâmite laboratorial de rotina (lavadas, desidratadas, diafanizadas) e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados, com 6 μ m de espessura, os quais foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) para análise histométrica.

Análise histométrica

Os cortes histológicos de cada espécime correspondentes à região central do defeito criado cirurgicamente foram analisados por um mesmo examinador cego ao experimento e calibrado anteriormente. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de câmera digital acoplada a microscópio de luz, com aumento original de 5x e 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 obtenção da perda óssea da área de furca para a análise histométrica de todos os espécimes.

Os seguintes critérios foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica da imagem digitalizada, de acordo com Messora 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

O valor atribuído a AON de cada animal foi representado pela porcentagem medida obtida dos cortes histológicos examinados. Foi realizado o teste ANOVA para avaliar a significância das diferenças entre os grupos em relação à AON além do teste de Tukey havendo diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

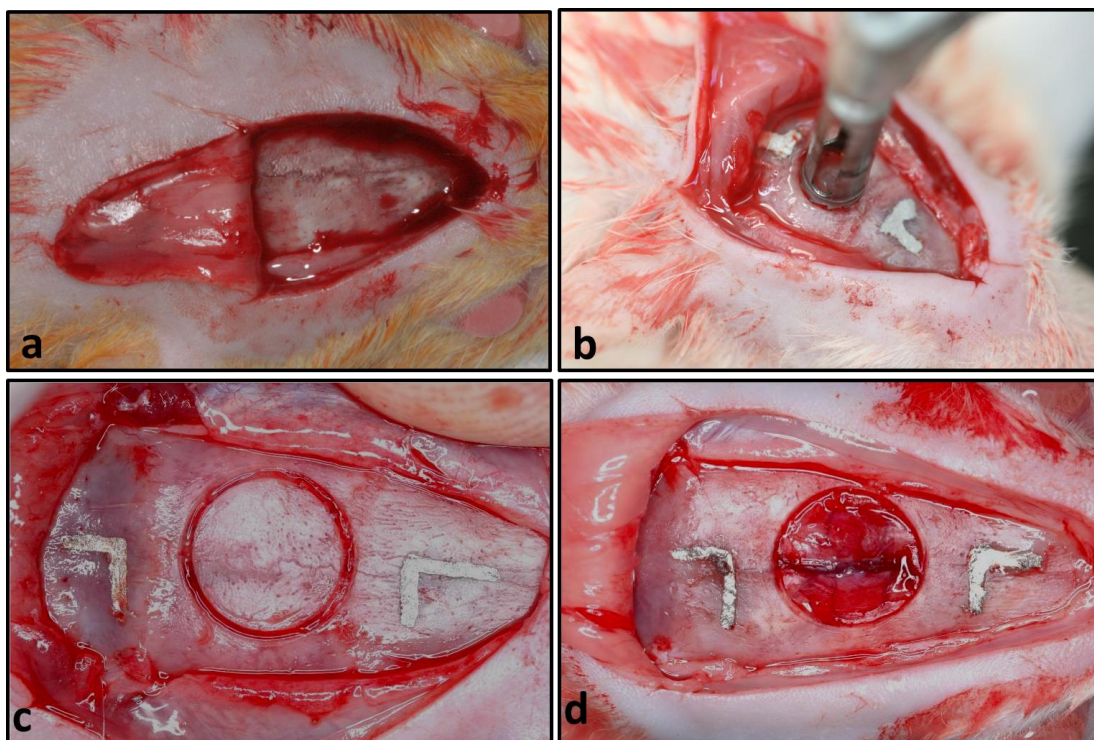


Figura 1. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico realizado com broca trefina. a) calota craniana exposta; b) broca trefina em posição; c) osteotomia realizada ; d) defeito ósseo realizado.

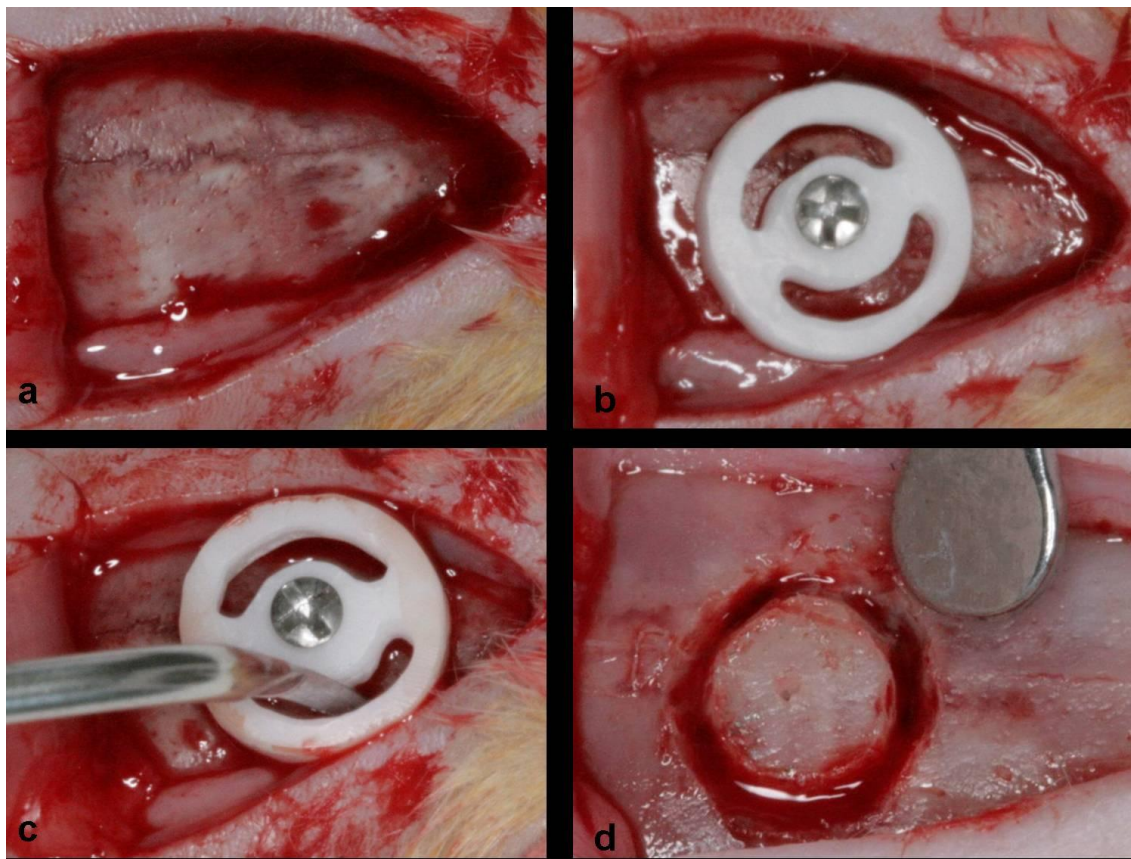


Figura 2. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico com instrumento piezoelétrico. a) calota craniana exposta; b) padrão cirúrgico fixado na calota cranina; c) ponta do instrumento piezoelétrico em posição para corte; d) defeito ósseo realizado.



Figura 3. Beta tricálcio fosfato (Beta TCP Bionnovation®)

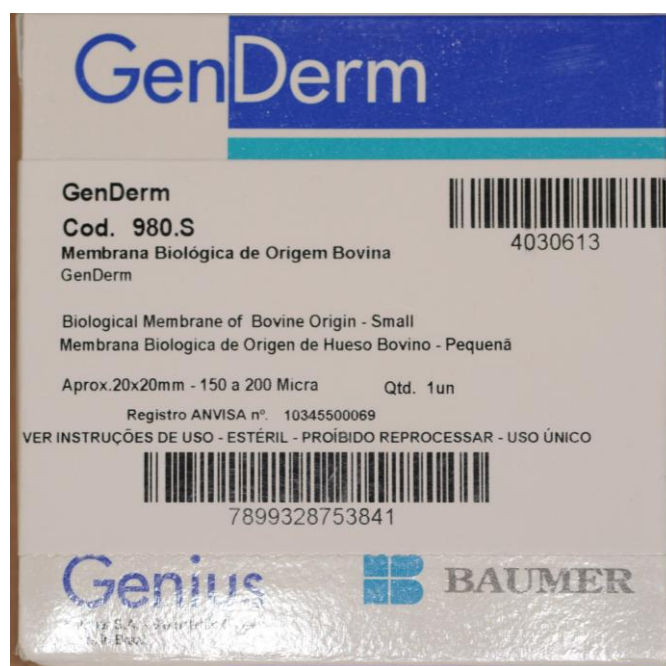


Figura 4. Membrana de cortical de osso bovino utilizada (GenDerm®)

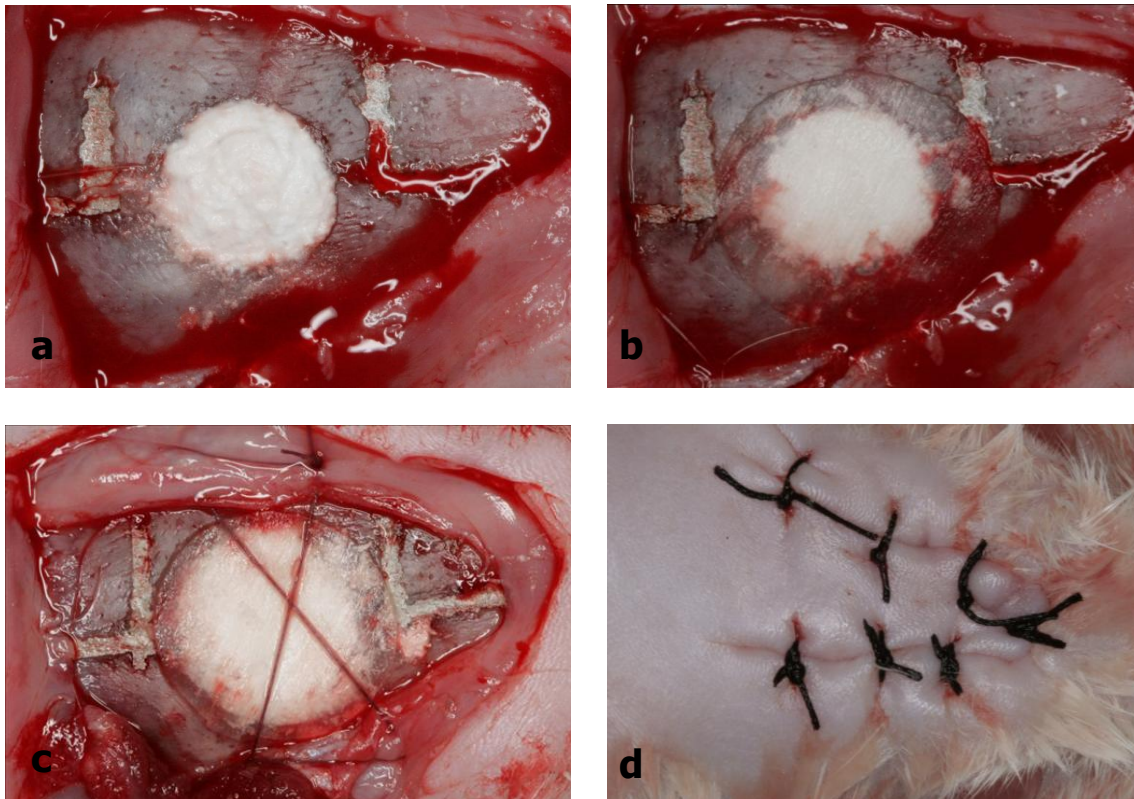
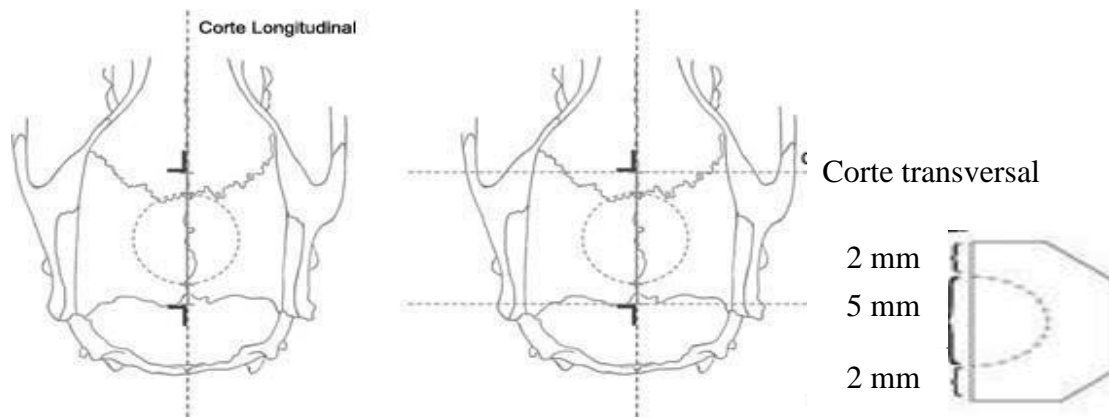


Figura 5. Preenchimento do defeito ósseo de tamanho crítico. Beta-Fosfato tricálcio. a) defeito ósseo preenchido com B-TCP ; b) Membrana de cortical de osso bovino em posição; c) sutura da membrana em posição; d) retalho posicionado mantido com suturas.



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.

5 – RESULTADO

Análise histométrica

Antes do processo de análise histométrica as lâminas foram avaliadas para serem selecionadas para a análise. Algumas estavam com cortes histológicos insatisfatórios para a análise e por esta razão foram descartadas. Este descarte reduziu para quatro o número de amostras de animais por grupo/período. A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Industria Brasileira, Manaus, AM, Brasil).

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.

Os resultados demonstraram que nenhum dos defeitos de tamanho crítico criados em calota craniana de ratos evidenciaram completa formação de tecido ósseo no período de 45 dias (Figura 7).

Na análise dos dados histométricos pode ser observado que o grupo **Tre** no período de 45 dias evidenciou formação de tecido ósseo ($37,73 \pm 15,21$) estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo **Pie** ($14,26 \pm 3,88$) e **Pie + TCP** ($13,59 \pm 3,26$) aos 30 dias. Aos 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa na formação de tecido ósseo, entre os grupos.

Os dados obtidos evidenciaram que houve maior formação de osso nos espécimes dos grupos **Tre** aos 45 de pós-operatório ($37,73 \pm 15,21$) evidenciando que os defeitos criados com broca trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo e cobertos por membrana de cortical óssea bovina demonstraram o melhor resultado.

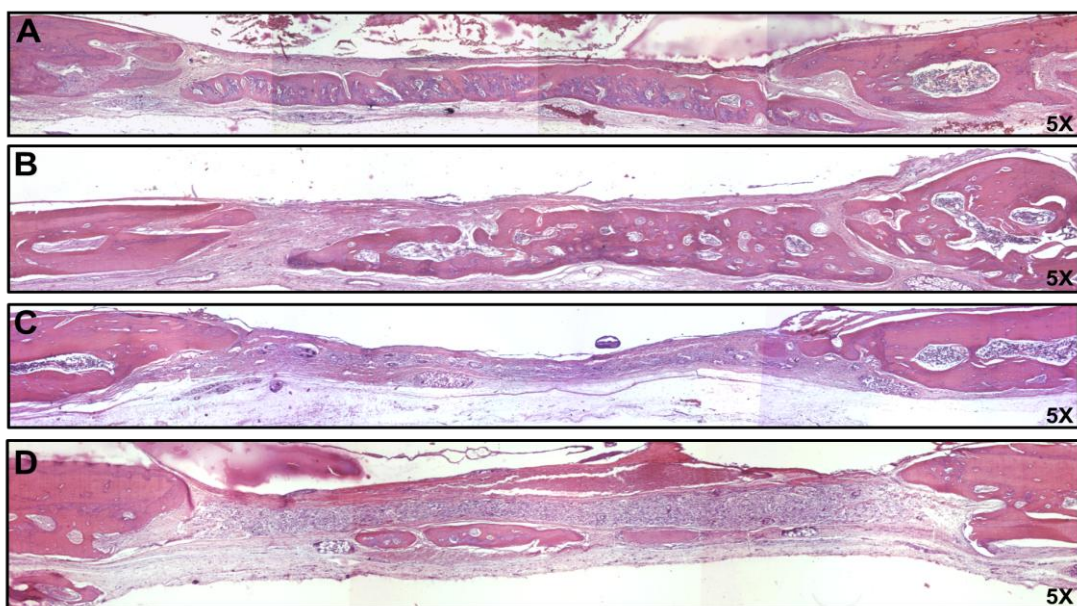


Figura 7. Vista panorâmica dos defeitos em calvária de ratos. 45 dias. A - Grupo Tre; B - Grupo Pie; C - Grupo Tre + TCP; D - Grupo Pie + TCP. Aumento original 5X.

Tabela 1. Média e Desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos, descritos em porcentagem de área de osso neoformado (% AON) nas calotas, de acordo com cada grupo (Tre, Pie, Tre + TCP, Pie + TCP) no período de 30 e 45 dias.

Grupos		
Períodos/Dias	30 dias	45 dias
Tratamentos		
Tre	19,87±6,47	37,73±15,21
Tre + TCP	15,30±5,51	29,14±11,80
Pie	14,26±3,88 ⁺	23,60±14,45
Pie + TCP	13,59±3,26 ⁺	19,98±4,65
N	16	16

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

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado a formação óssea em defeitos de tamanho crítico, realizados com instrumento rotatório (broca trefina) e com instrumento piezoelétrico, preenchidos ou não com biomaterial cerâmico.

O biomaterial estudado trata-se de uma cerâmica granulada reabsorvível, beta tricálcio fosfato de fase pura ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), sintetizada a partir de hidróxido de cálcio tendo o seu uso indicado como matriz osteocondutora para a neoformação óssea.

Os resultados do presente estudo demonstraram que nenhum dos DTC preenchidos somente com coágulo sanguíneo (grupos Tre e Pie) demonstraram completo preenchimento ósseo. Embora estudos tenham documentado que DTC criados em calvária de ratos demonstraram formação óssea completa após 4 semanas (Takagi & Urist, 1982) ou até 30 dias (Cunha et al. 2007), isto não ocorreu no presente estudo. Este fato provavelmente se deve a diferentes fatores como o suprimento sanguíneo da área e a relativa deficiência de osso medular (Prolo et al., 1982).

Por outro lado os resultados demonstraram que os defeitos criados com broca trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo e protegidos com membrana de cortical óssea bovina apresentaram maior preenchimento ósseo no período de 45 dias. Este fato reforça o papel da membrana e o seu uso. Ainda bastante discutido, alguns

autores sustentam que a membrana atuando como barreira, impede a infiltração de células do tecido conjuntivo para o interior da cavidade, proporcionando proteção para a manutenção adequada do coágulo sanguíneo. E, quando utilizada em cavidades preenchidas com biomaterial a mesma atuaria immobilizando o material de preenchimento na área do defeito, evitando o seu deslocamento e melhorando suas propriedades osteocondutoras (Donath et al. 1987). Outros autores sustentam também que o perióstio desempenha papel importante no processo de regeneração óssea pois constitui um meio de fornecimento de células indiferenciadas que podem se transformar em células formadoras de novo osso (Cunha et al. 2007), que com o uso de membrana isto não ocorreria.

Por outro lado no presente estudo os defeitos ósseos que foram preenchidos com beta-TCP não evidenciaram formação óssea significativa nos períodos de 30 e 45 dias. Na análise da literatura observa-se resultados conflitantes quanto a resposta biológica do B-TCP. Jensen et al. (2006) observaram que defeitos provocados na mandíbula de mini-porcos apresentaram maior formação óssea quando preenchidos com beta tricálcio fosfato (57%) do que osso autógeno (55%) ou osso bovino inorgânico (42%) após 8 semanas de avaliação. Cunha et al. (2007) avaliaram em tíbia de ratos fissura óssea criada cirurgicamente e preenchidas ou não (controle) com pasta de fosfato tricálcio. Os autores observaram que o tratamento promoveu recuperação mais rápida que o controle e concluíram que o

material mostrou biocompatibilidade e capacidade osteocondutora. Relataram ainda que o preenchimento da loja cirúrgica pôde ser observado a partir do período de 30 dias. Já Padaroupoulos et al. (2009) observaram em defeitos ósseos provocados em cães que o beta-TCP promoveu formação óssea parcial após um período de 4 meses de avaliação, enquanto que Frota et al. (2011) avaliando DTC em calvária de ratos preenchidos com Beta-TCP concluíram que este material não contribuiu significativamente para o reparo ósseo, no período máximo de análise que foi de 30 dias. Estes achados foram corroborados pelos de Yun et al. (2011) que observaram que DTC (8 mm) provocados em calotas de rato e preenchidos com B-TCP, mostravam formação óssea significativamente limitada.

A biodegradação do Beta-TCP pode ocorrer pela dissolução química do biomaterial pelos fluidos biológicos, pela reabsorção mediada por células ou pela associação de ambas (Jensen et al., 2006; Podaropoulos et al., 2009). Acreditamos que os resultados observados no presente estudo provavelmente se devem também ao período de avaliação ter sido precoce para esta análise, não havendo tempo suficiente para a sua degradação, pois estudos demonstraram que o TCP na fase pura pode ser reabsorvido entre 5 a 6 meses (Rey, 1990, Trisi et al., 2003), embora alguns estudos atestaram que este biomaterial acelera a regeneração óssea na fase inicial do processo (Jensen et al. 2006). Estudo *in vitro* avaliaram os efeitos do TCP em culturas primárias de osteoblastos e observaram que o material não

possui efeito adverso na quantidade, viabilidade e morfologia celular, desempenhando um efeito limitado na proliferação celular (Aybar et al., 2004).

Entendemos que há a necessidade de realização de novos estudos, para contribuir para o uso clínico deste promissor biomaterial na prática clínica, pois pouco se conhece sobre a interação do B-TCP com as células osteoblásticas (Aybar et al. 2004).

.

7 – CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, com a metodologia utilizada no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) Houve maior formação de tecido ósseo nos defeitos criados com broca trefina e preenchidos com coágulo sanguíneo no período de 45 dias (grupo **Tre**);
- 2) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no período de 30 dias.
- 3) Nenhum dos defeitos ósseos provocados em calvária de ratos demonstrou completa formação óssea no período final de avaliação de 45 dias.

8 - REFERÊNCIAS

AICHELMANN-REIDY, M.E, YUKNA, R.A. Bone replacement grafts. The bone substitutes. Dent Clin North Am 1998;42:491-503.

ALMEIDA, J.M., SANTOS, M.R., FERNANDES, L.A., THEODORO, L.H., GARCIA, V.G. 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.

ARTZI, Z., KOOZLOVSKY, A., NEMCOVSKY, C.E., MOSES, O., TAL, H., ROHRER, M.D., PRASAD, H.S., 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 Surg 2008;23:1063-1070.

AYBAR, B., BILIR, A., ALÇAKAYA, H., CEYHAN, T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in Vitro. Clin Oral Impl Res 2004;15:119-125.

BALDI, D., MENINI, M., PERA, F., RAVERA, G., PERA, P. Sinus floor elevation using osteotomes or piezoelectric surgery. Int J Oral Maxillofac Surg 2011;40:497-503.

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.

BERENGO, M., BACCI, C., SARTORI, M., PERINI, A., BARBERA, M.D., VALENTE, M. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol* 2006;55:189-198.

BLOCK, M.S., KENT, J.N. Sinus augmentation for dental implants: the use of augmentation bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1281-1286.

CALIXTO, R.F.E., TEÓFILO, J.M., BREN TAGANI, L.G., LAMANO, T. Comparison of rat bone healing following intra-alveolar grafting with organic or inorganic bovine bone particles. *Braz J Oral Sci* 2008;7:1512-1519.

CAMARGO, P.M., LEKOVIC, V., WEINLAENDER, M., KLOKKEVOLD, P.R., KENNEY, E.B., DIMITRIJEVIC, B. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontias. *Oral Sur oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:581-586.

CHIRIAC, G., HERTEM, M., SCHWARTS, F., ROTHAMEL, D., BECKER, J. Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery) on chip morphology, cell viability and differentiation. *J Clin Periodontol* 2005;32:994-999.

CONRAD, E.U., ERICKSEN, D.P., TENCER, A.F., STRONG, D.M., MACKENZIE, A.P. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop* 1993;290:279-284.

COSTA, A.M., KOBAYASHI, G.S., BUENO, D.F., MARTINS, M.T., FERREIRA, M., PASSOS-BUENO, M.R., ALONSO, N. An experimental model for the study of craniofacial deformities. *Acta Cir Bras (Serial on the Internet)* 2010;25.

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

DAHLIN, C., LINDE, A., GOTTLow, J. Healing of bone defect by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-676.

DONATH, K., ROHRER, M.D., HORMANN, K. Mobile and immobile hydroxiapatite integration and resorption and its influence on bone. *J Oral Implantol* 1987;13:120-127.

DREESMANN, H. Ueber Knochenplombierung. Beiträge Zur Kinische Chirurgie 1892;9:804-810.

DRIESENS, F.C.M., RAMSELAAR, M.M.A., SCHAEKEN, H.G., STOLS, A.L.H. Van MULLEN, P.J. Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. J Mater Science Mater Med 1992;3:413-417.

EGGERS, G., KLEIN, J., BLANK, J. Piezosurgery: An ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. Br J Oral Maxillofac Surg 2004;42:451.

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

ERIKSSON, R.A. & 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, A.C., F.C., GUSKUMA, M.H., JARDIM, E.C.G., PEREIRA, ARANEGA, A.M., GARCIA JÚNIOR, I.R. Enxerto ósseo em odontologia: Revisão de literature. Innov Implant J, Biomater Esthet 2010;5:48-52.

FOWLER, E.B., CUENIN, M.F., HOKETT, S.D. Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials : study in rat calvaria defects. J Periodotol 2002;73:191-197.

FRAME, J.W. Animal research: the experimental model. Brit J Oral Maxillofac Surg 1984;22:341-348.

FREEMAN, E., TURNBULL, R.S. The value of osseous coagulum as a graft material. J periodont Res 1973;8:229-236.

FROTA, R., SILVA JÚNIOR, V.A., TEIXEIRA, M., SOBRAL, A.P., SILVA, E.D.O., SILVEIRA, MM.F., ARAGÃO-NETO, A.D. Histological evaluation of bone repair using B-tricálcium phosphate. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2011;1:190-194.

FURLANETO, F.A.C., NAGATA, M.J.H., FUCINI, S.E., DELIBERADOR, T.M., OKAMOTO, T., MESSORA, M.R. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulphate: a histologic and histometric study in rat calvária. Clin Oral Impl Res 2007;18:311-318.

GHANAVATI, F., GHOLANI, G.A., ASGARI, S., EFHBAL, M., GHANAVANI, F., RAHIMI, H., KARAMLOU, TAMIZI, M. Bone augmentation potential in rabbit calvaria and ex vivo cytotoxicity of

four bone substituting materials. J Periodontol Implant Dent 2011;3:1-7.

GLEISAL, A., BE., BERA, J.C., LAVANDIER, B., BEZIAT, J.L. Piezoelectric osteotomy: a new technique for bone surgery - advantages in craniofacial surgery. Child Nerv Syst 2007;23:509-513.

GRUBER, R.M., KRAMER, F.J., MERTEN, H.A, SCHLIEPHAKE, H. Ultrasonic surgery: an alternative way in orthognatic surgery of the mandibule. A pilot study. Int j Oral maxillofac Surg 2005;34:590-593.

GUGLIELMOTTI, M.B., CABRINI, R.L. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. J Oral Maxillofac Surg. 1985;43:359-364.

HEILAND, M., BLESSMAN, M., POHLENZ, P., LI, L., SCHMELZLE, R., BLAKE, F. Intraoral ostotomies using piezosurgery for distraction in an infant with Pierre-Robin sequence. Clin Oral Investig 2007;11:303-306.

HJERTING-HANSEN, E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery: . A historical review in German. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002;6:6-14.

HOIGNE, D.J., STUBINGER, S., KAENEL, O.V., SHAMDASANI, S., HASENBOEHLER, P. Piezoelectric osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique. *BMC Musc Dis* 2006;7:1-4.

HOLLINGER, J.O., KLEINSCHMIDT, J.C. 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 ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis* 2008;14:457-464.

JENSEN S.S., TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(Suppl):218-236.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 1995. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 433p.

KALISH, B. P., SCHUSTER, G.S., PEACOCK, M.E., CUENIN, M.F., SWIEC, G.D., POTTER, B.J., BUXTON, T.B., McPHERSON III, J.C. 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.

KATCHBURIAN, E., ARANA, V. *Histologia e embriologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2004.

KATRIKOWA, B., WIRTZ, R., KREMPIEN, R., BLANK, J., EGGERS, G. Piezosurgery: a new safe technique in cranial osteoplasty? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:461-465.

KERAWALA, C.J., MARTIN, I.C., ALLAND, W. The effect of operator technique and bur design on temperature during osseous preparation for osteosynthesis self-tapping screws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:145.

KFOURI, F.A., DUALIBI, M.T., BRETOS, J.L.G., FERREIRA, L.M., DUALIBI, S.E. Cirurgia piezoelétrica em implantodontia: aplicações clínicas. *RGO* 2009;57:121-126.

KIM, C.K., KIM, H.Y., CHAI, J.K. Effect of a calcium sulfate implant with calcium sulfate barrier on periodontal healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol* 1998;69:982-988.

KLEIN, C.P., DRIESSEN, A.A., DE GROOT, K., CON DER HOOFF, A. Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 1983;17:769-84

KRAMER, F.J., LUDWING, H.C., MATERNA, T., GRUBER, R., MERTEN, H.A., SCHILIEPHAKE, H: Piezoelectric osteotomies in craniofacial procedures: a series of 15 pediatric patients. *J Neurosurg* 2006;104 (suppl):68-71.

LABANCA, M., AZZOLA, F., VINCI, R., RODELLA, L.F. Piezoelectric surgery: twenty years of use. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46:265-269

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

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive materials: calcium phosphates. *Clin Orthop Rel Res* 2002;395:81-98.

LIM, S.C., LEE, M.J., YEO H.H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Path Intern* 2000;50:594-602.

MATZENBACHER, S.A., MAILHOT, J.M., McPHERSON, J.C., CUENIN, M.F., HOKETT, S.D., SHARAWY, M., PEACOCK, M.E. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodont* 2003;74:1641-1646.

MELCER, A.H. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch oral Biol* 1969;14:1101-1109.

MELLO, L.G., NAGATA, M.J.H., BOSCO, A.F., RIBEIRO, L.L., LEITE, C.M. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin oral Implants Res* 2005;16:683-691.

MELLONIG, J.T., PREWETT, A.B., MOYER, M.P. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 1992;63(12): 979-983, 1992.

MENDES, S.M., FONSECA, C.E., BASSI, A.P.F., PONZONI, D., CARVALHO, P.S.P. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso

desmineralizado ou por osso composto com ou sem proteína morfogenética do osso (BMP). Rev Odont Araçatuba 2006;27:34-40.

MESSORA, M.R., NAGATA, M.J.H., DORNELLES, R.C.M., BONFIM, S.R.M., FURLANETO, F.A.C., de MELO, L.G.N., DELIBERADOR, T.M., BOSCO, A.F., GARCIA, V.G., FUCINI, S.E. 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, M.R., NAGATA, M.J.H., MARIANO, R.C., DORNELLES, R.C.M., BONFIM, S.R.M., FUCINI, S.E., GARCIA, V.G., BOSCO, A.F. 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.

METZGER, M.C., BORMANN, K.H., SCHOEN, R., GELLRICH, N.C. Inferior alveolar nerve transposition. An in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. J Oral Implantol 2006;32:19-25.

MORETI, E.A., GÓMEZ, G.F., PATTERSON F., MARIO, P., ALONSO, E., FODOR M. Evaluación experimental de diferentes sustitutos osseo en calota craneana de conejos albinos NZ/Experimental assessment of

several bone substitutes in NZ albino rabbits skulls. *Rev Argent Cir Plast* 1997;3:24-32.

MUDDUGANGADHAR, B.C., AMARNATH, G.S., TRIPATHI, S. DIKSHIT, S., DIVYA M.S. Biomaterials for dental implants: Na Overview. *Int J Oral Implantol Clin Res* 2011;2:13-24.

MURASHIMA, Y., YOSHIKAWA, G., WADACHI, R., SAWADA, N., SUDA, H. Calcium sulphate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. *Int Endod J* 2002;35:768-774.

NAGAHARA, K., ISOGAI, M., SHIBATA, K., MEENAGHAN, M.A. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. *Int Oral Maxillofac Implants* 1992;7:72-79.

NAGATA, M.J.H., MELO, L.G.N., MESSORA, M.R., BONFIM, S.R.M., FUCINI, S.E., GARCIA, V.G., BOSCO, A.F., OKAMOTO, T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009a;36:775-783.

NAGATA, M.J.H., MESSORA, M.R., POLA, N., CAMPOS, N., VIERIA, R., ESPER, L.A., SBRANA, M., FUCINI, S.E., GARCIA, V.G., BOSCO, A.F. 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* 2009a. 9999;1-6 DOI. 10.1002/jor.21027.

OH, H.J., WIKESJO, U.M.E., KANG, H.S., KU, Y., EOM, T.G., KOO, K.T. Effect of implant drill characteristics on heat generation

OLIVEIRA, R.C., OLIVEIRA, F.H.G., CESTARI, T.M., TAGA, R., GRANJEIRO, J.M. 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.

OLIVEIRA, L.S.A., OLIVEIRA, C.S., MACHADO, A.P., ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea. Método de análise e perspectivas futuras. *Rev Ci med biol* 2010;9Supl.1):37-44.

ORSINI, M., ORSINI, G., BENLLOCJ, D. A comparison of calcium sulfate and autogenous bone graft to bioabsorbible membrane plus autogenous bone graft in the treatment of intrabony periodontal defects: a split-mouth study. *J Periodontol* 2001;72:296-302.

PANG, E.K., IM, S.U., KIM, C.S., CHOI, S.H., CHAI, J.K., KIM, C.K., HAN, S.B., CHO, K.S. 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, J.W., KIM, E.S., JANG, J.H., SUH, J.Y., PARK, K.B., 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.

PARK, J.W., JANG, J.H., BAE, S.R., AN, C.H., SUH, J.Y. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. Clin Oral Impl Res 2009;20:372-378.

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.

PELTIER L.F. The use of plaster of paris to fill defects in bone. Clin Prthop 1961;21:1-31.

PODAROULOULUS, L., VEIS, A.A., PAPADIMITRIOU, S., ALEXANDRIDIS, C., KALYVAS, D. Bone regeneration using B-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. J Oral Implantol 35:1:28-36.

POTIJANIAKUL, P., SATTAYASANSAKUL, 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.

PRECHEUR, H.V. Bone graft materials. Dent Clin N Am 2007;51:729-746.

PROLO, D.J., PEDROTTI, P.W., BURRESE, K.P., OKLUND, S. Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. Clin Orthop 1982;168:230-242.

RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, M.P., CALVO-GUIRADO, J.L., DELGADO-RUIZ, R.A., del VAL, J.E.M.S., 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.

REY, C. Calcium phosphate biomaterials and boné mineral: differences in composition, structures and properties. Biomaterials 1990;11:13-15.

SAMMARTINO, G., TROSINO, O., DILAURO, A.E., AMATO, M. CIOFFI, A. Use of piezosurgery device in manegement of surgical dental

implant complication: a case report. *Impl Dent* 2011;20: DOI: 10.197/ID.0b013e31820fb2da

SANTINONI, C.S. 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.

SANTOS Jr, P.V., MELHADO, R.M. Efeito da estimulação ultra-sônica sobre o processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odont UNESP* 1990;19:291-299.

SATTOSANTI, J.S. Calcium sulfate: a biodegradable and biocompatible barrier for guided regeneration. *Compend Contin Dent* 1992;13:226-234.

SATTOSANTI, J.S. Calcium sulfate is a safe, resorbable barrier adjunct to implant surgical procedures. *Dent Implantol Update* 1993;4:69-73.

SBORDONE, L., BORTOLAIA, C., PERROTI, V., PASQUANTONIO, G., PETRONE, G. Clinical and histologic analysis of calcium sulfate in

treatment of a post-extraction defect: a case report. *Implant Dent* 2005;14:82-87.

SHI, H., MA, J., ZHAO, N., CHEN, Y., LIAO, Y. Periodontal regeneration in experimentally-induced alveolar bone dehiscence by an improved biphasic calcium phosphate ceramic in beagle dogs. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:3515-3524.

SCHLIEPHAKE, H., TAVASSOL, F., GELINSKY, M., DARD, M., SEWING, A., POMPE, W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Imp Res* 2004;15:112-118.

SCHMITZ J.P., HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthopedics Related Res* 1986;205:299-308.

SAUERESSIG, F. Avaliação microscópica do processo de reparo ósseo na presença de enxerto ósseo humano liofilizado mineralizado e desmineralizado e membrana de cortical bovina em calota craniana de ratos. Dissertação (Mestrado) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p.122. 2005.

TAKAGI, K, URIST, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of Surgery* 1982;196:100-109.

TAMIMI, F.N., TORRES, J., CLEMENTE, C., LÓPES-CABARCOS, E., BLANCO, L.J. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio_Oss and B-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;33:922-928.

TAY, B.K.B., PATEL, V.V., BREADFORD, D.S. Calcium sulfate and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin N Amer* 1999;30:615-623.

TOPAZIAN, R.G., HAMMER, W.B., BOUCHER, L.J., HULBERT, S.F. Use of alloplastic for ridge augmentation. *J Oral Surg* 1971;29:792-798.

TREVISAN JR, W., RODRIGUES, M.R., SILVA, T.B., SIMIONI, J.C. Sulfato de cálcio como barreira e material de preenchimento associado ao osso autógeno no tratamento de defeito ósseo periodontal – proposta de tratamento e relato clínico. *Inn Impl J* 1;1:54-61.

TRIZI, P., RAO, W., REBAUDI, A., FIORE, P. Histologic effect of pure beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodont Rest Dent* 2003;23::69-77.

TURONIS, J.W., McPHERSON, J.C., CUENIN, M.F., HOKETT, S.D., PEACOCK, M.E., 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; 32;2:55-62, 2006.

VERCELLOTTI, T. Piezoelectric surgery in implantology: A case report. A new piezoelectric expansion technique. *Int J Periodont Restorative Dent* 2000;20:359.

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

VERCELLOTTI, T., CROVACE, A., PALERMO, A. Xxx The piezoelectric osteotomy in orthopedics: clinical and histological evaluations (pilot study in animals) *Med J Surg Med* 2001;9:89

WILLIAMS, D.F. *Definitions of biomaterials*. Elsevier: New York, 1987.

YUN, J.I., WIKESJO, U.M.E., BORKE, J.L., BISCH, F.C., LEWIS, J.E., HEROLD, R.W., SWIEC, G.D., WOOD, J.C., McPHERSON III, J.C. Effect

of systemic parathyroid hormone (1-34) and a B-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvária defect model. *J Clin Periodontol* 2010;37:419-426.

ZASACKI, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopaedic surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 1991;272: 82-87.

ZENÓBIO, E.G., MARCANTONIO, R.A.C., MARCANTONIO JR, E., FERREIRA, B.A., 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 ÓSSEO EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICOS CRIADOS EM CALVÁRIA DE RATOS, REALIZADOS COM BROCA TREFINA OU INSTRUMENTO PIEZOELÉTRICO, PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL (FOSFATO TRICÁLCIO)*" sob responsabilidade do(a) *Pesquisador(a) Valdir Gouveia Garcia* e o colaborador *Yuri Santos Muniz* 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 1202/2011.

Araçatuba, 04 de Julho de 2011


João Eduardo Gomes Filho
Presidente da CEUA

FAC/vbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Aracatuba – 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 citado a fonte.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Barretos abril de 2012.

Yuri Santos Muniz

