

LIVIA MARINA ALVARENGA MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ MALEÁVEL, REABSORVÍVEL E
POROSA E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA
PERIODONTAL PELA TÉCNICA DE REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M386d
2013
Martins, Livia Marina Alvarenga, 1985-
Desenvolvimento de uma matriz maleável, reabsorvível e
porosa e sua aplicação no tratamento da doença periodontal pela
técnica de regeneração tecidual guiada / Livia Marina Alvarenga
Martins. – Viçosa, MG, 2013.
x, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

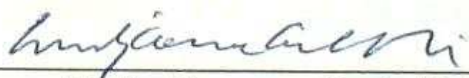
1. Cães - Doenças - Tratamento. 2. Periodontia.
3. Hidroxiapatita. 4. Materiais biomédicos. 5. Doença
periodontal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0897632

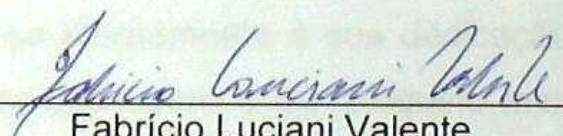
**DESENVOLVIMENTO DE UMA MATRIZ MALEAVEL, REABSORVIVEL E
POROSA E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DOENÇA
PERIODONTAL PELA TÉCNICA DE REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

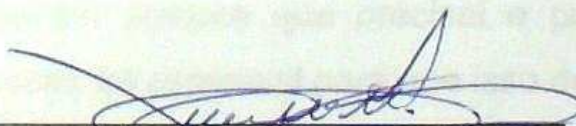
APROVADA: 31 de julho de 2013.



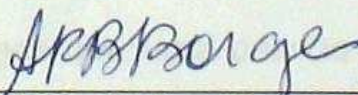
Emily Correna Carlo Reis
(Coorientadora)



Fabrício Luciani Valente
(Coorientador)



Kelly Cristine de Sousa Pontes



Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela minha linda família, pelos meus bons amigos e pela vida.

Agradeço aos meus amados pais, pela confiança colocada em mim, pela oportunidade de me permitirem continuar estudando aquilo que amo, pelo apoio incondicional nos momentos tristes e difíceis ao longo desses anos em Viçosa, e por sempre compartilharem as alegrias e as conquistas. Sem vocês, realizar esse projeto não seria possível. Amo vocês incondicionalmente. Esse título também é de vocês.

Em terceiro, mas não menos importante, agradeço à Andrea, minha querida orientadora, por ter confiado tão arduamente na minha capacidade. Obrigada pelos conselhos, por todos os ensinamentos ao longo dos anos, pela paciência em me orientar. A sua dedicação permitiu que eu visse que sou capaz de realizar aquilo que não acreditava que conseguiria algum dia. Você é, e sempre será o espelho de profissional que eu possa a vir me tornar algum dia.

À Emily, que permitiu que eu fizesse parte do seu Doutorado, despertando em mim a vontade de estudar mais sobre a Odontologia Veterinária. Muito obrigada por todos os ensinamentos e conselhos, e principalmente pela enorme paciência ao discutir minhas dúvidas.

Ao Fabrício, que hoje considero um grande amigo. Obrigado por aguentar os dramas do dia-a-dia, os choros, as lamentações, as tristezas, e as muitas risadas que se seguiram. Agradeço eternamente à sua dedicação em estar sempre por perto nos momentos de desespero e de “bloqueio mental”. Sem você, eu não teria conseguido.

À minha irmã Sílvia, e o irmão que ela escolheu por mim, Leandro. Obrigado por me abrigarem sempre que precisei e por se mostrarem tão presentes. O apoio de vocês foi essencial para que isso desse certo.

Aos meus irmãos Pedro e Marcus, obrigado por estarem com os ouvidos a postos quando mais precisei.

À Dani e a Mari, por aguentarem exaustivamente lapsos de mau humor, e por serem as melhores amigas que uma pessoa pode querer. Obrigado por estarem comigo ao longo de todos esses anos, “na alegria e na tristeza”. Amo vocês.

Ao meu grande companheiro de batalha, Raul. Muito obrigada é muito pouco pra dizer. Sua amizade foi essencial durante todo esse tempo. Agradeço imensamente pela atenção, carinho e companheirismo.

Aos meus amigos da veterinária: Rodrigo, Dinamara, Caio, Aline, Vó, Fabian, Sandy, Cleo e Nat. Obrigado por encherem parte desse tempo com muitas risadas. Foi essencial!

À Perdigão, minha irmã sem querer, pela amizade mais do que sincera. Essa dissertação não teria sido escrita sem você.

À Alice, minha querida estagiária estranha, que se tornou uma grande amiga. As cirurgias não seriam as mesmas sem você. Obrigado por toda ajuda e dedicação, e por todos os cupcakes, docinhos, coxinhas e as risadas que acompanharam tudo isso.

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária pelo apoio e pela amizade ao longo desse tempo: Maninha, Tatinha, Toninho, Claudio, Grazi. Um agradecimento em especial à Carmem, que se tornou uma grande amiga.

Ao Departamento de Solos, através do Laboratório de Mineralogia da UFV, pelo auxílio na realização da difração de raios-X.

Ao professor John Edward Davies, da Universidade de Toronto, por permitir e auxiliar as análises pela microtomografia computadorizada em seu laboratório.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelo auxílio na realização das análises de microscopia eletrônica.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto

À Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo, e ao seu laboratório JHS Laboratório Químico Ltda pelo fornecimento do material e orientações.

Por fim, mas não menos importante agradeço imensamente aos meus 12 cães, que foram utilizados nesse experimento. Agradeço as lambidas, aos latidos na minha chegada todos os dias, aos rabos sempre espertos. Agradeço a alegria que cada um deles me proporcionou ao longo do tempo. Foi difícil vê-los partir. Mesmo sem nome, no intuito que doesse menos na hora da partida, cada um de vocês terá um espaço enorme reservado no meu coração mole. Sem vocês esse estudo não teria acontecido. O meu muito obrigado e minhas eternas desculpas. Espero que estejam em um lugar mais bacana agora!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Resumo	viii
Abstract	x
CAPÍTULO I - Doença periodontal em cães: caracterização, tratamentos e perspectivas	1
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Doença Periodontal	3
Tratamento da Doença Periodontal	6
Regeneração Tecidual Guiada	8
Biomateriais	
Considerações Finais	11
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO II - Caracterização <i>in vitro</i> de membranas compostas por hidroxiapatita e policaprolactona para regeneração periodontal	18
Resumo	18
Abstract	19
Introdução	20
Material e métodos	21
Resultados e discussão	22
Conclusões	27
Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO III - Tratamento da doença periodontal pela técnica da regeneração tecidual guiada: aspectos clínicos, radiográficos, microtomográficos e histológicos	32
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e Métodos	37
Resultados e discussão	45
Conclusões	54
Referências Bibliográficas	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO II - Caracterização <i>in vitro</i> de membranas compostas por hidroxiapatita e policaprolactona para regeneração periodontal.	
Figura 1 - Difratoograma correspondente à membrana 1 (75HAP/25PCL)	24
Figura 2 - Difratoograma correspondente à membrana 2 (60HAP/40PCL)	24
Figura 3 - Micrografia da amostra 75HAP/25PCL obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura	25
Figura 4 - Micrografia da amostra 60HAP/40PCL obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura	26
 CAPÍTULO III - Tratamento da doença periodontal pela técnica da regeneração tecidual guiada: aspectos clínicos, radiográficos, microtomográficos e histológicos	
Figura 1 - Padronização do defeito realizado em 3º e 4º molar da mandíbula	38
Figura 2 - Poliéster de moldagem para cronificação do defeito	39
Figura 3 - Sutura de <i>flap</i> em padrão simples, realizado com Poliglactina 910 3.0	40
Figura 4 - Posicionamento da membrana sobre defeito em 4º pré-molar	42
Figura 5 - Exposição de membrana com recessão gengival avaliada aos 60 dias.	46
Figura 6 - Média e desvio-padrão do NCI (mm) dos grupos tratados e controle no pré-RTG e 60 dias após RTG	47
Figura 7 - Radiografia tirada imediatamente pós RTG	48
Figura 8 - Radiografias retiradas 60 dias pós RTG.	49
Figura 9 - Reconstrução tridimensional da área de interesse do osso alveolar do terceiro pré-molar saudável, da amostra que apresentou maior BV/TV, pertencente ao grupo controle, de uma amostra que apresentou um valor intermediário, também do grupo controle, e da amostra que apresentou o menor valor para BV/TV, pertencente ao grupo tratado	51
Figura 10 - Fotomicrografia do tecido conjuntivo fibroso que ocupava o defeito de um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar	52
Figura 11 - Fotomicrografia da região da base do defeito em um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar	53

Figura 12 - Fotomicrografia da borda da raiz dentária em um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar.	54
Figura 13 - Fotomicrografia da região da furca do terceiro pré-molar em um animal do grupo controle e do grupo tratado 60 dias após o implante	55

RESUMO

MARTINS, Livia Marina Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2013. **Desenvolvimento de uma matriz maleável, reabsorvível e porosa e sua aplicação no tratamento da doença periodontal pela técnica de regeneração tecidual guiada.** Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges, Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Fabrício Luciani Valente.

A doença periodontal é um importante problema tanto na medicina humana quanto na veterinária, pois apresenta como grave consequência a perda dos tecidos de sustentação da peça dental, sendo que o tratamento convencional – retirada mecânica da placa - não permite a formação dos tecidos periodontais de sustentação. Os defeitos ósseos resultantes da afecção necessitam de preenchimento com substitutos para que ocorra a regeneração óssea apropriada no local. A utilização de biomateriais biocompatíveis e osteocondutores, preferencialmente reabsorvíveis, serve como suporte para formação óssea e são reabsorvidos gradativamente pelo organismo, sem qualquer reação adversa. O objetivo desse trabalho foi caracterizar duas membranas compostas por hidroxiapatita sintética (HAP 91 PLUS ®) e policaprolactona (PCL) em diferentes concentrações (75HAP/25PCL e 60HAP/40PCL) e avaliação da utilização da segunda em defeitos periodontais na mandíbula de cães. A análise da membrana pela microscopia eletrônica de varredura revelou superfície complexa na membrana 75HAP/25PCL e menos complexa na membrana 60HAP/40PCL. Ambas apresentaram alta cristalinidade, avaliadas pela difração de raios-X e a presença de cristais de hidroxiapatita na superfície da membrana nos quais auxiliam a complexidade da topografia. Os diâmetros médios dos poros foram de $15,7(\pm 8,1)$ μm e $10,4(\pm 6,3)$ μm sem, entretanto, evidenciar a presença de macroporos nem a interconexão entre os poros existentes. Para explicação *in vivo*, os grupos experimentais foram divididos em controle e tratado, contendo seis animais cada. A doença periodontal foi induzida em três estágios em todos os animais, e seis deles receberam tratamento com a técnica de regeneração tecidual guiada. As avaliações clínicas foram realizadas durante duas semanas após a

implantação da membrana e após 60 dias do pós-operatório. Radiografias foram retiradas no pré operatório imediato e aos 60 dias após tratamento. A histologia e a tomografia microcomputadorizada foram realizadas aos 60 dias do pós-operatório. Clinicamente não foram observados dor e secreção purulenta, e não houve diferença estatística no nível clínico de inserção entre os grupos avaliados. Nos animais tratados, 50% apresentaram deiscência e 83% exposição de membrana. As imagens radiográficas demonstraram radiopacidade igual ao osso alveolar na região do defeito em ambos os grupos. A tomografia microcomputadorizada revelou que o grupo controle apresentou, com diferença estatística, maior relação de volume ósseo sobre o volume total do defeito em relação ao grupo tratado, no entanto em todos os animais, a região de furca não foi preenchida por novo osso alveolar. A histologia revelou presença de grande infiltrado inflamatório e presença de tecido conjuntivo em ambos os grupos. Osso novo apenas foi observado na borda apical do defeito tanto no grupo controle quanto no grupo tratado. Assim, o biomaterial utilizado não obteve sucesso quando utilizado em defeitos periodontais, sendo necessários assim, maiores estudos quanto a sua utilização em outras regiões do organismo.

ABSTRACT

MARTINS, Livia Marina Alvarenga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Development of a matrix malleable, bioabsorbable, porous and its application in the treatment of periodontal disease by the technique of guided tissue regeneration.** Advisor: Andrea Pacheco Batista Borges. Coadvisors: Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

Periodontal disease is a major problem both in human and in veterinary medicine, because presents as a serious consequence of the loss of alveolar bone, besides the supporting tissues of the dental piece: cementum and periodontal ligament. The treatment of this disease is the manual removal of plaque associated with the use of different antimicrobials to prevent systemic consequences that disease can cause. However, the conventional treatment prevents the formation of periodontal tissue support, occurring only proliferation of cells of the junctional epithelium and gingival connective tissue fibroblasts. Bone defects resulting from the need to fill condition replacements for bone regeneration to occur at the appropriate location. The use of biocompatible and osteoconductive biomaterials, preferably resorbable, serves as support for bone formation and are gradually reabsorbed by the body without any adverse reaction. The aim of this study was to characterize two membranes composed of synthetic hydroxyapatite (HAP 91 PLUS ®) and polycaprolactone (PCL) in different concentrations (75HAP/25PCL and 60HAP/40PCL) and it evaluation of the use in bone defects in the alveolar bone of the jaw dogs. The analysis of the membrane by scanning electron microscopy revealed complex surface in the membrane 75HAP/25PCL and less complex in the membrane 60HAP/40PCL. Both showed high crystallinity, evaluated by x-ray diffraction, and the presence of hydroxyapatite crystals adhered to the membrane, which improve their complex topography. The average pore diameters were 15.7 ($\pm$ 8.1) μ m and 10.4 ($\pm$ 6.3) μ m without, however, show the presence of macropores or interconnection between the existing pores. The experimental groups were divided into control and treated, containing six animals each. Clinical evaluations and radiographs were performed two weeks after the implantation

of the membrane and 60 days after operation. Histology and microtomography scan was performed at 60 days postoperatively. Were not clinically observed pain and purulent discharge, and the clinical insertion level showed no statistical difference between the groups. In treated animals, 50% of the animals showed dehiscence and 83% had membrane exposure. Radiographic images show alveolar bone radiopacity equal in both groups. The computed microtomography revealed that the control group showed, with statistical difference, the greater ratio of bone volume over the total volume of the defect in relation to the treated group, however in all animals, the furcation area was not filled by new alveolar bone. Histology revealed the presence of extensive inflammatory infiltration and connective tissue in both groups. New bone was only observed in the apical border of the defect in both the control and the treated group.

CAPITULO I

Doença periodontal em cães: caracterização, tratamentos e perspectivas

Martins. L.M.A. *et al.*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi apresentar, através de uma revisão bibliográfica, os aspectos relevantes relacionados à doença periodontal, bem como a utilização de biomateriais, pela técnica de regeneração tecidual guiada na regeneração periodontal. A perda do osso alveolar, grave consequência da progressão da doença periodontal, é um importante problema tanto na medicina humana quanto na veterinária, podendo levar a agravantes como a ocorrência de fraturas patológicas mandibulares. Os defeitos ósseos resultantes de tal perda necessitam de preenchimento com substitutos para que ocorra a regeneração óssea apropriada no local, levando também a formação de tecidos periodontais específicos como cemento e o ligamento periodontal. A utilização de biomateriais biocompatíveis e osteocondutores, preferencialmente reabsorvíveis, serve como suporte para formação óssea e são reabsorvidos gradativamente pelo organismo, sem qualquer reação adversa. O desenvolvimento e avanço nos estudos de tais biomateriais são de extrema importância já que os tratamentos convencionais utilizados hoje em dia não permitem a regeneração ideal dos tecidos que envolvem a peça dental, sendo esta revestida apenas por tecido conjuntivo. A associação de cerâmicas e polímeros apresenta-se hoje como uma boa alternativa, sendo amplamente estudados atualmente. As cerâmicas apresentam como principais características a semelhança com a fase mineral de ossos e dentes, excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade, porém muito frágeis. Já os polímeros apresentam alta resistência, além de serem facilmente moldados e adaptados no local de implantação.

Palavras-chave: doença periodontal, biomateriais, compósitos, regeneração óssea.

ABSTRACT

The aim of this paper is to present, through a literature review, the relevant aspects related to periodontal disease, and the use of biomaterials, associated with the technique of guided tissue regeneration in the correction of these disease in the patient. The alveolar bone loss is a severe consequence of periodontal disease progression and is a very important problem both in human and in veterinary medicine, and may lead to aggravating the occurrence of pathological mandibular fractures. Bone defects resulting from such loss, need to fill substitute for bone regeneration to take place appropriately on the spot, also leading to formation of periodontal tissue specific and the periodontal ligament and cementum. The use of biocompatible and osteoconductive biomaterials, preferably resorbable, serve as supports bone formation and are gradually reabsorbed by the body without any adverse reaction. The progress in research and development of such biomaterials are of utmost importance since conventional treatments used today do not allow for optimal regeneration of the tissues surrounding the dental piece, which is covered only by connective tissue. The combination of ceramics and polymers presents itself today as a good alternative, currently being widely studied. The ceramics present the main characteristics of similarity to the mineral phase of bone and teeth, excellent biocompatibility, bioactivity, absence of toxicity, degradation rates variables and osteoconductivity, but very fragile. As for the polymers have high strength and are easily shaped and adapted at the implantation site.

Key words: periodontal disease, biomaterials, composites, bone regeneration

INTRODUÇÃO

A doença periodontal tem ganhado grande destaque, tanto na medicina humana quanto na Medicina Veterinária, já que apresenta altos índices de prevalência (Nares, 2003; Roza, 2004). A afecção é a causa mais frequente da perda de dentes tanto em humanos quanto em animais, além de estar associada a várias doenças sistêmicas. Humanos com doença periodontal podem apresentar diabetes e doenças articulares e cardíacas. Em cães, desordens renais, hepáticas e cardíacas são comumente associadas à doença periodontal (Kim *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2008; Pavlica *et al.*, 2008). Assim, as técnicas já disponíveis para o tratamento da doença periodontal têm sido ampliadas na rotina, onde a única opção de tratamento se baseava na retirada mecânica da placa bacteriana e na profilaxia dental. Novas técnicas cirúrgicas, como as gengivoplastias foram adicionadas ao tratamento evitando a progressão da doença e a utilização de enxertos. Hoje novas formas de tratamento têm sido estudadas, como a utilização de biomateriais associados à técnica de regeneração tecidual guiada, sendo estes aos poucos incluídos na rotina clínico-cirúrgica. Assim, o objetivo desta revisão foi apresentar os aspectos relevantes da doença periodontal, seguido dos tratamentos atuais, bem como a utilização de biomateriais para a regeneração periodontal.

DOENÇA PERIODONTAL

O termo doença periodontal se refere à perda dos tecidos de sustentação dentária: osso alveolar, ligamento periodontal e cemento, em consequência da resposta imune e inflamatória que se desenvolve nos tecidos periodontais devido ao acúmulo da placa bacteriana sobre o dente (Harvey e Emily, 1993; Pihlstrom *et al.*, 2005). A doença periodontal crônica é a afecção inflamatória mais prevalente tanto em humanos, afetando aproximadamente 30% de humanos adultos (Nares, 2003) quanto em cães, dos quais 80% dos animais com mais de dois anos apresentam os sinais da doença (Niemic, 2008). Estudo realizado por Fernandes *et al.* (2012), ocorrido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, demonstrou que 88,67% dos animais avaliados na rotina hospitalar, durante um período de oito meses, apresentaram sinais clínicos da doença. Além disso, estudos epidemiológicos indicam aumento na prevalência da afecção com o aumento da idade (Kortegaard *et al.*, 2008, Fernandes, 2012) e maior ocorrência em cães de pequeno porte (Harvey *et al.*, 1994).

A doença periodontal é atualmente dividida em gengivite e periodontite, e pode ser classificada com base no avanço dos sinais e das lesões em quatro graus, conforme descreve Albuquerque (2012):

- Doença periodontal grau 1: caracterizada por progressivos sinais de gengivite, sendo o primeiro a presença de apenas pequena margem gengival eritematosa, passando pela gengivite moderada caracterizada por edema e sangramento ao toque, até a gengivite grave, onde a gengiva se apresenta extremamente edemaciada e com sangramento espontâneo no local;

- Doença periodontal grau 2: nesse estágio iniciam-se os sinais de periodontite, como formação de bolsas periodontais, recessão gengival e reabsorção de osso alveolar. Esse grau é caracterizado pela presença de sulcos gengivais e perda óssea de até 25%, sendo essa porcentagem quantificada pela radiografia da região afetada.

- Doença periodontal grau 3: caracterizada por perda óssea entre 25 – 50%, bolsas periodontais entre 5 e 8 mm, presença de recessão gengival e exposição de furca grau 2.

- Doença periodontal grau 4: caracterizada por perda óssea de mais de 50% do osso alveolar, bolsas periodontais maiores que 8 mm, presença de fistulas oronasais e exposição de furca grau 3.

A doença periodontal é a consequência da resposta inflamatória às bactérias residentes sobre o biofilme subgengival (Bartold *et al.*, 2010). Este é composto por agregados de bactéria e seus subprodutos, componentes salivares, restos teciduais bucais e células epiteliais e inflamatórias ocasionais (Roza, 2004; Gorrel, 2007), e é formado inicialmente por bactérias gram positivas imóveis e anaeróbias localizadas na região da coroa dentária (Marreta, 2001). O acúmulo de placa (biofilme) tem início em minutos sobre uma superfície dentária limpa (Gorrel, 2007). O estágio inicial da doença ocorre nos primeiros quatro dias, quando são liberados leucócitos polimorfonucleares e fatores vasoativos, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular (Ohlrich, 2009), levando assim aos primeiros sinais de inflamação vistos na doença periodontal grau 1.

Se nesse estágio não ocorrer o tratamento adequado da afecção, bactérias móveis, anaeróbias e gram negativas passam a se multiplicar, liberando citocinas inflamatórias, principalmente a Interleucina 1, a interleucina 6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Liu *et. al.*, 2010). Tais citocinas atuam diretamente sobre monócitos, fibroblastos e linfócitos e, sobre os dois últimos, ocorre liberação de um fator denominado RANKL, um mediador no processo de formação de novos osteoclastos. Tal mediador é inibido pela presença de uma proteína denominada osteoprotegerina (OPG). Dessa forma, quando a relação RANKL/OPG se torna alta, devido à estimulação das células supracitadas, o mediador RANKL se liga aos seus receptores presentes na superfície de pré-osteoclastos, que se diferenciam em osteoclastos, levando assim à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar (Cochran, 2008; Bartold, 2010, Kajiya *et. al.*, 2010).

O resultado final da doença é a perda dos dentes acometidos, causando dificuldades funcionais para alimentação e fístulas oronasais. Além disso, a afecção leva a predisposição de fraturas patológicas de mandíbula, esta última decorrente da fragilidade da mandíbula devido à reabsorção do osso alveolar durante a doença (Legendre, 2003).

Além dos grandes prejuízos para saúde oral, a importância da doença está também nas influências sistêmicas, sendo relacionada ou agravante para

diversas afecções como doenças cardiovasculares, diabetes, baixo peso ao nascimento em humanos, e diversas doenças cuja infecção pode ter origem em microrganismos da doença periodontal, como artrite, pneumonia, encefalite e glomerulonefrite (Harvey e Emily, 1994; Pihlstrom et al., 2005; Accarini e Godoy, 2006). Isso se deve a ocorrência de uma bacteremia transitória na periodontite extensiva durante a mastigação (Gorrel, 2007). Estudo realizado por Pavlica (2008) demonstrou que as chances de alterações cardíacas e renais ocorrerem, aumentam em 40%, a cada centímetro quadrado de tecido afetado pela doença.

O diagnóstico da doença periodontal é avaliado por meio de múltiplos parâmetros. É importante que cada peça dental seja avaliada individualmente para que a afecção seja classificada de forma correta e o tratamento adequado seja implantado. Os fatores que devem ser avaliados são: sondagem periodontal profunda, realizada por meio de sonda milimetrada, em pelo menos quatro pontos em torno da circunferência da peça dental; evidência de recessão gengival; evidência de exposição da furca em dentes multirradiculares e o grau de mobilidade de cada dente. Radiografias são indispensáveis para avaliar a extensão e o tipo de destruição do osso alveolar, além de permitir avaliar o cemento e o ligamento periodontal da peça dental em questão (Gorrel, 2007).

TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

O tratamento convencional de defeitos periodontais na Medicina Veterinária inclui apenas a retirada mecânica da placa bacteriana, sendo este processo dividido em quatro estágios. O primeiro consiste na curetagem supragengival, caracterizada pela remoção de cálculos, ou seja, a placa bacteriana já mineralizada, que estão acima da margem gengival, realizada por curetas odontológicas ou pela utilização do ultrassom odontológico. No segundo estágio é realizada a curetagem subgengival através de curetas odontológicas. O terceiro estágio é denominado aplainamento radicular e consiste no alisamento da raiz do dente utilizando-se curetas, removendo debris teciduais, facilitando assim a restauração dos tecidos afetados e dificultando a aderência de nova placa bacteriana. Por último ocorre o

polimento dental, com o objetivo de tornar a superfície dentária o mais lisa possível, já que o procedimento de raspagem cria uma superfície irregular, que facilita nova adesão bacteriana (Roza, 2004).

Porém nesse tratamento, células do epitélio juncional e fibroblastos do tecido conjuntivo gengival proliferam rapidamente, preenchendo a região do coágulo antes que as células desejáveis; osteoblastos e células progenitoras do ligamento periodontal possam fazê-lo (Macedo *et al.*, 2006; Roriz *et al.*, 2006). Sendo assim, a utilização do tratamento convencional na doença periodontal não é capaz de restabelecer as funções de sustentação do dente, amortecimento de impactos da mastigação, nutrição e atividade sensorial; necessárias para o bom funcionamento e manutenção da saúde oral. A formação do cemento, do ligamento periodontal e do osso alveolar não ocorre ou é mínima, limitada a uma pequena faixa na base do defeito (Cirelli *et al.*, 1997; Pihlstrom *et al.*, 2005; Roriz *et al.*, 2006).

Para o tratamento da doença periodontal como doença infecciosa, inúmeras estratégias terapêuticas para erradicação da infecção foram estudadas, incluindo antimicrobianos de efeito local e sistêmico. Tais estratégias devem ser associadas a profilaxia periodontal profissional, citada anteriormente, para que ocorra um resultado satisfatório no tratamento.

Antimicrobianos sistêmicos, ao serem utilizados, devem apresentar algumas características como facilidade de administração, boa absorção pela mucosa gastrointestinal, e principalmente, eficiência contra os patógenos encontrados no periodonto. Porém, é importante lembrar que a administração sistêmica de antibióticos não produz o mesmo efeito no periodonto comparado a outros sítios de infecção no organismo, devido a presença do biofilme acumulado no sulco gengival (Kraye *et al.*, 2010), já que este funciona como barreira de proteção contra antimicrobianos utilizados no tratamento da doença periodontal (Gorrel, 2007). Estudos indicaram que a administração de doxiciclina, a associação de metronidazol com amoxicilina e a associação de metronidazol com clindamicina, demonstraram efeito no tratamento da doença periodontal, diminuindo a acumulação de cálculo e diminuição na profundidade à sondagem (Bissada, 1998; Winkel *et al.*, 2001, Gomi *et al.*, 2007).

Além da utilização da antibioticoterapia sistêmica para o tratamento da doença periodontal, agentes químicos podem ser utilizados como método adjuvante. Porém, tais agentes apresentam valor limitado, pois não penetram

satisfatoriamente no sulco gengival, mas apresentam benefícios quando utilizados para o controle da inflamação gengival e durante períodos em que a higiene bucal for interrompida (Ciancio, 1989). Por outro lado, é reconhecido que produtos utilizados na saúde oral, durante longos períodos, como o gluconato de clorexidine podem causar dano à boca, com efeitos abrasivos e erosivos sobre os dentes (Addy, 2008).

Além das alternativas clínicas para correção da doença periodontal, várias técnicas cirúrgicas foram desenvolvidas para a resolução das consequências da afecção, dentre elas os tratamentos da recessão gengival, a utilização de enxertos ósseos e a utilização de biomateriais, associados ou não à técnica de regeneração tecidual guiada.

A recessão gengival é caracterizada pelo descolamento da margem apical da gengiva da junção cimento-esmalte, podendo ser generalizada ou localizada (Smith, 1997), causando, dentre outros efeitos, hipersensibilidade dentária (Kassab *et al.*, 2010). Em humanos, vários tratamentos são indicados como a utilização de enxertos gengivais e mucogengivais para o recobrimento das raízes afetadas. Tais enxertos podem não requerer um sitio doador, como os enxertos pediculados, que contêm seu próprio suprimento sanguíneo, ou podem ser utilizados enxertos autógenos livres (Wennstrom, 1996). Para que ocorram melhores resultados, as duas técnicas podem ser associadas (Kassab, 2010).

Enxertos ósseos são usualmente utilizados para promover formação de novo osso e regeneração periodontal. Tais enxertos oferecem uma ampla rede estrutural para o desenvolvimento do coágulo, a maturação e o remodelamento do osso formado. Os materiais utilizados devem ser biocompatíveis e osteocondutores. Os autoenxertos devem conter propriedades que suportem a osteogênese, como a presença de medula óssea. Os enxertos podem ser organizados de acordo com sua fonte, sendo classificados em autoenxertos quando a amostra retirada é aplicada no mesmo animal; aloenxertos em que a amostra retirada é implantada em animal da mesma espécie; xenoenxertos onde a amostra retirada de uma espécie é implantada em espécie diferente; e enxertos aloplásticos, ou biomateriais, nos quais são utilizados materiais sintéticos, biocompatíveis e inorgânicos (Reynolds, 2010).

REGENERACAO TECIDUAL GUIADA

A regeneração tecidual guiada (RTG) tem o princípio de prevenir a invasão de tecidos não funcionais na região afetada, a partir da utilização de membranas, coordenando assim essa interação dos tipos celulares diferentes no processo de reparação (Fujihara *et al.*, 2004). Tais membranas têm a função de proteger o defeito periodontal da invasão pelas células de rápida multiplicação provenientes do epitélio juncional e tecido conjuntivo gengival, funcionando como uma barreira, permitindo que osteoblastos e células progenitoras do ligamento periodontal se proliferem (Macedo *et al.*, 2006; Roriz *et al.*, 2006). As membranas reabsorvíveis são as mais indicadas no tratamento, já que não requerem uma segunda intervenção cirúrgica para sua retirada, sendo assim mais confortáveis e econômicas (Andrade *et al.*, 2007).

Scantlebury (1993) descreveu os requisitos necessários a uma membrana ideal: 1) integração tecidual; 2) oclusividade celular; 3) fácil manuseio clínico; 4) manter um espaço suficiente; 5) biocompatibilidade. Estudos recentes têm demonstrado a necessidade de funções que vão além destas, além da barreira física para proteção do defeito, devendo-se adicionar a essas cinco características a osteocondução e a reabsorção (Amano *et al.*, 2004; Owen *et al.*, 2005; Christgau *et al.*, 2007).

BIOMATERIAIS

O principal objetivo da terapia periodontal hoje é a completa regeneração dos tecidos perdidos no curso da doença. Para isso são utilizados biomateriais, cuja composição, a topografia de superfície, e a morfologia são as características responsáveis pela osteocondução, que permite a formação de novo osso ao longo do biomaterial (Laurencin *et al.*, 2006).

Uma variedade de materiais biocompatíveis, não reabsorvíveis ou absorvíveis, são utilizados como membranas na técnica de regeneração tecidual guiada (Christgau *et al.*, 2007).

Polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados no campo da bioengenharia (Rezwan *et al.*, 2006), sendo a policaprolactona, um dos mais estudados. A policaprolactona é considerada um polímero biocompatível com um baixo ponto de fusão, em torno de 60°C. Este biomaterial tem sido explorado nos últimos anos como dispositivos médicos, em modelos para regeneração tecidual e sistemas de distribuição de drogas (Pok, 2010).

Na preparação da policaprolactona, várias técnicas são citadas na literatura, como evaporação de solvente, dissolução em gel e utilização de gás em alta pressão, sendo formados nas diferentes técnicas e diferentes graus de microporosidade (Tang *et al.*, 2004).

Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas é a diluição da PCL em clorofórmio. Tal técnica produz uma membrana de superfície homogênea e de alta resistência. Porém, a membrana produzida é altamente hidrofóbica e apresenta baixa adesão celular (Averous *et al.*, 2000, Nakagawa *et al.*, 2006;). Sendo assim, alguns estudos foram realizados desenvolvendo novas formas de preparação da PCL, com o intuito de melhorar as características físicas e químicas das membranas já existentes. Em estudo realizado por Pok (2010) foi testada a utilização de ácido acético como solvente, apresentando melhores resultados quanto à adesão celular e quanto ao grau de hidrofobicidade do material.

Uma das muitas vantagens da utilização da PCL como biomaterial é a sua forma de degradação no tecido, sendo esta realizada por hidrólise. Porém, as membranas de PCL apresentam baixa atividade bioregulatória, hidrofobicidade, e apresentam carga neutra (Sarasam, 2005). Sendo assim, é importante sua associação com cerâmicas, formando um compósito com melhores características.

A hidroxiapatita é o principal constituinte da parte mineral da matriz óssea e sua análoga sintética tem sido amplamente utilizada no preenchimento de defeitos ósseos, auxiliando a regeneração óssea em locais, como seios maxilares, diáfises de ossos longos e osso alveolar (Borges *et al.*, 2000; Woodard *et al.*, 2007). Em estudos realizados por Martinez *et al.* (2009) e Santos (2012) nos quais foram utilizados compósitos formados por hidroxiapatita e lignina, foi observado que os animais tratados apresentaram regeneração óssea mais precoce comparado ao grupo controle, além de apresentarem osso trabecular e compacto no canal medular ao final da avaliação. Vital *et al.* (2006), avaliaram a implantação de hidroxiapatita em ulna de coelhos e observaram que até os 120 dias do pós-operatório, os animais do grupo tratado apresentaram melhor regeneração óssea do que aqueles presentes no grupo controle. Silva *et al.* (2012) também observaram regeneração óssea em menor tempo comparado ao grupo controle, em tratamento realizado em osso alveolar de felinos, assim como Duarte *et al.*

(2006) em cães, onde observou-se crescimento ósseo e vascular no interior dos poros de hidroxiapatita. Esta foi integrada ao osso alveolar por meio de formação direta de novo osso lamelar, à medida que foi sendo degradada.

A hidroxiapatita sintética é um material biocompatível, bioativo e osteocondutor, ou seja, sua estrutura porosa funciona como suporte para a migração e deposição de células osteogênicas, auxiliando a formação de novo osso (Tampieri *et al.*, 2001; Woodard *et al.*, 2007). Sendo bioativo, o material quando implantado não é isolado por tecido conjuntivo fibroso formando, portanto, uma ligação físico-química com o tecido ósseo (Borges *et al.*, 2000). Acredita-se que o tamanho ideal dos poros para permitir a migração celular esteja entre 150 e 500 μm (Tampieri *et al.*, 2001). A HA pode ser reabsorvível, processo que envolve a ação de osteoclastos, as células responsáveis pela degradação natural do tecido ósseo (Borges *et al.*, 2000).

A hidroxiapatita é rígida, com baixa elasticidade, o que a torna frágil, limitando assim sua utilização em locais que requeiram sustentação de peso (Carlo *et al.*, 2007). Portanto para minimizar os problemas gerados pelas deficientes propriedades mecânicas da HA, promovendo uma melhor coesão entre as partículas, uma das abordagens mais estudadas é sua associação aos polímeros, como feito em estudo realizado por Reis *et al.* (2011) onde foram testadas membranas rígidas, dentre elas uma foi composta por ácido polilático-co-glicólico (PGLA) e fosfato de cálcio, apresentando como resultados uma ótima regeneração periodontal, com formação de cemento, osso e ligamento periodontal com fibras de Sharpey inseridas. Além disso, as membranas utilizadas não foram capazes de colapsar os defeitos realizados, mantendo assim o espaço, sendo capazes de reter o coágulo formado sobre o defeito, condição importante para a movimentação de osteoblastos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A perda dos tecidos de sustentação da peça dental, decorrentes do agravamento da doença periodontal, necessitam de tratamento específico para que não apenas tecido conjuntivo se estabeleça no local afetado, mas sim os tecidos específicos de sustentação: cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. Desse modo, o estudo de diferentes tratamentos para estimular e acelerar a regeneração óssea tem se intensificado nas últimas décadas. A

necessidade de novos materiais mais acessíveis e novas técnicas para utilização na odontologia, tanto humana quanto veterinária, é evidente. No entanto, o fato de grande parte dos biomateriais ser importada torna, muitas vezes, inviável sua utilização em pacientes de baixa renda.

A utilização de compósitos formados pela associação de cerâmicas e polímeros, de tecnologia inteiramente nacional, tem se apresentado como alternativa promissora no tratamento da doença periodontal, pela técnica de regeneração tecidual guiada, já que tais biomateriais apresentam características físico-químicas que se complementam. No entanto, novos estudos utilizando-se membranas multifuncionais são necessários, buscando-se, pela engenharia tecidual, o desenvolvimento de novos produtos que permitam ótima regeneração periodontal, associando a biocompatibilidade e a osteocondutividade à moldabilidade de diferentes materiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCARINI,R.; GODOY, M.F. Doença periodontal como potencial fator de risco para síndromes coronarianas agudas. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v.87, p. 592-596, 2006.
- ADDY, M. Oral hygiene products: potential for harm to oral and systemic health?. Periodotology 2000, v.48, p.54-65, 2008.
- ALBUQUERQUE,C. Canine priodontits: The dog as na important model for periodontal disease. The Veterinary Journal, v.191, p.299-305, 2012.
- AMANO,Y.,OTA,M., SEKIGUCHI, K., SHIBUKAWA, Y., YAMADA, S. Evaluation of a poly-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics, v.97, p.155-163, 2004.
- ANDRADE, P.F. Acellular dermal matrix as a membrane for guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation lesions: a histometric and clinical study in dogs. J Periodontol, v.78, p.1288-1299, 2007.
- AVEROUS, L, MORO, L. DOLE, FRINGANT, C. Properties of thermoplastic blends: starch–polycaprolactone. Polymer, v. 41 p. 4157–4167, 2000

- BARTOLD, P.M. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology* 200, v.53, p.55-69, 2010.
- BISSADA, N.F. Clinical evaluation of systemic doxycycline and ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis. *J Perodontol*, v.69, p.772-776, 1998.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NÓBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.52, n.6, 616-620, 2000
- CARLO, E.C. BORGES, A.P.B., FOFANO, G., FONTES, E.B., CARVALHO, T.B., SENA, M.P.T. Técnica da regeneração tecidual guiada (RTG) na reparação da mandíbula de cão. *Revista Ceres*, v.53, n.307, p.350-356, 2007
- CIANCIO, S. Non surgical periodontal treatment. *Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics*, 1989
- CIRELLI, J.A, MARCANTONIO E JR, ADRIANA, R., MARCANTONIO, C., LIA, R.C., GOISSIS, G., ROSSA, C. JR. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials*, v.18, p.1227-1234, 1997.
- CHRISTGAU, M., CAFFESSE, R.G., SCHMALZ, G., D'SOUZA, R.N. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology*, v.34, p.691-708, 2007.
- COCHRAN, D.L. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Perodontol*, v. 79, p. 1569-1576, 2008.
- DUARTE, T.S. ; BORGES, A.P.B. ; LAVOR, M.S.L. ; FILGUEIRAS, R. ; TSIOMIS, A.C. ; OLIVEIRA, F.L. ; PONTES, K.C.S. . Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, UFMG - EV, v. 58, p. 849-853, 2006.
- FERNANDES, N.A., BORGES, A.P.B., REIS, E.C.C.R., SEPULVEDA, R.V., PONTES, K.C.S. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners'

- level of awareness – a prospective clinical trial. *Revista Ceres*, v.59, p.446-451, 2012.
- FUJIHARA, K.; KOTAKI,M.; RAMAKRISHNA,S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*, v.26, p.4139-4147, 2004.
- GOMI, K. Effects of full-mounth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *J Periodontol*, v.78, p.422-429, 2007.
- GORREL,C. Afecção inflamatória bucal e periodonal; In: Slatter, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*.São Paulo: Manole, p. 2652-2662, 2007
- HARVEY,C.E.; EMILY,P.P. *Small Animal Dentistry*. Saint Louis, Mosby. 1994. 413 pp.
- KAJIYA, M.; GIRO, G.; TAUBMAN, M.A.; HAN, X.; MAYER, M.P.A.; KAWAI, T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal of Oral Microbiology*, v.2, p. 5532, 2010.
- KASSAB, M.M. Treatment of gingival recession. *The Dental Clinics of North America*, v.54, p.129-140, 2010.
- KIM, D.M., RAMONI, M.F., NEVINS, M., FIORELLINI, J.P., The gene expression profile in refractory periodontitis patients. *Journal of Periodontology* v.77, p.1043–1050, 2006
- KRAYER, J.W. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal disease. *The Dental Clinics of North America*, v.54, p.13-33, 2010.
- KORTEGAARD, H.E., ERIKSEN,T., BAEUM,V. Periodontal disease in research Beagle dogs – An epidemiological study. *Journal of Small Animal Practice*, v.49, p.610-616, 2008.
- KUO, L.-C., POLSON, A.M., KANG, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*, v.122, p.417–433, 2008.
- LAURENCIN, C. Bone grafts substitutes. *Expert Rev Med Devices*, v.3, p.49, 2006.

- LEGENDRE, L. Intraoral acrylic splints for maxillofacial fracture repair. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.20, p.70-78, 2003.
- LIU, Y.C., LERNER, U.H., TENG, Y.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000; v.52, p.163-206. 2010
- MACEDO, T.C.N.; CRUZ, S.S.; SOLEDADE, K.R.; TRINDADE, S.C.; SARMENTO, V.A. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. *Odonto Ciência*, v.21, p.77-81, 2006.
- MARRETA, S.M. Recognition and treatment of periodontal disease. In: THE ATLANTIC COAST VETERINARY CONFERENCE, 2001, New Jersey, USA.
- MARTINEZ, M.M.M, BORGES, A.P.B., VARGAS, M. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita – lignina implantado en tibia de conejos. *Rev. MVZ Cordoba*, v.14, p.1624-1632, 2009.
- NARES, S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontology* 2000, v.32, p.36-49, 2003.
- NAKAGAWA M, TERAOKA F, FUJIMOTO S, HAMADA Y, KIBAYASHI H, TAKAHASHI J. Improvement of cell adhesion on poly(L-lactide) by atmospheric plasma treatment. *J Biomed Mater Res Part A*, v.77, p.112-118, 2006.
- NIEMIEC, B.A. Periodontal Disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 23, p.72-80, 2008.
- OHLRICH, E.J. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, v.4, p.2-10, 2009.
- OWEN, G.R.H. et al. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials*, v.26, p.7447-7456, 2005.
- PAVLICA, Z., PETELIN, M., JUNTES, P., ERZEN, D., CROSSLEY, D.A., SKALERIC, U. Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.25, p.97–105, 2008
- PIHLSTROM, B.; MICHALOWICZ, B.; JOHNSON, N. Periodontal Diseases. *Lancet*, v.366, p.1809-1820, 2005.

- POK, S.W. WALLACE, K.N. MADIHALLY, S.V. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. *Acta Biomaterialia*, v.6, p.1061–1068, 2010.
- REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B; ARAUJO, M.V.F.; MENDES, V.C.; GUAN,L.; DAVIES,J.E. Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct. *Biomaterials*, v.32, p.9244-9253, 2011
- REYNOLDS, M.A. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *The Dental Clinics of North America*, v.54, p.55-71, 2010.
- REZWAN K, CHEN QZ, BLAKER JJ, BOCCACCINI AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; v. 27, p. 3413-3431
- RORIZ, V.M., SOUZA, S.L., TABA, M., PALIOTO,D.B. Treatment of class III furcation defects with expanded polytetrafluoroethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology*, v.77, p.490-497, 2006.
- ROZA, M.R. Periodontia; In: Roza, M.R. *Odontologia em pequenos animais*. Rio de Janeiro: L.F Livros, 2004, p. 119-135.
- SANTOS, L.C. MARTINEZ, M.M.M. Compósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães. 2012. 60f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SARASAM, A. MADIHALLY, S.V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, v. 26 p. 5500–5508, 2005.
- SCANTLEBURY,T.V. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*, v.64, p. 1129-1137, 1993.
- SILVA, E.C.,BORGES, A.P.B., NEVES, C.D., CARLO, E.C.,BARROS, R.E., HAGE, M.C.F.N.S., SOUZA, R.L., SOUZA, M.A., BARUD,H.S., BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. *Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zootecnia*, v.64, p. 873-880, 2012.

- SMITH, R.G. Gingival recession. Reappraisal of an enigmatic condition and a new index for monitoring. *J Clin Periodontology*, v.24, p. 201-205, 1997.
- TAMPIERI, A.; CELLOTI, G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO, A.; FRANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*, v. 22, n.11, p.1365-1370, 2001.
- TANG, Z.G.; BLACK, R.A.; CURRAN, J.M.; HUNT, J.A.; RHODES, N.P.; WILLIAMS, D.F. Surface properties and biocompatibility of solvent-cast polycaprolactone films. *Biomaterials*, v.25, p. 4741-4748, 2004.
- VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq. Brasil. de Med. Vet. e Zoo*, v. 58, p. 175-183, 2006.
- WENNSTROM, J.L. Increased gingival dimensions. A significant factor for successful outcome of root coverage procedures. A 2 year prospective clinical study. *J Clinical of Periodontology*, v. 23, p. 770-777, 1996.
- WINKEL, E.G. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, v.28, p. 296-305, 2001.
- WOODARD, J.R.; HILLDORE, A.J.; LAN, S.K. PARK, C.J.; MORGAN, A.W.; EURELL, A.A.C.; CLARK, S.C.; WHELLWE, M.B.; JAMISON, R.D; JOHNSON, A.J.W. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, v.28, p.45-54, 2007.

CAPITULO II

Caracterização *in vitro* de membranas compostas por hidroxiapatita e policaprolactona para regeneração periodontal

Martins, L.M.A. *et al.*

RESUMO

A associação de cerâmicas e polímeros vem sendo amplamente estudada, destacando-se como bons substitutos ósseos já que cumprem vários requisitos desejáveis para a sua utilização *in vivo*. A hidroxiapatita é o principal constituinte da parte mineral da matriz óssea, sendo bioativa, biocompatível e osteocondutor, no entanto, é um biomaterial extremamente frágil. A policaprolactona é um polímero biodegradável, porém apresenta baixa taxa de adesão celular. Contudo, por ser moldável e mais deformável, ou seja, apresenta módulo de elasticidade mais baixo, torna-se ótima opção para sua associação à hidroxiapatita. Nesse contexto objetivou-se analisar duas membranas compostas por hidroxiapatita (HAP) e diferentes concentrações de policaprolactona (PCL), sendo a membrana 1 formada por 75% de HAP para 25% de PCL e a membrana 2 formada por 60% de HAP para 40% de PCL. Foram avaliados o grau de cristalinidade de cada membrana através da difração de raio-x, bem como suas características de superfície através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ambas as membranas apresentaram alto grau de cristalinidade, entretanto os picos relacionados à policaprolactona só foram identificados na membrana 60HAP/40PCL. A MEV revelou superfícies complexas na membrana 75HAP/25PCL e pouco complexas na membrana 60HAP/40PCL. No entanto, cristais de hidroxiapatita foram visualizados, o que ajuda a melhorar a complexidade da topografia. Foi observada a presença de pequenos poros com diâmetro médio de 15,7 ($\pm 8,1$) μm na membrana 75HAP/25PCL e a membrana 60HAP/40PCL apresentou uma média de 10,4 ($\pm 6,3$) μm sem, entretanto, evidenciar a presença de macroporos nem a interconexão entre os poros existentes em ambas as amostras.

Palavras chave: biomateriais, hidroxiapatita, policaprolactona, topografia de superfície, difração de raio-x

ABSTRACT

The combination of ceramics and polymers has been widely studied, standing out as bone substitutes fulfill, presenting several desirable requirements for their use in vivo. Hydroxyapatite is the main constituent of the mineral part of bone matrix, and bioactive, biocompatible and osteoconductive, however, is extremely fragile. The Polycaprolactone is a biodegradable polymer, but has a low rate of cell adhesion. However, being moldable and tougher, it becomes a great choice for its association with hydroxyapatite. In this context we aimed to analyze two membranes composed of hydroxyapatite and polycaprolactone in different concentrations. The first membrane is being formed by 90 grams of hydroxyapatite associated with 30 grams of polycaprolactone (75HAP/25PCL) and the membrane 2 formed by 90 g of hydroxyapatite associated 60 grams of polycaprolactone (60HAP/40PCL). We evaluated the degree of crystallinity of each membrane through the x-ray diffraction as well as their surface characteristics by scanning electron microscopy (SEM). Both membranes show high degree of crystallinity, however polycaprolactone related peaks are identified only in membrane 60HAP/40PCL. SEM revealed the complex surfaces of membrane 75HAP/25PCL and less complex at 60HAP/40PCL membrane. However, the hydroxyapatite crystals were visualized, which helps improve the complexity of the topography. We observed the presence of small pores with an average diameter of $15.7 (\pm 8.1) \mu\text{m}$ in the membrane 75HAP/25PCL, and 60HAP/40PCL membrane an average of $10.4 (\pm 6.3) \mu\text{m}$ without, however, highlight the presence of macropores or interconnection between existing pores. Therefore, it is possible that despite the favorable complex surface tissue regeneration, the absence of macropores and the lack of evidence of interconnections between them to be a factor to osteoconduction and undesirable clinical use of membranes evaluated.

Keywords: biomaterials, hydroxyapatite, polycaprolactone, surface topography, x-ray diffraction

INTRODUÇÃO

A bioengenharia associada à técnica de regeneração tecidual guiada, tem sido amplamente utilizada com os objetivos específicos de reparação e regeneração de órgãos e tecidos perdidos devido a alguma injúria (Nerem, 1991). O ideal para que tais objetivos sejam alcançados, é a utilização de biomateriais, naturais ou sintéticos, utilizados em forma de membranas, que permitam a interação celular com o biomaterial e promovam suporte estrutural para formação de novo tecido (Karageorgiou e Kaplan, 2005).

Porém, tais membranas necessitam apresentar características específicas, o que torna a busca por novos biomateriais um desafio. Primeiro, é necessário que o biomaterial seja biocompatível ao organismo, ou seja, o material não pode estimular resposta inflamatória no paciente, não demonstrando imunogenicidade ou citotoxicidade (Scantlebury, 1993; Chaikof *et al.*, 2002,).

Além disso, é necessário que a membrana utilizada mantenha o espaço do defeito ao longo do tempo, apresente oclusividade celular e seja de fácil manuseio clínico (Scantlebury, 1993). Estudos recentes têm demonstrado a necessidade de funções que vão além da barreira física para proteção do defeito, devendo-se adicionar a essas características a osteocondução e a absorção (Amano *et al.*, 2004; Owen *et al.*, 2005; Christgau *et al.*, 2007), sendo esta última característica de extrema importância já que não requer uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do biomaterial, sendo assim mais confortável e econômica no ponto de vista geral (Andrade, 2007).

Assim, para preencher todas as características desejáveis em um biomaterial, compósitos têm sido desenvolvidos, combinando as vantagens dos polímeros e das cerâmicas, demonstrando ser uma escolha promissora, particularmente para a reconstrução óssea (Rezwan *et al.*, 2006).

A policaprolactona (PCL), de fórmula $-(CH_2)_5-COO]_n-$, é um poliéster alifático, biodegradável, com ponto de fusão entre 59-64 °C (Labet, e Thielemans, 2009; Pok *et al.*, 2010). Uma das muitas vantagens da utilização da PCL como biomaterial é a sua forma de degradação no tecido, sendo esta realizada por hidrólise. Porém, as membranas de PCL apresentam baixa

atividade bioregulatória, hidrofobicidade, apresenta carga neutra e é suscetível à degradação realizada por bactérias (Sarasam, 2005).

A hidroxiapatita (HA) é o principal constituinte da parte mineral da matriz óssea e sua análoga sintética tem sido amplamente utilizada no preenchimento de defeitos ósseos, auxiliando a regeneração óssea em locais, como seios maxilares, diáfises de ossos longos e osso alveolar (Borges *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2006; Woodard *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Sendo um material biocompatível, bioativo, e osteocondutor, apresenta estrutura porosa, proporcionando suporte para a migração e deposição de células osteogênicas, auxiliando na formação de osso novo (Tampieri *et al.*, 2001; Woodard *et al.*, 2007). Acredita-se que o tamanho ideal dos poros para permitir a migração celular esteja entre 150 e 500 µm (Tampieri *et al.*, 2001, Karageorgiou e Kaplan, 2005). Tal biomaterial é rígido, com baixa elasticidade, o que o torna frágil, limitando assim sua utilização em locais que requeiram sustentação de peso (Carlo *et al.*, 2007). Portanto, para minimizar os problemas gerados pelas deficientes propriedades mecânicas da HA, promovendo melhor coesão entre as partículas, uma das abordagens mais estudadas é a sua associação com polímeros.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar dois tipos de membrana compostas por hidroxiapatita e diferentes concentrações de policaprolactona, buscando caracteriza-las quanto a sua cristalinidade pela utilização da difração de raios-X e quanto à topografia de superfície interna, avaliada pela microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma será possível escolher a melhor opção para o uso da técnica de regeneração tecidual guiada, buscando-se o desenvolvimento de uma membrana rígida o suficiente para manter sua forma e, conseqüentemente, o espaço do defeito e com topografia desejável para promover melhor adesão celular.

MATERIAL E MÉTODOS

As membranas avaliadas foram desenvolvidas pelo JHS Laboratório Químico, em Belo Horizonte. A primeira foi composta por 75% de HAP (HAP-91® Plus) associadas a 25% de PCL(75HA/25PCL) e a segunda composta por 60% de hidroxiapatita (HAP-91® Plus) associadas a 40% de PCL

(60HAP/40PCL). O método de fabricação de cada membrana não pode ser informado, pois as mesmas se encontram em processo de patente.

A cristalinidade das membranas foi analisada por difração de raios X. As análises foram realizadas em três amostras de cada membrana em difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , λ = 1,79026 Å), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com diferença de potencial de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo passo a passo em intervalo de 15 a 50° 2 θ com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo.

Para análise morfológica, foi utilizado inicialmente um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca LEO 1430VP, a voltagens de 10 ou 15 kV. Para tal, as superfícies foram cobertas por uma camada de 20 nm de ouro, utilizando um sistema de deposição “sputtering balzers” (Electron Microscopy Sciences, modelo 550x). Foram obtidos dados qualitativos das fotografias, analisando-se: a) topografia das superfícies; b) distribuição e formato dos cristais de hidroxiapatita expostos na superfície das amostras, se existentes; c) presença ou não de poros. Foram também avaliados os diâmetros médios dos poros, medindo-os a partir do programa ImageJ 1.47v, onde um gradeado foi colocado sobre as imagens analisadas. Os poros presentes nas colunas pares foram contabilizados, e foram obtidos posteriormente a média e o desvio padrão. Foi possível comparar assim, a diferença no tamanho dos poros entre as membranas e analisar a adequação desses tamanhos ao desenvolvimento do tecido ósseo com base na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O difratograma de cada membranas encontra-se representado na figura 1 (membrana 75HAP/25PCL) e na figura 2 (membrana 60HAP/40PCL). Na membrana 75HAP/25PCL foram identificados picos de hidroxiapatita, condizente com seu respectivo CPDS CARD (MYNCRIST, 2013). No entanto, em tal membrana os picos relativos à presença de policaprolactona não foram identificados. Já na membrana dois, tanto os picos relacionados á

hidroxiapatita quanto à policaprolactona foram identificados de acordo com a literatura (Baji *et al.*, 2006, Quian *et al.*, 2009). Diferenças nas formas de processamento de diferentes biomateriais podem gerar alterações em seus respectivos difratogramas, assim como visto por Senedese (2011), onde materiais compostos por policaprolactona sofreram processamento térmico e apresentaram alterações na estrutura cristalina do material. A diferença também pode ser explicada pela proporção de policaprolactona presente em cada membrana. A menor proporção associada ao processamento podem levar a uma menor cristalinização do compósito, explicando assim os resultados apresentados no difratograma da membrana 2.

Mesmo apresentando diferenças visíveis, ambas as membranas apresentaram alto grau de cristalinidade. Essa característica é de grande importância, considerando-se que ela influencia o desempenho do material *in vivo* por afetar tanto a sua absorção quanto as suas propriedades mecânicas. A absorção do biomaterial é mais lenta em materiais com alto grau de cristalinidade (Reis *et al.*, 2012). Propriedades como resistência e rigidez geralmente são diretamente proporcionais ao grau de cristalinidade do biomaterial, no entanto a transparência e a solubilidade tendem a diminuir com tal característica (Oréfice *et al.* 2006).

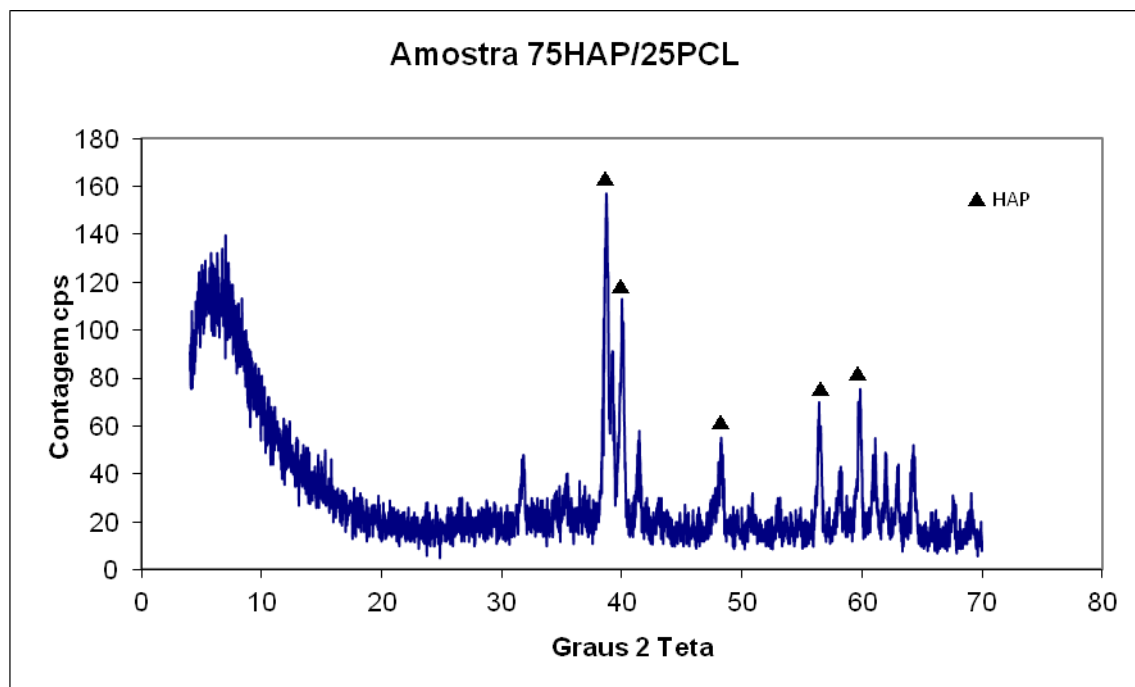


Figura 1: Difratoograma correspondente à membrana (75HAP/25PCL)

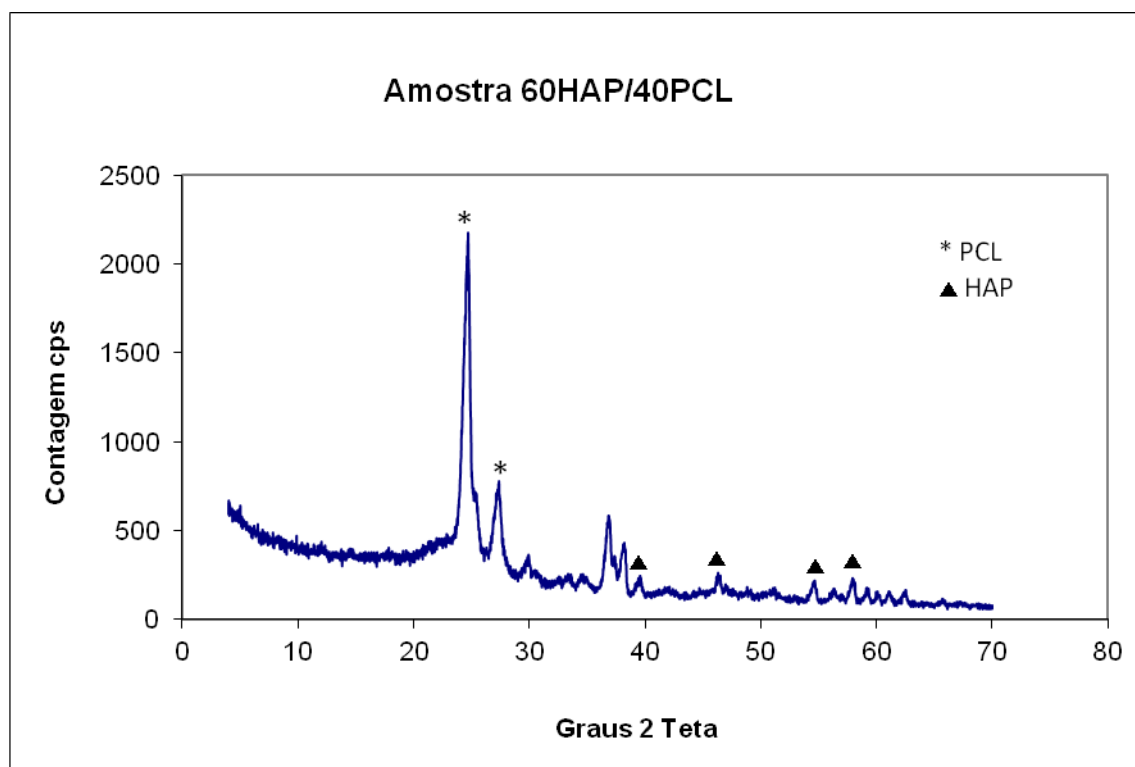


Figura 2: Difratoograma correspondente à membrana 2 (60HAP/40PCL)

A caracterização das membranas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura realizada nas superfícies intactas evidenciou grânulos de

hidroxiapatita aderidos na superfície da membrana, caracterizando assim uma superfície complexa de membrana em ambas as amostras. No entanto, na membrana 60HAP/40PCL, os cristais estão distribuídos menos uniformemente quando comparados a membrana 75HAP/25PCL (Figura 4). A presença de tais cristais, em meio à matriz lisa de policaprolactona, contribui para aumentar a complexidade da superfície da membrana, assim como visto por Reis *et al.* (2012) em análise de compósito formado por hidroxiapatita e polihidroxibutirato. Além disso, os poros encontrados em ambas as membranas, aparentemente não são interconectados (Figura 3). Baji *et al.*, (2006), em estudo de caracterização de membrana composta por hidroxiapatita reforçada por policaprolactona, apresentou resultados físicos semelhantes aos encontrados nesse experimento. A complexidade da superfície da membrana é de grande importância, pois permite maior aderência celular, sendo uma vantagem quando o tamanho dos poros do biomaterial não apresenta o tamanho ideal para que ocorra crescimento tecidual no seu interior.

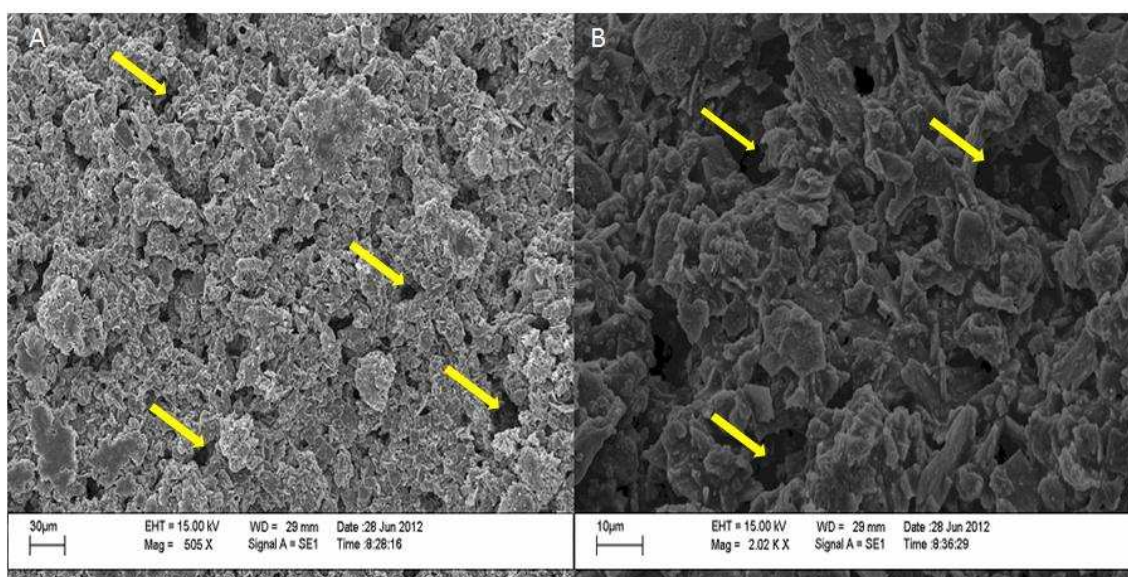


Figura 3: Micrografia da amostra 75HAP/25PCL obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura. (A) aumento de 500x e (B) aumento de 2000x. Observar a presença de pequenos poros (setas) sobre a superfície do biomaterial, aparentemente não interconectados e topografia de superfície complexa.

Em estudo comparativo na fabricação de membranas de policaprolactona por diferentes técnicas, Pok *et al.*, (2010) apresentaram resultados semelhantes, onde não foi observado presença de poros e superfície de topografia pouco complexa. Tais resultados diferem daquele observado por Shokrollahi (2010), onde membranas compostas por hidroxiapatita e policaprolactona, associados a polímeros supramoleculares,

apresentaram superfície de membrana extremamente complexa, com presença de inúmeros poros.

Em maior aumento (Figura 4b), é possível observar também sobre a membrana 60HAP/40PCL a presença de pequenos cristais de hidroxiapatita. A presença de tais cristais, em meio à matriz lisa de policaprolactona, contribui para aumentar a complexidade da superfície da membrana, assim como visto por Reis *et al.*(2012) em análise de compósito formado por hidroxiapatita e polihidroxibutirato.

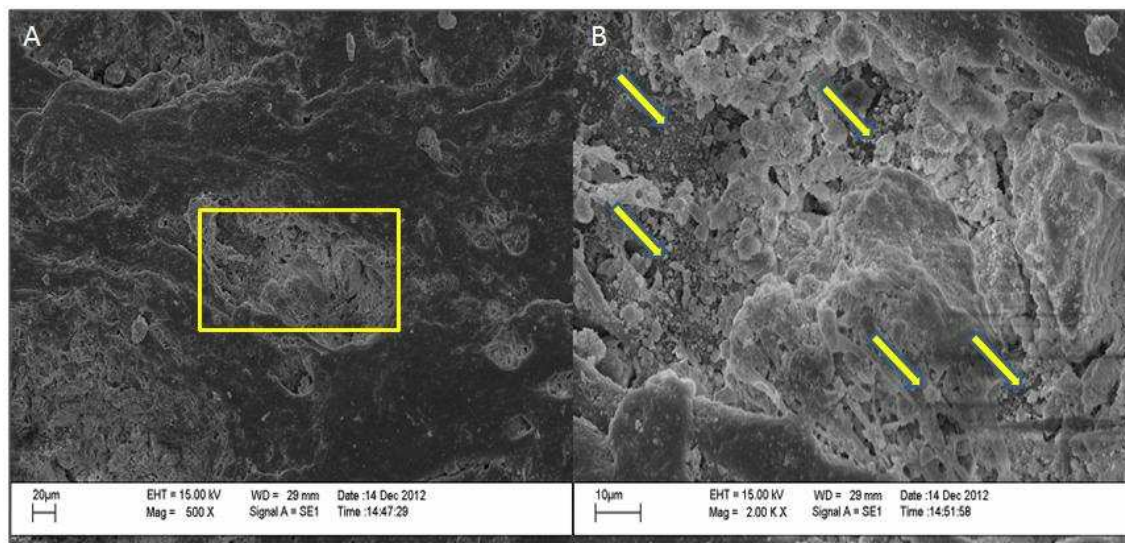


Figura 4: Micrografia da amostra 60HAP/40PCL obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura.(A) Presença de cristais de hidroxiapatita sobre a matriz lisa de PCL (retângulo amarelo) em aumento de 500x e (B) aumento de 2000x, detalhe da área demarcada em A. Observar a complexidade dos grânulos de HAP (setas preenchidas) sobre a superfície do polímero.

Ainda, com o auxílio do programa denominado ImageJ Launcher, foram medidos os poros em ambas as membranas. A membrana 75HAP/25PCL apresentou poros com diâmetro médio de 15,7 ($\pm 8,1$) μm e a membrana 60HAP/40PCL uma média de 10,4 ($\pm 6,3$) μm ao longo da superfície do biomaterial, não sendo observada a presença de macroporos ou mesmo a conexão entre os já existentes.

A presença de poros é essencial para a formação de novo osso, pois os mesmos permitem a migração e a proliferação de osteoblastos e células mesenquimais. Permitem ainda a formação de novos vasos sanguíneos, tornando o processo de reparação mais dinâmico (Kuboki, 1998). Além disso, uma superfície porosa melhora consideravelmente a união entre a superfície do implante e do osso, proporcionando grande estabilidade mecânica (Story, 1998; Órefice, 2006).

Além da importância da presença de poros no biomaterial, o diâmetro dos mesmos também deve ser considerado. Hulbert *et. al.* (1970) definiram primariamente que o tamanho crítico dos poros em membrana de hidroxiapatita deveria ser de 100 μm para que ocorra formação de novo osso. Já estudos mais recentes demonstram que ocorre neovascularização e presença de novo osso lamelar em materiais com porosidade acima de 300 μm (Tsuruga *et. al.*, 1997; Gotz *et. al.*, 2004). No caso de polímeros, a porosidade deve apresentar valores elevados de vazio e com diâmetro entre os poros entre 100 μm e 200 μm , além de elevada conectividade entre os poros (Órefice, 2006). Assim, os resultados obtidos em relação ao diâmetro dos poros em ambas as membranas, foram inferiores aos descritos pela literatura, sendo, possivelmente, muito pequenos para acomodar as células juntamente com o sistema de irrigação sanguínea, sendo esta uma característica não desejável. No entanto, esse efeito pode ser suprido pelo fato das membranas apresentarem microestrutura complexa de superfície, predispondo a uma maior adesão celular e do coágulo.

CONCLUSÕES

As membranas avaliadas apresentaram elevada cristalinidade, no entanto apenas a membrana de composição 75HAP/25PCL apresentou superfície de membrana complexa, sendo esta uma característica positiva para sua utilização *in vivo*.

A membrana 75HAP/25PCL apresentou diâmetro médio dos poros de 15,7 ($\pm 8,1$) μm e a membrana 60HAP/40PCL uma média de 10,4 ($\pm 6,3$) μm , valores abaixo daqueles vistos na literatura, além de não apresentarem conectividade entre si.

Ambas apresentaram grânulos de hidroxiapatita na superfície avaliada, como se é esperado, melhorando a complexidade da topografia das membranas. Contudo a membrana 60HAP/40PCL não apresentou uniformidade na distribuição dos grânulos de hidroxiapatita.

Entretanto, a ausência de macroporos e da interconexão entre os poros existentes pode ser uma característica que não auxiliará no processo de osteocondução em uma futura utilização no tratamento da doença periodontal,

porém as mesmas podem apresentar características desejáveis se utilizadas em outros defeitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANO, Y., OTA, M., SEKIGUCHI, K., SHIBUKAWA, Y., YAMADA, S. Evaluation of a poly-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics*, v.97, p.155-163, 2004..
- ANDRADE, P.F. Acellular dermal matrix as a membrane for guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation lesions: a histometric and clinical study in dogs. *J Periodontol*, v.78, p.1288-1299, 2007.
- BAJI, A., WONG, S.C., LIU, T., LI, T., SRIVATSAN, T.S. Morphological and X-ray Diffraction Studies of Crystalline Hydroxyapatite-Reinforced Polycaprolactone. *J. of biomedical materials research: applied biomaterials*, p. 343-350, 2006.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NÓBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.52, n.6, 616-620, 2000.
- CARLO, E.C., BORGES, A.P.B., FONTES, E.B., FOFANO, G., CARVALHO, T.B., SENA, M.P.T. Técnica da regeneração tecidual guiada (RTG) na reparação da mandíbula de cão. *Revista Ceres*, v.53, n.307, p.350-356, 2007.
- CHAIKOF, EL, MATTHEW, H, KOHN, J, MIKOS, AG, PRESTWICH, GD, YIP CM. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Acad Sci* v.961, p.96–105, 2002.
- CHRISTGAU, M., CAFFESSE, R.G., SCHMALZ, G., D'SOUZA, R.N. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *Journal of Clinical Periodontology*, v.34, p.691-708, 2007.

- DUARTE, T.S. ; BORGES, A.P.B. ; LAVOR, M.S.L. ; FILGUEIRAS, R. ; TSIOMIS, A.C. ; OLIVEIRA, F.L. ; PONTES, K.C.S. . Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, UFMG - EV, v. 58, p. 849-853, 2006.
- GOTZ, HE., MULLER, M., EMMEL, A., HOLZWARTH, U., ERBEN, R.G., STANG, I.R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*, v.25, p4057–64, 2004.
- HULBERT, S.F., YOUNG, F.A., MATHEWS, R.S., KLAWITTER, J.J., TALBERT, C.D., STELLING, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res*; v.4, p.433–56, 1970
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. v.26, p.5474-5491, 2005
- KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI,D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.39, n.2, p.190-199, (1998).
- LABET,M., THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, v.38, p.3484–3504, 2009.
- MARTINEZ, M.M.M, BORGES, A.P.B., VARGAS, M. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita – lignina implantado en tibia de conejos. *Rev. MVZ Cordoba*, v.14, p.1624-1632, 2009.
- MYNCRYST. Crystallographic and Crystallochemical Database for Minerals and their Structural Analogues: banco de dados. Disponível em: < <http://database.iem.ac.ru/mincryst/> >. Acesso em 05 jun. 2013.
- NEREM, R.M. Cellular engineering. *Ann Biomed Eng*; v.19, p.529–45, 1991.
- ORÉFICE, R.L., Materiais poliméricos-ciência e aplicações como biomateriais; In: Orefice, R.L., Pereira, M.M., Mansur, H.S. *Biomateriais-Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro:Cultura Médica, p. 87-155, 2006.
- OWEN, G.R.H. JACKSON, J., CHEHROUDI, B., BURT, H., BRUNETTE, D.M. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. *Biomaterials*, v.26, p.7447-7456, 2005.

- POK, S.W. WALLACE, K.N. MADHALLY, S.V. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. *Acta Biomaterialia*, v.6, p. 1061–1068, 2010.
- QUIAN, Y., LI, X., SU, Y., KE, Q., MO, X. Fabrication and Characterization of Polycaprolactone/Chlorophyllin Sodium Copper Salt Nanofibrous Mats from 2,2,2-Trifluoroethanol Solution by Electrospinning. *Iranian Polymer Journal*, v.18, p.265-274, 2009.
- REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M. SILCA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**. v.22, n.1, p.73-79, 2012.
- REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J., BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.27, p.3413-3431, 2006.
- SANTOS, L.C. MARTINEZ, M.M.M. Compósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães. 2012. 60f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SARASAM, A. MADHALLY, S.V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, v. 26 p. 5500–5508, 2005.
- SCANTLEBURY, T.V. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*, v.64, p.1129-1137, 1993.
- SENEDESE, A.L.C. Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em engenharia química – desenvolvimento de processos químicos). Universidade Estadual de Campinas – SP.
- SHOKROLLAHI, P., MIRZADEH, H., SCHERMAN, O.A., HUCK, W.T.S. Biological and mechanical properties of novel composites based on supramolecular polycaprolactone and functionalized hydroxyapatite. *J of biomedical materials research*, v.95, p.209-221, 2010.

- SILVA, E.C., BORGES, A.P.B., NEVES, C.D., CARLO, E.C., BARROS, R.E., HAGE, M.C.F.N.S., SOUZA, R.L., SOUZA, M.A., BARUD, H.S., BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zootecnia, v.64, p. 873-880, 2012.
- STORY, B.J., WAGNER, W.R., GAISSE, D.M., COOK, S.D., RUST-DAWICKI, A.M. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. Int J Oral Maxillofacial Implants, v.13(6), p.749–57, 1998.
- TAMPIERI, A.; CELLOTI, G.; SPRI, S.; DELCOGLIANO, A.; FRANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. Biomaterials, v. 22, n.11, p.1365-1370, 2001.
- TSURUGA, E., TAKITA, H., ITOH, H., WAKISAKA, Y., KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP induced osteogenesis. J Biochem. v.121(2), p.317–24, 1997.
- WOODARD, J.R.; HILLDORE, A.J.; LAN, S.K. PARK, C.J.; MORGAN, A.W.; EURELL, A.A.C.; CLARK, S.C.; WHELLWE, M.B.; JAMISON, R.D.; JOHNSON, A.J.W. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. Biomaterials, v.28, p.45-54, 2007.

CAPÍTULO III

Tratamento da doença periodontal pela técnica da regeneração tecidual guiada: aspectos clínicos, radiográficos, microtomográficos e histológicos

Martins, L.M.A. *et al.*

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um compósito formado por hidroxiapatita e policaprolactona como tratamento da doença periodontal. Para tal, foi realizado um defeito periodontal de tamanho crítico entre as raízes do 3º e o 4º pré-molar no intuito de induzir a doença periodontal. Foram utilizados 12 cães, divididos em grupo controle e tratado, cada um contendo seis animais. As medidas do defeito foram padronizadas em 3 mm a distância vestibulo-lingual, 7 mm a distância mesio-distal e 6 mm a distância corono-apical. Sobre o defeito foi posicionada uma membrana, previamente aquecida, tornando-a passível de ser moldada, composta por 60% de hidroxiapatita (HAP-91® Plus) e 40% de policaprolactona. Duas semanas após a realização do defeito periodontal, os animais foram avaliados quanto à presença de dor, secreção purulenta, deiscência e exposição de membrana, sendo esta também avaliada aos 60 dias do pós-operatório. Radiografias foram tiradas no pós-operatório imediato e 60 dias após implantação da membrana. O nível clínico de inserção também foi medido nesta mesma data. Aos 60 dias de pós-operatório foram retiradas amostras contendo o defeito ósseo em todos os animais e encaminhadas para a realização de microtomografia computadorizada e posteriormente foram processadas conforme técnicas rotineiras para realização da análise histológica, para avaliação da neoformação óssea a partir do biomaterial, e se ocorreu formação de ligamento periodontal e de novo cemento. Nas análises clínicas, os animais não apresentaram dor e secreção purulenta. Ocorreu deiscência em 50% dos animais e exposição de membrana em cinco dos seis animais do grupo tratado. O nível clínico de inserção do grupo tratado não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle. As imagens radiográficas aos 60 dias demonstraram radiopacidade igual ao osso alveolar em ambos os

grupos. A tomografia microcomputadorizada revelou que o grupo controle apresentou, com diferença estatística, maior relação de volume ósseo sobre o volume total do defeito em relação ao grupo tratado. No entanto em todos os animais, a região de furca não foi preenchida por novo osso alveolar. A histologia revelou presença de grande infiltrado inflamatório e presença de tecido conjuntivo em ambos os grupos. Osso novo apenas foi observado na borda apical do defeito tanto no grupo controle quanto no grupo tratado.

Palavras chave: membrana, hidroxiapatita, policaprolactona, ligamento periodontal, cimento.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of a composite consisting of hydroxyapatite and polycaprolactone as treatment of periodontal disease. To this end, we performed a bone defect between the roots of the 3rd and 4th premolar of 12 dogs divided into control and treated groups, each containing six animals. The defect measures have been standardized in 3 mm distance buccolingual, 6 mm distance apicocoronal and 7 mm distance mesiodistal. On the defect is positioned a membrane, previously heated, making it capable of being molded, composed of 60% hydroxyapatite (HAP-91 Plus ®) and 40% of polycaprolactone. Two weeks after the completion of the bone defect, the animals were evaluated for the presence of pain, purulent discharge, dehiscence and membrane exposure, which is also evaluated at 60 days postoperatively. Radiographs were taken in the immediate postoperative period and 60 days after implantation of the membrane. The clinical attachment level was also measured on the same date. At 60 days post-operative samples were collected containing the bone defect in all animals and forwarded conduct to computerized microtomography and subsequently were processed by routine techniques for performing histological analysis for evaluation of new bone formation from the biomaterial, and formation of periodontal ligament and new cementum. In clinical analysis, the animals showed no pain and purulent discharge. Dehiscence occurred in 50% of animals and exhibit membrane in five of six animals of the treated group. The clinical insertion level showed no statistical difference when compared to the control group treated. Radiographic

images to the alveolar bone radiopacity were equal in both groups. The computed microtomography revealed that the control group showed, with statistical difference, the greater ratio of bone volume over the total volume of the defect in relation to the treated group, however in all animals, the furcation area was not filled by new alveolar bone. Histology revealed the presence of extensive inflammatory infiltration and connective tissue in both groups. New bone was only observed in the apical border of the defect in control and treated group.

Keywords: membrane, hydroxyapatite, polycaprolactone, periodontal ligament, cementum.

INTRODUÇÃO

O termo doença periodontal se refere à enfermidade inflamatória causada pela microflora patogênica do biofilme ou placa bacteriana que se forma sobre o dente. A resposta imune e inflamatória que se desenvolve nos tecidos periodontais em resposta ao acúmulo desse biofilme resulta na perda dos tecidos de sustentação do dente: osso alveolar, ligamento periodontal e cemento, com a formação de grandes espaços contaminados entre a gengiva e a superfície do dente, denominados bolsas periodontais (Harvey e Emily, 1994; Pihlstrom *et al.*, 2005). A consequência de tal afecção é a perda dos dentes acometidos, resultando em dificuldades funcionais para alimentação, fístulas oronasais e na predisposição para fraturas patológicas de mandíbulas, de difícil resolução, decorrentes da fragilidade da mandíbula devido à reabsorção do osso alveolar na doença periodontal e ausência de dentes, o que diminui sensivelmente a espessura da mandíbula (Harvey e Emily, 1994; Legendre, 2003).

Além de sua grande prevalência e prejuízos para saúde oral, a importância da doença periodontal está também nas influências sistêmicas, sendo relacionada ou agravante para diversas afecções em humanos como doenças cardiovasculares, diabetes, baixo peso ao nascimento, câncer renal e pancreático e diversos tipos de doenças em animais cuja infecção pode ter origem em microrganismos da doença periodontal como, por exemplo, artrite,

pneumonia, encefalite e glomerulonefrite (Pihlstrom *et al.*, 2005; Accarini e Godoy, 2006).

A doença periodontal é uma condição que afeta diretamente a qualidade de vida tanto de pessoas quanto de animais de companhia, sendo esta a enfermidade mais comum em animais domésticos, com a sua prevalência aumentando com a idade e atingindo cerca de 80% dos cães com mais de cinco anos de idade (Harvey e Emily, 1993). Em estudo realizado por Fernandes *et al.* (2012), 88,67% dos animais avaliados em um período de oito meses no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, apresentaram sinais clínicos da doença. A necessidade de tratar defeitos ósseos de diferentes etiologias, magnitudes e localizações tem estimulado a busca de biomateriais capazes de favorecer o crescimento ósseo por condução e se possível, por indução. Estas características, dependentes das propriedades físicas e químicas do material, devem ser compatíveis com a fisiologia óssea (Gao *et al.*, 1995).

O tratamento convencional de defeitos periodontais inclui apenas o acesso cirúrgico às regiões afetadas (retalho muco-gengival), raspagem da placa e do cálculo e reposicionamento do retalho. Neste caso, células provenientes do epitélio juncional e fibroblastos do tecido conjuntivo gengival proliferam rapidamente, preenchendo a região do coágulo antes que as células desejáveis, osteoblastos e células progenitoras do ligamento periodontal possam fazê-lo (Macedo *et al.*, 2006; Roriz *et al.*, 2006). Dessa forma, a superfície da raiz é coberta por longo epitélio juncional, que não apresenta as funções de sustentação do dente, amortecimento de impactos da mastigação, nutrição e atividade sensoriais necessárias para o funcionamento e manutenção da saúde oral. A formação do cemento, ligamento periodontal e do osso alveolar não ocorre ou é mínima, limitada a pequena faixa na base do defeito (Cirelli *et al.*, 1997).

Diferentes técnicas e materiais já foram desenvolvidos e utilizados na regeneração periodontal, como a utilização de membrana rígida composta por hidroxiapatita (HA) e polihidroxibutirato (PHB), porém os resultados encontrados ainda são imprevisíveis e apenas uma parte do defeito foi regenerada de forma satisfatória, não atingindo assim a mesma quantidade de tecido existente antes do aparecimento da doença (Macedo *et al.*, 2006; Roriz *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2011).

Nesse contexto, as biocerâmicas em conjunto com biopolímeros constituem interessante campo de investigação e desenvolvimento para a obtenção de biomateriais úteis na fabricação e/ou fixação de implantes e também como substituintes de partes vitais do corpo humano. O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no recobrimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como colágeno (Kawachi *et al.*, 2000).

A utilização de compósitos de hidroxiapatita associados a policaprolactona tem merecido grande destaque entre os biomateriais devido as suas características químicas e morfológicas. A hidroxiapatita (HA) sintética é um material biocompatível, bioativo e osteocondutor, ou seja, tem a capacidade de servir como suporte para o crescimento de novo osso, dentro de seus poros, a partir das margens de um defeito (Borges *et al.*, 2000; Tampieri *et al.*, 2001), sendo tais característica comprovadas por diversos estudos (Martinez *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Santos, 2012; Dornas, 2013). A policaprolactona (PCL) é um poliéster biocompatível e bio-reabsorvível, sendo ambas as características desejadas na busca de um biomaterial (Elzein, 2004). Além disso, a associação dos dois materiais permite a formação de uma membrana porosa e maléavel (Rezwan *et al.*, 2006), que poderá ter a capacidade de manter o espaço do defeito, permitindo uma melhor e maior migração de células osteogênicas, da formação e manutenção do coágulo, e consequentemente a formação de uma ampla rede de vasos sanguíneos, que permite ainda mais o recrutamento e migração de osteoblastos e osteoclastos (Fujihara *et al.*, 2004).

A necessidade de novos materiais mais acessíveis e novas técnicas para utilização na medicina e odontologia humana e veterinária é evidente. O fato de grande parte dos biomateriais ser importada torna, muitas vezes, inviável sua utilização em pacientes de baixa renda. É neste contexto que o presente trabalho se insere. Pretende-se avaliar a biocompatibilidade, a capacidade osteocondutora e o tempo de formação de novo tecido ósseo de um produto de menor custo, que utiliza 100% de matéria prima nacional.

MATERIAL E METODOS

A metodologia empregada neste trabalho foi elaborada em concordância com a legislação vigente e aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 014/2012).

- *Pré-operatório*

Para este estudo foram utilizados 12 cães adultos saudáveis, fêmeas, pesando entre 10 e 15 kg, alojados em baias individuais disponíveis no Canil Experimental da UFV. Ao longo do experimento, receberam ração comercial e água *ad libitum* com período de adaptação de no mínimo 30 dias, onde foram vacinados e receberam tratamento contra endoparasitas. Estes cães apresentavam no máximo gengivite (doença periodontal grau 1 de acordo com recomendações do *American Veterinary Dental College*), sendo este o critério de exclusão.

Os animais selecionados para a realização do experimento foram divididos em dois grupos, com seis animais em cada, sendo um grupo utilizado como controle e o outro grupo recebeu tratamento.

- *Primeiro procedimento cirúrgico*

O primeiro procedimento cirúrgico constou da indução de doença periodontal com a confecção de um defeito periodontal com dimensões padronizadas.

Para tal, os cães foram sedados com acepromazina (0,1 mg/kg) por via endovenosa, após jejum hídrico e sólido de 12 horas. A anestesia geral foi induzida com propofol (6 mg/kg) também por via endovenosa e mantida com mistura de isoflurano e oxigênio.

Os animais do grupo controle foram posicionados em decúbito lateral, expondo a gengiva bucal da mandíbula direita que foi higienizada, juntamente com toda a coroa dos dentes com solução de clorexidine a 0,12%. Foi criado um retalho mucoperiosteal, realizando-se uma incisão no sulco gengival do terceiro e quarto pré-molares da mandíbula no sentido caudo-rostral, e duas incisões na gengiva bucal, uma caudal ao quarto pré-molar e a outra rostral ao

terceiro pré-molar. O retalho foi deslocado apicalmente expondo o osso alveolar.

Um defeito no quarto pré-molar inferior foi provocado com o auxílio de uma broca cônica FG acoplada a um motor de alta rotação. O defeito obedeceu às seguintes medidas: 6 mm na direção corono-apical (medido desde a junção cimento-esmalte até a borda mais apical do defeito); 7mm no sentido mesio-distal e 3mm de profundidade (sentido vestibulo-lingual) medido desde a superfície vestibular da raiz até a superfície mais lingual do defeito ósseo (Figura 1). Essas medidas foram realizadas com auxílio de sonda periodontal milimetrada.

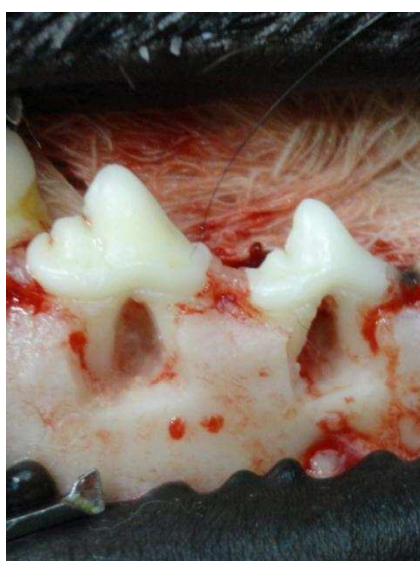


Figura 1: Padronização do defeito ósseo realizado em 3º e 4º pré-molares da mandíbula de cão.

As raízes expostas foram curetadas utilizando-se cureta Gracey para remover as fibras de Sharpey e cimento. O mesmo defeito foi realizado sob o terceiro pré molar. Foram obtidas neste momento, radiografias das regiões operadas, utilizando filme intra-oral, com o filme posicionado na região lingual da mandíbula, ou seja, técnica do paralelismo, utilizando aparelho de raios X odontológico.

Em seguida, o defeito periodontal foi preenchido com poliéster de moldagem (Figura 2) para prevenir a regeneração espontânea do defeito agudo e promover sua cronificação com contaminação por bactérias da placa bacteriana (Macedo *et al.*, 2006; Roriz *et al.*, 2006).

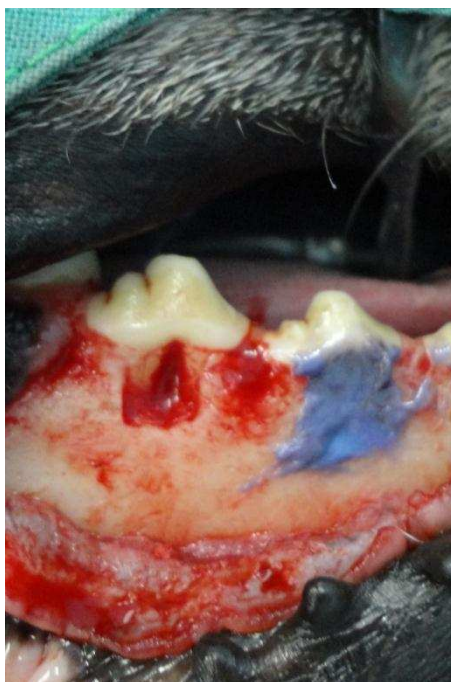


Figura 2: Poliéster de moldagem para cronificação do defeito ósseo, em 3º pré molar do grupo controle.

O retalho foi reposicionado e suturado em padrão interrompido simples, também com poliglactina 910 (Figura 3).

No grupo tratado, os mesmos procedimentos descritos acima foram realizados, sendo que neste grupo o defeito sob o quarto pré-molar foi realizado no lado direito, enquanto o defeito sob o terceiro pré-molar foi realizado no lado esquerdo da mandíbula do animal, permitindo assim melhor cicatrização do *flap* gengival, diminuindo as chances de deiscência e perda da membrana.



Figura 3: Sutura de flap em padrão simples, realizado com Poliglactina 910 3.0, sobre os 3º e 4º pré-molares da mandíbula no grupo controle.

- Pós-operatório

Os animais receberam morfina¹² (2mg/kg)(Cruz, 2002) a cada seis horas durante 24 horas por via subcutânea para analgesia, e as feridas cirúrgicas foram limpas diariamente com solução de clorexidina a 0,12% até a cicatrização da ferida.

- Segundo procedimento cirúrgico

Durante os três dias anteriores ao segundo e ao terceiro procedimento cirúrgico, os cães receberam como antibioticoterapia profilática doxiciclina (10mg/Kg)¹, via oral, a cada 24 horas.

Após 21 dias de indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e o poliéster de moldagem foi retirado, curetando-se o defeito. Em seguida os animais receberam profilaxia periodontal com raspagem da placa e cálculo se existentes (curetas e ultra-som odontológico) e polimento. Um programa de controle da placa foi instituído, com escovação diária e aplicação de clorexidine 0,12% duas vezes ao dia por duas semanas.

- Terceiro procedimento cirúrgico – Regeneração tecidual guiada

Duas semanas após o procedimento anterior, foi realizado o tratamento cirúrgico. O pré-operatório foi o mesmo realizado para o primeiro procedimento cirúrgico, assim como a sedação e anestesia dos animais. Com o mesmo acesso cirúrgico descrito anteriormente, os defeitos foram expostos e curetados para retirada de tecido de granulação, assim como as raízes expostas nos defeitos.

Nesse momento foi introduzida a técnica de regeneração tecidual guiada. Foi utilizada nesse trabalho a membrana composta por 60% de hidroxiapatita e 40% de policaprolactona. A utilização da membrana composta por 75% de hidroxiapatita e 25% de policaprolactona foi descartada apesar da mesma apresentar melhores características morfológicas quando comparada a membrana 60HAP/40PCL. Isso ocorreu devido ao fato que, em estudo prévio realizado com a membrana 75HAP/25PCL, a mesma não apresentou facilidade no manuseio, sendo perdida quando avaliada *in vivo*.

Antes do posicionamento da membrana cobrindo o defeito, a mesma foi aquecida à 100 graus, para que se tornasse maleável, facilitando assim seu manuseio e permitindo que a mesma recobrisse todo o defeito. A membrana, após o aquecimento foi prensada no intuito de diminuir sua espessura e foi posicionada cobrindo o defeito realizado de modo que permanecesse uma borda de pelo menos 2 mm nas direções mesial, distal e apical além do defeito e fixada sobre o osso alveolar com parafuso de titânio (Figura 4). Fio de poliglactina 910 nº 3-0 com sutura em padrão simples foi utilizado para fixar a membrana na posição adequada.



Figura 4: Posicionamento da membrana composta por Hidroxiapatita (HAP 91 Plus®) e policaprolactona, fixada por parafuso de alumínio; sobre defeito ósseo realizado sobre o 4º pré molar inferior.

Com o animal ainda sob efeito da anestesia, foram obtidas radiografias das regiões operadas, utilizando filme intra-oral pela técnica do paralelismo.

- Pós-operatório

Os animais receberam morfina (2 mg/kg) por via subcutânea por 24 horas, a cada seis horas. Receberam também, doxicilina (10 mg/Kg) por via oral por 10 dias, uma vez ao dia, após a cirurgia e as feridas cirúrgicas foram limpas diariamente com solução de clorexidina a 0,12% até a cicatrização. Os animais foram alimentados com comida pastosa até a completa cicatrização da ferida cirúrgica. Foi instalado o controle da placa bacteriana logo após o procedimento cirúrgico por meio de escovação dentária a cada 48 horas até o final do experimento e aplicação de clorexidine 0,12% nos locais de implantação das membranas.

- Exame clínico

O exame clínico local constou de observação diária da ferida cirúrgica por duas semanas e aos 60 dias após a cirurgia, avaliando-se a presença ou ausência de hemorragia, secreção purulenta, deiscência e exposição da membrana. O dia em que a ferida cirúrgica foi considerada fechada foi destacado, ou seja, completa cicatrização gengival. A sensibilidade dolorosa foi avaliada pela reação do animal ao toque da ferida cirúrgica atribuindo-se os escores; 0 - quando o animal permitia o toque e não manifestar reação; 1 -

quando o animal permitia o toque, mas manifestava reação de dor como aumento da frequência respiratória, vocalização ou tentativa de fuga; 2 - quando o animal não permitia o toque.

O nível clínico de inserção foi medido (medida desde a junção cimento-esmalte até ao local de aderência do epitélio juncional, ou seja, o fundo da bolsa periodontal) antes do tratamento (pré RTG) e aos 60 dias após a cirurgia. A proporção da regressão da doença foi obtida dividindo-se o valor final pelo inicial.

- Radiografias

Radiografias da região operada dos animais de cada grupo foram obtidas antes do início do tratamento (pré RTG) e aos 60 dias após a cirurgia, utilizando filme intraoral pela técnica do paralelismo.

Nas radiografias foram observadas a presença ou ausência da lâmina dura e o espaço do ligamento periodontal. As radiografias foram analisadas também quanto à radiopacidade, comparando a região do defeito com o osso alveolar na base do mesmo. O defeito foi classificado de acordo com os escores: 0 - radiopacidade do defeito menor que a do osso vizinho; 1 - radiopacidade semelhante à do osso vizinho; 2 - radiopacidade do defeito maior que a do osso vizinho. A regularidade das bordas do defeito foi observada, sendo cada borda classificada como regular ou não.

- Tomografia microcomputadorizada

Quantitativamente, os seguintes parâmetros foram avaliados pela microtomografia computadorizada: porcentagem do volume ósseo no defeito em relação ao volume total do defeito (BV/TV); espessura das trabéculas neoformadas (Tb.Th.); distância entre as trabéculas (Tb.Sp.) e número de trabéculas (Tb.N.)

Os parâmetros quantitativos foram avaliados pela microtomografia computadorizada (MicroCT40, Scanco, Switzerland) em 85 kV e 77 mA., e realizada na Universidade de Toronto, Canadá.

Uma amostra do terceiro pré-molar íntegro de um animal não portador de doença periodontal e que veio a óbito por causas naturais no Hospital Veterinário/UFV foi coletado e analisado como referência.

Após a reconstrução de uma imagem bidimensional (2D), sendo esta representada por cortes axiais de 10 mm de espessura, foi selecionada a região de interesse (ROI) para análise. Tal região foi delimitada 0,4 mm abaixo do limite coronal do defeito (acima da ROI), que corresponde à linha cimento-esmalte; e pelo limite apical (abaixo da ROI), que foi definido por um plano com uma distância de 1 milímetro inferior à altura pré definida do defeito de modo que apenas osso neoformado foi incluído na medição. Os canais radiculares foram utilizados como pontos de referência anatômica para os limites mesial, distal e lingual da ROI. Estes pontos de referência foram usados para desenhar a área do defeito em diferentes profundidades em duas dimensões, que em seguida foram reconstruídos para formar uma imagem tridimensional, que corresponde ao volume de interesse, onde foram avaliados os parâmetros quantitativos citados acima.

- Biópsias e análises histológicas

Aos 60 dias após a cirurgia, os seis animais de seus respectivos grupos, foram sedados e anestesiados como descrito para a realização da cirurgia. Após a indução anestésica, os animais foram eutanasiados utilizando-se sobredose de propofol e, após ausência de reflexo corneal, foi aplicado cloreto de potássio, de acordo com as normas exigidas pela Resolução 714 do CFMV.

Pelo mesmo acesso realizado nas cirurgias anteriores, foram coletados os fragmentos contendo os defeitos, os dentes a eles associados e a gengiva da região vestibular.

Os fragmentos coletados foram fixados em formol e, então, descalcificados em solução de ácido fórmico e citrato de sódio. Em seguida, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina, sendo desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Três seções longitudinais não sequenciais de 5µm de espessura, com no mínimo 50µm de distância entre si, foram obtidas de cada amostra e coradas em hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram fotografadas em microscópio ótico nos diversos aumentos e as imagens analisadas em *software* apropriado.

O material foi analisado qualitativamente. Assim, os tecidos e células presentes em toda a amostra foram caracterizados, atentando-se para a

presença de infiltrado inflamatório e tipo, se existente, se houve formação de osso novo, cimento e ligamento periodontal.

- Análise Estatística

Os níveis de inserção, em milímetros, foram avaliados por teste t pareado. As proporções relativas foram comparadas entre os grupos por Kruskal-Wallis, visto que as observações não apresentaram homogeneidade de variâncias. As variáveis obtidas na análise tomográfica das amostras (BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp) foram submetidas ao teste t de Student para comparação das médias. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa SigmaPlot 11.0, considerando nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Exame Clínico

No pós-operatório, cinco animais do grupo controle apresentaram hemorragia discreta, durante dois dias. Considerando o grupo tratado, apenas um animal apresentou hemorragia também discreta, apenas nos dois primeiros dias de pós-operatório. Apesar da grande vascularização do osso alveolar, ao que se relaciona também a sua grande capacidade de regeneração (Figun & Garino, 1994), a presença de pequena hemorragia nos animais pode ser explicada pela justaposição correta do *flap* gengival no grupo controle. A presença da membrana no grupo tratado pode ter favorecido a retenção do coágulo, o que pode explicar a ausência de hemorragia em praticamente 100% dos animais do grupo em questão.

Nenhum animal apresentou secreção purulenta ao longo dos sessenta dias. No grupo controle apenas dois animais apresentaram deiscência dos pontos, sendo esta observada, em ambos os animais, no sexto dia de pós-operatório. A cicatrização do flap gengival nos animais ocorreu entre o 7º-10º dia de pós-operatório. A realização do segundo procedimento cirúrgico – profilaxia dental – não permitiu que ocorresse um processo infeccioso no local de implantação do biomaterial que alterasse o resultado final do experimento, explicando assim as variáveis citadas acima.

Já no grupo tratado, três animais apresentaram deiscência no pós-operatório imediato e, conseqüentemente, exposição da membrana (Figura 5), possivelmente devido á presença da membrana. Ao final das duas semanas de análise clínica, todos os seis animais apresentaram discreta recessão gengival e exposição de membrana. Três animais perderam uma das suas membranas aos 22º, 35º e 40º dia de pós-operatório. A perda do biomaterial nos animais em questão pode ter contribuído para a variação no resultado final do experimento, no qual a presença da membrana não permitiu que maior quantidade de tecido de sustentação se desenvolvesse no local do defeito.

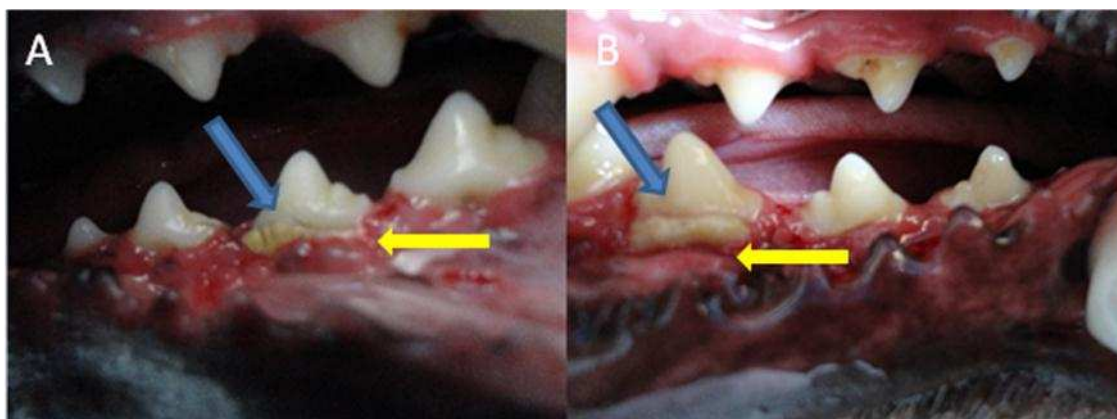


Figura 5: Exposição de membrana (setas azuis) em grupo tratado, com recessão gengival (setas amarelas), avaliada aos 60 dias ápos a colocação da membrana, sobre 3º pré-molar esquerdo (A) e 4º pré-molar direito (B).

Tais sinais são diferentes daqueles encontrados por Reis *et al.* (2011), no qual foi realizado estudo com membranas compostas por PLGA/fosfato de cálcio. Em tal experimento apenas um animal apresentou exposição de membrana, e a recessão gengival apresentada por alguns animais, foi solucionada após alguns dias. Essas observações podem ser explicadas pela diferença física entre as duas membranas, sendo a utilizada no presente experimento, um biomaterial menos maleável do aquele utilizado por Reis *et al.* (2011). Kinochita *et al.* (2010) também não observaram exposição de membrana em estudo realizado com membranas compostas por policaprolactona e fosfato tricálcico. No entanto, Reis *et al.* (2011) ao utilizar membranas compostas por hidroxiapatita e polihidroxibutirato no tratamento da doença periodontal, apresentou resultado semelhante ao presente estudo,

onde a maioria dos animais apresentaram exposição de membrana, devido possivelmente às características físicas semelhantes das duas membranas.

A sensibilidade dolorosa apresentada pelos animais de ambos os grupos foi considerada normal, apresentando escore 1, por apenas dois dias após a cirurgia, já que dor é esperada em qualquer procedimento cirúrgico, e escore 0, após tal período. A ausência de dor moderada também pode ser explicada pela aplicação de morfina no pós-operatório imediato.

O nível clínico de inserção foi medido imediatamente pré- regeneração tecidual guiada (RTG) e antes da retirada das amostras, aos 60 dias pós-RTG. Os valores mostraram regressão significativa em ambos os grupos, com $p < 0,001$ para o grupo controle e $p = 0,002$ para o tratado (Figura 6).

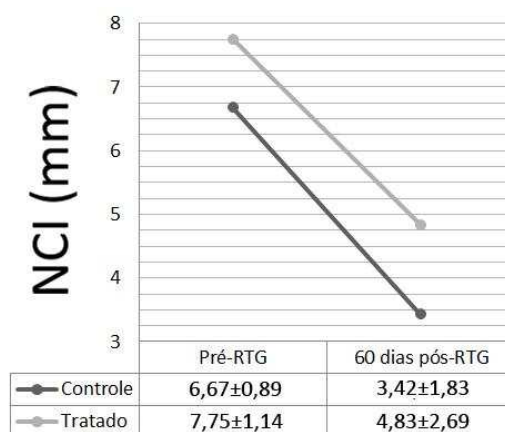


Figura 6: Média e desvio-padrão do Nível Clínico de Inserção (mm) dos grupos tratados e controle no pré-RTG (Antes da colocação da membrana) e 60 dias após RTG. Teste t pareado $\alpha = 0,05$; controle: $p < 0,001$; tratado: $p = 0,002$.

Entretanto, a proporção de regressão do nível de inserção até os 60 dias, dada pela razão entre as medidas pré-RTG e 60 dias pós-RTG, não foi diferente entre os grupos ou os dentes analisados ($p = 0,430$) (Tabela 1), o que indica que a membrana pode atuar de forma semelhante ao osso alveolar como um suporte para adesão da gengiva.

Tabela 1. Medianas da proporção de regressão do NCI segundo tratamento e dente analisado. Kruskal-Wallis $\alpha=0,05$; $p=0,430$.

Grupo	3º PRÉ-MOLAR	4º PRÉ-MOLAR
Controle	0,417Aa	0,607Aa
Tratado	0,670Aa	0,534Aa

Letra maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si.

Radiografias

Os resultados radiológicos da peça dental, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, obtidos imediatamente após o 3º procedimento cirúrgico, revelaram radiopacidade grau 0 nas regiões do defeito, de acordo com a classificação proposta (Figura 7).

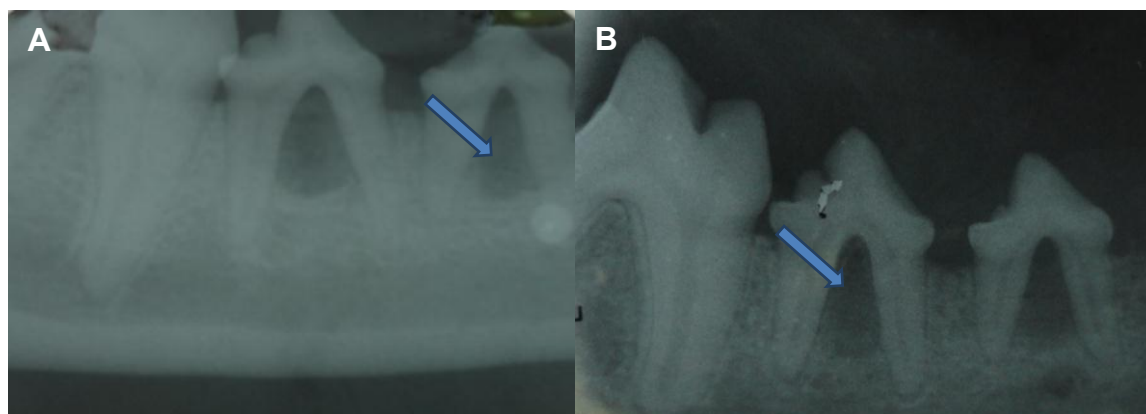


Figura 7: Radiografias obtidas imediatamente pós RTG (Regeneração Tecidual Guiada). Visualizar radiopacidade grau 0 comparada ao osso alveolar adjacente (setas azuis) sendo, (A) grupo tratado, e (B) grupo controle.

Nas radiografias de ambos os grupos aos 60 dias, observou-se radiopacidade na região do defeito igual aquela do osso alveolar adjacente, sugestivo de que o defeito estava completamente preenchido por tecido, aparentemente ósseo (Figura 8). Também em ambos os grupos não foi possível observar a presença do espaço do ligamento periodontal nem da lâmina dura. Todas as imagens avaliadas demonstraram um defeito preenchido, com furca exposta, sem presença de bordas.

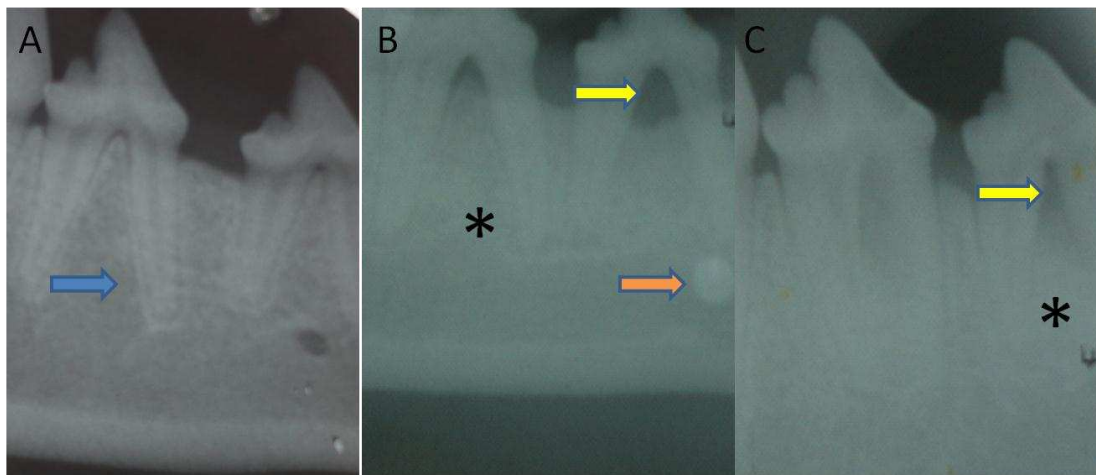


Figura 8: Radiografias de osso inteiro (A) obtidas 60 dias pós RTG, nos grupos tratado (B) e controle (C). Observar radiopacidade do defeito semelhante ao osso adjacente tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. Observar também a presença de exposição de furca em ambos os grupos (setas amarelas). A seta azul corresponde ao espaço do ligamento periodontal, não observado em nenhum dos grupos (asterisco). Seta laranja corresponde ao parafuso de titânio utilizado para fixação da membrana no grupo tratado.

Tomografia microcomputadorizada (microCT)

Os valores obtidos na tomografia microcomputadorizada indicam um menor crescimento ósseo no grupo tratado. Entretanto, apenas BV/TV mostrou diferença estatisticamente significativa, com $p=0,042$ (Tabela 2). No entanto, o número de trabéculas e a espessura das mesmas foram maiores no grupo controle, e no mesmo grupo, o espaçamento entre trabéculas se mostrou menor. Esses valores não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Tabela 2).

Esses resultados demonstram que a membrana não foi capaz de promover a regeneração óssea de forma mais eficiente que no grupo controle após 60 dias. Eles também indicam que a RTG pode ainda ter influenciado negativamente na regeneração, já que a utilização da técnica permitiu que ocorresse recessão gengival, e consequentemente exposição da membrana. Com isso, a região do defeito manteve-se em contato com o biofilme formado,

e portanto, também em contato com as bactérias responsáveis pela doença periodontal, tornando o defeito constantemente contaminado.

Esses efeitos podem ter ocorrido devido à apresentação da membrana utilizada, visto que Reis *et al.* (2011), com uma formulação diferente foram capazes de demonstrar regeneração óssea por tomografia computadorizada em defeitos semelhantes e ausência de recessão gengival. Iwata *et al.* (2009), utilizando células derivadas do ligamento periodontal em *scaffolds* de colágeno e hidroxiapatita, apresentou regeneração óssea satisfatória no grupo tratado. O grupo controle apresentaram os mesmos resultados vistos no presente estudo, assim como Kinoshita *et al.* (2010). Em seu trabalho os autores utilizaram-se de uma membrana composta por policaprolactona e fosfato tricálcico, além da aplicação de fatores de crescimento sobre um dos defeitos analisados.

Tabela 2. Médias, desvios-padrão e valores de p para a comparação estatística das variáveis BV/TV (Porcentagem do volume ósseo no defeito em relação ao volume total do defeito), Tb.N (número de trabéculas), Tb.Th (espessura das trabéculas neoformadas) e Tb.Sp (distância entre as trabéculas).

Parâmetros	Amostra íntegra	Controle	Tratado	p*
BV/TV	0,83	0,36±0,08	0,20±0,15	0,042
Tb.N	3,82	1,63±0,91	1,00±0,75	0,215
Tb.Th	0,47	0,26±0,07	0,18±0,07	0,087
Tb.Sp	0,15	1,24±0,72	1,82±0,76	0,207

(* valores de p para comparação entre os grupos controle e tratado)

Verificando-se valores para BV/TV da Tabela 2, pode-se inferir ainda que o coeficiente de variação, dado pela razão entre o desvio-padrão e a média no grupo tratado é 3,5 vezes maior que no grupo controle (respectivamente, 0,748 e 0,213), o que pode ser resultado da influência de fatores individuais, seja na resposta do animal ao tratamento ou em variações técnicas relacionadas à metodologia do implante. A exposição da membrana, como falado anteriormente, também pode explicar a grande diferença no coeficiente de variação vista entre os dois grupos avaliados. Deliberador *et al* (2006) também observaram variações no resultado do experimento, no qual os

autores consideraram tais alterações uma resposta da variabilidade biológica entre os animais. Essa variabilidade pode ser comportamental, genética, bioquímica ou fisiológica (Selvig, 1994). Além disso, os valores para BV/TV apresentados por ambos os grupos foram bem aquém do obtido na amostra íntegra (0,83). Essa observação deve-se ao fato de que, nesta amostra, toda a área do defeito era preenchida por osso alveolar, enquanto nos dois grupos trabalhados, a maior parte da área de interesse considerada no cálculo desta variável não era ocupada por tecido de densidade compatível com o osso (Figura 9).

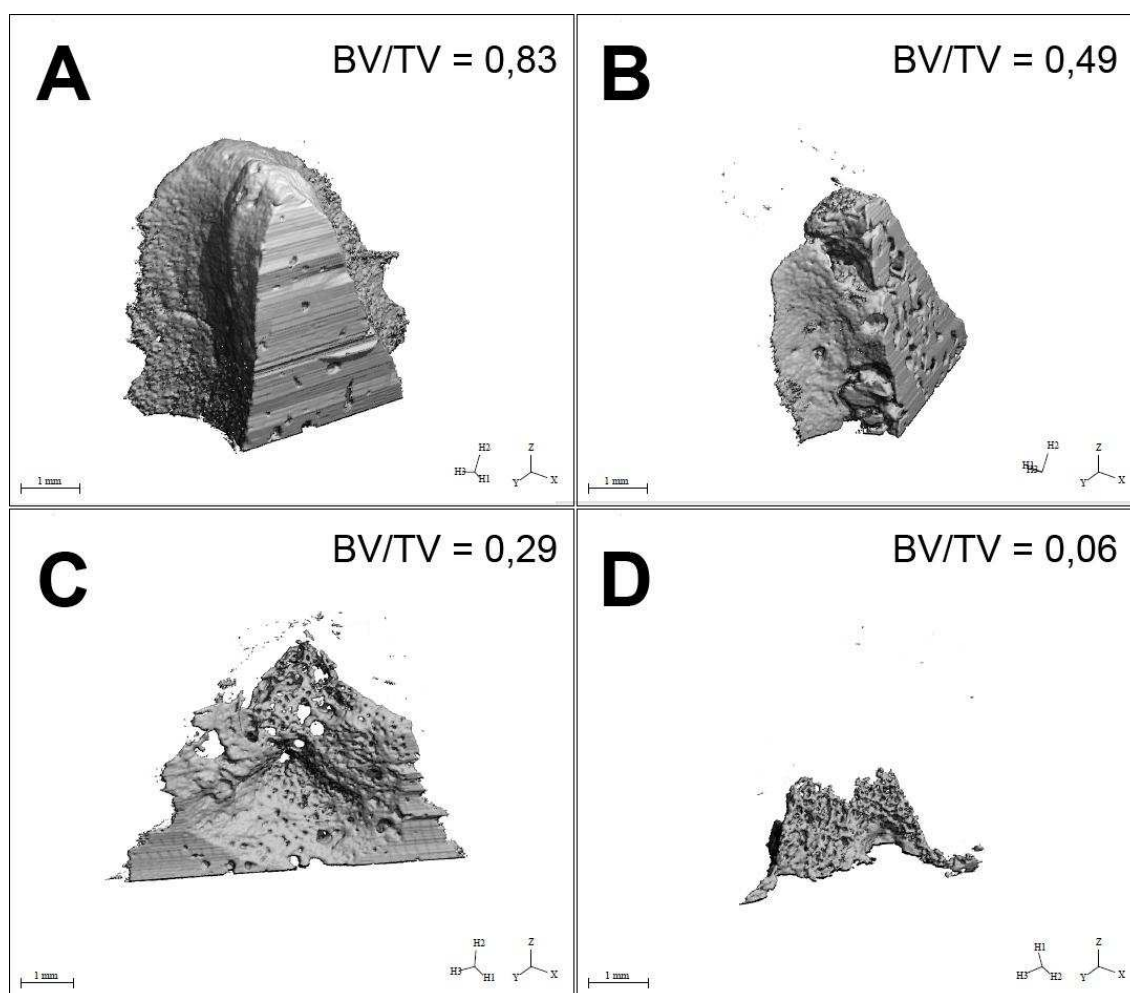


Figura 9: Reconstrução tridimensional da área de interesse do terceiro pré-molar do osso alveolar saudável (amostra íntegra) (A), da amostra que apresentou maior BV/TV, pertencente ao grupo controle (B), de uma amostra que apresentou um valor intermediário, também do grupo controle (C), e da amostra que apresentou o menor valor para BV/TV, pertencente ao grupo tratado (D). Estas amostras não devem ser tomadas como representativas para todo o grupo, mas mostram a diferença no preenchimento da área de interesse em relação à amostra íntegra, principalmente nas porções mais coronal e vestibular do defeito.

Análises Histopatológicas

A análise dos cortes longitudinais dos dois grupos possibilitou a visualização de toda a área do defeito, que foi completamente preenchida por tecido conjuntivo organizado e intensa matriz extracelular (Figura 10). O mesmo resultado foi observado por Christgau et al.(2007), em estudo realizado com 4 membranas diferentes, em que se demonstraram a presença de tecido conjuntivo organizado. No entanto, os autores observaram que o mesmo tecido conjuntivo organizado foi notado duas semanas após a aplicação da técnica de regeneração tecidual guiada, sendo que em quatro semanas, formação óssea extensa pode ser observada, diferente dos resultados vistos no presente trabalho.

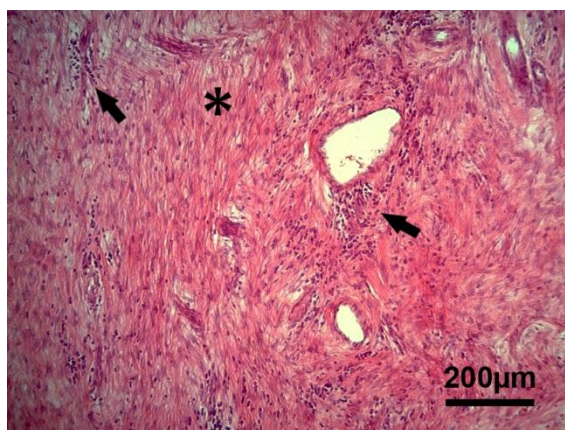


Figura 10. Fotomicrografia do tecido conjuntivo fibroso que ocupava o defeito de um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar. Notar a organização das fibras (asterisco) e infiltração de células inflamatórias (seta preta). Estas observações foram comuns ao grupo controle.

A formação de novas trabéculas ósseas mostrou-se restrita à borda apical do defeito, onde puderam ser observados osteoblastos ativos e matriz extracelular óssea sendo depositada a partir da matriz provisória (Figura11). Não foi observada formação de ligamento periodontal em ambos os grupos analisados. Tal resultado difere daquele encontrado por Reis *et al.* (2011), no qual foi utilizada membrana composta por cerâmica e polímero, onde foi possível visualizar a formação de trabéculas ósseas na região de furca e presença de ligamento periodontal ao longo da raiz da peça dental. A diferença possivelmente ocorreu já que na técnica utilizada por Reis (2011), não ocorreu exposição da membrana, permitindo assim que apenas células responsáveis pela formação de novo tecido de sustentação, se proliferassem.

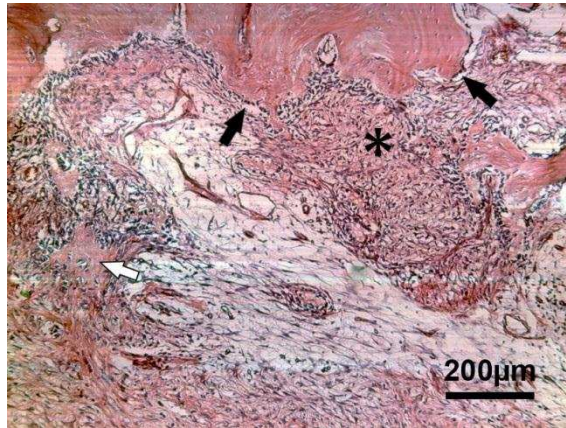


Figura 11. Fotomicrografia da região da base do defeito em um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar. Notar a presença de osteoblastos ativos (setas pretas), matriz extracelular não organizada (asterisco) e formação de osteoide (seta branca). Estas observações foram comuns ao grupo controle.

Em algumas amostras, uma camada de matriz foi observada acompanhando a raiz do dente próximo à região onde existia o cimento, que foi raspado no processo de indução da doença periodontal, ou mesmo sobrepondo-o em pontos onde ainda estava presente (Figura 12). Embora a metodologia utilizada na confecção das lâminas não permita a diferenciação entre osso e cimento, não foram observadas fibras de Sharpey inseridas no tecido apresentado. Pode-se afirmar, no entanto, que com o avanço do tratamento, tais fibras possam ser visualizadas já que numa fase inicial de reparação apenas fibras intrínsecas de cimento são formadas, sendo estas incapazes de fornecer ancoragem à peça dental. Segundo Listgarten (1999) ao longo do tempo, novas fibras são depositadas (fibras de Sharpey), fornecendo assim sustentação ao dente. Estas observações foram semelhantes tanto no grupo controle quanto no tratado.

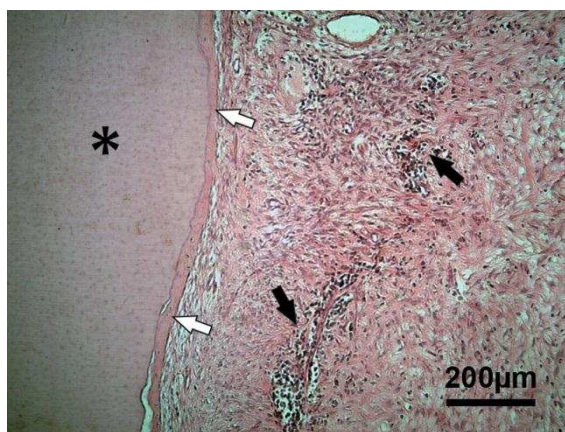


Figura 12. Fotomicrografia da borda da raiz dentária em um animal do grupo tratado 60 dias após o implante no quarto pré-molar. Notar uma camada de matriz semelhante à do osso (setas brancas) cobrindo a dentina (asterisco). Nesta imagem, o infiltrado inflamatório em meio ao tecido conjuntivo também está evidente (setas pretas). Estas observações foram comuns ao grupo controle.

Os cortes transversais mostraram que a proliferação tanto do tecido conjuntivo e do epitelial foi mais exuberante nas amostras do grupo controle. De acordo com a definição da regeneração tecidual guiada, a membrana atua como uma barreira impedindo que tecido gengival e tecido conjuntivo cresçam sobre o defeito, favorecendo a migração de células do tecido periodontal para o interior do defeito (Bosshardt *et al.* 2009). Entretanto, a presença de epitélio justaposto ao tecido conjuntivo dentro da furca no grupo tratado, mostrou que a membrana não foi capaz de impedir a invasão epitelial, mas possivelmente tenha limitado a expansão dos dois tecidos. Além disso, a proliferação epitelial no grupo controle pode estar associada à resposta do próprio *flap*, enquanto no grupo que recebeu a membrana, tratava-se de uma segunda camada epitelial.

Ambos os grupos mostraram infiltração inflamatória difusa pelo tecido conjuntivo que preenchia o defeito. Porém essa infiltração foi mais pronunciada nas áreas próximas ao tecido epitelial proliferativo, e, por isso, foi mais evidente nas amostras do grupo controle (Figura13). Esse resultado é consistente com aquele encontrado por Deliberador *et al.* (2009), no qual o grupo controle do tratamento realizado com membranas de sulfato de cálcio, apresentaram elevada infiltração inflamatória difusa. No entanto, o grupo tratado pela técnica de regeneração guiada, apresentou grande quantidade de tecido ósseo novo na região da furca, diferente do resultado aqui apresentado. Lekovic *et al.* (1998), em estudo realizado com quatro membranas, sendo uma delas de policaprolactona, apresentaram como resultados uma ótima formação de cimento e de osso alveolar, no entanto, a membrana composta por

policaprolactona apresentou elevada resposta inflamatória, assim como visto no presente estudo.

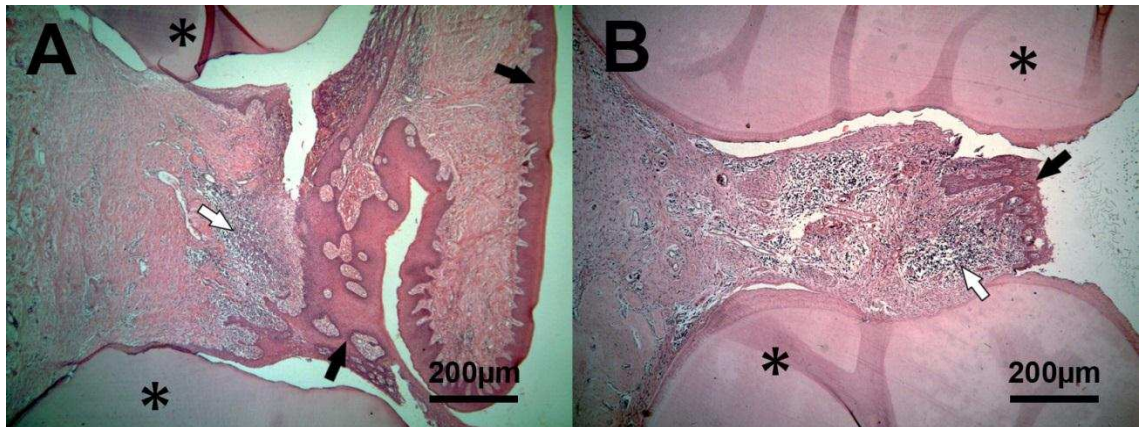


Figura 13. Fotomicrografia da região da furca do terceiro pré-molar em um animal do grupo controle (A) e do grupo tratado (B) 60 dias após o implante. Notar a diferença na proliferação do tecido epitelial (setas pretas) e tecido conjuntivo entre as raízes (asteriscos). As setas brancas apontam o infiltrado inflamatório.

CONCLUSÕES

Ambos os grupos avaliados apresentaram invasão de tecido conjuntivo sobre o defeito ósseo, no entanto, a utilização da membrana limitou a invasão de maior quantidade de tecido conjuntivo gengival no grupo tratado. Além da membrana ter a capacidade de manter o espaço do defeito, pelas análises histológicas ela mesma se mostrou biocompatível, porém pouco osteocondutora, característica também demonstrada pela tomografia microcomputadorizada. Apesar da ausência clínica de sinais de inflamação, reação inflamatória pode ser observada na análise histopatológica das lâminas em ambos os grupos avaliados. Tais resultados são explicados pela contaminação constante do defeito, devido à exposição da membrana, não permitindo assim que células formadoras de novo tecido de sustentação se estabelecessem na região do defeito ósseo.

Assim, a membrana utilizada neste trabalho não apresentou vantagens em ser utilizada para o tratamento da doença periodontal, mas não deve ser descartada como opção para o tratamento de outras afecções, sendo assim necessária a realização de outros estudos para sua aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCARINI,R.; GODOY, M.F. Doença periodontal como potencial fator de risco para síndromes coronarianas agudas. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v.87, p. 592-596, 2006.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NÓBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.52, n.6, 616-620, 2000.
- BOSSHARDT, D.D., SCULEAN, A. Does periodontal tissue regeneration really work?. Periodontology 2000, v.51, p. 206-219, 2009.
- CHRISTGAU,M.,CAFFESSE,R.G., SCHMALZ,G., D'SOUZA, R.N. Extracellular matriz expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. Journal of Clinical Periodontology, v.34, p.691-708, 2007.
- CIRELLI, J.A, MARCANTONIO E JR, ADRIANA, R., MARCANTONIO, C., LIA, R.C., GOISSIS, G., ROSSA, C. JR. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. Biomaterials, v.18, p.1227-1234, 1997.
- CRUZ, M.L., Anestesia em ortopedia. In: FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. São Paulo, Roca, 2002.
- DELIBERADOR, NAGATA,M.J.H. FURLANETO,F.A.C., MELO, L.G.N.; OKAMOTO,T., MARIA L.M.M. SUNDEFELD, M.L.M.M., STEPHEN E. FUCINI, S.E. Autogenous Bone Graft With or Without a Calcium Sulfate Barrier in the Treatment of Class II Furcation Defects: A Histologic and Histometric Study in Dogs. J. Periodontol, v. 77, p. 780-789, 2005.
- DORNAS,R.F. Cimento a base de Beta-fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Vterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ELZEIN, T. NASSER-EDDINE, M. DELAITE, C. BISTAC, S. DUMAS, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of Colloid and Interface Science, v. 273, p. 381–387, 2004.

- FERNANDES, N.A., BORGES, A.P.B., REIS, E.C.C.R., SEPULVEDA, R.V., PONTES, K.C.S. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness – a prospective clinical trial. *Revista Ceres*, v.59, p.446-451, 2012.
- FÍGUN, M.E., GARINO, R.R. Sistema dental. Anatomia odontológica funcional e aplicada, 3a ed. Rio de Janeiro, Panamericana. 451p, 1994.
- FUJIHARA, K.; KOTAKI,M.; RAMAKRISHNA,S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*, v.26, p.4139-4147, 2004.
- GAO, T.J.; LINDHOLM, B.; KOMMONEN, P.; RAGNI, P.; PARONZINI, A.; LINDHOLM, T.C. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implant in sheep diaphyseal defects. *Biomaterial*, v.16, p.1175-1179, 1995.
- HARVEY,C.E.; EMILY,P.P. Small Animal Dentistry. Saint Louis, Mosby. 1994. 413 pp.
- IWATA, T. , MASAYUKI YAMATO, M., TSUCHIOKA, H., TAKAG, R., MUKOBATA, S.,WASHIO, K., OKANO, T., ISHIKAWA, I. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*, v.30, p. 2716-2723, 2009.
- KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v.23, n.4, p.518-522, 2000.
- KINOSHITA,Y., MATSUO, M., TODOKI,K., OZONO, S., FUKUOKA, S., TSUZUKI, H., NAKAMURA, M., TOMIHATA, K., SHIMAMOTO, T., IKADA, Y. Alveolar bone regeneration using absorbable poly(L-lactideco-ε-caprolactone)/b-tricalcium phosphate membrane and gelatin sponge incorporating basic fibroblast growth factor. *Inter. Journal of Oral & maxillofacial surgery*, v.37, p.275-281, 2008.
- LEGENDRE, L. Intraoral acrylic splints for maxillofacial fracture repair. *Journal of Veterinary Dentistry*, v.20, p.70-78, 2003
- LEKOVIC,V., KLOKKEVOLD,P.R, KENNEY,E.B., DIMITRIJELIC,B., NEDIC,M., WEINLAENDER, M. Histologic Evaluation of Guided Tissue Regeneration Using 4 Barrier Membranes: A Comparative Furcation Study in Dogs. *Journal of Periodontology*, v. 69, p.54-61, 1998.

- LISTGARTEN, M.A. Histology of the periodontium: site. Disponível em: <http://www.dental.pitt.edu/informatics/periohistology/>. Acesso em 05 jul. 2013.
- MACEDO, T.C.N.; CRUZ, S.S.; SOLEDADE, K.R.; TRINDADE, S.C.; SARMENTO, V.A. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. *Odonto Ciência*, v.21, p.77-81, 2006.
- MARTINEZ, M.M.M, BORGES, A.P.B., VARGAS, M. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita – lignina implantado en tibia de conejos. *Rev. MVZ Cordoba*, v.14, p.1624-1632, 2009.
- PIHLSTROM, B.; MICHALOWICZ, B.; JOHNSON, N. Periodontal Diseases. *Lancet*, v.366, p.1809-1820, 2005.
- REIS, E.C.C. ; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; MARTINEZ, M.M.M.; ELEOTÉRIO, R.B.; MORATO, G.O.; OLIVEIRA, P.M. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 817-826, 2010.
- REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B; ARAUJO, M.V.F.; MENDES, V.C.; GUAN,L.; DAVIES,J.E. Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct. *Biomaterials*, v.32, p.9244-9253, 2011
- REZWAN K, CHEN QZ, BLAKER JJ, BOCCACCINI AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; v. 27, p. 3413-3431
- RORIZ, V.M., SOUZA, S.L., TABA, M., PALIOTO,D.B. Treatment of class III furcation defects with expanded polytetrafluoroethylene membrane associated or not with anorganic bone matrix/synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology*, v.77, p.490-497, 2006.
- SANTOS, L.C.. Compósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães. 2012. 60f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SELVIG, K.A. Discussion: Animal models in reconstructivetherapy. *J Periodontol*; v.65, p.1169-1172, 1994

SILVA, E.C.,BORGES, A.P.B., NEVES, C.D., CARLO, E.C.,BARROS, R.E., HAGE, M.C.F.N.S., SOUZA, R.L., SOUZA, M.A., BARUD,H.S., BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zootecnia, v.64, p. 873-880, 2012.

TAMPIERI, A.; CELLOTI,G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO,A.; FRANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. Biomaterials, v. 22, n.11, p.1365-1370, 2001.