

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCOMAXILOFACIAL**

**ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO NAS FRATURAS DE ÂNGULO MANDIBULAR
COM FIXAÇÃO INTERNA RÍGIDA - ESTUDO EM COELHOS**

GLEISSE WANTOWSKI

Porto Alegre
2007

Gleisse Wantowski

**ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO NAS FRATURAS DE ÂNGULO MANDIBULAR
COM FIXAÇÃO INTERNA RÍGIDA - ESTUDO EM COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira
-Orientador-

Profa. Dra. Marina de Oliveira Ribas
-Co-orientadora-

Porto Alegre

2007



Dedicatória

*À Deus, por me dar o dom da Vida...
Por me fazer errar e compreender, que é errando que se aprende
verdadeiramente...
Por me proteger nos caminhos tortuosos da vida, me deixando cair, mas me
estendendo a mão para que me levantasse e seguisse adiante...
Por me amparar nos momentos de angústia...
Por me ensinar a amar e a me sentir amada...
Por me dar dignidade para lutar pelo meu Ideal...*

*"Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve.*

*A VIDA É MUITO
para ser insignificante"*

Charles Chaplin



Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu Pai **João Sebastião Wantowski** e a minha Mãe **Ilse Tureck Wantowski** por todo o apoio e carinho dedicados nestes anos, e por me dar a oportunidade de realizar meus sonhos. Amo muito vocês!!!

À minha irmã **Rosclair Wantowski** pelo seu incansável apoio, amparo e carinho nos meus momentos mais difíceis. Suas palavras sempre serão um afago para meu coração, muito obrigada!

Aos meus irmãos **Ignaur e Erikson Wantowski** e aos meus sobrinhos e afilhados **Sabrina, Vítor, Marina, Sólon e João Luiz**, por fazerem parte da minha vida, renovando a cada dia o verdadeiro sentido da família!

Aos meus padrinhos **Antônio e Zica Muench**, por todo o afeto e atenção. Ao Professor **Doutor Antônio Muench** por toda a ajuda com a parte estatística deste trabalho, meu sincero agradecimento e admiração.

À minha tia **Inês Floriani** e aos meus primos **Marnes e Marco** por todo o carinho.

Ao **Daniel Augusto Gaziri** por estar ao meu lado nestes dois anos. Serei eternamente grata por toda a sua ajuda e o seu apoio!

À minha amiga **Tânia Gomes Segatto Faria** e a sua família por toda a ajuda durante estes dois anos. Obrigado por todo o apoio.

À minha amiga **Carla Bonfim Propst** e a sua família por todo o carinho e incentivo.

Aos meus amigos **Anderson Noboru Tsumanuma e Melissa Rodrigues Araújo** pela amizade e pela presença constante, ainda que a distância.

Às minhas amigas de Rio Negrinho, em especial à minha prima **Katelyn Wantowsky** por me mostrarem a cada dia o verdadeiro sentido da amizade.

À Professora Doutora **Marina de Oliveira Ribas**, minha grande incentivadora dentro da Cirurgia, por me acompanhar especialmente nestes últimos quatro anos com tanta dedicação. Agradeço-lhe de coração por me acompanhar em mais este trabalho, por todos os ensinamentos, orientação e compreensão a mim dispensadas.

Ao meu orientador Professor Doutor **Rogério Belle de Oliveira**, pela confiança em minha capacidade e pelo apoio no desencadeamento deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora **Daniela Nascimento Silva** por ter acreditado no meu trabalho, meu muito obrigado por todo o incentivo, apoio e dedicação oferecidos neste período de crescimento profissional.

Ao Professor Doutor **Cláiton Heitz** por ter contribuído muito para o enriquecimento dos meus conhecimentos científicos e pessoais.

Ao **Professor Doutor Rogério de Miranda Pagnoncelli** pelos ensinamentos e pela contribuição a este trabalho.

Aos meus colegas de turma **André, Ângelo, Carlos, Daniel, Gisela, Giuliano e Simone**, meus companheiros desta caminhada.



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, em nome do seu atual diretor, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, pela oportunidade de ter realizado este tão bem conceituado curso.

Ao **Ministério da Educação**, por meio da **CAPES**, por acreditar e investir nos alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS e contribuir para a formação de novos docentes e pesquisadores.

À **Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa**, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS e ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, coordenador da área de concentração CTBMF.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS: **Dr. Cláiton Heitz, Dr. Rogério Belle de Oliveira, Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, Dr. Manoel Sant'Ana Filho, Dra. Daniela Nascimento Silva, Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, Dra. Karen Cherubini, Dra. Liliane Yurgel, Dra. Nilza Pereira da Costa e Dra. Elaine Bauer Veeck** pelos preciosos ensinamentos técnico-científicos.

Ao Professor Doutor **Antônio Carlos**, *in memoriam*, por viabilizar a parte densitométrica e ao Professor Doutor **Rodolfo Schneider** por toda a prestatividade com na interpretação dos dados deste trabalho.

Ao Professor Doutor **Roberto Hübler** e aos colegas **Renata Renz e Alexandre Cunha** pelos ensaios mecânicos, por toda a colaboração e apoio.

Ao Professor Doutor **Manoel Sant'Ana Filho**, pela disponibilidade de colaborar com a análise microscópica deste trabalho.

Ao meu amigo **Rodrigo Cardoso**, pela colaboração na fase operatória deste trabalho.

A minha amiga **Karis Barbosa Guimarães** pela amizade e apoio.

Aos colegas **Alexandre Cunha**, **Renata Renz** e ao **Professor Doutor Roberto Hübler** por toda a atenção e apoio com a realização dos testes mecânicos deste trabalho.

especialmente ao **Mizael** e ao **Doutor Indalécio** atenção e cuidado com os animais deste experimento.

À **Ana Paula Camargo Martins** funcionária da patologia da PUCPR, pela preparação das lâminas do estudo histológico.

À **Miriam**, funcionária do CEMM da PUCRS, pela essencial ajuda na tomada das imagens por microscopia eletrônica de varredura.

À **Vanessa**, funcionária do laboratório de patologia da PUCRS pela compreensão e colaboração para a leitura das lâminas.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS** e do **Hospital São Lucas da PUCRS**, em especial os funcionário de **sexto sul** e à **Sandra**, muito obrigado por toda a ajuda durante o curso.

Aos **legítimos e verdadeiros amigos**, que próximos ou distantes, estiveram comigo, torcendo para que alcançasse este objetivo. A vocês o meu muito obrigado!

*Que eu faça de mim sereno dentro de minha própria turbulência,
Sábio dentro dos meus limites pequenos e inexatos,
humilde diante de minhas grandezas tolas e ingênuas...*

*Permita-me ensinar o pouco que sei
e aprender o muito que não sei,
traduzir o que os mestres ensinaram e compreender a alegria com que os simples
traduzem suas experiências...*

*Respeitar incondicionalmente o ser, o ser por si só,
por mais nada que possa ter além de sua essência!*

Gregory Colbert



RESUMO

O presente estudo teve por objetivo investigar macroscopicamente e microscopicamente o processo do reparo ósseo no local da fratura mandibular em coelhos da linhagem Nova Zelândia, com atenção às miniplacas e aos parafusos de titânio (Neoortho®), empregados como material de fixação, em diferentes períodos de tempo. Para a amostra foram selecionados 18 coelhos machos da linhagem Nova Zelândia, com peso até 4000 gramas, distribuídos aleatoriamente em três grupos, de acordo com o período de tempo de observação dos animais. Foram efetuadas osteotomias unilaterais em região de ângulo mandibular, fixadas por uma miniplaca e quatro parafusos de titânio. Os animais foram mortos aos 30, 60 e 90 dias. Os resultados obtidos demonstram que, macroscopicamente, o sistema de fixação foi capaz de manter os segmentos ósseos na posição desejada, sem propiciar complicações como processos infecciosos ou pigmentação aos tecidos moles adjacentes. Histologicamente pode-se afirmar que o calo fibroso esteja estabelecido aos 30 dias e o calo ósseo aos 60 dias. O colágeno tipo I, maduro, é predominante na linha de reparo da fratura óssea, especialmente ao período de 60 dias, entretanto a densidade do colágeno tipo II é maior. Em torno das perfurações estes índices mantem-se proporcionais. O titânio induz ao intenso crescimento ósseo aposicional, sem apresentar potencial de dissolução nos tecidos adjacentes, ou complicações que indiquem sua remoção. Os índices de cálcio pouco variados entre os períodos de tempo sugerem que estabelecido o reparo da fratura, o calo ósseo seja composto por osso corticalizado, de densidade mineral padrão. O sistema por placas e parafusos de titânio se mostrou eficaz para o tratamento das fraturas de ângulo mandibular.

Fixação maxilo-mandibular; técnica de fixação maxilar; fratura facial; modelo animal; mini-placas ósseas e parafusos ósseos.³

³ DeCS – Descritores em Ciências da Saúde – Bireme - Brasil



Abstract

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate, through macroscopic and microscopic analysis the bone repair process in mandibular fractures in rabbits, lineage New Zealand, with especial attention to the titanium plates and screws (Neoortho®), applied as material fixation. For the sample 18 males rabbits were used, with weight maximal to 4000 grams, randomly distributed in three groups, in accordance with the period of observation time. The death of the animals occurred on the 30th, 60th, 90th days. The obtained results demonstrate that, macroscopically the bone fixation system was able to maintain the bone segments in the expected position, without complications associated as healing problems or soft tissue pigmentation. The histological founds may suggest that the fibrous callus is established to the 30 days and the bone callus to the 60 days. The collagen type I, ripe, is predominant in the line of bone repair, especially to the period of 60 days; however the density of the collagen type II is larger. Around the screws the collagen type does not vary accordance with the periods of time. The titanium induces intensive appositional bone growth, without presenting dissolution potential in the soft tissues around the implants surfaces, or complications that indicate a latest removal. The little varied indexes of calcium among the periods of time suggest that established the repair of the fracture, the bone callus is composed by mature bone, which presents a standard mineral density. The system for plates and screws of titanium was shown effective for the treatment of the fractures of mandibular angle in rabbits.

Maxillomandibular fixation; jaw fixation technics; facial fracture; animal model; bone plates; bone screws; internal fixators.²

² MeSH – Medical Subject Headings – National Library of Medicine - USA



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Administração do Anestésico Endovenoso na veia auricular esquerda-----	65
Figura 2- Tricotomia da região do ângulo esquerdo da mandíbula-----	65
Figura 3- Anti-sepsia da pele do animal com álcool iodado 0,5% e o isolamento do campo operatório com campo cirúrgico fenestrado-----	66
Figura 4- Incisão longitudinal de aproximadamente 3,0 cm de extensão na pele e no tecido subcutâneo-----	66
Figura 5- Divulsão do periósteo até a visualização de todo a região de ângulo mandibular-----	67
Figura 6- A osteotomia executada por peça de mão reta, com uma broca tronco-cônica número 701, para promover a linha de fratura na mandíbula-----	67
Figura 7- Adaptação da placa do sistema 2.0 e 4 parafusos com 2,0 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento-----	68
Figura 8- Síntese do periósteo por pontos simples, e da ferida operatória pela técnica contínua simples-----	68
Figura 9- Peça operatória obtida do ângulo mandibular esquerdo após remoção do material da placa e dos parafusos-----	70
Figura 10- Peça operatória obtida do ângulo mandibular esquerdo e encaminhada ao CEMM para metalização em ouro-----	70
Figura 11: Delimitação das áreas de neoformação óssea (NO) e das fibras colágenas (FC) através do programa Image Tool com auxílio do cursor do mouse. A área é calculada automaticamente, através do programa Image Tool Scripting. Coloração por HE; ampliação original, 40X-----	76
Figura 12: Regiões seqüenciais (A, B, C, D) ao longo da linha de reparo da fratura óssea-----	76
Figura 13: Peça operatória do período de 30 dias apresentando linha de fratura definida e discreto recobrimento do material de fixação-----	81
Figura 14: Peça operatória do período de 60 dias apresentando reparo ósseo da linha de fratura e moderado recobrimento do material de fixação-----	81
Figura 15: Peça operatória do período de 90 dias apresentando intenso recobrimento do material de fixação-----	81

- Figura 16: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se entre os bordos do tecido cortical (TC), trama de fibras colágenas (FC), atividade angiogênica (AA), atividade osteoclástica (OC) na linha de fratura óssea (LF). Aumento de 400X. Coloração HE----- 85
- Figura 17: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se neoformação óssea (NO) e trama de fibras colágenas (FC). Aumento de 400X. Coloração HE----- 85
- Figura 18: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se em torno das perfurações o tecido cortical (TC) neoformado, trama de fibras colágenas (FC) e atividade osteoclástica (OC). Aumento de 400X. Coloração HE----- 86
- Figura 19: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se em torno das perfurações tecido medular (TM), trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e atividade angiogênica (AA). Aumento de 400X. Coloração HE- 86
- Figura 20: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se na linha de fratura o tecido cortical (TC), trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 88
- Figura 21: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se na linha de fratura tecido cortical (TC), preenchido por uma trama de fibras colágenas (FC), atividade angiogênica (AA) e início da neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 88
- Figura 22: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se em torno da perfuração uma trama de fibras colágenas (FC) circular, atividade angiogênica (AA), atividade osteoclástica (OC) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 89
- Figura 23: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se em torno da perfuração uma trama de fibras colágenas (FC) e neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 89
- Figura 24: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se na linha de reparo da fratura, uma trama de fibras colágenas (FC) orientadas e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 91
- Figura 25: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC), atividade osteoblástica (OB) e tecido cortical (TC). Aumento de 400X. Coloração HE----- 91
- Figura 26: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se em torno da perfuração a trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoblástica (OB) e tecido cortical (TC). Aumento de 400X. Coloração HE----- 92
- Figura 27: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se em torno da perfuração trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE----- 92

Figura 28: Imagem de corte histológico do grupo I região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	96
Figura 29: Imagem de corte histológico do grupo I região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	96
Figura 30: Imagem de corte histológico do grupo II região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	97
Figura 31: Imagem de corte histológico do grupo II região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	97
Figura 32: Imagem de corte histológico do grupo III região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	98
Figura 33: Imagem de corte histológico do grupo III região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR-----	98
Figura 34: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se perfuração 2 (P2), osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3), linha de fratura (LF). Aumento de 32X-----	108
Figura 35: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se a lacuna correspondente à linha de fratura. Aumento 100X-----	108
Figura 36: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se osso maduro (OM), osso imaturo (OI) e a linha de fratura (LF). Aumento de 200X-----	109
Figura 37: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se osso maduro (OM), osso imaturo (OI) repleto de osteoblastos. Aumento de 400X-----	109
Figura 38: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se a perfuração 4 (P4) e as espiras do parafuso (EP). Aumento de 50X-----	110
Figura 39: Eletromicrografia do grupo I. Observam-se as espiras do parafuso (EP) e osteoblastos (OB). Aumento de 400X-----	110
Figura 40: Eletromicrografia do grupo I. Observam-se através da análise por EDS elementos de Carbono (C), Oxigênio (O), Fósforo (P), Cálcio (Ca)-----	111
Figura 41: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se perfuração 2 (P2), osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3), linha de fratura (LF). Aumento de 32X-----	113
Figura 42: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se o osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3) e linha de fratura (LF). Aumento de 32X-----	113

Figura 43: Eletromicrografia do grupo II em BSE. Observa-se a linha de fratura (LF) e o canal de Havers (CH). Aumento de 65X-----	114
Figura 44: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se a perfuração 1 (P1), as espiras do parafuso (EP) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 100X-----	114
Figura 45: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se, as espiras do parafuso (EP) e células osteoblásticas (OB). Aumento de 400X-----	115
Figura 46: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se a neoformação óssea (NO). Aumento de 1000X-----	115
Figura 47: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se através da análise por EDS elementos de Carbono (C), Ouro (Au), Potássio (K) e Cálcio (Ca)-----	116
Figura 48: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a perfuração 2 (P2), a perfuração 3 (P3), o crescimento em torno da placa (PL) e a linha da fratura (LF). Aumento de 32X-----	118
Figura 49: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a perfuração 2 (P2), a perfuração 3 (P3), o crescimento em torno da placa (PL) e a linha da fratura (LF). Aumento de 26X-----	118
Figura 50: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a linha da fratura (LF) e as áreas de neoformação óssea. Aumento de 400X-----	119
Figura 51: Eletromicrografia do grupo III em BSE. Observa-se a perfuração 2 (P2) e as áreas de neoformação óssea (NO). Aumento de 51X-----	119
Figura 52: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se através da análise por EDS elementos de Oxigênio (O), Ouro (Au) e Cálcio (Ca)-----	120
Figura 53: Eletromicrografia da placa de titânio. Observa-se a placa de titânio (PL) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 48X-----	122
Figura 54: Eletromicrografia da placa de titânio. Observa-se a cabeça do parafuso (CP) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 66X-----	122
Figura 55: Eletromicrografia da placa de titânio do grupo III. Observa-se a placa de titânio (PL), a neoformação óssea (NO) e o defeito criado pela broca (DB). Aumento de 37X-----	123
Figura 56: Eletromicrografia da placa de titânio do grupo III. Observa-se a superfície íntegra (SI Ti) e o defeito criado pela broca (DB). Aumento de 1435X-----	123
Figura 57: Análise densitométrica do grupo I-----	125
Figura 58: Análise densitométrica do grupo II-----	126
Figura 59: Análise densitométrica do grupo III-----	127



LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Médias (escores) e teste de Kruskal-Wallis* da avaliação macroscópica de reparo ósseo, nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias-----	82
Tabela 5.2: Médias (escore) e teste de Kruskal-Wallis* da avaliação macroscópica do crescimento ósseo aposicional, nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias-----	83
Tabela 5.3: Médias* (mm^2) do reparo ósseo e fibras colágenas na linha de fratura com coloração HE-----	93
Tabela 5.4: Análise de variância da área total dos colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração SR-----	100
Tabela 5.5: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração SR, correspondente ao fator tipo de colágeno-----	100
Tabela 5.6: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração SR, correspondente à interação tipo de colágeno x região-----	101
Tabela 5.7: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração SR, correspondente à interação período de tempo x tipo de colágeno x região-----	101
Tabela 5.8: Análise de variância da densidade total de colágeno, distribuído nas perfurações e na linha de fratura, com coloração SR-----	104
Tabela 5.9: Médias* (μm) da densidade total de colágenos distribuído nas perfurações e linha de fratura, com coloração SR, correspondente ao fator tipo de colágeno-----	104
Tabela 5.10: Médias* (μm) da densidade total de colágenos, distribuídos nas perfurações e na linha de fratura, com coloração SR, correspondente à interação período de tempo x tipo de colágeno x região-----	105
ANEXO E- Tabela da Avaliação Macroscópica (escores)-----	156
ANEXO F - Reparo ósseo na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)-----	157
ANEXO G - Fibras colágenas na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)-----	158
ANEXO H – Área total do colágeno distribuído nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração SR (μm^2)-----	159
ANEXO I – Densidade total do colágeno distribuído nas perfurações e na linha de fratura, com coloração SR (μm^2)-----	160



Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Observa-se pouca diferença entre o reparo ósseo e os períodos de tempo-----	82
Gráfico 2: Observa-se diferença entre as médias do crescimento ósseo aposicional entre os períodos de tempo, especialmente entre 30 e 90 dias-----	83
Gráfico 3: Médias* (mm ²) do reparo ósseo na linha de fratura, observando evidência de reparo ósseo mais acentuado no período de tempo de 60 dias para as regiões A, B e D-----	94
Gráfico 4: Médias* (mm ²) das fibras colágenas na linha de fratura, observando evidência de deposição mais acentuada no período de tempo de 30 dias para as regiões A, B e D-----	94
Gráfico 5: Predominância significativa do colágeno tipo I maduro-----	100
Gráfico 6: Predominância do Colágeno Tipo I em torno das perfurações e na linha de reparo da fratura óssea-----	101
Gráfico 7: Pouca expressividade estatística dos tipos de colágeno em torno das perfurações-----	102
Gráfico 8: Maior significância do colágeno tipo I aos 90 dias, na linha da fratura-----	102
Gráfico 9: Maior significância da densidade do colágeno tipo II-----	105
Gráfico 10: Discreta predileção da densidade do colágeno tipo II no período de 30 dias, em torno das perfurações-----	106
Gráfico 11: Densidade mais acentuada do colágeno tipo I e II no período de 60 dias, na linha da fratura-----	106



Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

EDX	Energy-dispersive X-ray
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
HA	Hidroxiapatita
LC-DCP	Limited contact dynamic compression plate
Ti	Titânio
ASIF	Association for the Study of Internal Fixation
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CEMM	Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálises
SE	Scattering electron
BSE	Backscattering electron
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
HE	Hematoxilina-eosina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEP	Comitê de ética em pesquisa
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
BMD	Bone Mineral Density
BMC	Bone Mineral Content
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa



Lista de Siglas e Símbolos

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

TiO ₂	Óxido de Titânio
NaOH	Hidróxido de cálcio
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio
Ca	Cálcio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Kg	Kilograma
Gr	Gramma
Mg	Micrograma
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
nm	Nanômetro
Kv	Kilovoltagem
cm ²	Centímetro quadrado
gr	Gramma
Hz	Hertz
X	Vezez



Sumário



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO -----	33
2 REVISTA DA LITERATURA -----	35
2.1 Tecido ósseo e bases biológicas para reparo ósseo-----	35
2.2 Fixação interna rígida-----	41
2.3 Análise clínica da estabilidade dos sistemas de fixação rígida-----	44
2.4 Análise da superfície por microscopia óptica-----	45
2.5 Análise da superfície por microscopia eletrônica de varredura-----	49
2.6 Análise da superfície através da densitometria-----	53
3 PROPOSIÇÃO -----	57
4 METODOLOGIA -----	59
4.1 Respaldo ético da pesquisa-----	59
4.2 Caracterização-----	59
4.3 Paradigma-----	59
4.4 Questões da pesquisa-----	60
4.5 Hipótese-----	60
4.6 Configuração da amostra-----	60
4.7 Organização dos grupos-----	61
4.8 Critérios de inclusão / exclusão-----	61
4.9 Técnica cirúrgica-----	62
4.10 Morte dos animais e obtenção da amostra-----	69
4.11 Preparo do material para avaliação por microscopia óptica-----	71
4.12 Preparo do material para avaliação por microscopia eletrônica de varredura-----	72
4.13 Preparo do material para avaliação por densitometria óssea-----	72
4.14 Análise dos resultados-----	73
4.15 Análise Estatística-----	78
5 RESULTADOS -----	80
6 DISCUSSÃO -----	129
7 CONCLUSÕES -----	143
REFERÊNCIAS -----	145
ANEXO A – Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS -----	151
ANEXO B- Protocolo do Comitê de Ética no uso de Animais da PUCPR -----	152
ANEXO C – Normas para prática didático-científica da vivisseção de animais ---	153

ANEXO D – Declaração de permissão de utilização dos Aparelhos de Densitometria e de Mamografia do Hospital São Lucas da PUCRS-----	155
ANEXO E- Tabela da Avaliação Macroscópica (escores)-----	156
ANEXO F - Reparo ósseo na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)-----	157
ANEXO G - Fibras colágenas na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)-----	158
ANEXO H – Área total do colágeno distribuído nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração <i>Sirius-red</i> (μm^2)-----	159
ANEXO I – Densidade total do colágeno distribuído nas perfurações e na linha de fratura, com coloração <i>Sirius-red</i> (μm^2)-----	160



Introdução



1 INTRODUÇÃO

As miniplacas desenvolvidas por Luhr e colaboradores no ano de 1967 trouxeram um grande desenvolvimento para a fixação das fraturas e osteotomias do esqueleto facial (YAREMCHUCK *et al.*, 1995). A partir de então, vários sistemas de fixação interna rígida surgiram no mercado, a fim de restaurar a forma e a função dos ossos fraturados ou deformados.

O titânio tem sido largamente utilizado como material para implantes dentários, na fixação maxilofacial e nas cirurgias ortopédicas, pelas suas excelentes propriedades mecânicas e químicas, e pela sua biocompatibilidade (LONGE *et al.*, 1998).

Miniplacas metálicas são utilizadas para a estabilização das fraturas nos ossos da face, mas a decisão de se manter o material de fixação *in situ* deve ser determinada por diversos fatores, entre eles a biocompatibilidade do implante, a dificuldade no acesso cirúrgico e a escolha do paciente. As implicações financeiras e o risco cirúrgico de uma segunda intervenção para a remoção do material também devem ser considerados. Na ausência de sintomatologia clínica os implantes poderiam ser mantidos (TORGERSEN *et al.*, 1994).

As fraturas do ângulo mandibular em especial, são as que apresentam maior índice de complicações, dentro das fraturas mandibulares, pois a biomecânica do ângulo dificulta o tratamento nesta região. A fixação interna rígida tem sido empregada com sucesso no tratamento das fraturas faciais durante as duas últimas décadas (SIDDIQUI *et al.*, 2007) de acordo com os princípios estabelecidos por MICHELET *et al.* (1973) e CHAMPY *et al.* (1978).

O tecido ósseo possui uma capacidade reparadora adequada e, em muitas situações, é capaz de restabelecer perfeitamente a estrutura arquitetônica e as propriedades mecânicas, através de um processo complexo

que envolve atividade local e sistêmica do organismo. A extensão e a velocidade do reparo dependem da localização anatômica, do agente etiológico, das dimensões da lesão, além das características biológicas de cada indivíduo. No entanto, a capacidade reparativa do osso tem limites e também pode falhar, caso certas condições não forem atendidas. Fatores determinantes como falhas de vascularização e instabilidade mecânica podem dificultar ou até mesmo impedir o adequado reparo ósseo (PINHEIRO *et al.*, 2006).

As perdas ósseas promovidas por fraturas faciais ou processos patológicos do complexo estomatognático levam à constante busca pelo aprimoramento de técnicas e materiais, capazes de promover o reparo efetivo do tecido lesado. Apesar de conhecida, a cicatrização óssea promovida pelas placas e parafusos de titânio, empregados como sistema de fixação interna rígida, ainda é questionada na literatura, especialmente quanto à permanência do material após o período de consolidação óssea.

Os objetivos deste estudo são investigar macroscopicamente e microscopicamente, o reparo da fratura óssea em ângulo mandibular de coelhos, em diferentes períodos de tempo e, avaliar a inocuidade do titânio implantado, considerando as reações físicas e biológicas nos tecidos ósseos adjacentes.



2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS PARA REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido mineralizado rígido, de origem conjuntiva, que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto, apresentando propriedades mecânicas e biológicas distintas e diferenciáveis. Ao lado do excelente comportamento mecânico, o osso exibe um excelente potencial de reparo (SCHENK, 1996).

O tecido ósseo serve de suporte e proteção para as partes moles e os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, constituindo, assim, um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O tecido esquelético calcificado é composto por uma matriz extracelular que contém tanto moléculas orgânicas, quanto cristais de hidróxiapatita. A presença desta porção mineral faz do osso um tecido de características singulares, não apenas pelo ponto de vista da biosíntese, mas também pela ação catabólica. A quantidade de tecido ósseo presente durante a fase de crescimento fisiológico e na remodelação, presente na fase adulta são determinadas pelo equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (LERNER, 2000).

A matriz orgânica do osso é constituída principalmente por colágeno tipo I, glicoproteínas sulfatadas e algumas proteoglicanas. A matriz colágena é

calcificada com cristais de hidróxiapatita, tornando o osso uma das substâncias mais duras do corpo (GARTNER e HIATT, 2002).

Diversos tipos celulares compõem o tecido ósseo, dentre os quais:

- *células osteoprogenitoras*: é considerada uma célula de repouso ou de reserva que pode ser estimulada para se transformar em um osteoblasto e produzir matriz óssea (ROSS *et al.*, 1993).

- *osteoblastos*: são células cúbicas e cilíndricas baixas, responsáveis pela síntese da matriz óssea. À medida que produzem a matriz óssea, ficam rodeados por esta matriz e, então, se tornam osteócitos. Quando os osteoblastos estão quiescentes, eles perdem grande parte da maquinaria da síntese protéica e se assemelham às células osteoprogenitoras (GARTNER e HIATT, 2002).

- *osteócitos*: são células discóides, achatadas, localizadas em lacunas, e são responsáveis pela manutenção do osso. Seus prolongamentos citoplasmáticos entram em contato e formam junções comunicantes com prolongamentos de outros osteócitos no interior dos canalículos (GARTNER e HIATT, 2002).

- *osteoclastos*: são células multinucleadas derivadas dos monócitos; eles são responsáveis pela reabsorção óssea. A cooperação entre osteoclastos e osteoblastos é responsável não só pela formação, remodelação e reparo do osso, mas pela manutenção, a longo prazo, da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo (GARTNER e HIATT, 2002).

O osso compacto maduro é constituído por cerca de 70% de sais inorgânicos e 30% de matriz orgânica por peso. O colágeno constitui mais de 90% do componente orgânico, sendo o remanescente proteoglicanos da substância fundamental e um grupo de moléculas não-colágenas que parecem estar implicadas na regulação da mineralização do osso. O colágeno do osso representa cerca da metade do colágeno corporal total e está quase que exclusivamente sob a forma das fibras do tipo I (YOUNG e HEATH, 2000).

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, constituindo o endóstio e o perióstio,

respectivamente. A camada mais superficial do periósteo contém, sobretudo, fibras colágenas e fibroblastos (BURKITT *et al.*, 1997).

Na sua porção mais profunda, o periósteo é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras, morfologicamente parecidas com os fibroblastos. As células osteoprogenitoras multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando importante papel no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endósteo é, em geral, constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas, revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann (BURKITT *et al.*, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Os osteoblastos que finalizaram seu processo de diferenciação formam uma camada unicelular, que recobre o osso compacto e o osso esponjoso. Estes osteoblastos podem ser ativados para a produção de tecido ósseo, permanecer inativos na camada unicelular ou, podem ser envolvidos nas etapas iniciais da reabsorção óssea. Os osteoclastos que irão promover a reabsorção óssea deverão penetrar nesta camada de osteoblastos para atingir a superfície óssea. Portanto, o processo de mineralização não acontece na camada unicelular dos osteoblastos, mas em uma camada de osso não mineralizado que sempre será mantida entre os osteoblastos e o osso mineralizado, chamado de osteóide (VAES, 1988). Como somente os osteoclastos são capazes de promover a reabsorção do tecido ósseo mineralizado, tanto a penetração de osteoblastos através da camada unicelular quanto à remoção do osteóide são necessários para que o processo da remodelação óssea ocorra (LERNER, 2000).

Não apenas durante o desenvolvimento esquelético, mas também por toda a vida, células advindas da linhagem dos osteoblastos sintetizam e secretam determinadas moléculas que desencadeiam e controlam a diferenciação dos osteoclastos (DUCY *et al.*, 2000). As alterações promovidas no fenótipo dos osteoblastos permitem a secreção de enzimas proteolíticas, as quais degradam a matriz extracelular constituída pelos osteócitos, além de estimularem a diferenciação das células progenitoras mononucleares dos

osteoclastos, presentes no periósteo, transformando-as em osteoclastos ativos multinucleares, para que, assim, possam iniciar o processo de reabsorção do tecido ósseo (LERNER, 2000).

A atividade osteoclástica é essencial para o processo fisiológico de reabsorção do osso durante o crescimento e a remodelação do esqueleto. Os osteoclastos também desenvolvem papel primordial na manutenção dos níveis de cálcio no organismo. Se esta atividade osteoclástica estiver acelerada, poderá induzir à perda excessiva de tecido mineralizado em patologias como a osteoporose, artrite reumatóide, periodontite e doenças malignas. Esta atividade osteoclástica pode ainda estar diminuída, quer seja pelo decréscimo do número de osteoclastos ou da atividade propriamente, como nas doenças osteopetróticas (LERNER, 2000).

Os sistemas *haversianos* desenvolvem-se no osso compacto, que pode ter sido formado a partir de osso esponjoso fetal, por deposição direta de osso compacto adulto (lamelas circunferenciais em osso adulto) ou pode ser osso compacto antigo constituído por sistemas *haversianos* e lamelas intersticiais. Em qualquer modalidade, é feito um túnel através do osso compacto pelos osteoclastos. À medida que este túnel vai se formando, começa quase que imediatamente, a deposição de tecido ósseo em suas paredes. Os dois aspectos da atividade celular são organizados como unidade de *remodelação óssea* (ROSS *et al.*, 1993).

A formação óssea depende de dois pré-requisitos: suprimento vascular e amplo suporte mecânico. Os osteoblastos exercem suas atividades apenas nas proximidades adjacentes aos vasos sanguíneos (SCHENK, 1996).

O processo de reparo ósseo é descrito por três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Instala-se, assim, um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e

macrófagos, provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas (a exemplo da histamina e serotonina) no local lesionado. Esta fagocitose tem como objetivo iniciar a remoção do coágulo das regiões necrosadas e dos osteócitos mortos que surgem nas superfícies ósseas da região lesionada. Imediatamente após, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, reabsorvendo o coágulo e o tecido ósseo necrosado, surge, gradativamente, uma nova rede capilar, oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar rapidamente, um novo tecido ósseo no local, por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva, resultando em um osso imaturo. O calo ósseo tem uma textura própria, mais celular e menos mineralizada, indicando a rapidez do processo de ossificação e justificando a denominação de osso imaturo. Na fase remodeladora, o calo ósseo passa por uma série de processos de reabsorção e neoformação até que a região lesionada retome as características morfológicas, biomecânicas e funcionais, as quais possuíam antes da lesão. As atividades osteoblásticas e osteoclásticas removem os excessos de material do calo ósseo, restabelecendo as cavidades ósseas que existiam e reconstróem os sistemas de Havers e o trabeculado de osso esponjoso na mesma disposição anterior à lesão (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; POSPISILOVÁ, 1982).

A remodelação óssea fisiológica é um processo complexo que resulta na reabsorção do osso pré-existente de uma determinada área específica, seguida pela neoformação óssea (HILL e ORTH, 1998). Desta forma, o equilíbrio da massa óssea depende da interação entre esses dois processos (SWAMINATHAN, 2001).

O processo de reabsorção óssea inclui a dissolução dos cristais de hidróxiapatita e a quebra das proteínas da matriz óssea extracelular (LERNER, 2000). Morfologicamente e bioquimicamente, o processo de reabsorção óssea

inicia-se pela dissolução de componentes inorgânicos seguida da degradação da matriz óssea. Com a evolução deste processo, os componentes orgânicos são fagocitados através de vesículas, enquanto que, os componentes inorgânicos são conduzidos para o meio extracelular através da membrana celular (SALO *et al.*, 1997; LERNER *et al.*, 1997).

Atualmente o termo formação óssea é designado para descrever dois processos bem distintos. Originalmente, a formação óssea é definida pela manutenção da função osteoblástica, como por exemplo, a deposição da matriz óssea. A função tardia da formação óssea, no entanto, ocorre na fase adulta a fim de se manter constante o índice de massa óssea, durante o processo de remodelação (KARSENTY, 2000).

Entende-se por regeneração a substituição das células lesadas por outras de mesma morfologia e função. No tecido ósseo, defeitos com dimensões pequenas reparam-se com facilidade sem deixar cicatriz fibrosa, em virtude de dispor de mecanismo reparador semelhante ao da osteogênese embriológica (SEAL *et al.*, 2001).

2. 2 FIXAÇÃO INTERNA RÍGIDA

A fixação interna rígida através de placas, parafusos, pinos e similares tem sido aplicada por alguns anos. Esta técnica se tornou mais praticável quando metais como o aço de alta qualidade, ligas de cromo-cobalto e o titânio passaram a ser empregados na indústria. A Associação para os Estudos da Fixação Interna Rígida (ASIF) foi criada com o propósito de se entender os fatores necessários para se fixar dois segmentos ósseos com rigidez, dispensando esplintagens externas (GRIFFTHS, 1978).

As miniplacas de titânio são frequentemente empregadas para promover a fixação entre os segmentos ósseos. Uma vez implantadas, estas placas normalmente são deixadas no local, pelas propriedades de biocompatibilidade

e resistência à corrosão do titânio. Estas características são próprias do titânio, que forma um filme denso, não-poroso e auto-regenerativo de óxido de titânio sobre a superfície, conhecido como lâmina passiva (TiO₂). Entretanto, outras placas como as de aço ou de *vitallium* (liga de cromo-cobalto) devem ser removidas pela presença de metais como cromo, níquel, molibdênio, outrora encontrados nos tecidos adjacentes (ROSENBERG *et al.*, 1993; MOBERG *et al.*, 1989).

As placas compressivas de contato dinâmico (LC-DCP) apresentam retenções entre os orifícios de entrada dos parafusos, na sua face inferior, permitindo uma redução no contato com a superfície óssea adjacente, diminuindo-se desta maneira, as alterações indesejadas ao aporte sanguíneo local. As LC-DCP são confeccionadas por puro titânio comercial (Ti), e tem sido utilizada como material de implante ósseo por mais de trinta anos (PERREN *et al.*, 1990). Alguns autores afirmam que as placas de titânio deveriam ser removidas, para permitir a adaptação fisiológica do osso e para prevenir reações de corpo estranho (FERGUSON *et al.*, 1960; MORAN *et al.*, 1991).

O objetivo do tratamento das fraturas mandibulares é a recuperação da forma e da anatomia pré-existent, função oclusal e estética facial. Ainda que estes objetivos possam ser alcançados com a redução fechada e o emprego do bloqueio maxilo-mandibular, fraturas em condições desfavoráveis requerem redução aberta e fixação. O método também pode ser indicado quando o bloqueio maxilo-mandibular não pode ser aplicado. Existem inúmeras situações em que esta técnica pode estar contra-indicada, ou parcialmente contra-indicada. Estas situações incluem pacientes portadores de epilepsia, alcoólatras, dependentes químicos, distúrbio respiratório obstrutivo crônico ou qualquer condição em que as vias aéreas possam estar comprometidas (KURIAKOSE *et al.*, 1996).

Estudos de SHUBERT *et al.* (1997) demonstraram que a região de ângulo mandibular apresenta uma qualidade de osso mais delgada em relação ao osso do corpo, localizado anteriormente, e do ramo, localizado

posteriormente. Forças incidindo lateralmente, tendem a promover a fratura da região com menor secção transversa, no caso, o ângulo mandibular. Anatomicamente, esta região representa a confluência abrupta do corpo na posição horizontal, com o ramo vertical, submetendo a região a movimentos geométricos de incidência de força complexos, se comparados a superfícies lineares.

O benefício de esclarecer aos cirurgiões sobre o uso de novas tecnologias é essencialmente, proporcionar ao paciente a melhor terapia existente e auxiliar, para que as técnicas comumente utilizadas sejam reavaliadas (PIETRZAK *et al.* 1997).

Cabe ao cirurgião, como investigador de práticas clínicas, estar certo de que novos materiais, introduzidos no mercado, são seguros e eficazes

Dentre todas as fraturas ocorridas na mandíbula, as fraturas do ângulo mandibular são as que ocorrem mais frequentemente. A etiologia destes traumas pode estar associada à área de maior fragilidade do ângulo mandibular. (Existem diversas razões que poderiam explicar as freqüentes fraturas ocorridas na região do ângulo mandibular, dentre elas, 1) a presença do terceiro molar, 2) a espessura óssea mais delgada na direção do dente, 3) biomecanicamente o ângulo pode ser considerado como uma área de "alavanca" (ELLIS III, 1999).

LANDES *et al.* (2003) sintetizaram alguns requisitos para um sistema de síntese ideal:

- - ser facilmente adaptado e moldado.
- - ter um custo acessível.
- - possuir uma estabilidade suficiente para manter a fixação rígida.
- - possuir resistência suficiente para suportar a deformação pela movimentação.
- - ser biocompatível, sem causar reações adversas.
- - ser completamente reabsorvido, após o período de fixação.
- - ser delgado e não palpável através dos tecidos moles.

- - não propiciar reações inflamatórias nos tecidos moles à eventual exposição da placa.
- - ser compatível com terapias de radiação posteriores.
- - ser de fácil aplicabilidade, requerendo poucos instrumentais para sua inserção.

O objetivo primordial no desenvolvimento dos biomateriais para a ortopedia são implantes que promovam a indução controlada, guiada e rápida do reparo ósseo. Para acelerar este processo de reparo cicatricial normal, a inserção destes implantes deveria resultar na formação de uma camada interfacial com propriedades mecânicas adequadas. A fim de se alcançar estes objetivos, uma melhor compreensão dos eventos na interface entre o osso e o material se faz necessária, bem como o desenvolvimento de novos materiais, e de novas abordagens para promover a osseointegração (POPAT *et al.*, 2007).

Os modelos animais foram desenvolvidos para se testar o reparo ósseo através das técnicas de engenharia tecidual, simulando as situações clínicas reais. Diferentes estudos promovendo-se fraturas ósseas (fêmur, tíbia, mandíbula) em animais como cães, ovelhas, ratos e coelhos têm sido promovidos para se avaliar o processo de reparo ósseo, sob diferentes métodos de tratamento (CANCEDDA *et al.*, 2007).

2. 3 ANÁLISE CLÍNICA DA ESTABILIDADE DOS SISTEMAS DE FIXAÇÃO RÍGIDA

Uma fixação interna rígida eficiente deve ser biocompatível, promover o menor distúrbio para a vascularização óssea adjacente possível, e apresentar propriedades mecânicas adequadas durante o período de implantação (UNGERSBÖCK *et al.*, 1996).

Em estudo clínico com 281 casos de fixação interna rígida por placas compressivas (de aço e de titânio), ARENS *et al.* (1996) examinaram a

susceptibilidade de infecção prévia após a implantação do material. A diferença entre os grupos examinados foi estatisticamente insignificante, levando a concluir que, apesar de ainda não determinados, os fatores de risco para promover infecção, após redução aberta das fraturas e estabilização por placas compressivas, não parecem estar relacionados às características do implante como material, *design*, superfície e técnica.

KURIAKOSE *et al.* (1996) analisando comparativamente 266 fraturas mandibulares fixadas pelo sistema rígido (AO/ASIF) e pelo sistema de miniplacas, afirma que não foram observadas diferenças significativas quanto à restauração da função oclusal. As placas rígidas requerem abordagem extrabucal, propiciando maior risco de lesão ao nervo facial. A incidência de infecção com necessidade de reintervenção para remoção do material esteve mais presente no grupo das miniplacas. Fraturas cominutas de ângulo mandibular apresentaram melhores resultados, se estabilizadas pelo sistema rígido.

Analisando 274 osteosínteses empregadas na estabilização de fraturas mandibulares, JAQUES *et al.* (1997) afirmam que o sistema de fixação interna rígida tipo AO permite adequado reparo ósseo, com evidência de poucas complicações, e retorno rápido as funções mandibulares normais. O sistema rígido evita o emprego do bloqueio maxilo-mandibular, permitindo mobilização imediata da mandíbula e a recuperação precoce do paciente.

JOHANSSON *et al.* (1999) compararam a susceptibilidade bacteriológica de dois tipos de fixação interna rígida, as placas metálicas de aço e de titânio, através da inoculação de *Staphilococcus aureus* em tíbias de coelhos. Nos testes experimentais com patógenos hematogênicos por contraste, o tipo do implante não pareceu ser relevante.

2. 4 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA DE LUZ

Uma fratura, como qualquer lesão traumática, produz hemorragia e destruição tecidual. As primeiras alterações reparadoras são, assim, as que ocorrem caracteristicamente em qualquer lesão do tecido mole. Fibroblastos em proliferação e concrecimentos capilares desenvolvem-se em direção ao coágulo sanguíneo e área lesada, formando um tecido de granulação. A área é também invadida por leucócitos polimorfonucleares e, mais tarde, por macrófagos, que fagocitam os resíduos histológicos. O tecido de granulação torna-se gradualmente mais denso, e em proporções do mesmo, forma-se cartilagem. Este tecido conjuntivo e cartilagem recém formados são designados como calo. Este serve para estabilizar e unir temporariamente o osso fraturado. À medida que o processo ocorre, as células osteogênicas dormentes do periósteo crescem, tornando-se osteoblastos ativos. Do lado externo do osso fraturado, inicialmente a certa distância da fratura, deposita-se tecido ósseo. Essa formação de novo osso continua em direção as extremidades fraturadas e forma, finalmente, uma camada semelhante a uma bainha óssea sobre o calo fibrocartilaginoso. À medida que o osso aumenta em quantidade, gêmulas osteogênicas invadem o calo fibroso e cartilaginoso, substituindo-os por um calo ósseo. Na substituição do calo fibrocartilaginoso, a cartilagem sofre calcificação e absorção. O osso recém-formado é inicialmente do tipo esponjoso e não compacto. Transforma-se depois num tipo compacto, e o calo se reduz em diâmetro (KIRCHNER, 1973).

ONODERA *et al.* (1993) reportaram um caso de tratamento de ameloblastoma com ressecção mandibular e reconstrução por uma placa de titânio no local do defeito. A pigmentação por titânio foi observada clinicamente, nos tecidos moles em torno do material. A cadeia linfática submandibular foi analisada através de uma amostra coletada por biópsia, decorridos dois anos da implantação. Em análise por microscopia óptica, o material coletado apresentava indícios da dissolução passiva do titânio.

ROSENBERG *et al.* (1993) identificaram partículas metálicas da placa de aço, principalmente no interior do citoplasma das células gigantes.

A coloração por HE é utilizada em histologia porque mostra as características estruturais e não porque forneça informações sobre as características químicas dos cortes de tecido. Apesar de seus méritos, este método não revela certos componentes estruturais dos cortes histológicos, entre os quais o material elástico, fibras reticulares, membranas basais e lipídeos (ROSS *et al.*, 1993).

No estudo de WEINGART *et al.* (1994) partículas delgadas de reação de corpo estranho foram identificadas nos cortes histológicos, como uma pigmentação escurecida no interior do citoplasma de alguns macrófagos. Estas delgadas partículas de plasma *spray*, depositadas na superfície dos implantes, foram transportadas pelos fagócitos à região dos linfonodos, sem que sinais de processo inflamatório ou reação de corpo estranho no local fossem observados.

No estudo de KIM *et al.* (1997) foram analisadas miniplacas de titânio, empregadas na estabilização de fraturas ósseas e na estabilização de enxertos ósseos em 14 pacientes. Após a remoção destas placas, o tecido mole adjacente e dois sítios ósseos em torno do material foram encaminhados para análise. Na microscopia óptica, foram identificadas partículas metálicas localizadas entre as fibras colágenas. Em torno destas partículas, foram observadas alterações degenerativas da matriz óssea.

JORGENSON *et al.* (1999) através de estudos com implantes de titânio em cavidade peritoneal de ratos demonstraram que o tratamento da superfície através da anodização reduz a dissolução passiva do titânio.

ZHANG *et al.* (2000) estudou a influência na remodelação do calo ósseo sobre as placas semi-rígidas (anti-estresse), empregadas na estabilização de osteotomias em tibia de coelhos. Com 8 semanas, o calo ósseo estava completamente remodelado, com fibras colágenas desorientadas, iniciando sua transformação em osso lamelar. Decorridas 24 semanas, a estrutura óssea e o arranjo das fibras colágenas na linha de osteotomia apresentavam-

se de maneira similar ao osso cortical normal. Comparando-se ao sistema rígido de fixação, as placas semi-rígidas (anti-estresse) são capazes de promover a remodelação do calo ósseo, evitando a osteoporose na cortical abaixo do material.

ZAFFE *et al.* (2003), analisando os tecidos adjacentes às placas e às telas de titânio removidas de pacientes sem sintomatologia clínica inflamatória, concluíram que íons de titânio estavam presentes a uma distância inferior a um milímetro, especialmente nas células sanguíneas do tecido fibrótico, em torno do material. Este resultado implica no potencial de liberação e acúmulo do titânio, sem que este fenômeno pareça interferir no processo osteogênico do reparo.

O aço e o titânio comercialmente puro são materiais empregados com rotina na ortopedia. Entretanto, as discussões em torno das reações teciduais adversas promovidas pelos implantes de aço fazem rever sua indicação, na prática clínica. A toxicidade, o potencial alergênico e a liberação de íons carcinogênicos em torno dos implantes de aço tornam o titânio, o material de eleição para as osteosínteses, especialmente quando não se tem a intenção de removê-los (KRISCHAK *et al.*, 2004).

TAKATSUKA *et al.* (2005) investigou a influência da idade do pacientes como fator de influência direta no reparo de fraturas com deslocamento do côndilo mandibular. Foram realizadas osteotomias unilaterais em região condilar de coelhos adolescentes e adultos, e os segmentos ósseos, reposicionados de maneira diferente. No grupo I os segmentos foram recolocados na sua posição original. No grupo II, os segmentos foram deslocados 55 - 90°. Para o grupo III, o ângulo de afastamento dos segmentos ósseos ultrapassou 135°. Histologicamente, após 4 semanas, o côndilo apresentava aspecto de remodelação óssea com tendência à normalidade. Apenas no grupo III dos animais adultos evidenciou-se a deposição de um tecido cartilaginoso no coto ósseo, sugerindo neoformação condilar.

Quando instaladas nas proximidades de tendões, tanto as placas de titânio quanto as placas de aço parecem promover processo inflamatório local, com encapsulação do material de fixação por um tecido fibroso. Este processo de inflamação parece aumentar com o tempo de implantação, até que o reparo tenha terminado (NAZZAL *et al.*, 2006).

POPAT *et al.* (2007) analisaram por microscopia óptica, a interface do material implantado no tecido subcutâneo de ratos. A superfície nano-tubular de titânio promoveu a formação de um guia favorecendo o crescimento e a manutenção das células ósseas. As células cultivadas na superfície nano-tubular apresentaram altos índices de adesividade, atividade de fosfatase alcalina e proliferação da matriz óssea, se comparadas àquelas cultivadas sobre a superfície de titânio convencional. Sua biocompatibilidade *in vivo* sugere que a arquitetura nano-tubular não promova inflamação crônica ou fibrose.

2. 5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE METÁLICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica altamente difundida e conhecida para a obtenção de imagens com maiores magnificações que as obtidas em microscopia óptica. Os microscópios eletrônicos apresentam maiores resoluções espaciais e profundidade de foco das imagens, em relação aos microscópios ópticos, devido ao uso de um feixe incidente de elétrons. O fenômeno físico envolvido se baseia na interação de um feixe eletrônico acelerado em direção a superfície da amostra analisada. Esta interação pode gerar elétrons secundários provenientes das ionizações causadas nos átomos da amostra e elétrons retro-espalhados devido à interação do feixe eletrônico com o núcleo atômico dos átomos presentes no material analisado. Os dois tipos de interação são utilizados para a obtenção das imagens em modo de elétrons secundários e modo de elétrons retro-espalhado. Um microscópio eletrônico de varredura pode ser subdividido em

vários componentes, com diferentes funções, buscando a obtenção de uma imagem nítida e satisfatória dos materiais. Os componentes são divididos em: canhão de elétrons, sistema eletro-óptico, câmara da amostra, detector de elétrons secundários, detector de elétrons retro-espalhados, sistema de vácuo e sistema eletrônico de formação da imagem (BRUNDLE *et al.*, 1992).

O maior cuidado na retenção permanente das miniplacas e parafusos metálicos, usados na estabilização das fraturas ósseas seria o potencial de corrosão. Estudos experimentais em animais têm demonstrado que a superfície dos materiais é capaz de manter suas características originais após um período de implantação. Em análise por microscopia eletrônica de varredura, demonstrou-se que após um período variando entre 7 a 10,5 meses, implantes cilíndricos metálicos e de titânio instalados em tibia de coelhos não apresentaram sinais de corrosão (LINDER *et al.*, 1975).

A estrutura e a composição química dos átomos na camada mais externa do implante, e a primeira camada das biomoléculas absorvidas do metal vão determinar as reações na interface (ALBREKTSSON *et al.*, 1983).

A adsorção da porção orgânica pelos implantes depende das alterações na superfície metálica e da energia dispendida para que o processo ocorra. A camada protéica adsorvida serve como substrato para a subsequente deposição tecidual. Nos implantes de titânio, ocorre a formação espontânea de uma camada de óxido sobre a superfície. A espessura desta camada de óxido, para os implantes não-anodizados de titânio, é de aproximadamente 5 nm. Esta camada de óxido de titânio pode aumentar durante a implantação, dependendo das reações orgânicas, para 40 nm, podendo ainda incorporar substâncias orgânicas e inorgânicas (SUNDGREN *et al.*, 1986).

O óxido de titânio é capaz de promover resistência à corrosão e reduz a difusão do metal aos tecidos adjacentes (ALBREKTSSON *et al.*, 1983). Através da microscopia eletrônica para análise química por fotoeletro-espectromicroscopia, pode-se determinar detalhes das condições químicas da superfície (UNGERSBÖCK *et al.*, 1996).

ROSENBERG *et al.* (1993) realizaram um estudo retrospectivo com 32 pacientes, a fim de se analisar a pigmentação escurecida dos tecidos adjacentes às miniplacas de titânio. O tecido mole de recobrimento foi comparado ao tecido que revestia as placas de aço (tipo Champy). Todos os implantes foram removidos após 8 meses da inserção. Macroscopicamente, foram encontradas pigmentações visíveis em 25,6% do tecido mole em torno das placas de titânio; em torno das placas de aço não foram observadas alterações. Microscopicamente, estas alterações quanto à pigmentação foram observadas em 71,8% nos tecidos em torno do titânio, e 65,3% em torno das placas de Champy. Em análise por feixes de EDS, o tecido mole em torno das miniplacas de titânio revelou apenas a presença de dióxido de titânio. Em torno das placas de aço tipo Champy foram encontrados metais como: cromo, níquel, ferro e molibdênio. A análise por microscopia eletrônica mostrou dióxido de titânio depositado entre as fibras colágenas.

WEINGART *et al.* (1994) estudaram a deposição do titânio na cadeia linfática de cães (beagles), após a inserção de implantes de titânio, com tratamento de superfície por plasma *spray*. Em análise por EDS, estas partículas foram identificadas como titânio. Nas vísceras não foram encontrados sinais de pigmentação metálica.

MATTHEW *et al.* (1996) analisaram, através de microscopia eletrônica de varredura, a superfície de placas e parafusos de titânio utilizado para estabilizar fraturas em modelo animal, comparando com placas e parafusos que não haviam sido utilizadas, como controle da amostra. Observou-se intenso processo de danificação na cabeça dos parafusos que foram inseridos no osso, promovidos pelo processo de inserção, sem evidências de corrosão ou qualquer outra alteração da superfície do material. A análise na superfície das placas por raios X dispersivos (EDS) encontrou depósitos de alumínio e silicone. Mesmo após 6 meses, não foram encontradas evidências que justificassem a remoção do material do material implantado.

UNGERSBÖCK *et al.* (1996), através de um estudo experimental em 10 ovelhas, analisaram comparativamente 5 tipos de tratamento de superfície sobre as placas de titânio. Os tratamentos de superfície analisados foram: titânio anodizado por uma delgada camada, por uma camada intermediária, por uma camada grosseira, titânio uzinado e ataque ácido. A camada reativa de deposição de tecido mole mais delgada, aliada a melhor adesividade da superfície implantar, de acordo com a análise por microscopia eletrônica, foi observada nas placas com titânio anodizado por uma camada grosseira. Os implantes uzinados foram os que apresentaram as condições de integração mais desfavoráveis.

KIM *et al.* (1997) analisaram as miniplacas de titânio, empregadas na estabilização de segmentos ósseos fraturados, e removidas dos pacientes após o período de consolidação óssea. A microscopia eletrônica revelou supostas partículas de titânio, localizadas no tecido conectivo de todos os espécimes.

Através de um modelo comparativo, COATHUP *et al.* (1999) investigaram a interferência no potencial de integração óssea junto às placas de titânio, instaladas na superfície cortical do fêmur de coelhos adultos. Os tratamentos na superfície do metal consistiram de jateamento, plasma *spray* contendo grânulos de Hidróxiapatita (HA) de baixa cristalinidade (57%), solução precipitada de cálcio-fosfato, plasma *spray* contendo grânulos de HA de média cristalinidade (85%). Este estudo demonstrou que a camada de HA apresentou um encaixe de maior precisão com a superfície óssea, quando comparado ao jateamento de superfície (6 μm). Pode-se concluir que a camada de HA é um importante fator de fixação no processo de implantação do material, apresentando um efeito local e limitado, a fim de promover um reparo ósseo adequado. A análise da geometria das placas demonstrou que espaços superiores a 1 mm na placa propiciam a neoformação óssea, se comparada a espaços menores. A diferente porosidade óssea não pareceu afetar o reparo tecidual, nas diferentes geometrias do material.

ZAFFE *et al.* (2003), através da análise por EDS das placas e das telas de titânio removidas de pacientes sem sintomatologia clínica inflamatória, após um período em torno de seis meses da implantação afirmam que o titânio pareceu interagir promovendo a indução do crescimento ósseo aposicional, sobre a superfície do material.

OH *et al.* (2005) analisaram o potencial de crescimento vertical dos nano-tubos (nanômetro), na superfície de óxido de titânio previamente anodizada por tratamento com hidróxido de cálcio (NaOH), tornando a superfície bioativa. A presença do TiO_2 induziu o crescimento de uma nano-estrutura "nano-induzida", com nano-fibras de Titanato de Sódio bioativo extremamente delgadas, com uma espessura máxima de 15 nm, na parede do nano-tubo. A imersão *in-vitro* da estrutura do nano-tubo em um fluido semelhante ao do corpo humano induziu a nucleação e o crescimento nano-dimensional da fase da hidróxiapatita (HA). A formação de HA foi significativamente acelerada devido à presença da nano-estrutura, portanto, a adesividade da superfície, pela presença do nano-tubo foi mais efetiva.

As injúrias causadas por acidentes e doenças têm propiciado o desenvolvimento de diversos materiais sintéticos para a reconstrução dos tecidos duros, como o osso. Dentre estes materiais, a hidróxiapatita (HA), material bioativo, vem apresentando bom desempenho e excelente biocompatibilidade. Nos estudos de WU *et al.* (2007), uma composição nova de HA / Al_2O_3 (óxido de alumínio), depositada sobre a superfície do titânio pareceu induzir a aposição óssea. Os elétrons depositados são compostos de cristais de Ca (cálcio) deficiente em HA, que serão então convertidos em Ca rico em HA, dentro da nano-estrutura, após tratamento hidrotérmico. Estes cristais de Ca ricos em HA são capazes de induzir o crescimento ósseo como a apatita do fluido do corpo humano. Este mecanismo de dissolução e recristalinização parece contribuir para a deposição dos cristais ricos em HA.

2. 6 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE ÓSSEA ATRAVÉS DA DENSITOMETRIA

A Densitometria Óssea digitalizada estabeleceu-se como o método mais moderno, aprimorado e inócuo para se medir a densidade mineral óssea. A medida da densidade do osso pode ser feita por um aparelho especial que utiliza Raios X para medir a densidade mineral óssea, com baixa dose de radiação (SBDens, 2003).

Na calcificação, os minerais são depositados na forma de diminutos cristais (hidróxiapatita) intimamente associados às fibras colagenosas. Estes cristais são pequenos demais para serem vistos ao microscópio óptico comum, mas fotomicrografias eletrônicas mostram que eles aparecem primeiramente à superfície de fibrilas e posteriormente no interior das mesmas. Alinham-se de forma ordenada em relação à estriação transversal periódica das fibrilas. A calcificação óssea depende de (1) disponibilidade de quantidades adequadas de minerais, particularmente fósforo e cálcio, (2) determinadas condições químicas e físicas dentro da área da calcificação. Os minerais presentes no sangue são levados à área de calcificação, onde em condições normais, íons de cálcio e fosfato estão presentes na forma de soluções metastáveis. A falta de minerais em teor suficiente conduz a uma diminuição da rigidez óssea (KIRCHNER, 1973).

SOUTHARD *et al.* (2000) analisaram a densidade do osso mandibular e do osso vertebral, em coelhos saudáveis e coelhos com osteoporose induzida, através de terapia com esteróides. A densidade óssea mineral (BMD) da mandíbula foi mais sensível ao tratamento com glico-corticóides do que a BMD vertebral, sugerindo uma forte relação linear entre a dose cumulativa de esteróides e a perda da BMD. Para a amostra de animais saudáveis, a densitometria mandibular e vertebral apresentou-se moderadamente correlacionadas, ou seja, as médias obtidas mantiveram-se próximas. O lado esquerdo e o direito da região mandibular apresentou perda da densidade óssea simétrica, bem como a região antero-posterior e a lateral, das vértebras.

NORRIS *et al.* (2001) analisaram a densidade óssea em coelhos, fêmeas, durante o período de maturação esquelética, da 20 a 56 semana. Através do exame de densitometria, procurou determinar-se a variabilidade da densidade óssea nos animais, durante a fase de crescimento, e ainda, testar a hipótese de que o coelho pode servir como um modelo de estudo para se compreender a fisiologia óssea humana. Os resultados sugerem que a densidade óssea aumente progressivamente durante o período de crescimento, e que atingida a maturidade esquelética, em torno da 28 semana de idade, os índices da densidade óssea mineral (BMD) continuem aumentando até a semana 36, 4 a 8 semanas depois de cessado o crescimento. De acordo com este estudo, o *turnover* ósseo do coelho é similar ao do humano, especialmente durante a fase de crescimento.

CASTAÑEDA *et al.* (2006) desenvolveram um estudo comparativo entre coelhos saudáveis e coelhos com osteoporose induzida, na tentativa de se estabelecer as medidas densitométricas em 4 sítios dos membros posteriores. Os sítios analisados foram respectivamente a crista entre a 3^o e a 4^o vértebra, e a articulação do joelho, estabelecendo padrões entre o osso medular, cortical e subcondral. A osteoporose nos animais foi desenvolvida através da remoção bilateral dos ovários, seguida de corticoterapia por 4 semanas. O aparelho de densitômetro foi calibrado diariamente. Na aquisição das imagens empregou-se um *Software* apropriado para a análise de pequenas amostras, por aumentar a resolução espacial da área escaneada. A área óssea (BA), a quantidade de osso mineral (BMC) e a densidade óssea mineral (BMD) foram determinadas. A BMD pareceu aumentar progressivamente da espinha lombar até a articulação do joelho. A região proximal da tíbia apresentou o maior índice da densidade total. A região subcondral apresentou características densitométricas de padrões variados, com predominância de osso cortical. A média estatística dos resultados das medidas obtidas entre os grupos avaliados sugere que, a densidade óssea, para os quatro sítios analisados é consideravelmente superior nos animais saudáveis.



3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o processo do reparo ósseo no local da fratura mandibular em coelhos da linhagem Nova Zelândia, com atenção às miniplacas e aos parafusos de titânio, empregados como material de fixação, em diferentes períodos de tempo;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar através da análise macroscópica, o reparo da fratura óssea e o crescimento ósseo aposicional sobre o material de fixação;
- Verificar as reações biológicas do reparo ósseo na linha da fratura e em torno do material de fixação por microscopia de luz, com coloração de Hematoxilina-eosina (HE);
- Analisar, por meio de histomorfometria, a presença das fibras colágenas e o processo de reparo ósseo na linha da fratura óssea, com coloração de HE;
- Analisar a área e a densidade dos colágenos tipo I e II, na linha da fratura óssea e em torno do material de fixação, com coloração de *Sirius red* (SR);
- Verificar o processo de reparo ósseo na linha da fratura, e o crescimento ósseo aposicional sobre o material de fixação, por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar os índices de BMC e BMD na linha da fratura, através da densitometria óssea.



4 METODOLOGIA

4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi submetida à avaliação e aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e protocolado sob o número 061/07 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA-PUCPR), protocolado sob o número 60.07, registro 209 (Anexo B).

Nesta pesquisa, foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 6.638/79 (GOLDIN, 1995) (Anexo C).

4.2 CARACTERIZAÇÃO

A pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração CTBMF, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da Linha de Pesquisa de Biomateriais em Odontologia.

4.3 PARADIGMA

O trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional quantitativo, no *design* de estudo quase experimental (CAMPBELL e STANLEY, 1979).

4.4 QUESTÕES DA PESQUISA

Utilizando o sistema de fixação interna por placas e parafusos de titânio em fratura de mandíbula procurar-se-á investigar se:

- O sistema de fixação metálica promove estabilidade adequada para permitir o reparo ósseo em região de ângulo mandibular?

4.5 HIPÓTESE

A miniplaca de titânio é capaz de manter os segmentos ósseos na posição desejada, permitindo o reparo ósseo adequado, sem a necessidade de remoção do material, após o período de consolidação óssea.

4.6 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

Para a amostra, foram selecionados 18 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, albinos, linhagem Nova Zelândia, com peso de até 4000 gramas, e aproximadamente 90 dias de vida. Os animais utilizados foram criados pelo método *Ran Rotacional*, de criação heterogênica, e mantidos em condições sanitárias de biotério convencional. Os coelhos eleitos apresentavam-se clinicamente sadios e foram submetidos a controle de ectoparasitas e endoparasitas pelo responsável técnico Dr. Indalécio Mainardes Sutil, médico veterinário responsável pelo biotério da PUCPR antes de constituírem a população desta pesquisa. Foram coletadas fezes para exames parasitológicos periódicos, no intuito de se excluir espécimes que apresentassem evidências de infestação.

Foram efetuadas osteotomias em região de ângulo mandibular, unilateralmente. O padrão operado, para todos os animais, foi o lado esquerdo, e o sistema de fixação empregado foi composto por 1 placa e 4 parafusos metálicos (titânio). O material de fixação foi removido após 30 dias, 60 dias e 90 dias da implantação. Parte da amostra foi encaminhada ao CEMM (Centro de

Microscopia e Microanálises) da PUCRS, para as análises por microscopia eletrônica e também ao GEPSI para avaliação das propriedades mecânicas. A outra parte da amostra foi utilizada para a análise das reações teciduais da linha de reparo ósseo, das extremidades da osteotomia e do tecido adjacente ao material implantado.

4.7 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os 18 animais foram divididos, por amostragem aleatória simples, em 3 grupos de 5 coelhos cada, para a análise por microscopia óptica, totalizando 15 animais. Para as demais análises, foram empregados 1 animal em cada período de tempo. Os grupos se diferenciam quanto ao tempo decorrido entre a implantação dos parafusos e a morte. No primeiro grupo, a morte deu-se após 30 dias da implantação. No segundo grupo, os animais foram mortos decorridos 60 dias. No terceiro grupo, passaram-se 90 dias da implantação do material.

Todos os animais foram identificados por numeração e acomodados individualmente em gaiolas plásticas, com grade metálica superior, e chão coberto por serragem. As gaiolas foram higienizadas diariamente, e mantidas sob a temperatura ambiente de 23°C, no intuito de diminuir os riscos de contaminação e infecções. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

4.8 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO

Para que os animais pudessem ser incluídos nos experimentos, deveriam:

- estar em bom estado nutricional;
- chegar ao final do período de observação com bom estado de saúde;

O critério avaliado para exclusão dos animais abrangeu:

- morte do animal antes do fim do experimento;

4. 9 TÉCNICA CIRÚRGICA

As cirurgias foram realizadas dentro dos padrões de anti-sepsia e assepsia para todos os animais. Toda a equipe cirúrgica utilizou equipamento de proteção individual (EPI).

Os coelhos foram primeiramente sedados com Xilazina base⁴ (Coopazine®) intramuscular (0,75 ml/5 kg). A Xilazina base é indicada como sedativo, onde se deseja analgesia e relaxamento muscular (Site do fabricante*).

O estado de anestesia foi obtido pela ação do Cloridrato de Ketamina 50 mg⁵ (Vetanarcol®) endovenoso (1 a 5 mg/kg) (Figura 1). O Cloridrato de Ketamina é um anestésico geral, injetável, não barbitúrico e de ação rápida, que interrompe de forma seletiva os mecanismos de associação do cérebro, promovendo intensa analgesia, sem promover obstrução das vias aéreas (Site do fabricante*).

A antibióticoterapia foi iniciada no pré-operatório imediato aplicando-se via subcutânea (0,5 ml/kg) de Sulfato de gentamicina 40 mg⁶ (Gentatec®). A gentamicina foi mantida por 7 dias, 1 aplicação diária para prevenir infecções por gram-positivos e gram negativos (Site do fabricante*).

Flunixinina meglumina 83 mg⁷ (Banamine®) foi aplicada como terapia analgésica, via intramuscular (1,1 ml/kg), a cada 12 horas, por um período de 3 a 5 dias, enquanto permanecesse os sintomas de dor, como inapetência. O Banamine® é um potente antiinflamatório, não-narcótico, não esteróide, que apresenta potente ação analgésica, antitérmica e anti-endotóxica indicado para o tratamento da dor aguda, pós-traumática ou pós-cirúrgica em animais (Site do fabricante*).

⁴ Xilazina base (Coopazine®)- Shering-plough www.spah.com.br

⁵ Cloridrato de Ketamina 50 mg (Vetanarcol®)- König do Brasil www.konigvet.com.br

⁶ Sulfato de gentamicina 40 mg (Gentatec®)- Chemitec www.chemitec.com.br

⁷ Flunixinina meglumina 83 mg (Banamine®)- Shering-plough www.spah.com.br

Após a obtenção do efeito anestésico foi procedida à tricotomia da região mandibular esquerda, com aparelho de barbear⁸, para se evitar lesão epidérmica (Figura 2).

Procedeu-se a antissepsia da pele do animal com álcool iodado 0,5%⁹, e o isolamento da região, com campo fenestrado esterilizado (Figura 3). O acesso à mandíbula do animal foi obtido por meio de incisão, utilizando-se lâmina de aço inox nº 15¹⁰ montada em cabo de bisturi nº3, longitudinal de aproximadamente 3,0 cm de extensão na pele e no tecido subcutâneo (Figura 4). A pele e o músculo adjacente foram dissecados até a exposição do periósteo, e este incisado longe da área de implantação do material. Este periósteo foi divulsionado para a visualização de toda a região do ângulo mandibular (Figura 5).

Com o objetivo de se padronizar a área de implantação, e não causar interferência ao tecido a ser analisado, o local de trabalho foi estabelecido a partir do ângulo mandibular.

Foi promovida primeiramente, a regularização da cortical óssea vestibular, com uma broca fresa multilaminada¹¹ acoplada à peça de mão reta, para facilitar a adaptação das placas, e a posterior análise por microscopia eletrônica. As osteotomias foram executadas por uma peça de mão reta¹², acoplada a um motor elétrico de baixa rotação¹³, com uma broca tronco-cônica multilaminada, número 701¹⁴ para promover a linha de fratura na mandíbula, seguida do completo seccionamento por cinzéis e martelo cirúrgico¹⁵ (Figura 6).

⁸ Philips®

⁹ Merck S. A. – Rio de Janeiro – RJ/Brasil

¹⁰ BD Lâmina – Curitiba – PR/Brasil

¹¹ Komet - Alemanha

¹² Kavo do Brasil

¹³ Driller / Dentoflex

¹⁴ Komet - Alemanha

¹⁵ Quinelato®- Indústria de Materiais Cirúrgicos- Bauru/SP

A adaptação das miniplacas¹⁶ à linha de osteotomia se deu por compressão manual. Foram efetuadas 2 perfurações em cada lado da fratura, para instalação do sistema de fixação. As perfurações para a inserção dos parafusos¹⁷ com 2,0 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento, foram executadas com motor de baixa rotação e peça de mão reta, com broca com batente de proteção de 2,0 mm de comprimento, e 1,5 mm de diâmetro, sob abundante irrigação com solução salina de soro fisiológico 0,9% e aspiração concomitante (Figura 7).

Após cuidadoso reposicionamento do periósteo em sua localização original, foi realizada a síntese do periósteo por pontos simples, e da ferida operatória pela técnica contínua simples, utilizando-se fio monofilamentar de *nylon* (4-0)¹⁸ de 45 cm de comprimento, montado em agulha atraumática semicircular de 1,5 cm de comprimento e seção triangular (Figura 8). O local da síntese foi protegido, por um período de 7 dias, com uma fita adesiva cirúrgica hipoalergênica microporosa¹⁹.

Realizado o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram no Biotério da PUCPR, acomodados em gaiolas plásticas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação, identificados e numerados de acordo com o grupo correspondente e assistidos diariamente, pelos técnicos e pesquisadores, até a sua morte.

¹⁶ Neoortho®- Indústria de Sistemas de Fixação Interna Rígida- Curitiba/PR

¹⁷ Neoortho®- Indústria de Sistemas de Fixação Interna Rígida- Curitiba/PR

¹⁸ Ethicon Co – São Paulo – SP/Brasil

¹⁹ Micropore - Ethicon Co – São Paulo – SP/Brasil

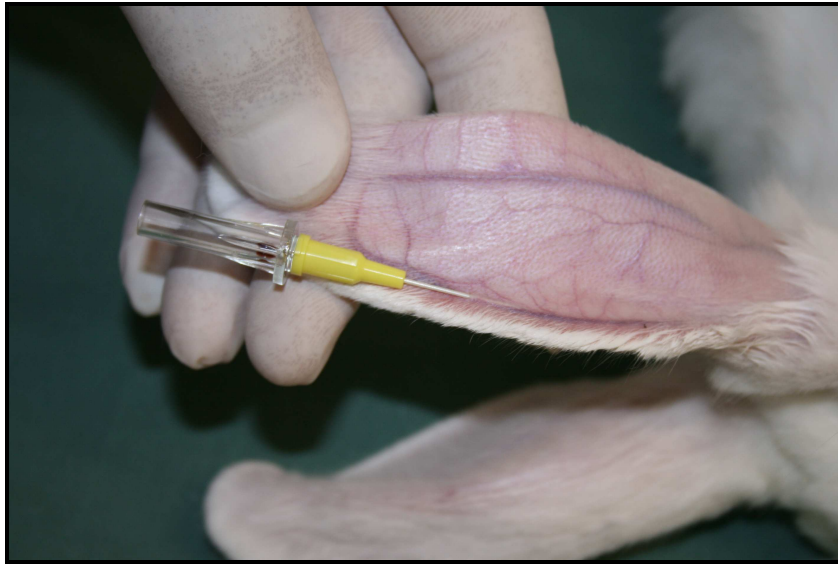


Figura 1- Administração do Anestésico Endovenoso na veia auricular esquerda

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 2- Tricotomia da região do ângulo esquerdo da mandíbula

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

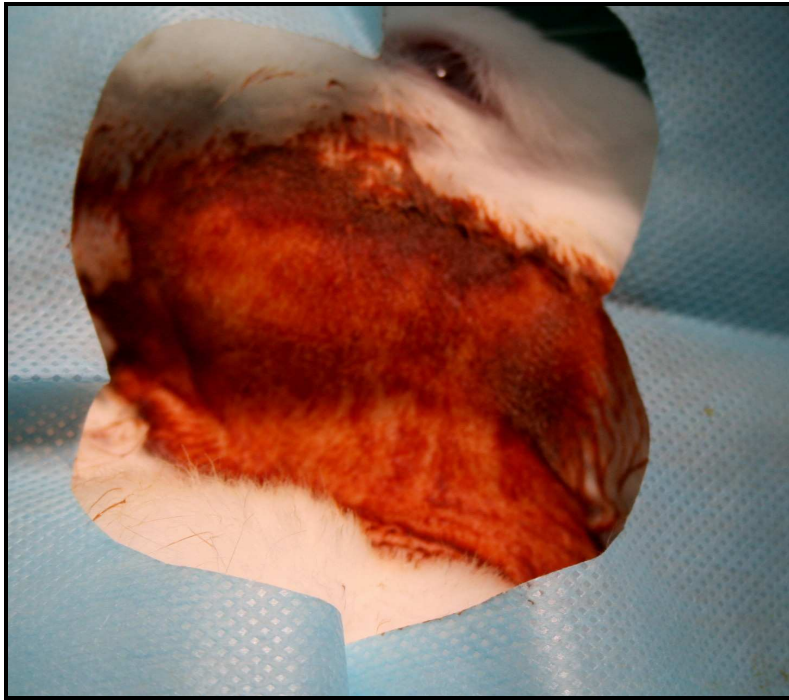


Figura 3- Anti-sepsia da pele do animal com álcool iodado 0,5% e o isolamento do campo operatório com campo cirúrgico fenestrado

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

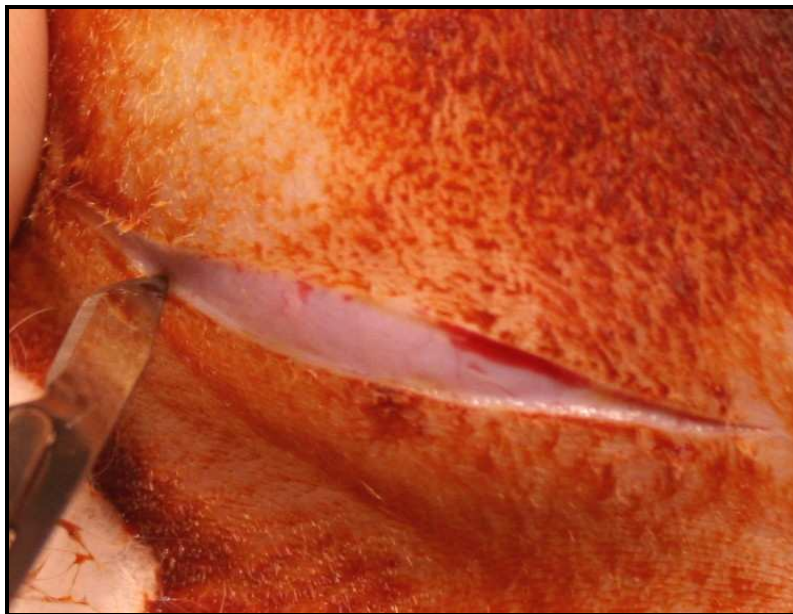


Figura 4- Incisão longitudinal de aproximadamente 3,0 cm de extensão na pele e no tecido subcutâneo

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 5- Divulsão do periósteo até a visualização de toda a região de ângulo mandibular

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

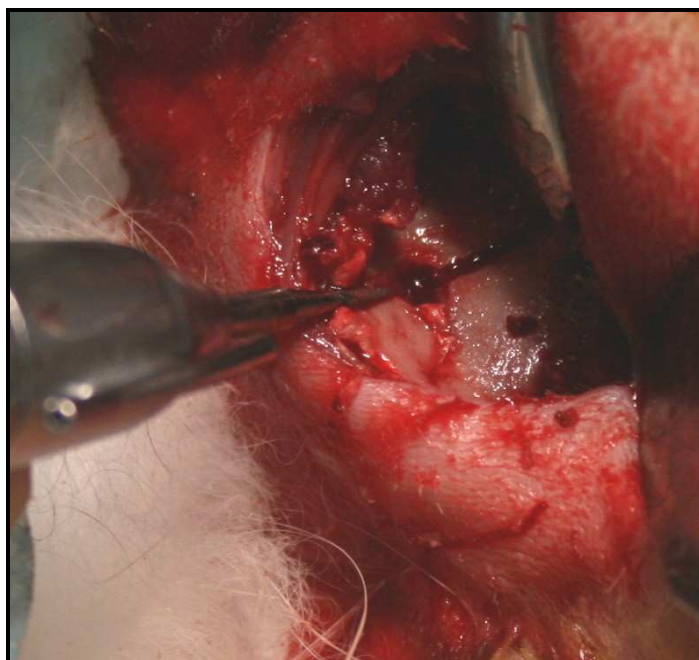


Figura 6- A osteotomia executada por peça de mão reta, com uma broca tronco-cônica número 701, para promover a linha de fratura na mandíbula

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

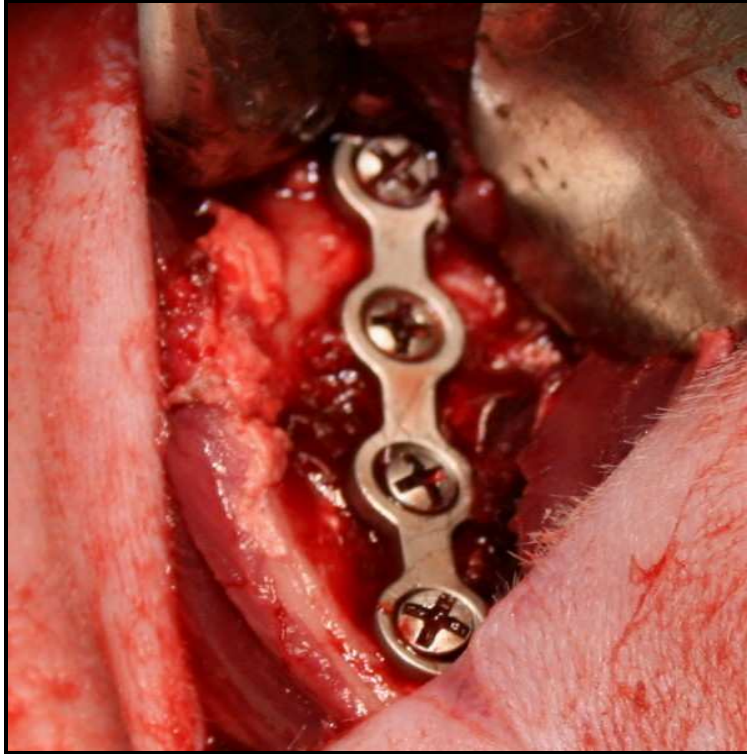


Figura 7- Adaptação da placa do sistema 2.0 e 4 parafusos com 2,0 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

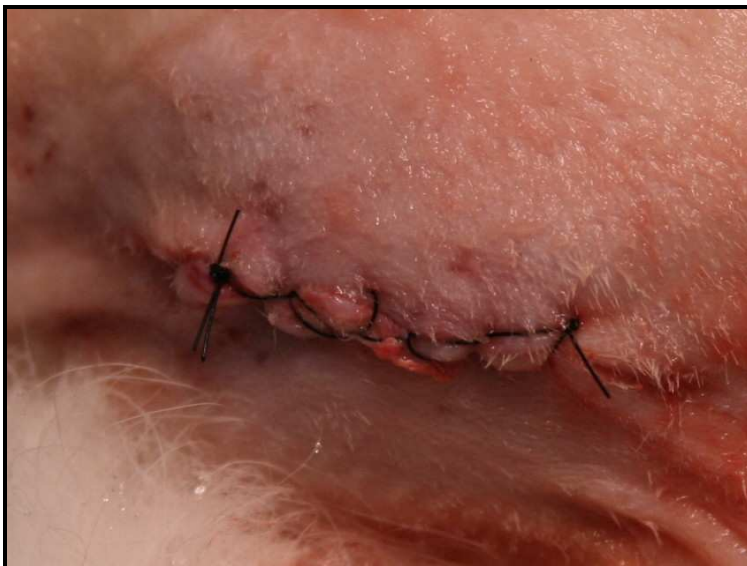


Figura 8- Síntese do periósteo por pontos simples, e da ferida operatória pela técnica contínua simples

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

4. 10 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA

Os coelhos foram mortos decorridos 30, 60 e 90 dias da cirurgia. A morte dos animais se deu por intoxicação através de injeção letal de tiopental sódico²⁰, via intraperitoneal, após sedação prévia com Xilazina base.

Para obtenção das amostras (peças cirúrgicas) foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, na base mandibular do lado operado. Após minuciosa e completa exposição óssea procedeu-se a remoção completa do osso.

Cada peça operatória incluiu o material de osteosíntese, removido logo após a obtenção da amostra, e o osso peri-implantar. Para a remoção das peças foram utilizados instrumentais especiais de cirurgia, peça de mão reta e uma broca tronco-cônica número 701, acoplada a um motor elétrico para osteotomização do segmento proximal. O segmento medial da peça operatória foi osteotomizado, e o lateral obtido através da completa luxação do côndilo (Figura 9). As peças cirúrgicas encaminhadas para análise por microscopia de luz foram fixadas em solução de formalina. As peças que sofreram análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram previamente submetidas à análise densitométrica no Hospital São Lucas da PUCRS, e então enviadas CEMM (Centro de Microscopia e Microanálises) da PUCRS (Figura 10).

Os animais mortos foram contidos em sacos especiais, segundo os critérios de controle de zoonoses, estabelecido pela vigilância sanitária.

²⁰ Tiopental Sódico



Figura 9- Peça operatória obtida do ângulo mandibular esquerdo após remoção da placa e dos parafusos

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

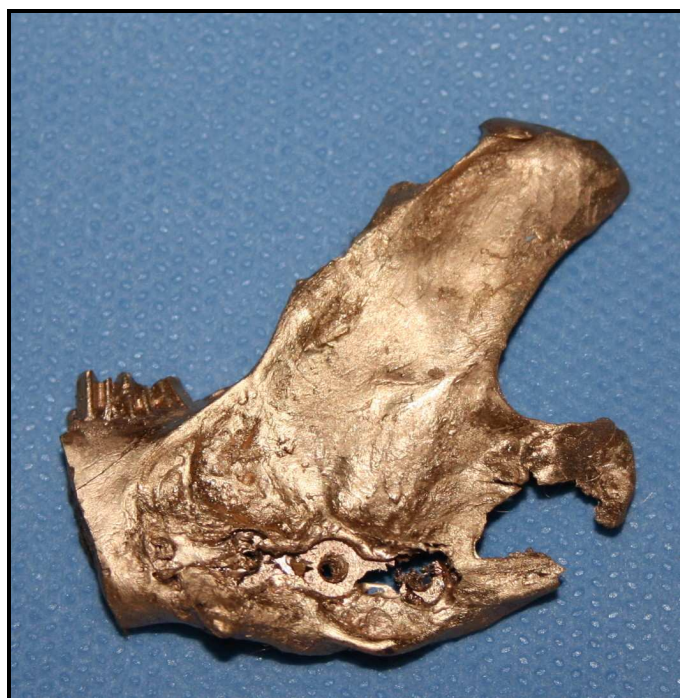


Figura 10- Peça operatória obtida do ângulo mandibular esquerdo e encaminhada ao CEMM para metalização em ouro

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

4. 11 PREPARO DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ

As amostras foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 10%, pH 6,9 por se tratarem de espécimes de consistência dura, contendo osso. Os parafusos foram cuidadosamente removidos dos espécimes nos diferentes tempos de implantação. O material foi então, submetido ao processamento histológico que inclui a desidratação, diafanização e impregnação em parafina em autotécnico ou histotécnico²¹, através de banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, e 3 banhos em álcool 100%, e mais 3 banhos em parafina líquida a 65°C, todos por 1 hora.

A inclusão do processo constituiu-se da confecção dos blocos de parafina.²² A obtenção dos cortes histológicos deu-se por microtomia, através do corte dos blocos em micrótomo²³. Foram realizados 4 cortes histológicos transversais em cada peça, com 5 µm de espessura. Estes cortes foram então colocados em banho-maria contendo água aquecida a 60°C e posteriormente, colocados em lâmina de vidro contendo albumina (clara de ovo + glicerina), servindo para aderir o corte histológico à lâmina. A secagem do material foi feita em estufa a 60°C²⁴, por aproximadamente 1 hora.

A desparafinização foi feita com xilol aquecido (3 x 5 min.), a desidratação realizada com álcool etílico absoluto (3 x 2 min.), e por fim a rehidratação com água, por 10 minutos.

A coloração das lâminas foi realizada pela técnica da Hematoxilina e Eosina (coloração básica para núcleo e citoplasma celular) e coloração de *Sirius-red* (observação específica da deposição de colágeno). A montagem das lâminas utilizou o método da colagem de Entellan (através de uma resina própria para microscopia), e lamínulas de vidro de tamanho 24 x 90 mm²⁵.

²¹ Aparelho Histotécnico- marca Leica®, modelo TP1020

²² Inclusor- marca Leica®, modelo EG1160

²³ Micrótomo- marca Leica®, RM2145

²⁴ Estufa- marca Fanem®

²⁵ Lâminas de vidro- marca Meck®

4. 12 PREPARO DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura foram armazenadas em soro fisiológico 0,9%, e enviadas ao CEMM / PUCRS para sofrerem dessecação em forno convencional²⁶ à temperatura média de 50°C. Devidamente secas, sofreram processo de metalização com íons de ouro²⁷. A análise das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura²⁸ pertencente ao CEMM / PUCRS. Essas imagens foram feitas com o intuito de analisar o processo de osseointegração através da linha de reparo ósseo, no local da osteotomia e nas inserções dos parafusos para a fixação.

Os modos de imageamento das imagens capturadas consistiram de SE (*scattering electron*) e BSE (*backscattering electron*), sendo que este último possibilita um maior contraste de imagem através da diferença de densidades dos componentes presentes nas amostras. A análise pelo sistema de EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) permitiu mapeamento dos elementos químicos na superfície óssea adjacente ao metal implantado.

4. 13 PREPARO DO MATERIAL PARA A AVALIAÇÃO POR DENSITOMETRIA ÓSSEA

As amostras para avaliação por densitometria óssea foram armazenadas em soro fisiológico 0,9% e enviadas ao Departamento de Geriatria e Gerontologia do Hospital São Lucas da PUCRS para análise por aparelho de densitômetro²⁹. A região correspondente à fratura na mandíbula foi localizada e demarcada, nos diferentes períodos de tempo.

²⁶ Fischer®

²⁷ Baltec® SCD, modelo 005

²⁸ Phillips®, modelo XL 30

²⁹ Hologic®, modelo QDR 4500

4.14- ANÁLISE DOS RESULTADOS

4. 14. 1 Análise Macroscópica

Para a análise macroscópica considerou-se o reparo ósseo na linha da fratura e o processo de crescimento ósseo aposicional, nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias, em diferentes parâmetros, para todos os animais da amostra. Para o reparo ósseo na linha da fratura considerou-se como discreto, aquele que apresentasse no local do defeito ósseo criado, espaços com medidas superiores a 3 mm. O reparo ósseo foi considerado moderado onde as lacunas remanescentes da fratura não superassem 3 mm, e intenso, nas peças que não mais fosse observada macroscopicamente o local da fratura.

Para se quantificar o processo de crescimento ósseo aposicional definiu-se como discreto aquele crescimento que não estivesse depositado sobre o material de fixação. O crescimento ósseo vertical foi considerado moderado, quando estivesse recobrando menos do que 50% do material de fixação. Quando a placa encontrava-se imersa no osso em proporções superiores a 50%, o crescimento foi determinado como intenso. Estes parâmetros foram classificados, de acordo com a intensidade, e receberam uma pontuação citada ao lado de cada item avaliado. Tais dados transformados em escores quantitativos, e transferidos para uma tabela do Excel (Anexo E).

1) Escore do Reparo ósseo na linha de fratura:

- Discreto= 1
- Moderado= 2
- Intenso= 3

2) Escore do Processo de crescimento ósseo aposicional:

- Discreto= 1
- Moderado= 2
- Intenso= 3

4. 14. 2 Análise por Microscopia de Luz

O estudo microscópico revelou ser um importante instrumento na mensuração quantitativa do processo de reparo ósseo. Para isto, as lâminas obtidas de cada animal foram submetidas ao exame microscópico³⁰ através do sistema computacional de captura e análise de imagem - Image-Pro Plus³¹. Sob um foco fixo e com clareza de campo, a imagem do microscópio foi capturada pela câmera de vídeo³² acoplada ao microcomputador³³, em aumentos de 40X e 400X, transformada em sinal elétrico na forma analógica, e transmitida para a tela do computador, onde a imagem foi digitalizada, sendo constituída por um conjunto de pixels³⁴ (1 pixel = 6,5 µm).

Todas as lâminas foram codificadas, impossibilitando desta forma, a identificação a qual grupo de estudo pertenceria cada lâmina analisada. Foram tomadas 4 imagens, distribuídas aleatoriamente em torno de cada perfuração e mais 4 imagens ao longo do reparo ósseo, totalizando 20 aquisições por lâmina. Nas 15 lâminas analisadas da amostra foram obtidas 300 imagens, sob as mesmas condições de luminosidade e aumento da objetiva padronizado em 400X. Após a captura das imagens, estas foram salvas em formato JPEG.

4. 14. 2. 1 Coloração de Hematoxilina-eosina

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia de luz, visando o entendimento do processo de reparo ósseo, bem como das alterações teciduais em torno do material de fixação, através da análise descritiva. Os aspectos histológicos das peças ósseas foram descritos levando-se em consideração a presença de tecido fibroblástico, células do

³⁰ Microscópio Óptico, marca Olympus, modelo BX50.

³¹ Programa IMAGE-PRO[®] PLUS, versão 4.5.1 desenvolvido por MediaCybernetics.

³² Marca Sony (CCD-Iris – Color Vídeo Câmera, modelo DXX-107A).

³³ Marca Compaq (Pentium 4, CPU 1.8 GHz, 128 MB de memória RAM, HD 40 GB, sistema operacional Microsoft Windows versão 2002).

³⁴ Pixel (*Picture element*) – Menor unidade gráfica de uma imagem digital (ROMANS, 1995).

reparo ósseo e a neovascularização (angiogênese) em torno das 4 perfurações, através de 4 campos distribuídos aleatoriamente.

Os cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina (HE) permitiram avaliar ainda, através de quatro imagens seqüenciais obtidas ao longo da linha de reparo ósseo (aumento de 40X), através da análise quantitativa, a área total do osso neoformado (pixels²) e a área total da proliferação angiofibroblástica (pixels²).

As 60 imagens foram capturadas em microscópio óptico em aumento de 40X, e transferidas ao computador através do programa Image Pro Plus. As áreas de osso depositado e de tecido fibrótico foram estabelecidas através do programa Image Tool³⁵, com o cursor do computador (Figura 11). Os dados obtidos, em pixels² foram transferidos para uma planilha do Excel (Anexo F e G). As quatro imagens obtidas na linha de reparo da fratura óssea foram padronizadas, através de campos seqüenciais, codificados por quatro letras, sendo que a letra localiza-se próxima à raiz dos dentes, as letras B e C são subseqüentes e a letra D próxima à cortical basal da mandíbula (Figura 12). Toda a análise morfométrica foi realizada sem o conhecimento prévio da distribuição das imagens nos seus respectivos grupos de estudo, sendo, portanto, codificadas todas as lâminas do estudo e, conseqüentemente, todas as imagens capturadas.

Os valores obtidos de cada área óssea neoformada e cada área de proliferação fibroblástica foram transferidos para uma tabela, na qual foram registrados e calculados os valores médios em cada lâmina analisada. Todos esses valores foram transportados para o programa Microsoft Excel³⁶ for Windows, inseridos nas tabelas definitivas e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS para o Windows³⁷.

³⁵ Programa Image Tool Scripting Language®, versão 2.0 (alpha 2).

³⁶ Programa EXCEL desenvolvido pela *Microsoft*®

³⁷ Statistical Pckage for Social Science. Versão 11.5. Produzido por programa SPSS® Inc. 233 South Wacker Drive, 11th floor Chicago, IL 6060

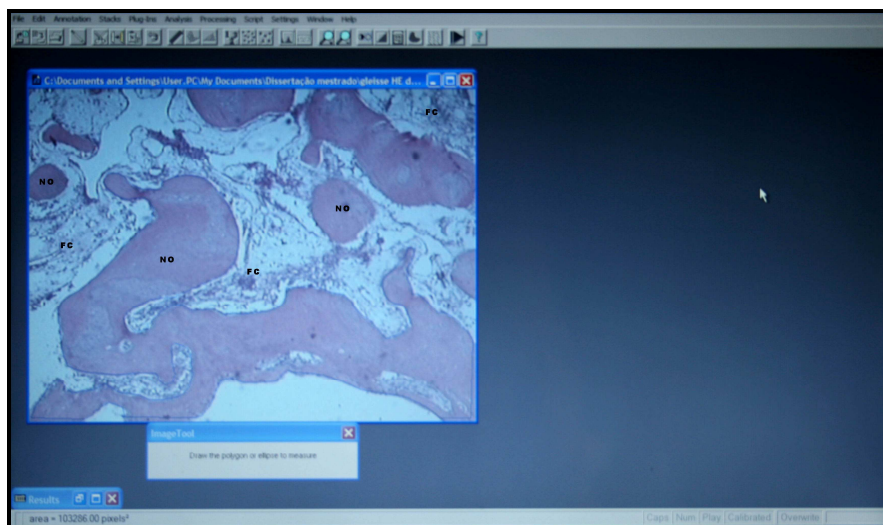


Figura 11: Delimitação das áreas de neoformação óssea (NO) e das fibras colágenas (FC) através do programa *Image Tool* com auxílio do cursor do *mouse*. A área é calculada automaticamente, através do programa *Image Tool Scripting*. Coloração por HE; ampliação original, 40X.

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

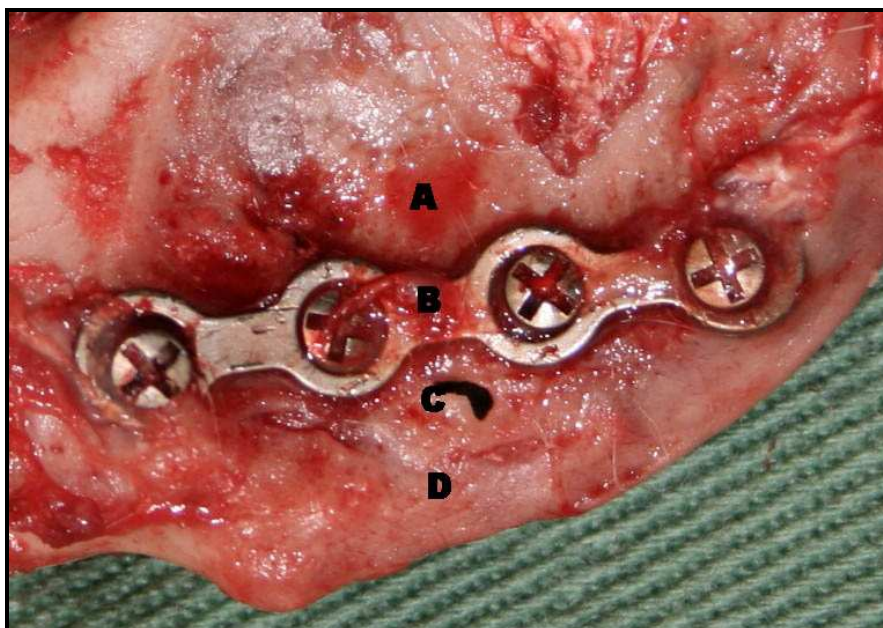


Figura 12: Regiões sequenciais (A, B, C, D) ao longo da linha de reparo da fratura óssea

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

4. 14. 2. 2 Coloração de Sirius-red

Os parâmetros para quantificação do tecido fibroblástico foram obtidos a partir de 4 campos distribuídos aleatoriamente em torno das 4 perfurações e na linha do reparo ósseo, com aumento de 400x, totalizando 300 imagens. Seleccionada a melhor resolução, empregou-se uma lente³⁸, rodada no sentido anti-horário, até a polarização da imagem. Os números representativos da área (μm^2) e da densidade do colágeno maduro e imaturo (μm) de acordo com uma média estatística oferecida pelo programa, foram transportados ao Excel (Anexo H e I), para análise estatística. Na imagem polarizada, as fibras de colágeno maduro (Tipo 1) coram-se em vermelho, e as fibras de colágeno imaturo (Tipo 2) coram-se em tons de verde. Estas fibras colágenas foram demarcadas com o auxílio de uma ferramenta do programa de computador Image Pro Plus, e calculada a média da área (μm^2) e da densidade total (μm) de colágeno presente na amostra.

4. 14. 3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras submetidas à microscopia eletrônica de varredura foram avaliadas quanto ao reparo tecidual no local da fratura e, quanto ao crescimento ósseo aposicional em torno do material implantado. Através da MEV foi possível identificar a presença de células osteoprogenitoras, bem como a reorganização tecidual ao longo da linha de osteotomia. O mapeamento da superfície por EDS propiciou a qualificação e a quantificação dos elementos químicos presentes na superfície da amostra.

4. 14. 4 Análise da Densitometria Óssea

Para a determinação da densitometria óssea foi analisada a densidade total da peça em relação proporcional à área R1 demarcada como o ponto

³⁸ Olympus U-Pot.

simétrico, passando com exatidão pela linha da osteotomia, a partir da cortical basal da mandíbula do animal. As unidades de medida avaliadas foram a densidade de massa total da peça (cm^2), a densidade óssea da parte mineral (gr), a quantidade de mineral no osso (gr/cm^2), a densidade total da área selecionada R1 (cm^2), a densidade óssea da parte mineral para a área R1 (gr) e a quantidade de mineral no osso em R1 (gr/cm^2).

Para analisar a densidade óssea no local da fratura, foi utilizado um programa específico para ossos pequenos, as medidas específicas foram obtidas através de um retângulo (R1), estabelecido na região central da linha de reparo da fratura óssea. A qualidade do osso neoformado foi comparada, qualitativamente, através de valores numéricos, nos diferentes períodos de tempo.

4. 15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados individuais de cada animal constantes nas Tabelas dos Anexos E, F, G, H, I foram submetidos às análises estatísticas, nos períodos de tempo de 30, 60 e o de 90 dias comparativamente. O nível mínimo de significância aceito é 5% ($p < \text{ou} = 0,05$). Os dados da análise macroscópica (reparo ósseo na linha de fratura e o crescimento ósseo aposicional) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados da microscopia óptica com coloração hematoxilina-eosina (reparo ósseo e fibras colágenas na linha da fratura óssea) foram analisados pelo teste ANOVA, individualmente para cada fator. Os dados quantitativos da microscopia com coloração Sirius-red (área e densidade do colágeno tipo I e II) foram submetidos aos testes de Tukey e ANOVA, através de análises desmembradas para cada fator.



5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE MACROSCÓPICA

5.1.1 Análise descritiva

Durante o período de observação, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal da ferida cirúrgica, sem evidência de infecção ou deiscência de sutura.

No período de tempo de 30 dias, o local de reparo ósseo, para a maioria das imagens analisadas, podia ser evidenciado como uma lacuna, livre de consolidação óssea, e sem preenchimento por tecido fibrótico, situado com mais freqüência entre o material de fixação e a cortical basilar. A discreta deposição de osso neoformado sobre a placa de titânio foi observada, especialmente em torno da perfuração lateral (Figura 13).

Aos 60 dias, este local de defeito ósseo pareceu estar preenchido por tecido conjuntivo fibroso, intimamente aderido ao material de fixação e ao perióstio no momento da remoção da peça anatômica. Lacunas livres de preenchimento tecidual ao longo da linha de reparo ósseo foram raramente identificadas, nas imagens analisadas. O crescimento ósseo aposicional delimitou a impressão da placa sobre a superfície óssea, com imersão parcial das cabeças dos parafusos por tecido ósseo neoformado (Figura 14).

O tecido fibroso foi substituído por osso imaturo, e ao período de 90 dias, todas as amostras do grupo apresentavam plena consolidação óssea do defeito criado. Em torno do material de fixação evidenciou-se intensa deposição óssea, com tendência à imersão das placas de titânio (Figura 15).

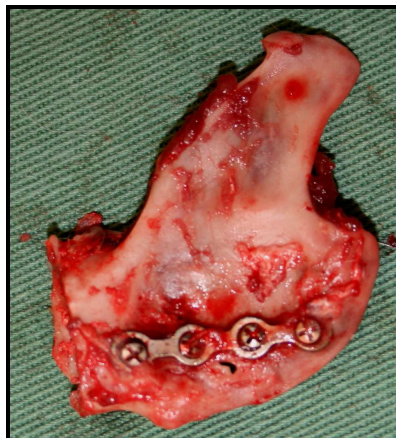


Figura 13: Peça operatória do período de 30 dias apresentando linha de fratura definida e discreto recobrimento do material de fixação

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

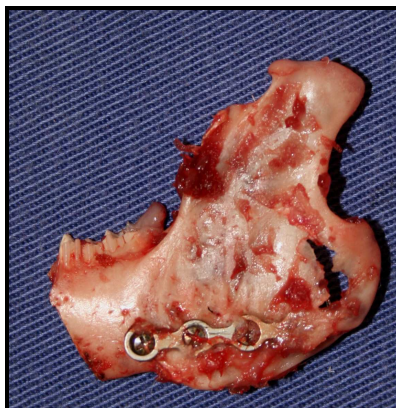


Figura 14: Peça operatória do período de 60 dias apresentando reparo ósseo da linha de fratura e moderado recobrimento do material de fixação

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

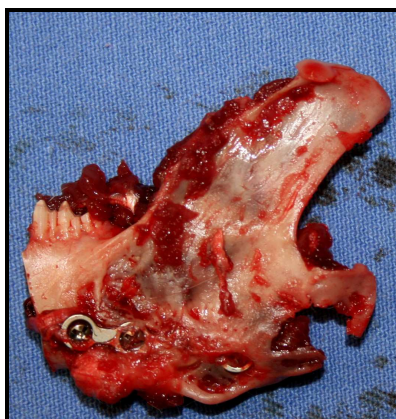


Figura 15: Peça operatória do período de 90 dias apresentando intenso recobrimento do material de fixação

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 1. 2 Análise Estatística:

Os escores médios da Tabela 5.1 correspondem à avaliação macroscópica do reparo ósseo (1- discreto; 2- moderado e 3- intenso) nos diversos períodos de tempo. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença significativa em relação ao tempo. Entretanto, nota-se uma tendência de reparo ósseo mais intenso aos 90 dias. A Tabela 5.2 apresenta os escores médios da avaliação macroscópica do crescimento ósseo aposicional. O teste de Kruskal-Wallis mostrou significância para esta avaliação ($p < 0,0361$). Embora não existam diferenças significativas entre as médias correspondentes a 30 e 60 dias, e 60 e 90 dias. Entre 30 e 90 dias observa-se uma diferença significativa estatisticamente. Nota-se que aos 90 dias o crescimento ósseo aposicional foi mais significativo se comparado ao período de 30 dias.

Tabela 5.1: Médias (escores) e teste de Kruskal-Wallis* da avaliação macroscópica de reparo Ósseo, nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias

Média (escore)**	Período de observação (dias)		
	30	60	90
	1,5 a	1,5 a	2,2 a

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Teste: probabilidade H_0 (17,58%) – não significativa

** Médias com mesmas letras são semelhantes

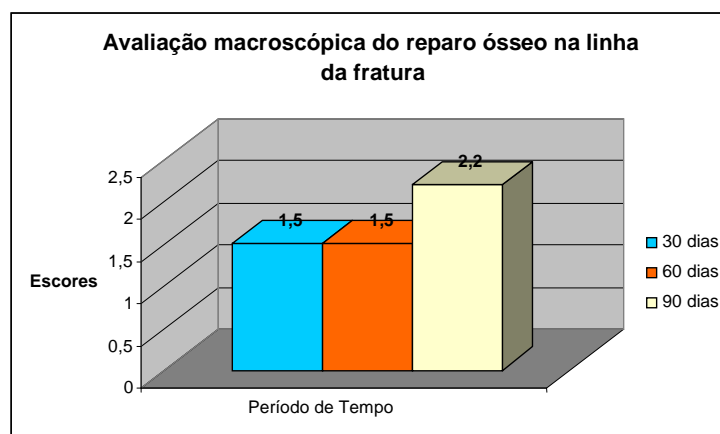


Gráfico 1: Observa-se pouca diferença entre o reparo ósseo e os períodos de tempo

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.2: Médias (escore) e teste de Kruskal-Wallis* da avaliação macroscópica do crescimento ósseo aposicional, nos períodos de tempo de 30, 60 e 90 dias

Média (escore)**	Período de observação (dias)		
	30	60	90
	1,3 b	1,8 b	2,3 b

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Teste: probabilidade Ho (3,61%) – significativa

** Médias com mesmas letras são semelhantes

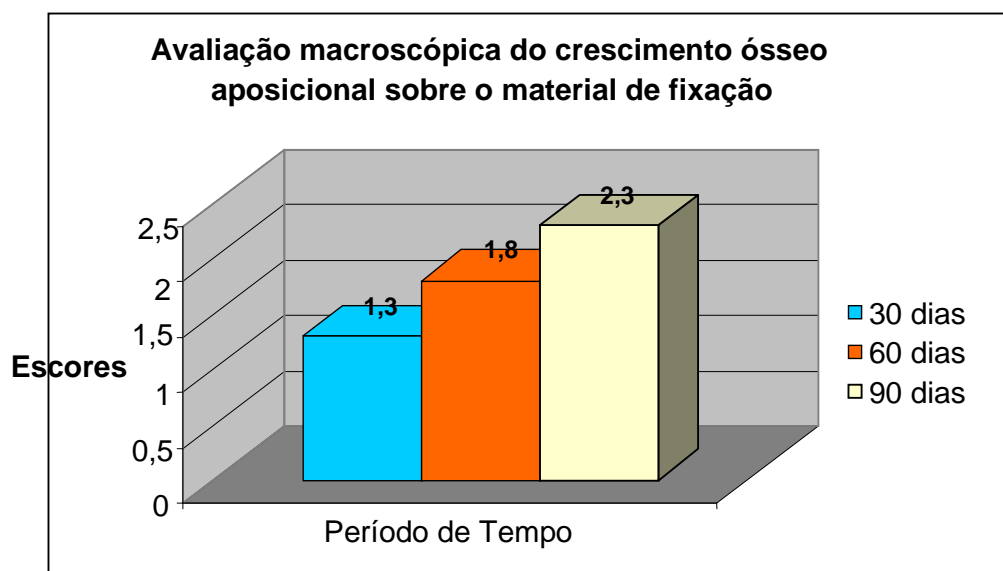


Gráfico 2: Observa-se diferença entre as médias do crescimento ósseo aposicional entre os períodos de tempo, especialmente entre 30 e 90 dias

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5.2 RESULTADOS DO EXAME POR MICROSCOPIA DE LUZ

5. 2. 1 Coloração de Hematoxilina-eosina: análise descritiva

A análise descritiva das lâminas coradas com HE procurou avaliar, em torno das 4 perfurações e na linha de reparo da fratura, a neoformação óssea, a deposição de tecido fibroblástico e a atividade angiogênica. Na linha da fratura procurou-se identificar a região do defeito ósseo e seu processo de ossificação.

5. 2. 1. 1 Grupo I- Período de Avaliação de 30 dias

As secções histológicas revelam uma linha de fratura óssea definida através de dois fragmentos de osso corticalizado, e no seu interior, a deposição de atividade fibroblástica, angiogênica e osteoclástica. As soluções de continuidade compatíveis com os defeitos ósseos confeccionados foram evidenciadas transversalmente e obliquamente à corticalização em torno do material de fixação (Figura 16). Entre as fibras colágenas observou-se o início da neoformação óssea (Figura 17).

Em torno das perfurações foi observada discreta atividade de neoformação óssea. A intensa deposição de fibras colágenas, entremeadas pela atividade osteoclástica estavam presentes, na maioria das imagens analisadas (Figura 18). A maioria dos campos analisados apresentou atividade angiogênica (Figura 19).

Sinais de necrose, invaginação de tecido conjuntivo para o interior da cavidade e atividade inflamatória não foram evidenciados nos campos histológicos estudados.



Figura 16: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se entre os bordos do tecido cortical (TC), trama de fibras colágenas (FC), atividade angiogênica (AA), atividade osteoclástica (OC) na linha de fratura óssea (LF). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

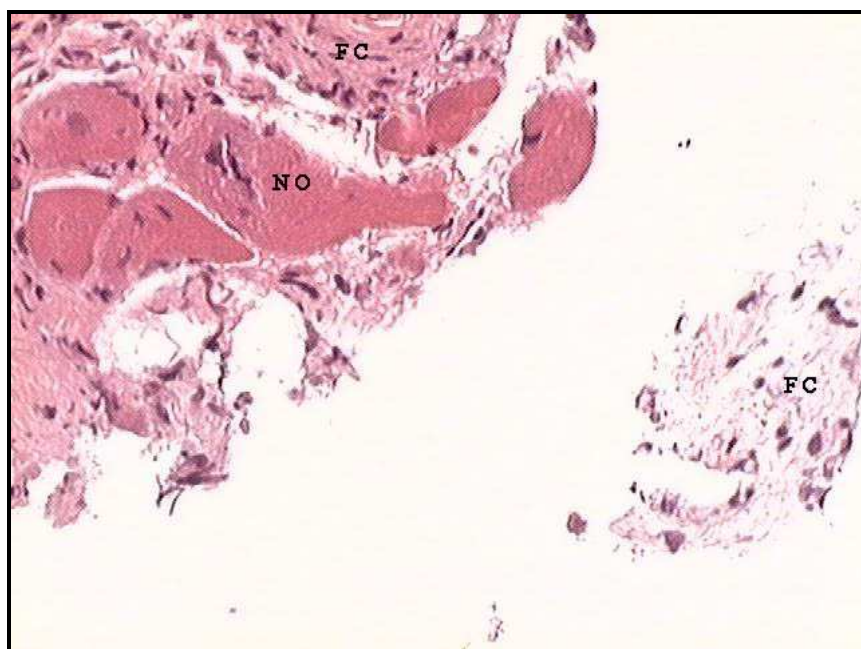


Figura 17: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se neof ormation óssea (NO) e trama de fibras colágenas (FC). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 18: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se em torno das perfurações o tecido cortical (TC) neoformado, trama de fibras colágenas (FC) e atividade osteoclástica (OC). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

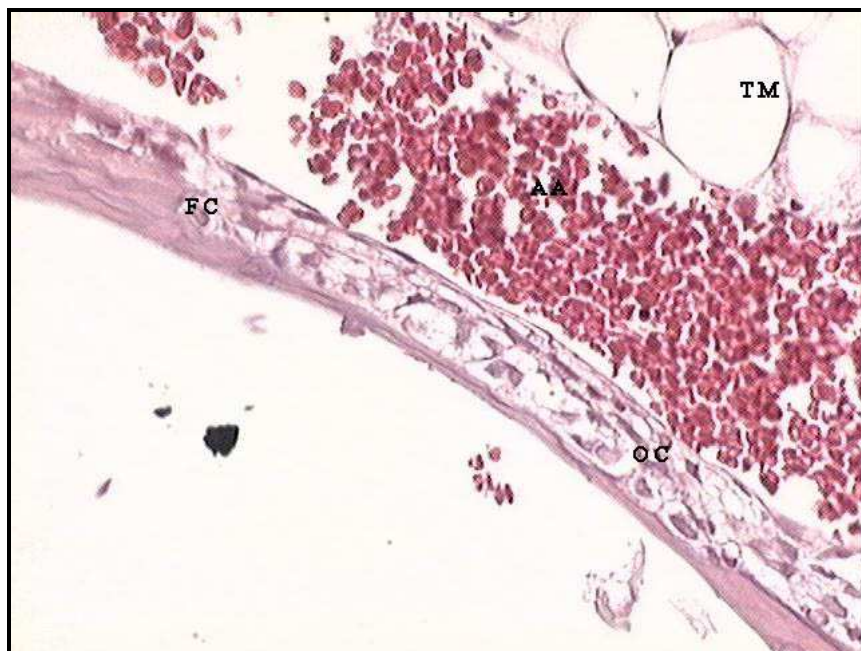


Figura 19: Imagem de corte histológico do grupo I. Observa-se em torno das perfurações tecido medular (TM), trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e atividade angiogênica (AA). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 2. 1. 2 Grupo II- Período de Observação de 60 dias

As secções histológicas revelam uma linha de fratura óssea pouco definida, se comparada às imagens do período de tempo anterior. Os fragmentos de osso corticalizado apresentam no seu interior uma deposição importante de fibras colágenas, e entre estas fibras, o início da atividade dos osteócitos para promover o reparo local (Figura 20). Estas fibras colágenas apresentam-se dispostas de maneira mais ordenada, no sentido da linha de reparo ósseo, transversa ao material de fixação (Figura 21). Observa-se atividade osteoclástica moderada e ou discreta ao longo da linha da fratura. A neoformação vascular foi substituída por células osteoprogenitoras. As soluções de continuidade compatíveis com os defeitos ósseos, a linha de fratura óssea, apresentavam-se preenchidas por tecido fibroblástico, na maioria das imagens analisadas.

Em torno das perfurações observa-se, semelhante ao encontrado na linha da fratura, o início da atividade de neoformação óssea, com matrizes ósseas em processo de ossificação, situadas entre as fibras colágenas. As células osteoclásticas foram observadas em torno dos osteócitos, auxiliando no processo de remodelação óssea. A atividade angiogênica foi observada apenas em torno das células do reparo ósseo, para a maioria dos campos analisados (Figura 22). As fibras colágenas, apresentavam-se dispostas de maneira circular, em torno da região correspondente à cabeça do parafuso (Figura 23).

Sinais de necrose ou atividade inflamatória e infecciosa não foram evidenciados, nos campos histológicos estudados.

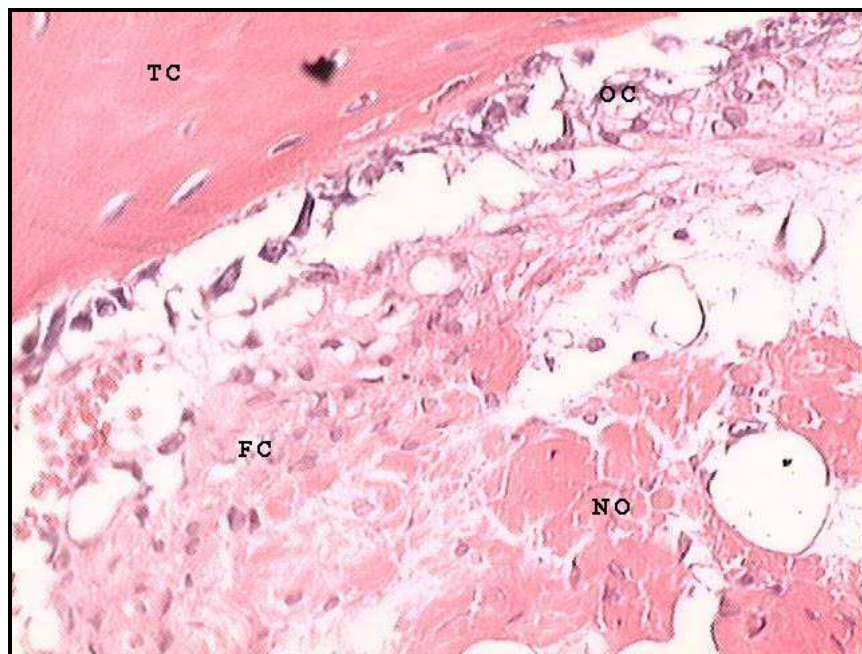


Figura 20: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se na linha de fratura o tecido cortical (TC), trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

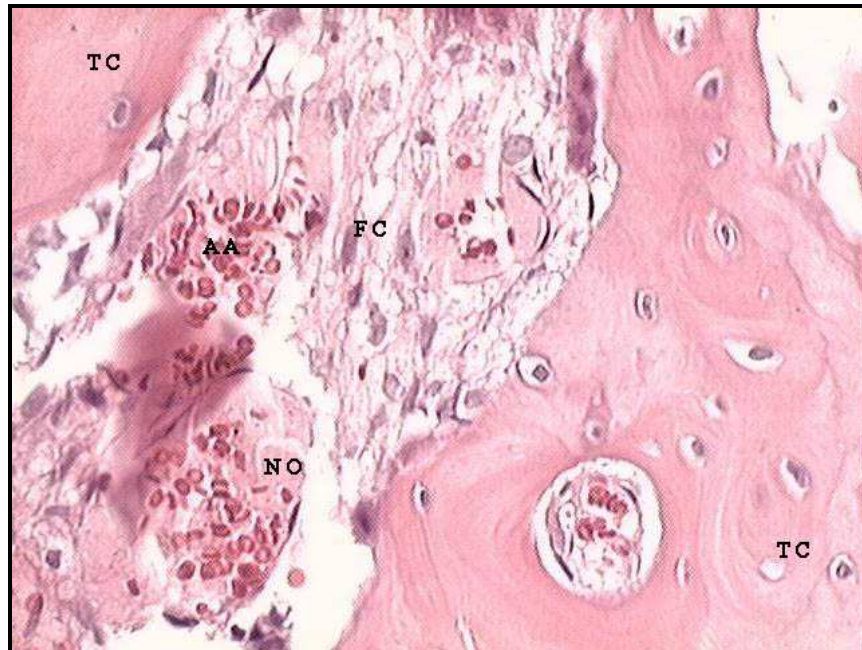


Figura 21: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se na linha de fratura tecido cortical (TC), preenchido por uma trama de fibras colágenas (FC), atividade angiogênica (AA) e início da neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 22: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se em torno da perfuração uma trama de fibras colágenas (FC) circular, atividade angiogênica (AA), atividade osteoclástica (OC) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

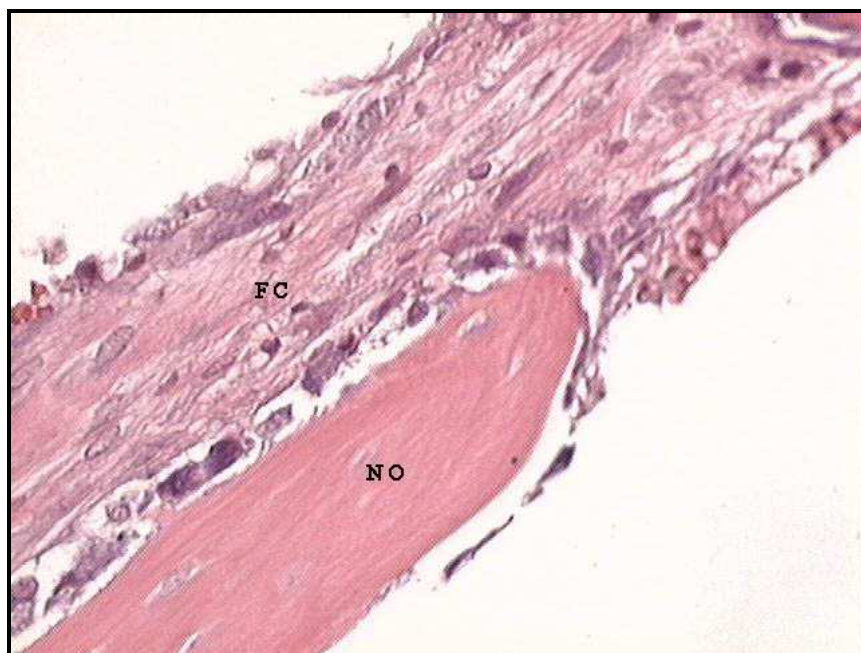


Figura 23: Imagem de corte histológico do grupo II. Observa-se em torno da perfuração uma trama de fibras colágenas (FC) e neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 2. 1. 3 Grupo III- Período de Observação de 90 dias

As secções histológicas revelam uma linha de fratura óssea pouco definida, até mesmo não identificada em determinados cortes. Os fragmentos de osso corticalizado apresentam no seu interior uma deposição intensa de fibras colágenas, e entre estas fibras, atividade dos osteócitos para promover o reparo local (Figura 24). As fibras colágenas estavam dispostas de maneira ordenada, seguindo o sentido da linha de reparo ósseo (Figura 25). A atividade osteoclástica apresenta-se discreta, ao longo da linha da fratura. A neoformação vascular foi substituída na maior parte das imagens analisadas, por células osteoprogenitoras. As soluções de continuidade compatíveis com os defeitos ósseos confeccionados apresentam-se totalmente preenchidos por tecido fibroblástico ou por matriz óssea.

Em torno das perfurações observou-se aglomeração de osteoblastos, entre o osso cortical e as fibras colágenas (Figura 26). Estas fibras colágenas apresentam-se em processo de ossificação. Alguns osteoclastos foram identificados em torno da matriz de osso neoformado, auxiliando o processo de remodelação óssea (Figura 27).

Sinais de necrose e atividade inflamatória, mesmo no período de tempo tardio, não foram evidenciados, nos campos histológicos estudados.

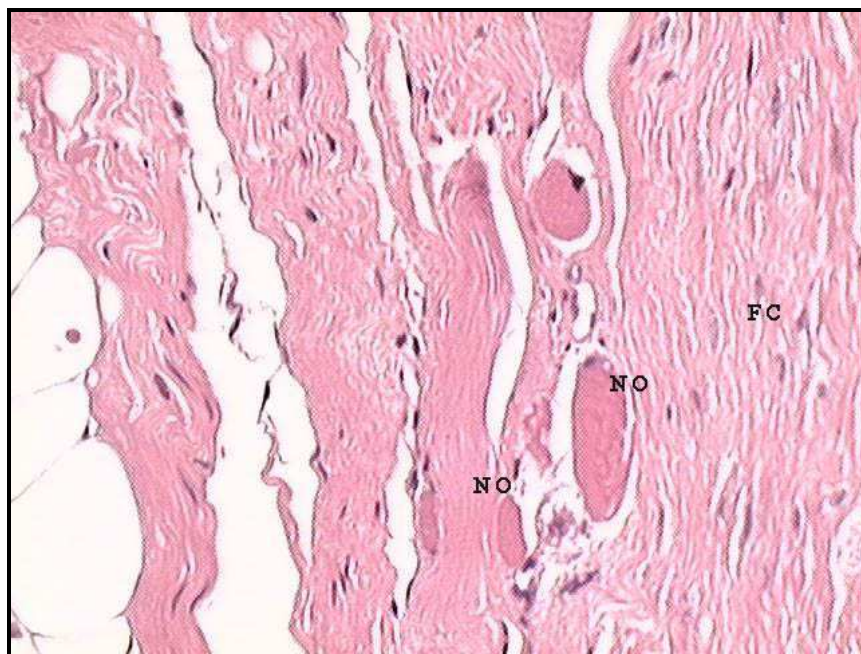


Figura 24: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se na linha de reparo da fratura, uma trama de fibras colágenas (FC) orientadas e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

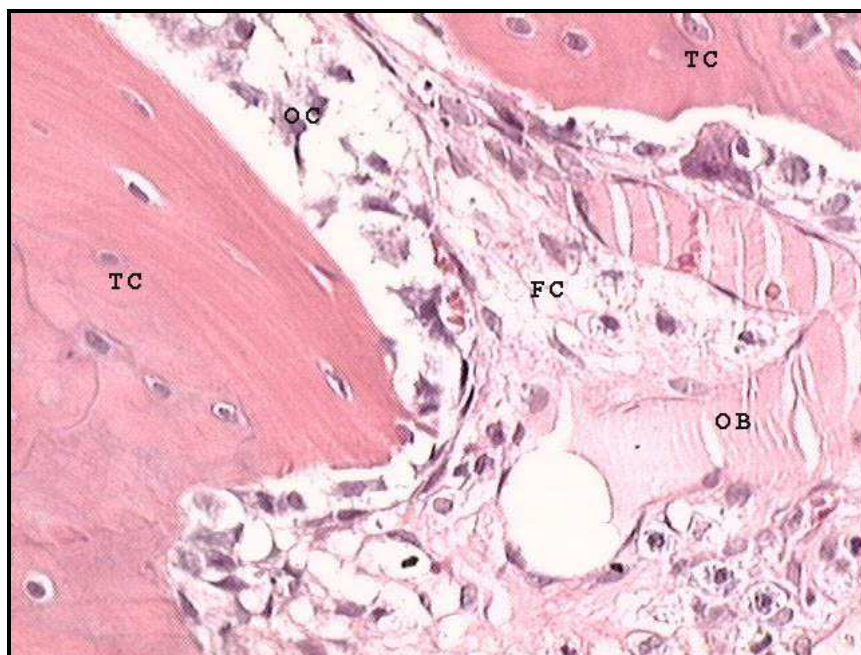


Figura 25: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC), atividade osteoblástica (OB) e tecido cortical (TC). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

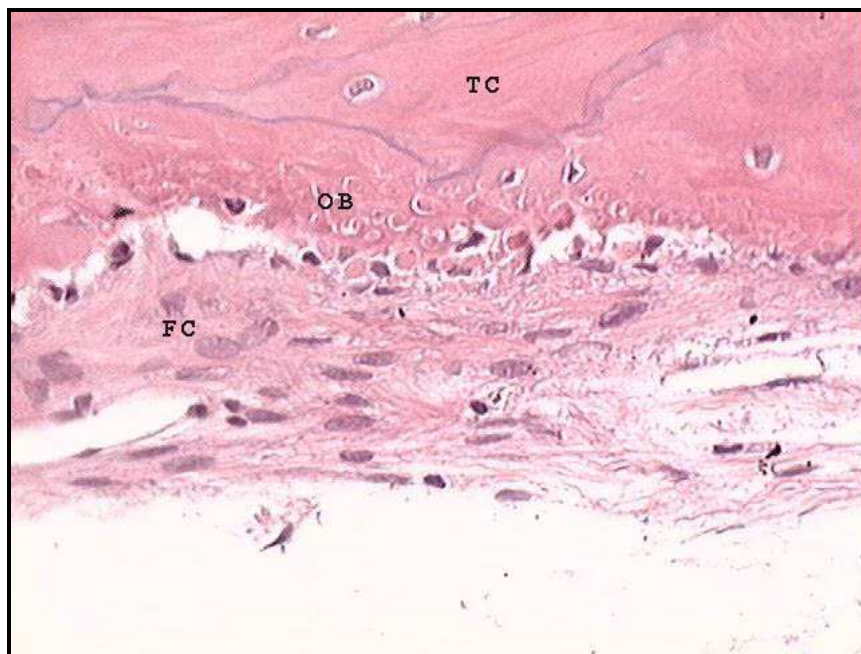


Figura 26: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se em torno da perfuração a trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoblástica (OB) e tecido cortical (TC). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

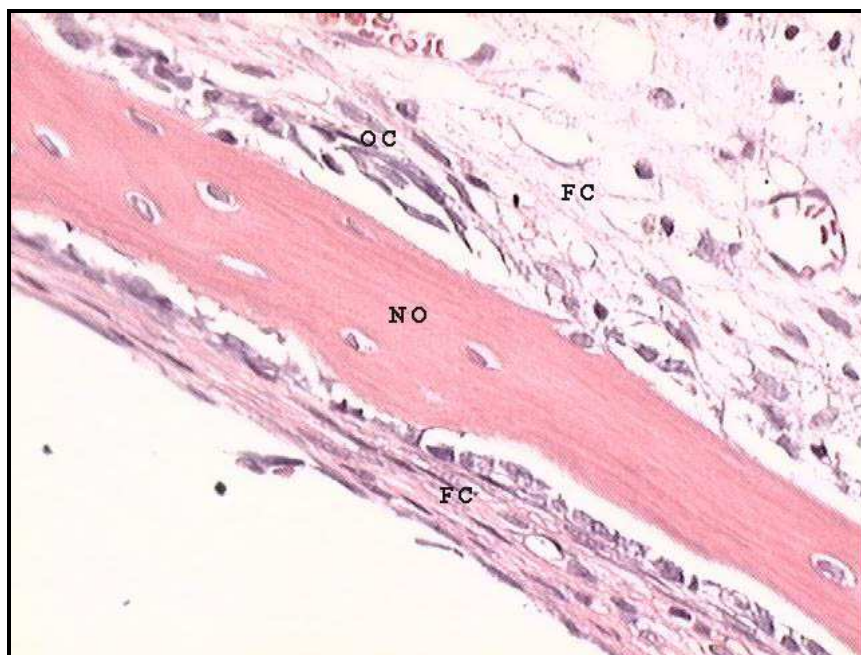


Figura 27: Imagem de corte histológico do grupo III. Observa-se em torno da perfuração trama de fibras colágenas (FC), atividade osteoclástica (OC) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 400X. Coloração HE

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 2. 2 Coloração de Hematoxilina-eosina: análise estatística da neoformação óssea e da deposição de fibras colágenas na linha de reparo da fratura óssea

Os dados coletados do reparo ósseo e das fibras colágenas estão respectivamente nos anexos F e G.

Os dados mencionados, em μm^2 , foram submetidos à análise ANOVA separadamente.

Os resultados não mostraram significância estatística tanto para os fatores principais quanto para as interações correspondentes, devido à grande variabilidade dos valores obtidos para um mesmo período de tempo, entre os animais da amostra. As repetições (coelhos) não apresentaram uma tendência numérica, entre as quatro regiões do reparo da linha de reparo ósseo. Na mesma repetição foram observadas diferenças significativas, entre os dados coletados.

A fim de dar ao leitor uma noção mais precisa dos valores das médias, os dados obtidos em μm^2 (Tabela 5.3) foram convertidos para mm^2 (1 mm^2 = 1.000 μm^2).

Esta grande variabilidade entre as repetições está representada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Médias* (mm^2) do reparo ósseo e fibras colágenas na linha de fratura-coloração HE.

Grandeza avaliada	Período de tempo (dia)	Região**			
		a	b	c	d
Reparo ósseo	30	1,64 a	1,54 a	1,61 a	1,41 a
	60	2,39 a	2,13 a	0,74 a	2,56 a
	90	1,86 a	1,82 a	1,61 a	1,05 a
Fibras colágenas	30	1,47 b	1,93 b	1,15 b	1,27 b
	60	0,79 b	1,26 b	1,66 b	0,60 b
	90	0,52 b	0,81 b	0,64 b	1,09 b

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com mesmas letras são semelhantes

** Região: a (próxima à superfície dos dentes); d (próxima à cortical basilar)

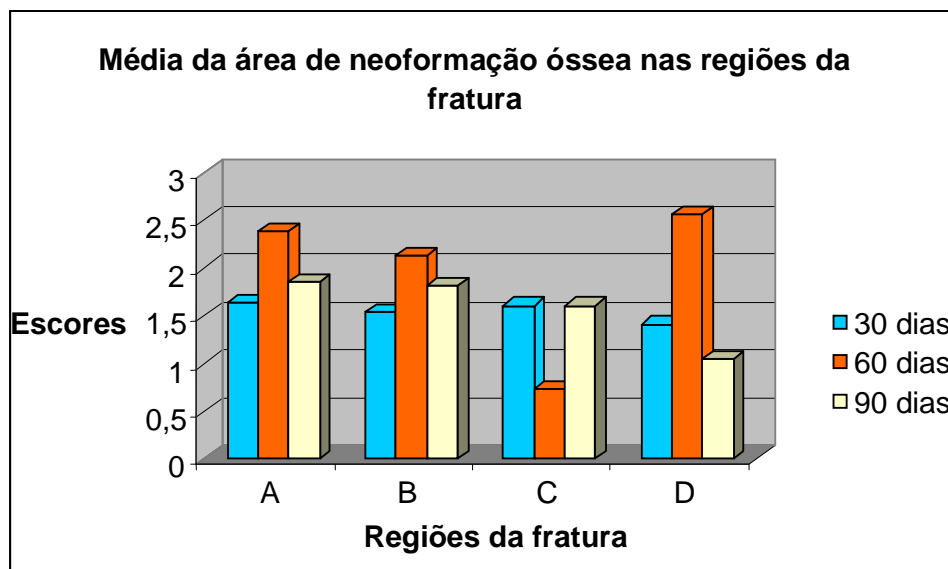


Gráfico 3: Médias* (mm^2) do reparo ósseo na linha de fratura, observando evidência de reparo ósseo mais acentuado no período de tempo de 60 dias para as regiões A, B e D.

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

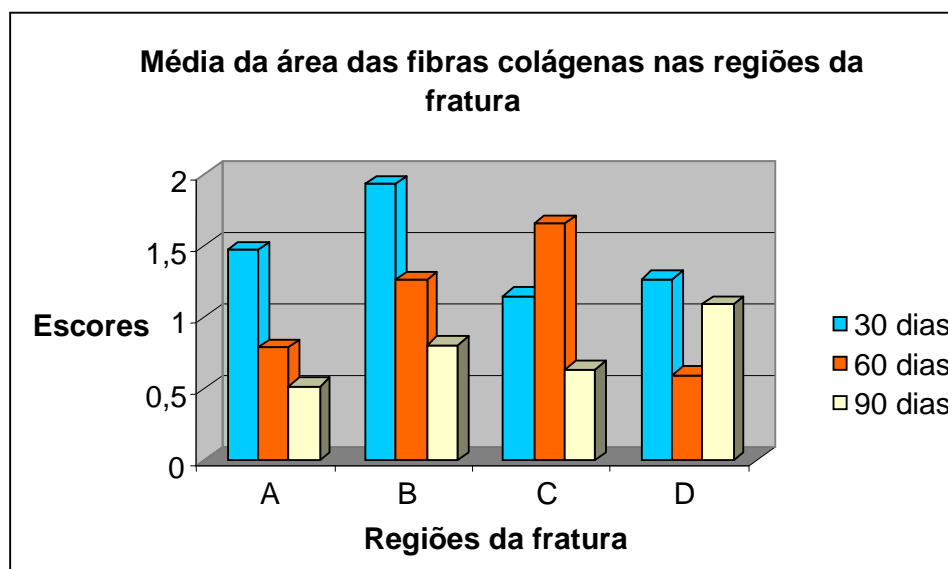


Gráfico 4: Médias* (mm^2) das fibras colágenas na linha de fratura, observando evidência de deposição mais acentuada no período de tempo de 30 dias para as regiões A, B e D.

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 2. 2 Coloração de *Sirius-red*

A análise por *Sirius-red* (SR) permite avaliar através da análise descritiva e quantitativa, a deposição das fibras colágenas na linha de reparo da fratura óssea e em torno do material de fixação.

As fibras de colágeno maduro, tipo I, apresentam-se em coloração vermelha e as fibras do colágeno imaturo, tipo II, coram-se em tons de verde.

Independentemente do período de tempo analisado, o colágeno tipo I esteve mais predominante, tanto para a linha da fratura (Figura 29; 31; 33), quanto em torno das perfurações (Figura 28; 30; 32).

Na linha de reparo da fratura óssea, aos 90 dias pode ser evidenciada a deposição acentuada de colágeno tipo I.



Figura 28: Imagem de corte histológico do grupo I região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 29: Imagem de corte histológico do grupo I região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 30: Imagem de corte histológico do grupo II região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

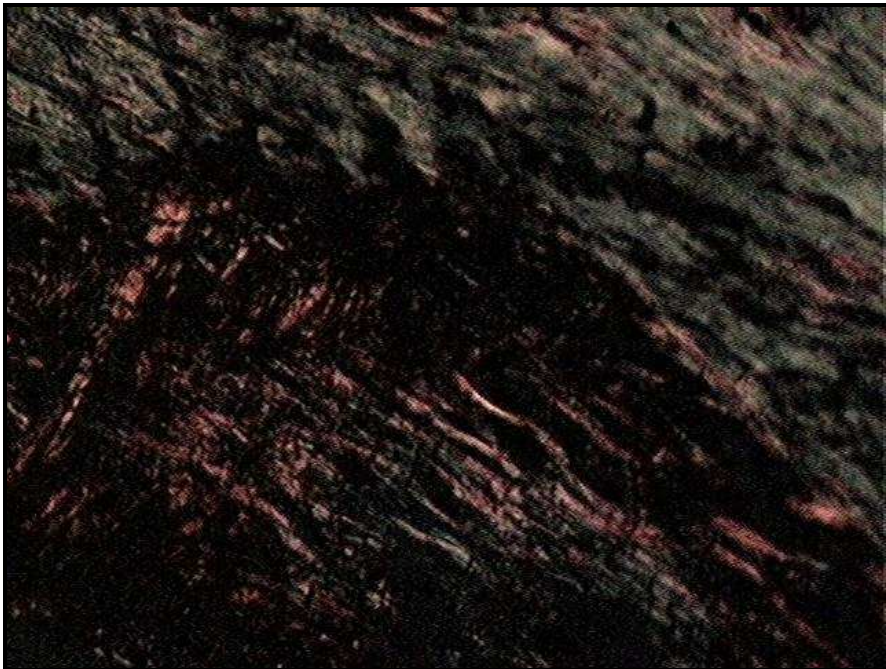


Figura 31: Imagem de corte histológico do grupo II região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

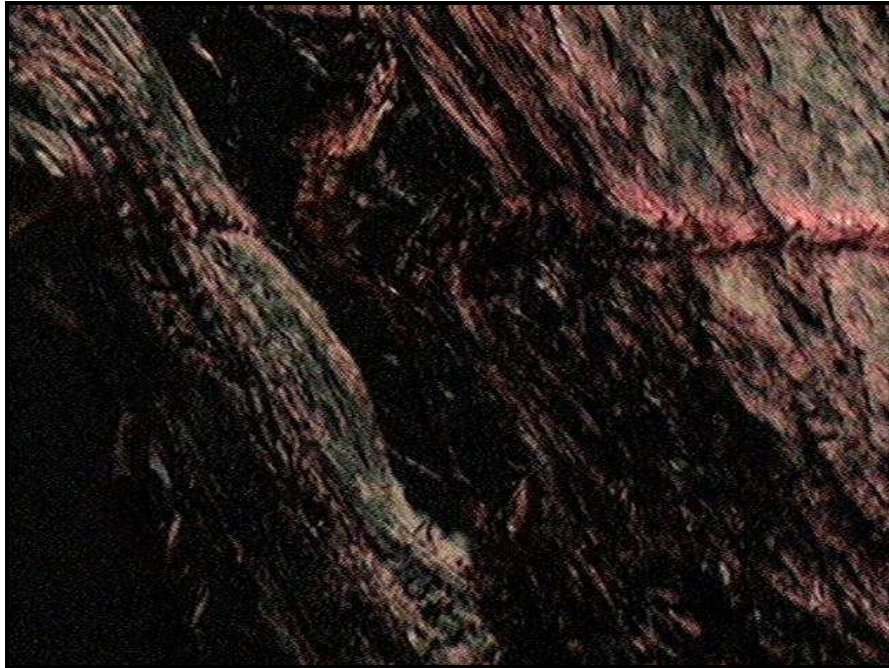


Figura 32: Imagem de corte histológico do grupo III região das perfurações. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)



Figura 33: Imagem de corte histológico do grupo III região da fratura óssea. Observa-se trama de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. Aumento de 400X. Coloração SR

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Análise estatística

5. 2. 2. 1 Área total dos colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura

Os resultados dessas avaliações encontram-se nas Tabelas 5.4 a 5.7.

A análise de variância (Tabela 5.4) mostrou significância para o tipo de colágeno e a interação correspondente a *tipo de colágeno x região*. Os demais fatores principais e interações não foram significantes.

A Tabela 5.5 apresenta as médias correspondentes ao tipo de colágeno. Verifica-se a predominância significativa ($189 \mu\text{m}^2$) do tipo I (maduro) em relação ao tipo II (imaturo), de $100 \mu\text{m}^2$.

A Tabela 5.6 apresenta as médias correspondentes à interação significativa *tipo de colágeno x região*.

Verifica-se (Tabela 5.6) que o tipo de colágeno maduro predomina em relação ao imaturo nas duas regiões. Entretanto a predominância foi maior na região da perfuração (203 e 90) do que na linha de fratura (175 e 109). Ainda que apresente pouca significância estatística, numericamente, o colágeno tipo I está mais presente em torno das perfurações. O colágeno tipo II, imaturo, foi mais intensamente observado na linha de reparo da fratura óssea.

A Tabela 5.7, correspondente às médias da interação *período de tempo x tipo de colágeno x região*, mostra as tendências observadas atrás.

Nota-se (Tabela 5.7) que nas regiões das perfurações, não houve variação significativa, tanto do colágeno maduro como imaturo, em relação ao período de tempo. Já na linha de fratura o colágeno maduro apresentou, aos 90 dias em relação aos 30, aumento significativo. Com o colágeno imaturo ocorreu situação semelhante. Nos três períodos de tempo, os valores são semelhantes.

Tabela 5.4: Análise de variância da área total dos colágenos distribuídos nas perfurações (P) e linha de reparo da fratura (F)- coloração SR

Fonte de variação	Perf.	Quadrados médios	Fratura	Probabilidade Ho (%)
Período de tempo (P)	2	2.424,7876	0,24	79,389
Resíduo I	12	10.194,7959	---	---
Bloco Principal	14	---	---	---
Tipo colágeno (T)	1	120.064,1406	36,30	0,016
Interação P x T	2	4.342,9795	1,31	30,512
Resíduo II	12	3.307,4709	---	---
Sub-bloco	15	---	---	---
Região (R)	1	256,1417	0,14	71,443
Interação P x R	2	2.687,0791	1,45	25,462
Interação T x R	1	8.496,7930	4,57	4,064
Interação P x T x R	2	1.485,5537	0,80	53,497
Resíduo III	24	1.859,0333	---	---
Sub-bloco	30	---	---	---
Total	59	---	---	---

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.5: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, coloração SR, correspondente ao fator tipo de colágeno.

Tipo de colágeno	
1 (maduro)	2 (imaturo)
189 a	100 b

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com mesmas letras são semelhantes

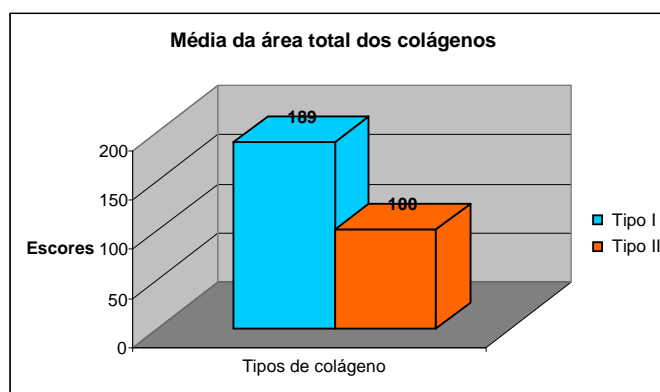


Gráfico 5: Predominância significativa do colágeno maduro Tipo I

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.6: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, coloração SR, correspondente à interação tipo de colágeno x região.

Região	Tipo de colágeno		Tukey (5%)
	1 (maduro)	2 (imaturo)	
P (perfurações)	203 a	90 b	43,4
L (linha de fratura)	175 a	109 b	

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com letras iguais são semelhantes

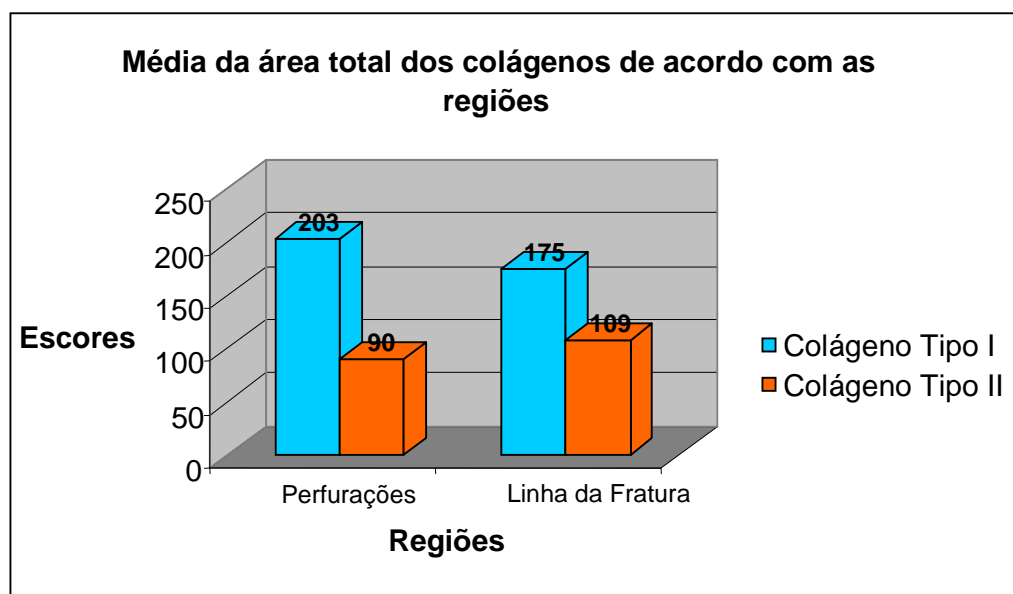


Gráfico 6: Predominância do Colágeno Tipo I em torno das perfurações e na linha de reparo da fratura óssea

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.7: Médias* (μm^2) da área total de colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura, coloração SR, correspondente à interação período de tempo x tipo de colágeno x região.

Região	Tipo de colágeno	Período de tempo (dias)		
		30	60	90
Perfurações	1 (maduro)	199 ab	196 abc	214 a
	2 (imaturo)	99 cd	82 d	88 d
Linha de fratura	1 (maduro)	134 bcd	172 abcd	220 a
	2 (imaturo)	103 bcd	125 abcd	101 cd

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com letras iguais são semelhantes. Tukey (5%) = 97,1.

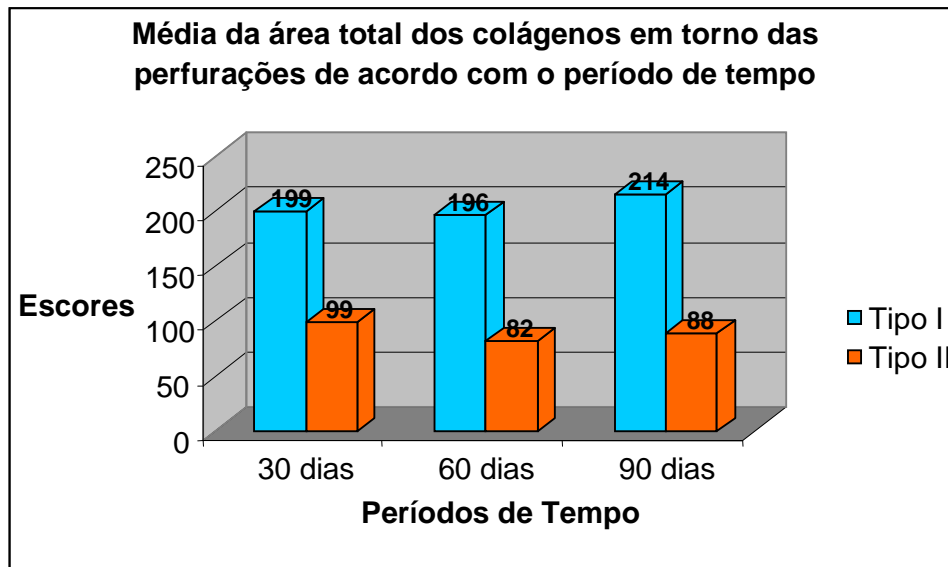


Gráfico 7: Pouca expressividade estatística dos tipos de colágeno em torno das perfurações

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

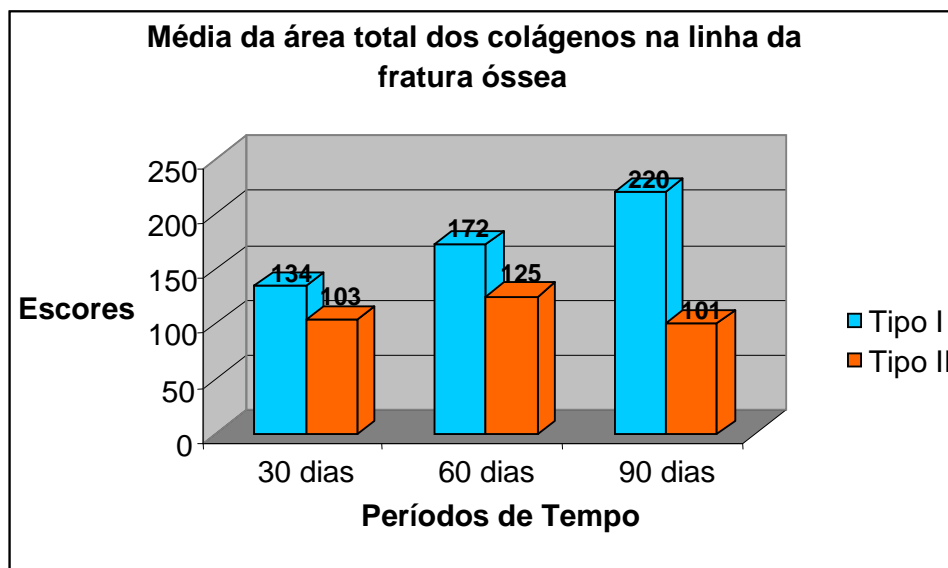


Gráfico 8: Maior significância do colágeno tipo I aos 90 dias, na linha da fratura

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 2. 2. 2 Densidade total dos colágenos distribuídos nas perfurações e linha de reparo da fratura

Os resultados dessa avaliação encontram-se nas Tabelas 5.8 a 5.10. Através da análise ANOVA (Tabela 5.8) observa-se que apenas o tipo de colágeno foi significativo. A Tabela 5.9 mostra a maior expressividade do colágeno maduro (109 μm), comparado com o imaturo (57 μm).

As médias correspondentes à interação *período de tempo x tipo de colágeno x região*, encontram-se na Tabela 5.10. As médias correspondentes ao colágeno imaturo, em relação ao maduro, em todos os casos, são significativamente menores.

Ainda que os resultados da densidade do colágeno maduro apresentem insignificância estatística, numericamente, estes valores aumentam com o período de tempo, tanto pra a região das perfurações como para a linha da fratura. Para o colágeno imaturo, na região das perfurações, nota-se uma diminuição, apenas numérica, com o aumento do tempo. Na região da linha de fratura, o colágeno imaturo apresenta o maior valor no período de 60 dias (80 μm).

Tabela 5.8: Análise de variância da densidade total de colágeno, distribuído nas perfurações e na linha de fratura- coloração SR.

Fonte de variação	Perf.	Quadrados médios	Frat.	Probabil. H0 (%)
Período de tempo (P)	2	1.062,9844	2,42	13,032
Resíduo I	12	440,1458	---	---
Bloco Principal	14	---	---	---
Tipo colágeno (T)	1	41.291,2539	72,69	0,002
Interação P x T	2	449,2480	0,79	52,082
Resíduo II	12	568,0208	---	---
Sub-bloco	15	---	---	---
Região (R)	1	459,2521	2,32	13,745
Interação P x R	2	555,8489	2,81	7,876
Interação T x R	1	317,4128	1,60	21,549
Interação P x T x R	2	255,3186	1,29	29,359
Resíduo III	24	198,0000	---	---
Sub-bloco	30	---	---	---
Total	59	---	---	---

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.9: Médias* (μm) da densidade total de colágenos distribuído nas perfurações e linha de fratura, coloração SR, correspondente ao fator tipo de colágeno.

Tipo de colágeno	
1 (maduro)	2 (imaturo)
109 a	157 b

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com mesmas letras são semelhantes

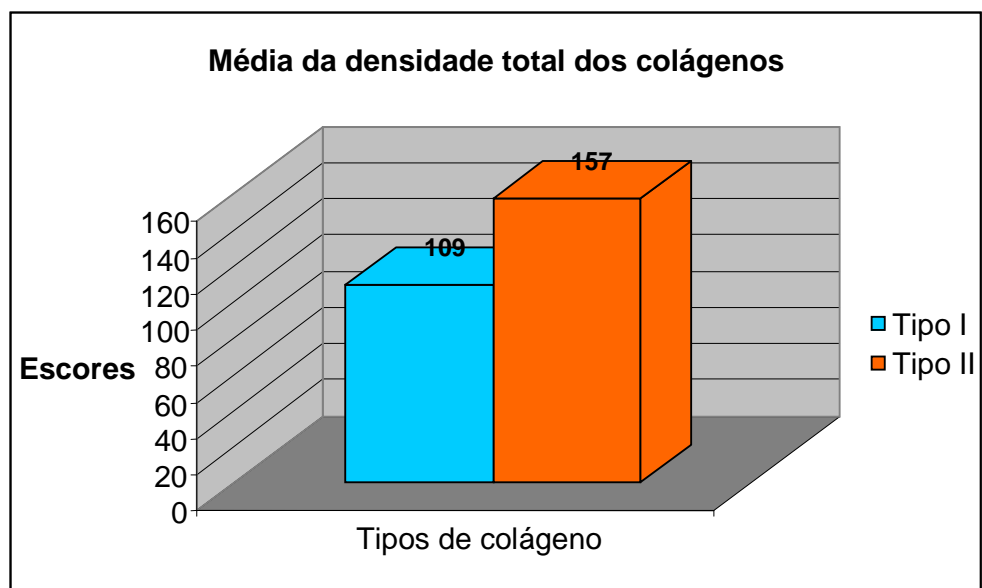


Gráfico 9: Maior significância da densidade do colágeno tipo II

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

Tabela 5.10: Médias* (μm) da densidade total de colágenos, distribuídos nas perfurações e na linha de fratura, coloração SR, correspondente à interação período de tempo x tipo de colágeno x região.

Região	Tipo de colágeno	Período de tempo (dias)		
		30	30	90
Perfurações	1 (maduro)	108 ab	111 ab	107 ab
	2 (imaturo)	61 cd	50 cd	44 d
Linha de fratura	1 (maduro)	107 ab	116 a	106 ab
	2 (imaturo)	63 cd	80 bc	42 d

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

* Médias com letras iguais são semelhantes. Tukey (5%) = 32,1.

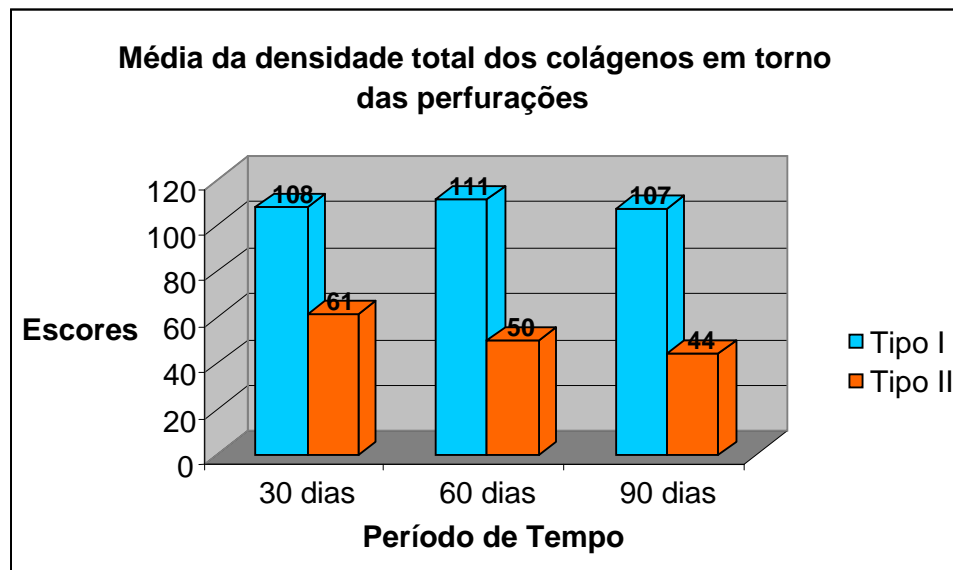


Gráfico 10: Discreta predileção da densidade do colágeno tipo II no período de 30 dias, em torno das perfurações

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

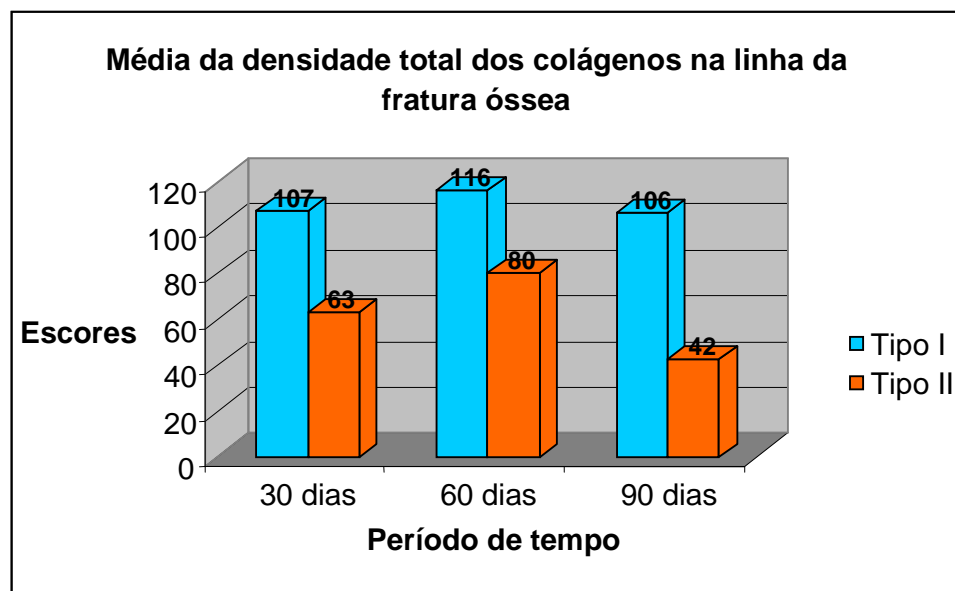


Gráfico 11: Densidade mais acentuada do colágeno tipo I e II no período de 60 dias, na linha da fratura

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 3 RESULTADOS DESCRITIVOS DA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise descritiva por microscopia eletrônica de varredura verificou a linha de reparo da fratura e a deposição de osso em torno do material de fixação. A análise por EDS quantificou e qualificou os elementos químicos presentes na superfície óssea.

5. 3. 1 Grupo I- Período de Observação de 30 dias

As imagens capturadas mostram uma deposição óssea vertical em torno do material de fixação, delimitando discretamente os contornos da placa e dos parafusos (Figura 34).

A linha da fratura encontra-se bem definida através de 2 segmentos de osso cortical, sem solução de continuidade (Figura 35). Na porção da cortical basilar da mandíbula, o reparo ósseo da fratura está em processo inicial de consolidação óssea, através da deposição de um osso jovem (Figura 36), pouco estruturado, apresentando em sua superfície células osteoblásticas (Figura 37).

Em torno das perfurações observa-se a deposição óssea nas estruturas adjacentes à cabeça do parafuso, e em torno das espiras do parafuso, um crescimento ósseo discreto (Figura 38). Neste crescimento ósseo em torno das espiras do parafuso, em maior aumento, observa-se a deposição intensa de células osteoblásticas (Figura 39).

Em análise da superfície óssea por EDS foram evidenciados elementos de Cálcio (Ca) e Fósforo (P), presentes na superfície óssea, Carbono (C) do preparo da amostra para análise e Oxigênio (O) do meio (Figura 40).

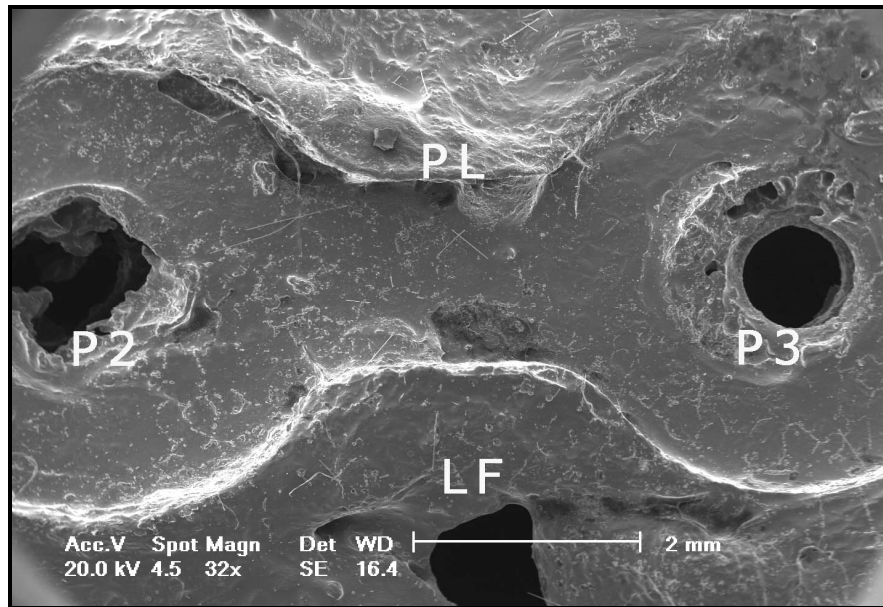


Figura 34: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se perfuração 2 (P2), osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3), linha de fratura (LF). Aumento de 32X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

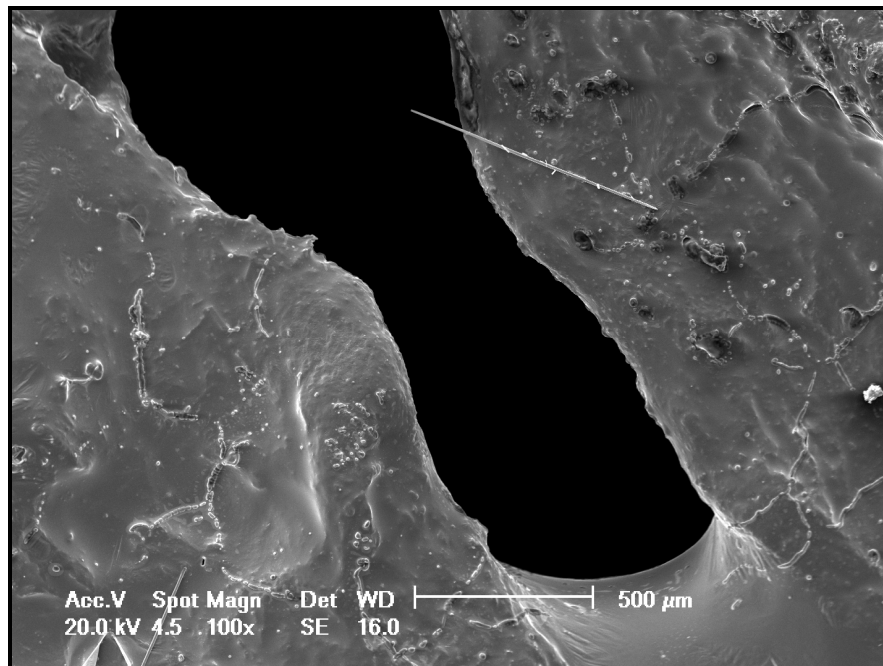


Figura 35: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se a lacuna correspondente à linha de fratura. Aumento 100X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

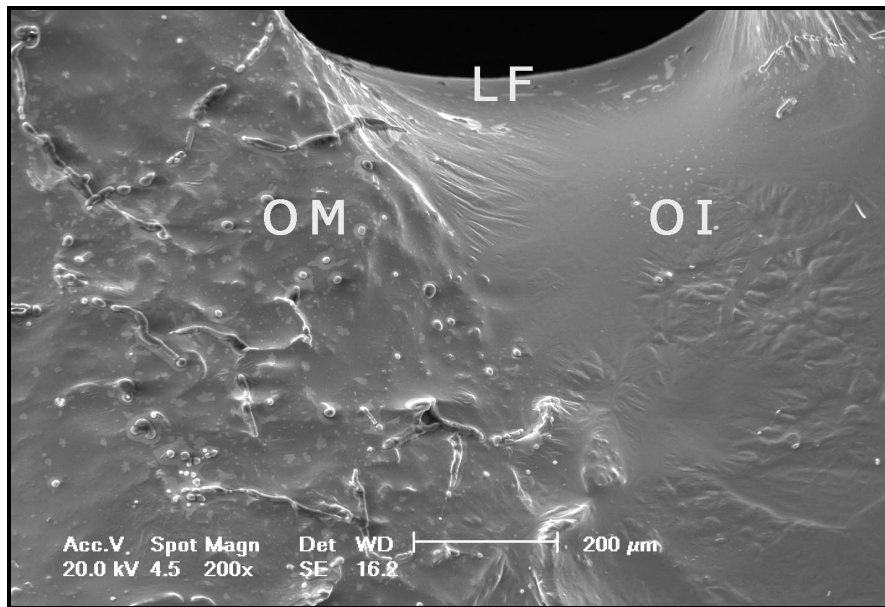


Figura 36: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se osso maduro (OM), osso imaturo (OI) e a linha de fratura (LF). Aumento de 200X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

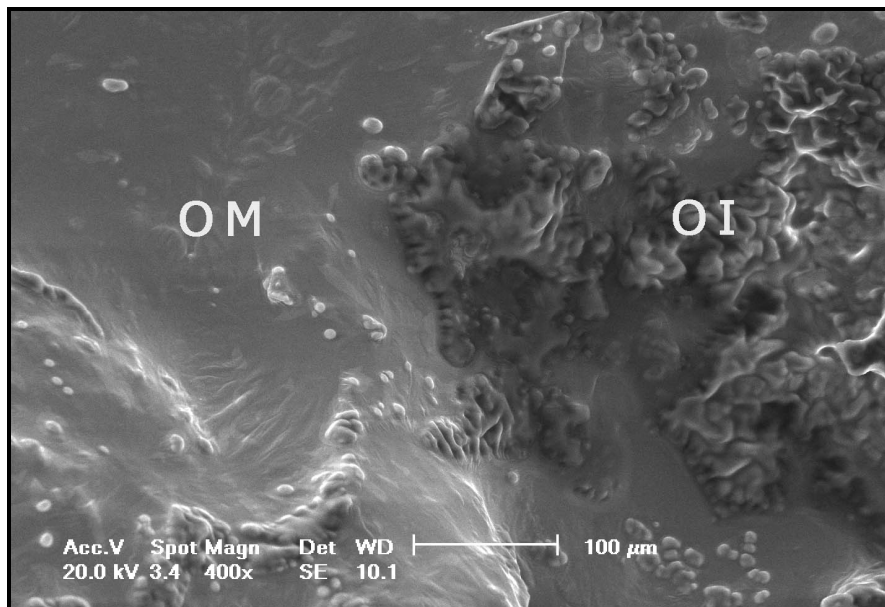


Figura 37: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se osso maduro (OM), osso imaturo (OI) repleto de osteoblastos. Aumento de 400X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

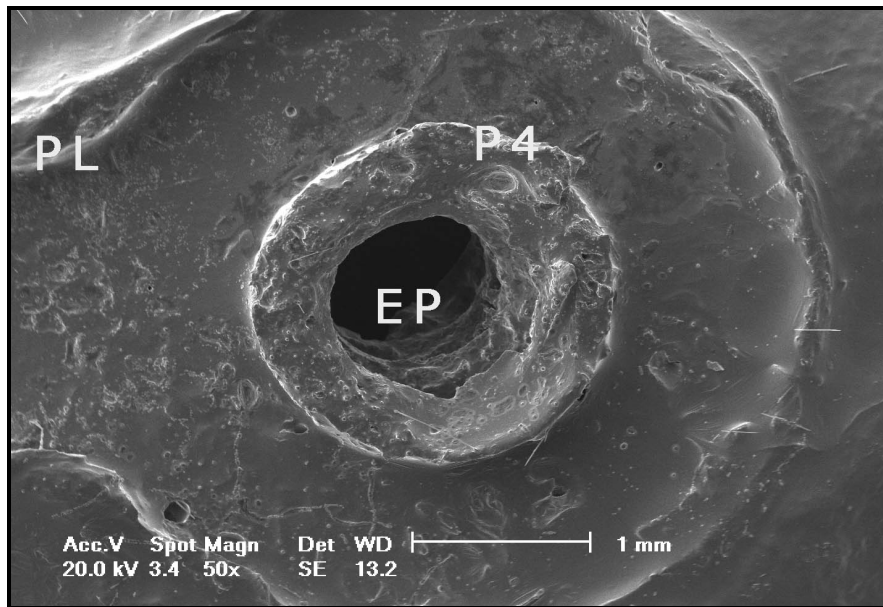


Figura 38: Eletromicrografia do grupo I. Observa-se a perfuração 4 (P4) e as espiras do parafuso (EP). Aumento de 50X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

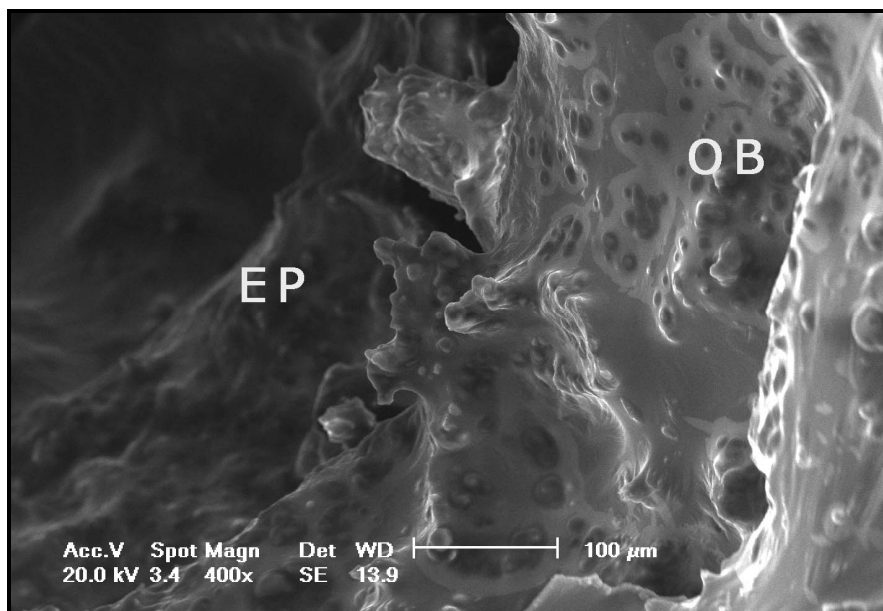


Figura 39: Eletromicrografia do grupo I. Observam-se as espiras do parafuso (EP) e osteoblastos (OB). Aumento de 400X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

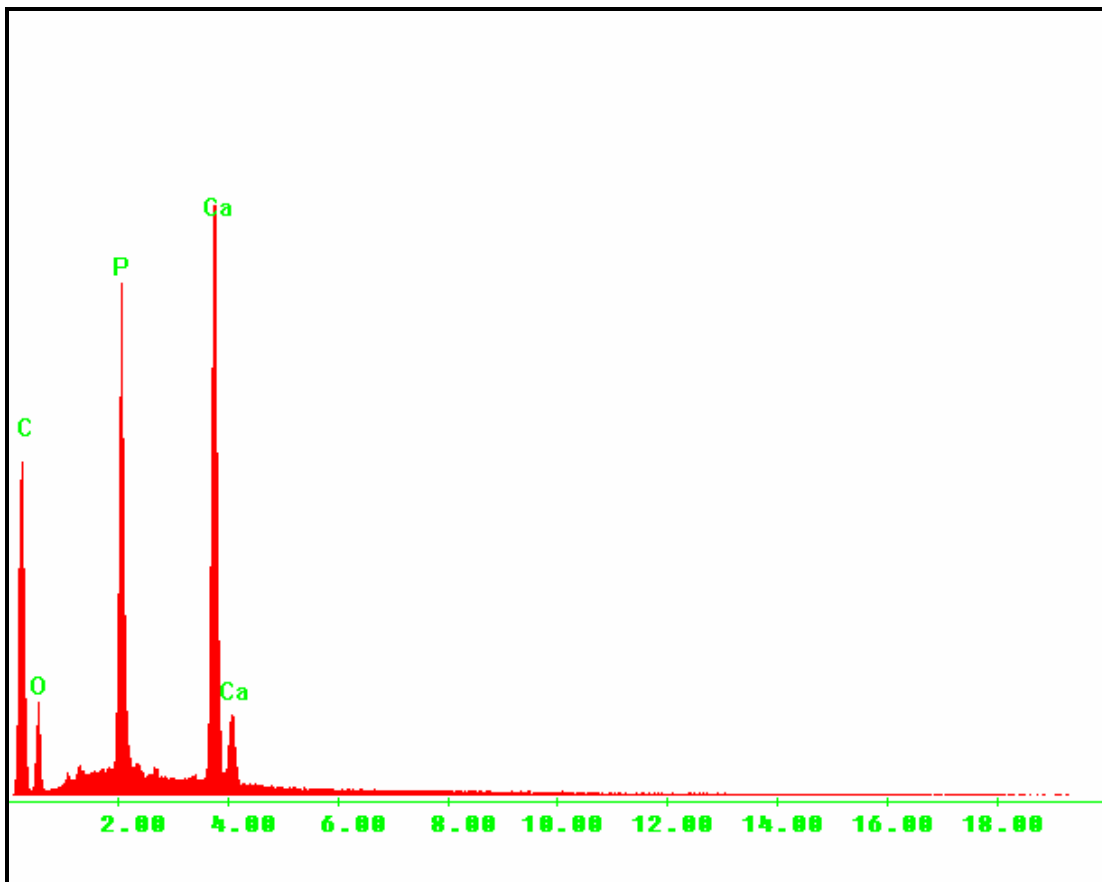


Figura 40: Eletromicrografia do grupo I. Observam-se através da análise por EDS elementos de Carbono (C), Oxigênio (O), Fósforo (P), Cálcio (Ca).

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 3. 2 Grupo II- Período de Observação de 60 dias

A linha da fratura pode ser definida pela deposição de um osso jovem, pouco organizado, pouco remodelado (Figura 41). Na linha de reparo da fratura, em direção à cortical basilar da mandíbula, observa-se o início da estruturação óssea, através da formação dos canais Haversianos, presentes do osso maduro para nutrição óssea (Figura 42). Em análise por *back scattering* (BSE) pode se determinar a estrutura do canal de Havers (Figura 43).

Na região correspondente ao contorno da placa de titânio, observa-se crescimento ósseo intenso, e na região das perfurações, intensa deposição óssea nas estruturas adjacentes à cabeça do parafuso, encobrendo parcialmente a perfuração, para a maioria das imagens analisadas (Figura 44). Após a remoção do parafusos, na região correspondente às espiras do parafuso, pode ser visualizado um crescimento ósseo bem definido, com algumas células osteoblásticas (Figura 45). Neste crescimento ósseo em torno das espiras do parafuso, em maior aumento, observa-se a organização da matriz óssea, em forma de trabeculado, através de um sistema de canais, orientados na mesma direção (Figura 46).

Em análise da superfície óssea por EDS foram evidenciados elementos de Potássio (K) e Cálcio (Ca) provenientes da superfície óssea, e elementos de Carbono (C) e Ouro (Au) do preparo da amostra para a análise por microscopia eletrônica (Figura 47).

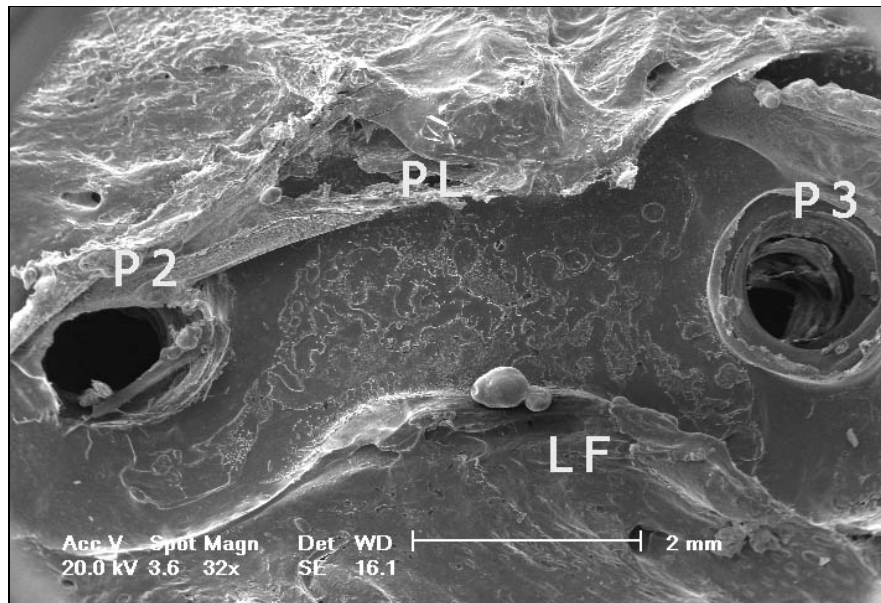


Figura 41: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se perfuração 2 (P2), osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3), linha de fratura (LF). Aumento de 32X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

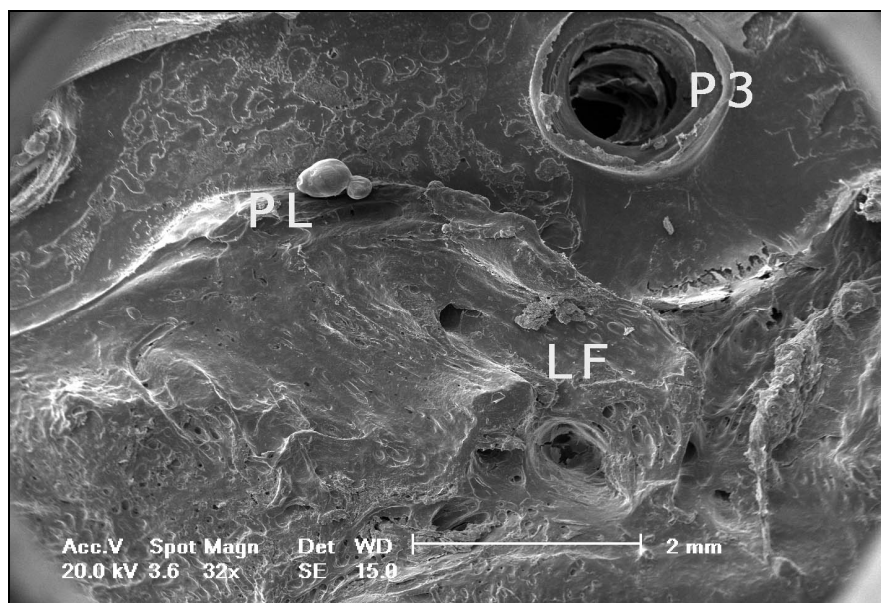


Figura 42: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se o osso em torno da placa (PL), perfuração 3 (P3) e linha de fratura (LF). Aumento de 32X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

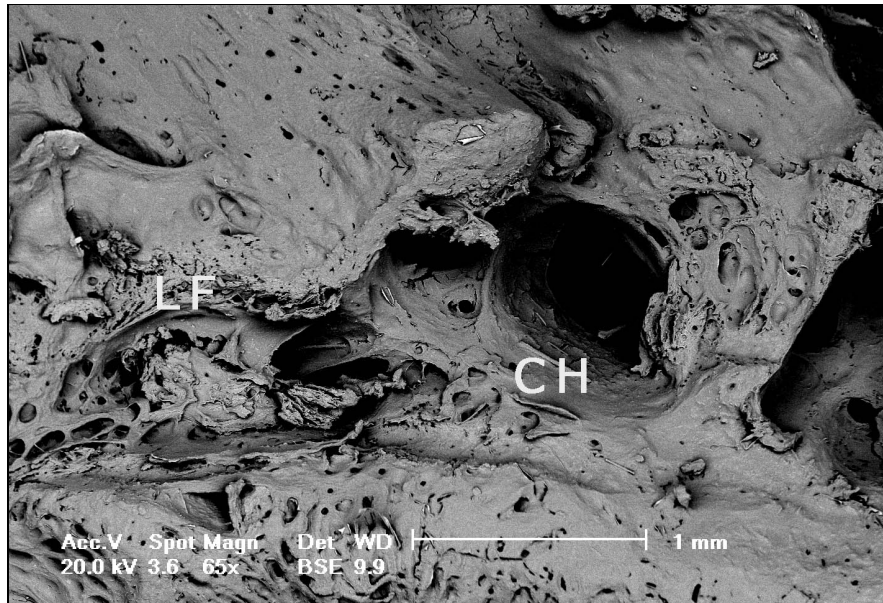


Figura 43: Eletromicrografia do grupo II em BSE. Observa-se a linha de fratura (LF) e o canal de Havers (CH). Aumento de 65X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

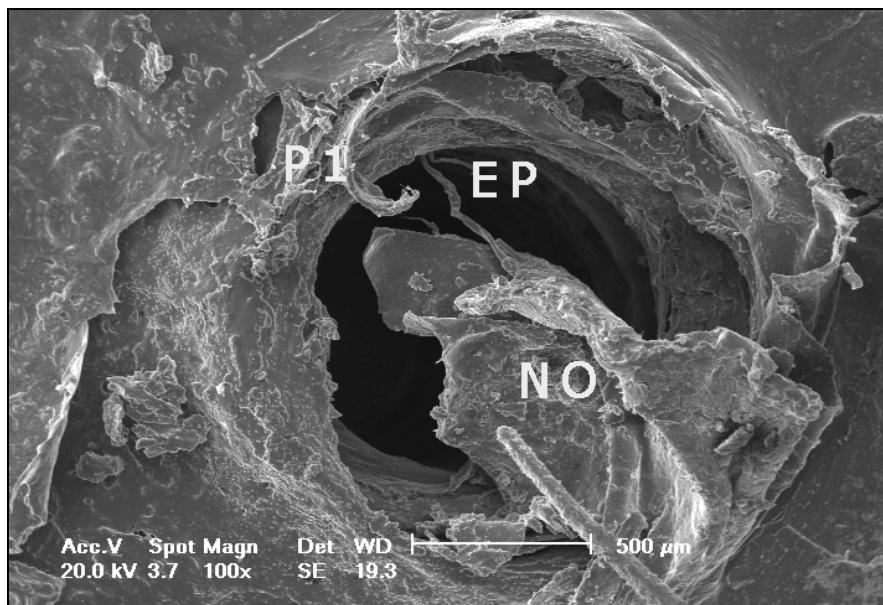


Figura 44: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se a perfuração 1 (P1), as espiras do parafuso (EP) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 100X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

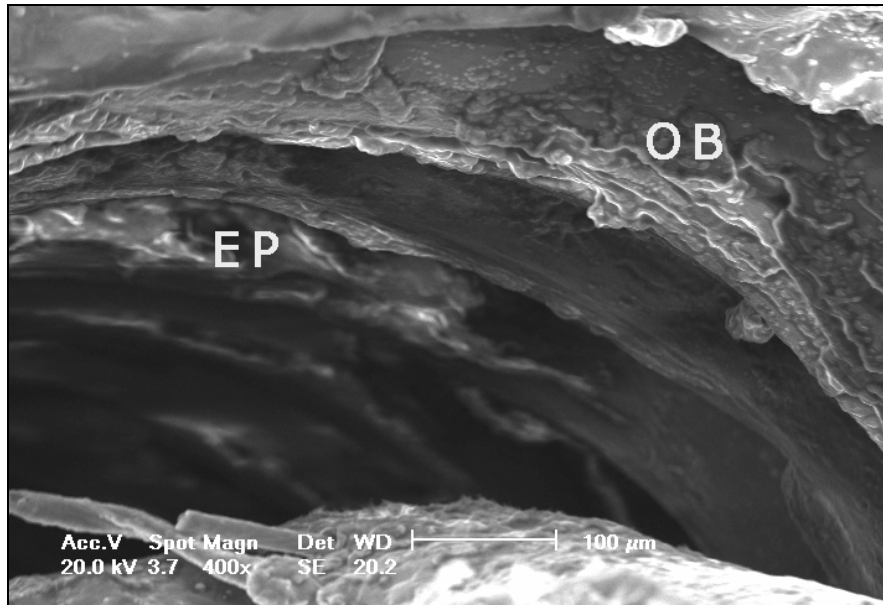


Figura 45: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se, as espiras do parafuso (EP) e células osteoblásticas (OB). Aumento de 400X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

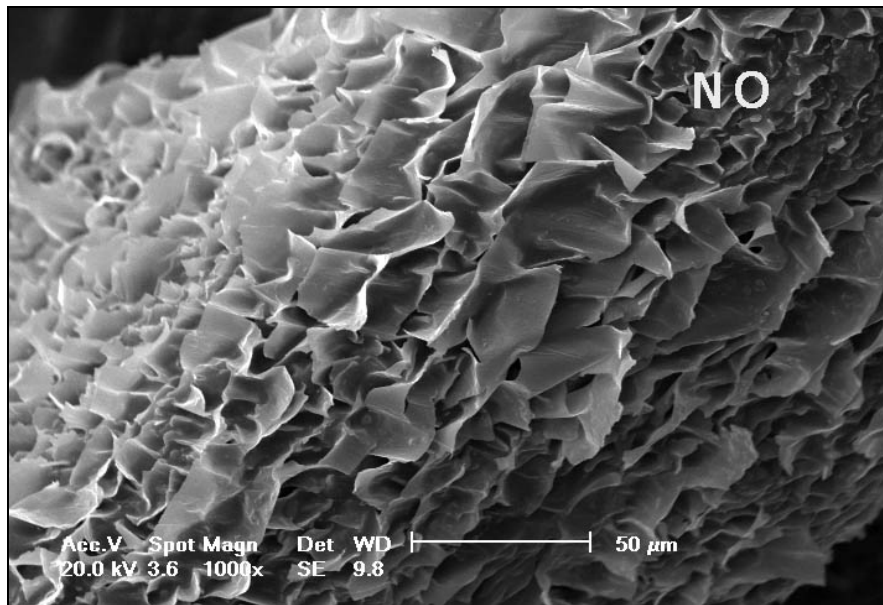


Figura 46: Eletromicrografia do grupo II. Observa-se a neoformação óssea (NO).

Aumento de 1000X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

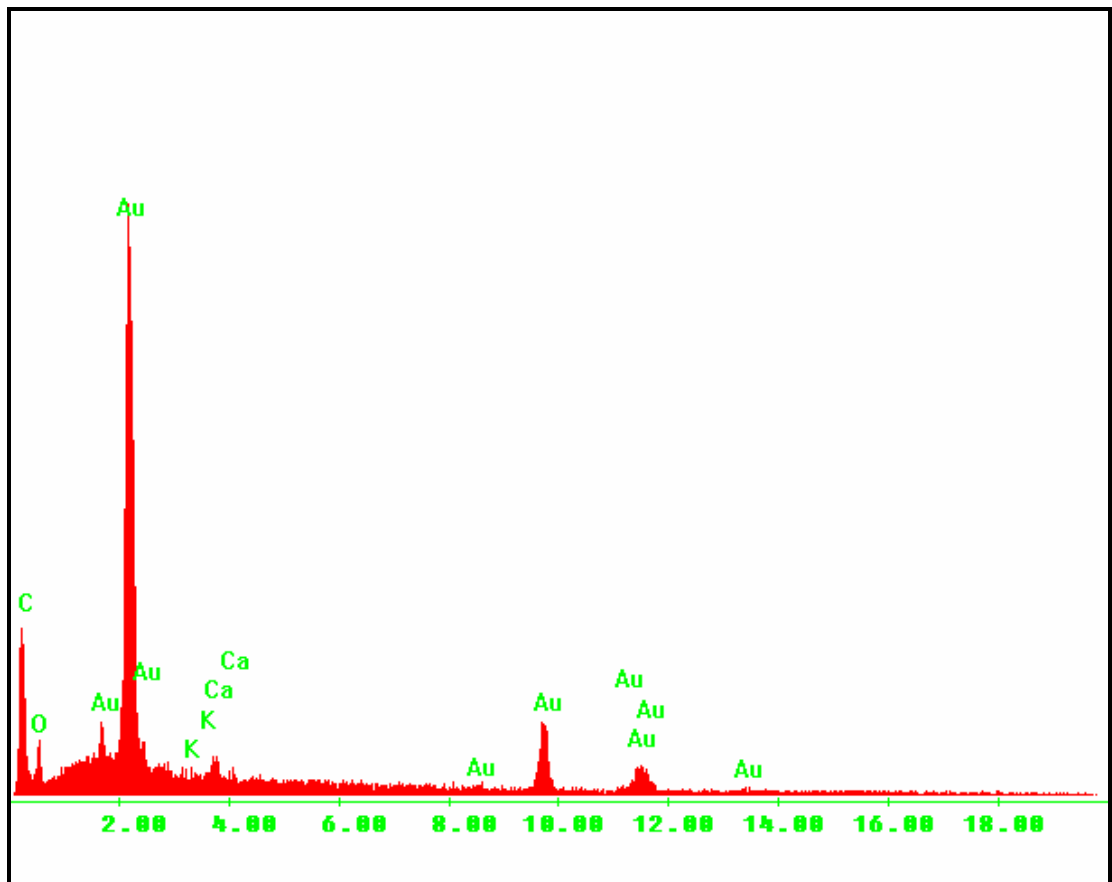


Figura 47: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se através da análise por EDS elementos de Carbono (C), Ouro (Au), Potássio (K) e Cálcio (Ca).

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 3. 3 Grupo III- Período de Observação de 90 dias

Na região correspondente à placa de titânio observa-se intensa deposição óssea. A linha da fratura não é diferenciada do osso adjacente, em grande parte da extensão do defeito ósseo (Figura 48). Na linha de reparo da fratura, em direção à cortical basilar da mandíbula, observa-se a deposição de um osso praticamente remodelado, semelhante ao osso cortical, localizado nas margens da fratura (Figura 49). Em maior aumento da linha da fratura, identifica-se o local de reparo ósseo através de depressões na superfície, envoltas por tabiques de neoformação óssea (Figura 50).

Na região correspondente às perfurações, através da análise por *BSE*, pode se determinar a irregularidade da deposição óssea sobre o material de fixação. A região de neoformação óssea tendeu a recobrir a região das perfurações, para a maioria das imagens analisadas (Figura 51).

Em análise da superfície óssea por EDS foram evidenciados elementos de Cálcio (Ca) provenientes da superfície óssea, elementos de Ouro (Au) do preparo da amostra para a análise por microscopia eletrônica e oxigênio (O) (Figura 52).

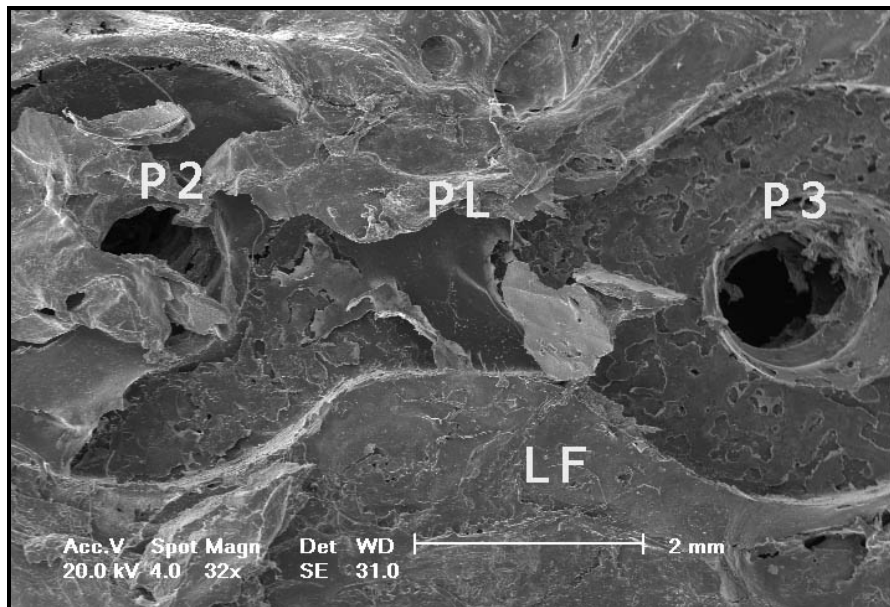


Figura 48: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a perfuração 2 (P2), a perfuração 3 (P3), o crescimento em torno da placa (PL) e a linha da fratura (LF). Aumento de 32X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

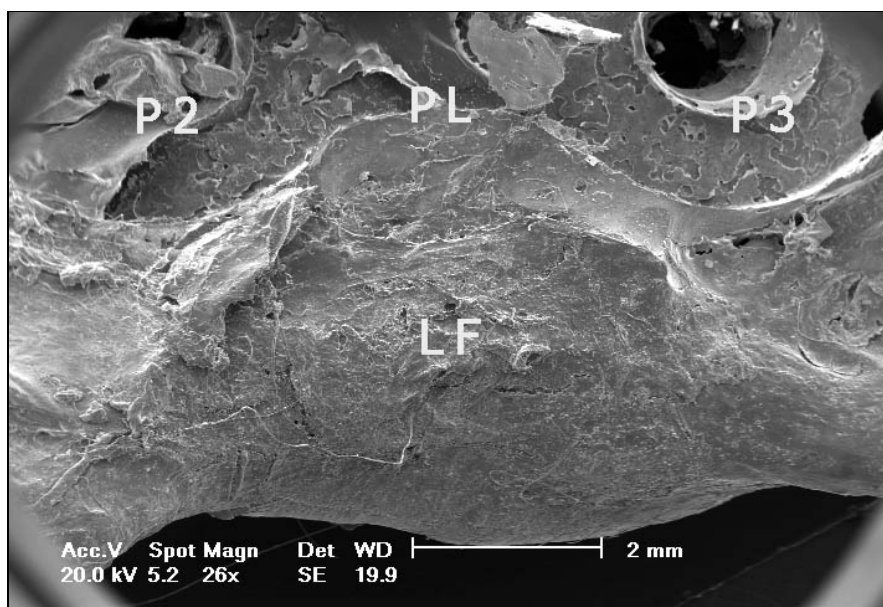


Figura 49: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a perfuração 2 (P2), a perfuração 3 (P3), o crescimento em torno da placa (PL) e a linha da fratura (LF). Aumento de 26X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

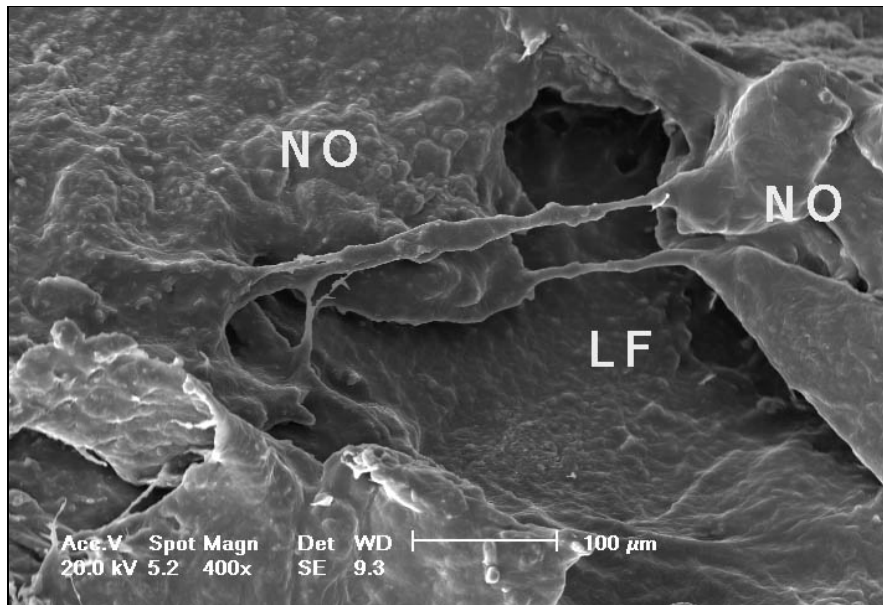


Figura 50: Eletromicrografia do grupo III. Observa-se a linha da fratura (LF) e as áreas de neoformação óssea. Aumento de 400X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

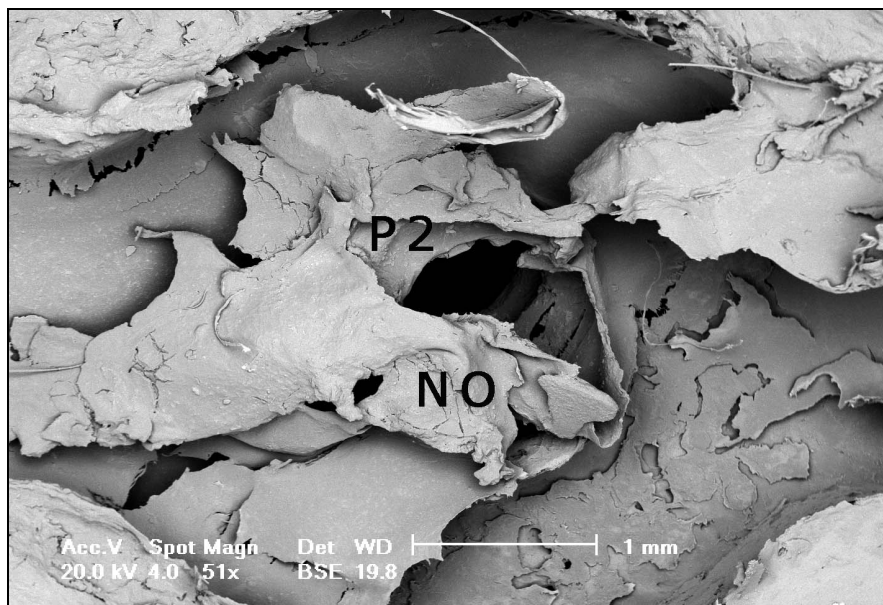


Figura 51: Eletromicrografia do grupo III em BSE. Observa-se a perfuração 2 (P2) e as áreas de neoformação óssea (NO). Aumento de 51X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

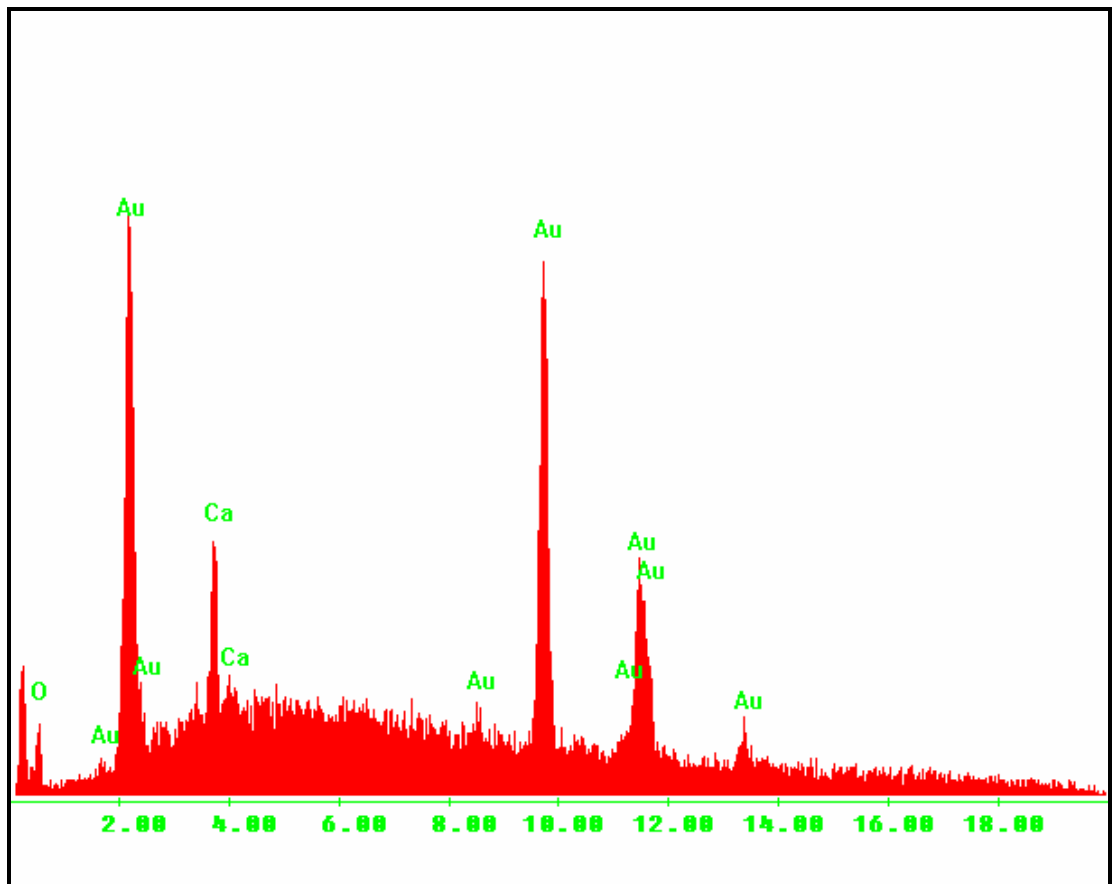


Figura 52: Eletromicrografia do grupo II. Observam-se através da análise por EDS elementos de Oxigênio (O), Ouro (Au) e Cálcio (Ca).

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5. 3. 4 Resultados descritivos da Análise do Material de Fixação

A análise descritiva das imagens obtidas a partir das placas de titânio mostrou integridade do contorno do material, com quantidades de deposição de osso neoformado variadas ao longo dos períodos de tempo, para todas as imagens analisadas (Figura 53).

As cabeças dos parafusos apresentaram-se íntegras, em todos os 3 grupos analisados, sem danificação da superfície por esmagamento ou dissolução do material. Na região central da cabeça do parafuso, correspondente à região da depressão para aprisionamento do material, observou-se deposição óssea intensa, especialmente no período de 90 dias (Figura 54).

O defeito criado pela broca na superfície da placa, ao período de 90 dias, aparece como estrias de tamanho e direções indefinidas (Figura 55). Em maior aumento, estas estrias são visualizadas como ranhuras de polimento, paralelas à direção do movimento da broca, ladeada pela superfície íntegra da placa de titânio (Figura 56).

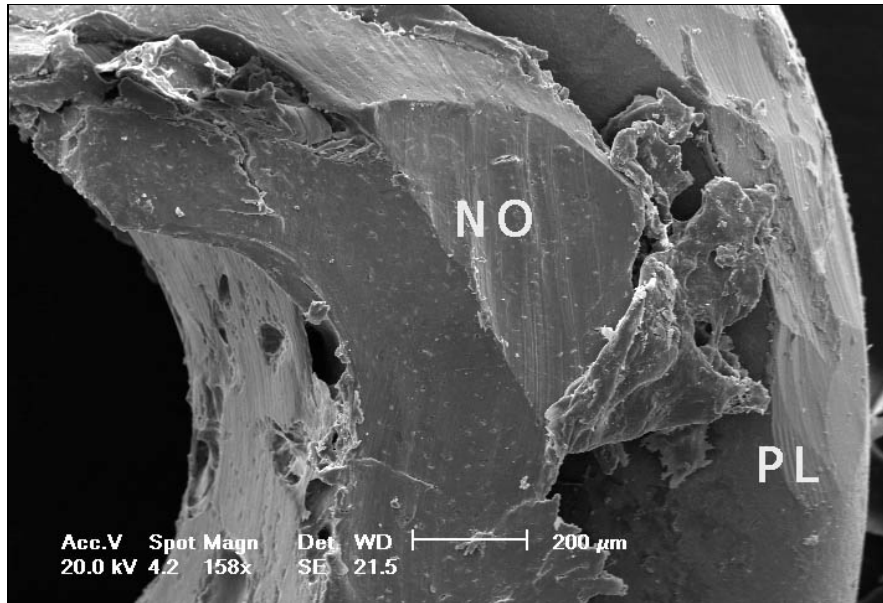


Figura 53: Eletromicrografia da placa de titânio. Observa-se a placa de titânio (PL) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 48X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

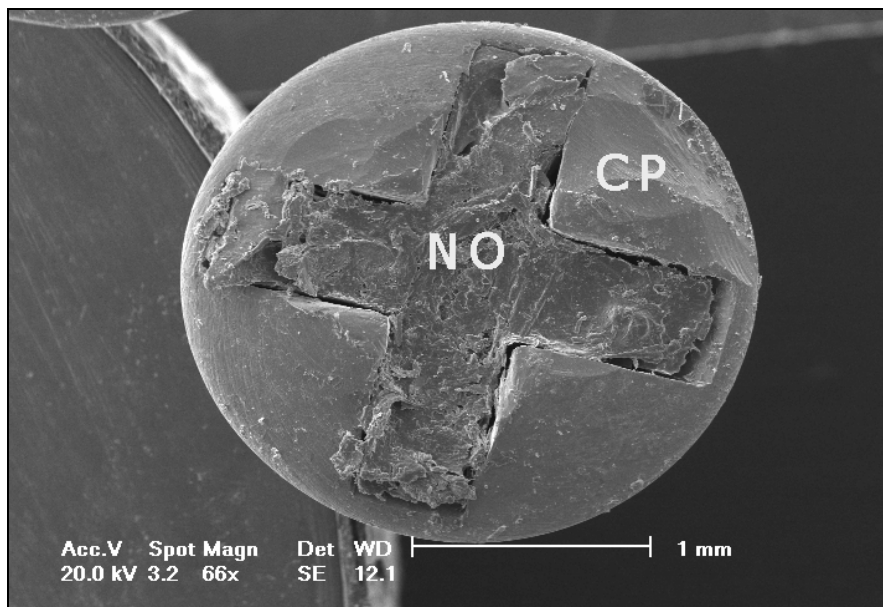


Figura 54: Eletromicrografia da placa de titânio. Observa-se a cabeça do parafuso (CP) e a neoformação óssea (NO). Aumento de 66X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

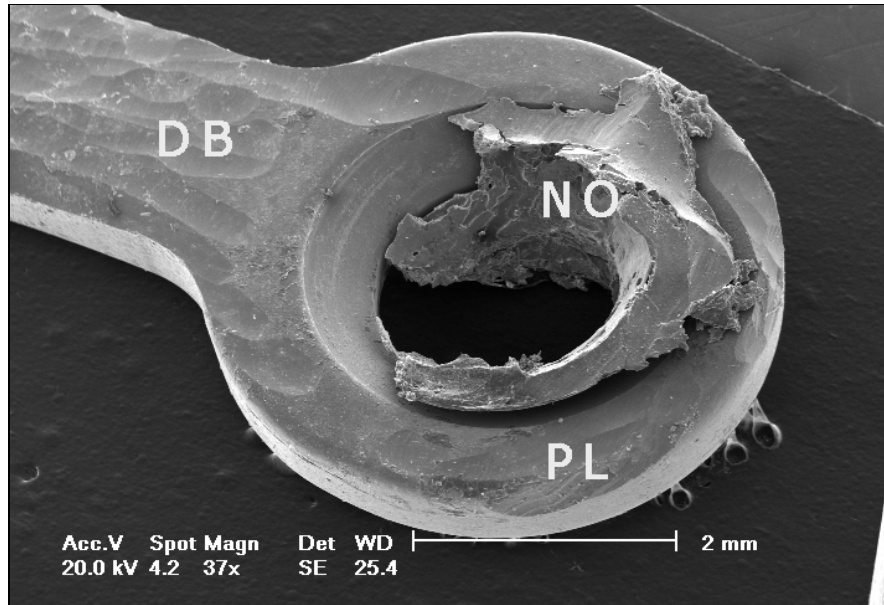


Figura 55: Eletromicrografia da placa de titânio do grupo III. Observa-se a placa de titânio (PL), a neoformação óssea (NO) e o defeito criado pela broca (DB). Aumento de 37X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

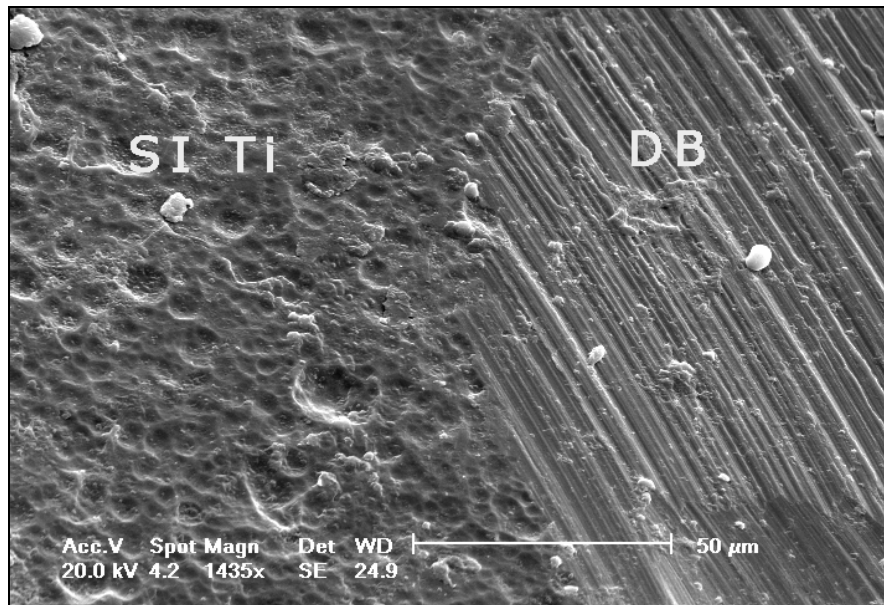


Figura 56: Eletromicrografia da placa de titânio do grupo III. Observa-se a superfície íntegra do titânio (SI Ti) e o defeito criado pela broca (DB). Aumento de 1435X

Fonte: Dados da pesquisa (FO/PUCRS, 2007)

5.4 RESULTADOS DESCRITIVOS DA ANÁLISE POR DENSITOMETRIA ÓSSEA

Para o grupo I (Figura 57), correspondente ao período de 30 dias, a área R1 foi selecionada e escaneada pelo densitômetro, a partir da linha da fratura ainda presente, em alguns pontos da peça. Dentro desta área R1 selecionada, o índice de mineral no osso (BMC) está aumentado, se comparado às outras amostras. A densidade mineral (BDM) na região da fratura está aumentada (0.2266).

Para o grupo II (Figura 58), correspondente ao período de 60 dias, a área indicando a metade da peça teve de ser previamente demarcada por um cursor metálico, pois o reparo da osteotomia estava completo, não sendo mais possível identificar, pelo escaneamento, o ponto exato para determinação de R1. A medida da BDM (0.1936) ainda permaneceu aumentada, mas os valores da BCM na R1 (0.0557) tenderam à normalidade.

Para o grupo III (Figura 59) correspondente ao período de 90 dias da implantação do material, a região correspondente à R1 pôde ser identificada no escaneamento a partir da radiopacidade do osso depositado aposicionalmente em torno dos parafusos. Os valores para a BCM permaneceram proporcionais aos da amostra anterior. O índice da BDM na R1 (0.2254) permaneceu proporcional aos períodos de tempo anteriormente avaliados.

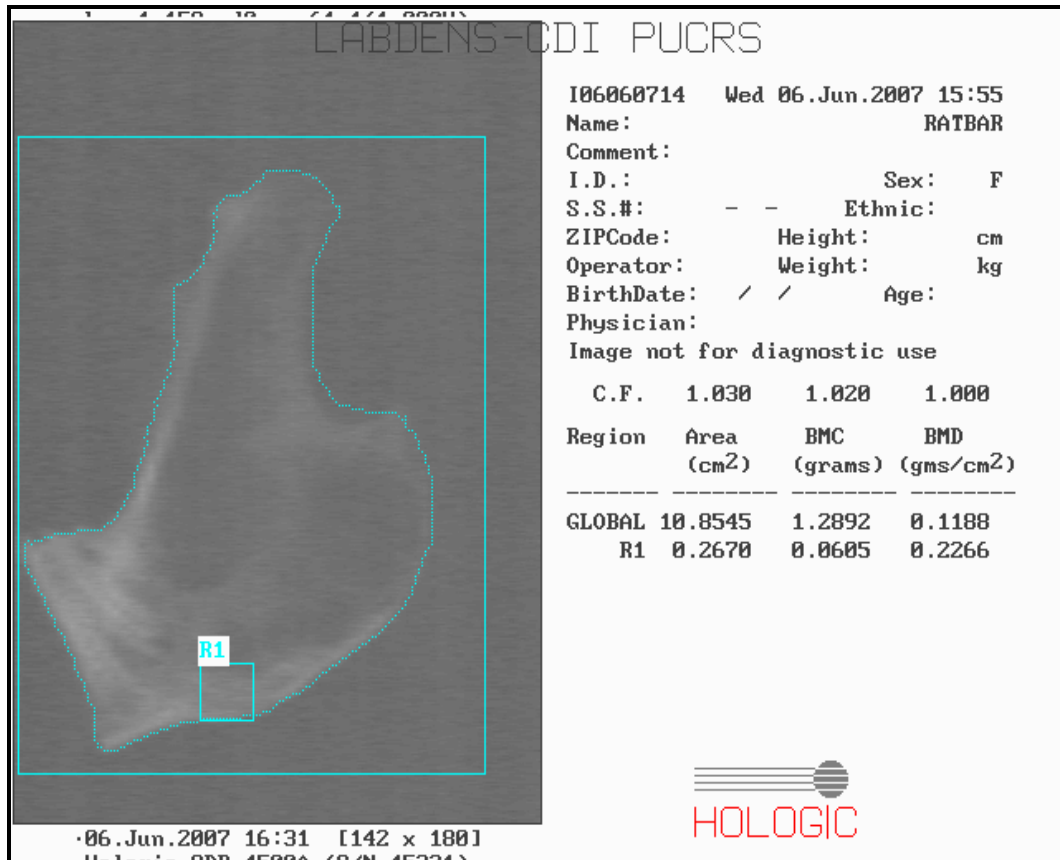


Figura 57: Análise densitométrica do grupo I.

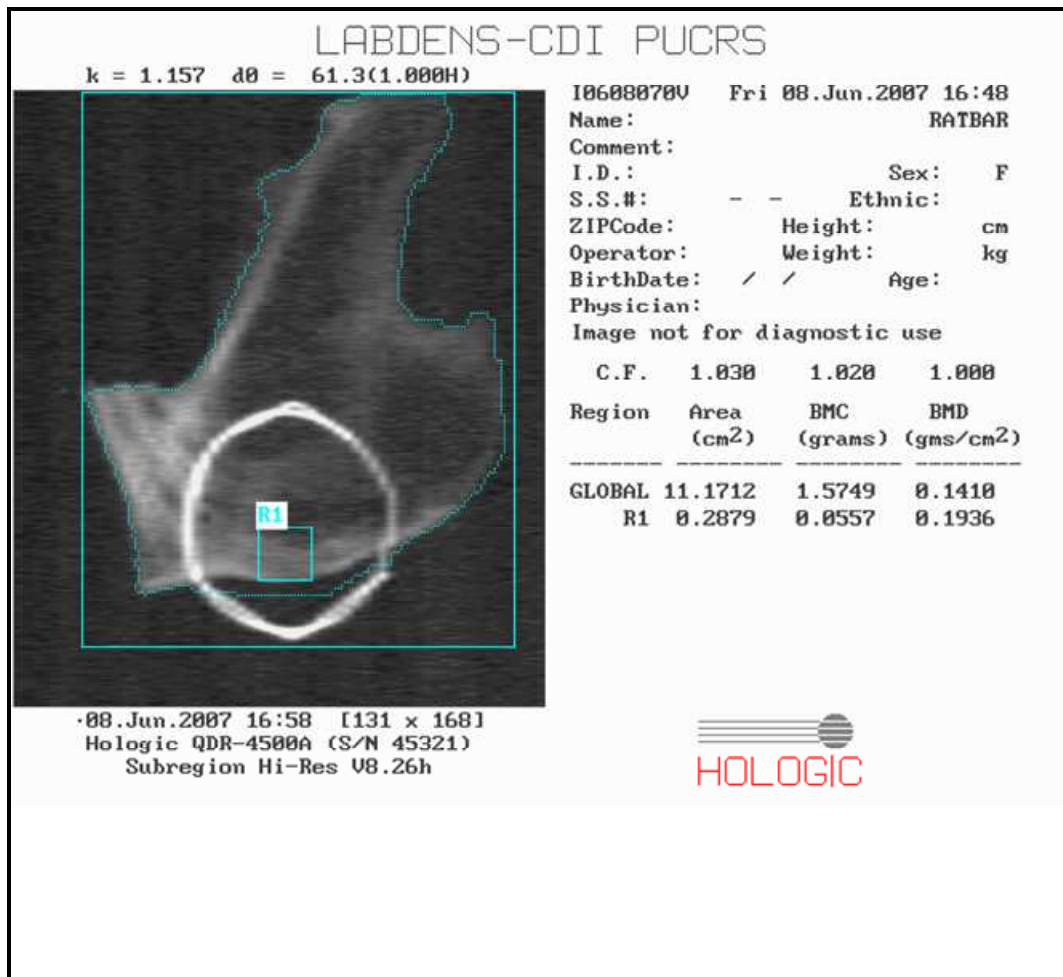


Figura 58: Análise densitométrica do grupo II.

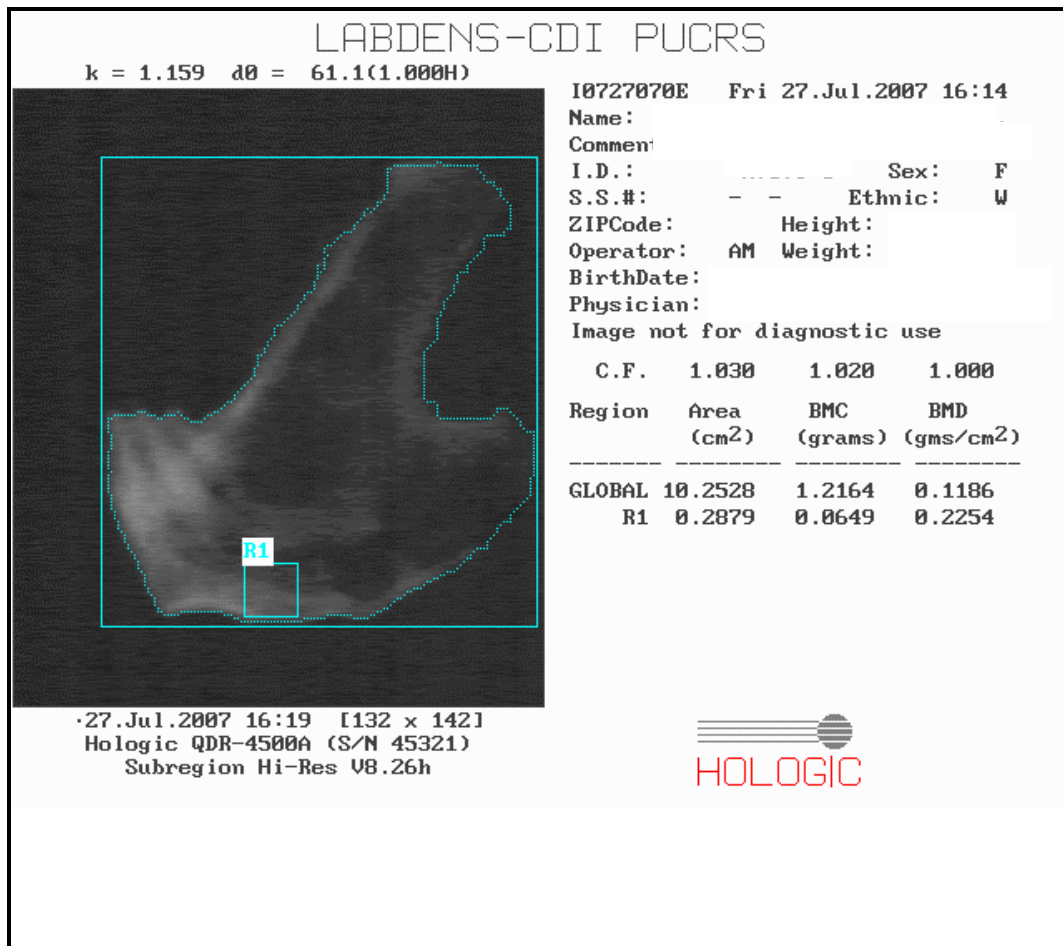


Figura 59: Análise densitométrica do grupo III.



6 DISCUSSÃO

O osso é um dos tecidos que apresentam maior dureza do corpo humano e esta rigidez, associada ao excelente potencial regenerativo (SCHENK, 1996; LERNER, 2000) serve, entre outras funções, para a proteção de órgãos vitais e para a inserção dos músculos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

No momento em que ocorre uma fratura óssea, seguem-se reações metabólicas de deposição e reabsorção óssea, a fim de se restaurar a forma e a função do tecido lesado (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; POSPISILOVÁ, 1982; BURKITT *et al.*, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Esta atividade osteoblástica simultânea a ação osteoclástica é denominada remodelação óssea, essencial durante a fase de crescimento do indivíduo e ainda, no processo de reparo tecidual (LERNER, 1997; SALO *et al.*, 1997; LERNER, 2000).

O ângulo mandibular é considerado por alguns autores como a região de maior fragilidade da mandíbula (SHUBERT *et al.*, 1997; ELLIS III, 1999). Seu tratamento é dificultado devido à ação de “alavanca” promovida pela inserção dos músculos masseter e pterigóideo lateral (ELLIS III, 1999).

Com a introdução e a popularidade das miniplacas e parafusos metálicos nos últimos trinta anos, os métodos de fixação óssea para a estabilização das fraturas do ângulo mandibular tornaram-se cada vez mais efetivos.

O titânio surgiu no mercado como um material adequado para promover a estabilização dos segmentos ósseos devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade e resistência à corrosão (MOBERG *et al.*, 1989; ROSENBERG *et al.*, 1993).

6. 1 O EXPERIMENTO

6. 1. 1 Análise Macroscópica

Os metais, entre eles o titânio, são passíveis de sofrer um processo de dissolução por adsorção da porção orgânica originária na superfície dos implantes (SUNDGREN *et al.*, 1986). Este processo de dissolução promove a liberação de partículas nos tecidos adjacentes ao material (ONODERA *et al.*, 1993). Segundo ROSENBERG *et al.* (1993), a causa da pigmentação proveniente das miniplacas de titânio ainda é desconhecida. Um fator a ser considerado seria a indução de microfaturas, promovendo o desprendimento de partículas de titânio, visto que esta pigmentação encontrava-se, tendenciosamente, nos tecidos moles adjacentes ao material. Contudo, a exata origem destas partículas ainda permanece inespecífica.

Nos estudos de MOBERG *et al.*, 1989 e ROSENBERG *et al.*, 1993, estes elementos desprendidos da placa de titânio foram evidenciados apenas nos tecidos moles adjacentes, sem complicações como processos infecciosos ou inflamatórios associados. Em contraposição aos resultados encontrados neste estudo, durante a análise das peças anatômicas obtidas, não foram observadas pigmentações escurecidas nos tecidos adjacentes às placas e aos parafusos de titânio que pudessem sugerir a dissolução do material. WEINGARD *et al* ainda em 1989 por sua vez sugerem que, as placas de aço ou outras ligas metálicas, devam ser removidas rotineiramente por apresentarem potencial de toxicidade proveniente da dissolução do material e conseqüente agregação na cadeia linfática.

Quanto ao potencial de promover infecção, ARENS *et al.* (1996) e JOHANSSON *et al.* (1999) afirmam que as características do material implantado como *design*, superfície e técnica não parecem ser relevantes. Na amostra analisada por este experimento, a placa e os parafusos de titânio não propiciaram a formação de processos inflamatórios ou infecciosos. JAQUES *et al.* (1997) analisando uma série expressiva de casos de fratura mandibular estabilizadas pelo sistema de fixação interna rígida tipo AO, entre elas fraturas

de ângulo, evidenciaram poucas complicações associadas à presença do material implantado, afirmando que o sistema por placas e parafusos de titânio permite a mobilização imediata da mandíbula e a recuperação precoce do paciente.

São inúmeras as técnicas descritas com sucesso na literatura para o tratamento das fraturas de ângulo mandibular. De acordo com SIDDIQUI *et al.* (2007), fraturas de ângulo mandibular tratadas por uma ou duas placas parecem não diferenciar quanto à probabilidade de ocorrer complicações, nem mesmo se tratadas por uma miniplaca (via acesso intrabucal) ou por uma placa de reconstrução (via acesso extrabucal) segundo KURIAKOSE *et al.* (1996), ARENS *et al.* (1996) e ELLIS III *et al.* (1999). Corroborando com estes achados, nesta pesquisa a utilização de uma miniplaca, via acesso extrabucal, se mostrou eficaz para o tratamento das fraturas de ângulo mandibular em coelhos, propiciando reparo ósseo adequado para todas as amostras analisadas.

As placas compressivas de contato dinâmico são confeccionadas, assim como o material empregado nesta pesquisa, por puro titânio comercial, e vêm sendo utilizadas por mais de 30 anos como sistema de fixação (PERREN *et al.*, 1990). Porém autores como FERGUSON *et al.*, 1960 e MORAN *et al.*, 1991 relatam que a presença do material em íntimo contato com o osso poderia afetar o aporte sanguíneo no local, dificultando a adaptação fisiológica do osso adjacente e, propiciando a atividade reativa de encapsulação deste material de fixação. Para os 3 períodos de tempo avaliados por este estudo, a superfície óssea adjacente à placa de titânio apresentava-se remodelada pela ação compressiva da placa. No momento da obtenção das peças anatômicas, observou-se a presença de um tecido fibroso, extremamente aderido ao osso e ao material da fixação, e esta adesão fibrosa esteve mais presente no maior período de tempo, entretanto, uma atividade reativa de corpo estranho, com a encapsulação do material não foi identificada nas amostras analisadas.

Defeitos com dimensões de espaçamento curto entre os segmentos ósseos, semelhante ao traço de fratura promovido por esta pesquisa, tendem a

ser reparados com relativa facilidade, sem deixar uma cicatriz fibrosa (SEAL *et al.*, 2001). Entretanto a biomecânica do ângulo dificulta o reparo ósseo no local, pois o ângulo representa o ponto de confluência abrupta entre o corpo e o ramo mandibular (ELLIS III, 1999). Ainda que a forma de tratamento por placas e parafusos tenha sido executada em modelo animal (o coelho) neste estudo, com anatomia de inserção muscular e disposição geométrica da superfície óssea diferenciadas do humano, a elaboração de um grupo controle, como no estudo de TAKATSUKA *et al.* (2005) em que foram promovidas fraturas de côndilo sem a fixação dos segmentos ósseos seria inviabilizada nesta amostra, pois, fraturas de ângulo mandibular sem sistema de fixação tenderiam à instabilidade devido à ação muscular no local, causando inapetência e a morte destes animais.

A ação de “alavanca” sofrida pelo ângulo mandibular descrita por ELLIS III (1999), pode ser observada através de uma deposição óssea mais acentuada sobre o segmento ósseo lateral, se comparado ao segmento ósseo medial, que compreende o segmento fixo da mandíbula.

Os resultados obtidos por este estudo sugerem que, entre 30 e 60 dias ocorra o processo de reparo da fratura óssea, através do preenchimento progressivo da linha de osteotomia por um tecido pouco estruturado. Os segmentos ósseos apresentam-se unidos de pela deposição deste tecido fibroso, firmemente aderido ao periósteo. Aos 90 dias, por sua vez, os dados estatísticos comprovam diferença significativa de reparo, através da deposição de um osso semelhante ao tecido cortical adjacente à linha da fratura.

Corroborando com os achados de ZAFFE *et al.* (2003), nas amostras analisadas, afirmam que o titânio induziu o crescimento ósseo aposicional progressivamente sobre o material de fixação. Quando comparados os três períodos de tempo da amostra, a diferença foi significativa estatisticamente, especialmente no período de tempo de 90 dias. A retenção prolongada das placas de titânio até o período observacional de 90 dias favoreceu a deposição óssea vertical, sem promover osteólise da superfície óssea em íntimo contato com a placa e os parafusos.

6. 1. 2 Análise por Microscopia de Luz

6. 1. 2. 1 Coloração Hematoxilina-eosina

O processo de reparo ósseo descrito por CATANZARO GUIMARÃES (1982) e POSPISILOVÁ (1982) é composto por três fase distintas: a fase inflamatória, a reparadora e a remodeladora. Estas fases foram determinadas, em tempos distintos, a partir de uma análise descritiva da linha de fratura óssea, durante os períodos de tempo avaliados por esta pesquisa.

De acordo com os relatos de JUNQUEIRA & CARNEIRO (1979), a angiogênese é um dos fatores mais importantes para o reparo ósseo, pois a hipóxia provocada pela injúria tecidual conduz a regulação na produção de fatores angiogênicos e seus receptores procuram restaurar o suprimento sanguíneo na loja cirúrgica através da deposição do coágulo sanguíneo. Essa angiogênese pode ser identificada neste estudo, especialmente no período de 30 dias da fratura, através do derramamento de vasos decorrente da fratura e pela presença de algumas células de defesa, como neutrófilos e macrófagos. Aos 60 dias, este coágulo sanguíneo começou a ser substituído por células precursoras do reparo ósseo, descrito por CATANZARO GUIMARÃES (1982) e POSPISILOVÁ (1982) como a fase reparadora, e aos 90 dias, este derramamento de vasos concentrava-se em determinados campos, especialmente em torno das perfurações, onde ocorreu rompimento da cortical óssea e compressão do osso medular, no momento da inserção dos parafusos rosqueados.

BURKITT *et al.* (1997), descreveram que, após a fase de maturação da matriz orgânica óssea, observada neste experimento através da deposição acentuada de fibras colágenas aos 60 dias, os cristais amorfos de fosfato de cálcio iniciam a colonização e a precipitação destas lacunas anteriormente ocupadas pelas fibras colágenas. Corroborando com estes achados, aos 90 dias identificou-se um maior número de células osteoprogenitoras, circundadas por osteoclastos a fim de promover a remodelação destes sítios de neoformação óssea. Esta remodelação é um processo fisiológico segundo

HILL e ORTH (1988) e necessária para se manter o equilíbrio da massa óssea (SWAMINTHAN, 2001).

As fibras colágenas depositadas no período de 60 apresentavam-se de maneira desorientada e, entremeadas por células precursoras do reparo ósseo, semelhante aos resultados encontrados por ZHANG *et al.* (2003) em tíbias de coelhos em igual período de tempo. Aos 90 dias, estas fibras estavam dispostas de maneira ordenada, interpostas mais frequentemente por matrizes ósseas, ocupando maiores regiões do que no período de tempo anterior, sugerindo ossificação mais avançada do calo fibroso.

A reação tecidual predominante à presença de um corpo estranho é a encapsulação por tecidos moles. A espessura e a composição celular desta camada de tecido mole refletem a biocompatibilidade do material e as condições da superfície metálica. Estes mesmos fatores interferem na adesão do tecido mole ao implante (ANDREWS *et al.*, 1979; RAHN *et al.*, 1980).

ROSENBERG *et al.* (1993) identificaram partículas desprendidas das placas de aço especialmente no interior do citoplasma de células gigantes. ONODERA *et al.* (1993) analisando os tecidos moles adjacentes ao material de fixação removido de pacientes após o período de consolidação óssea também encontraram indícios da dissolução passiva do titânio. KIM *et al.* (1997) em estudo semelhante encontrou partículas de titânio localizadas entre as fibras colágenas, sugerindo que estas partículas poderiam propiciar a degeneração da matriz óssea. Contrapondo estes achados, ZAFFE *et al.* (2003) encontraram íons de titânio situados a uma distância inferior a 1 mm, sem interferência no processo osteogênico do reparo. Até o período de tempo avaliado por esta amostra não foram identificadas reações de corpo estranho por partículas de titânio desprendidas do material de fixação.

WEINGART *et al.* (1994) afirmam que partículas depositadas na superfície dos implantes de titânio, como por exemplo o plasma *spray*, podem ser transportadas por fagócitos até a cadeia linfática. JORGENSON *et al.*

(1999) discordando destes achados afirmam que o tratamento superficial reduz o potencial de dissolução passiva do titânio.

Quando as dimensões dos defeitos estabelecidos nos tecidos ósseos são pequenas, estes se regeneram com relativa facilidade, sem deixar uma cicatriz fibrosa (SEAL *et al.*, 2001). A fim de se quantificar esta formação tecidual, foram determinadas as medidas das áreas de deposição fibroblástica bem como, das trabéculas de neoformação óssea presentes ao longo da linha de reparo da fratura. Os valores obtidos através da morfometria do reparo ósseo, tanto em relação à deposição óssea, quanto em relação à área das fibras colágenas não foram significantes estatisticamente entre os três períodos de tempo comparados nesta pesquisa.

A análise estatística comprovou uma grande variabilidade entre os campos analisados, ao longo da linha do reparo ósseo, com uma discreta tendência à deposição de tecido fibroso no período de 30 dias e uma maior ossificação da linha da fratura no período de tempo de 60 dias. Entretanto a quantificação das áreas das fibras colágenas e da neoformação óssea pareceram não apresentar significância estatística de acordo com os tempos determinados pelo estudo. Estes resultados indicam que, assim como na análise macroscópica, uma vez estabelecido o preenchimento do defeito ósseo por tecido fibroso, no período de 90 dias, variações quanto à maturação tecidual não podem ser quantificadas de maneira precisa através da análise morfométrica, pela coloração de HE.

Neste estudo, a determinação da área de neoformação óssea e de deposição das fibras colágenas não pareceu ser um método eficaz para a compreensão dos fenômenos de reparo ósseo, ao longo da fratura mandibular em coelhos. A área estabelecida como um campo de tecido fibroblástico, no método da morfometria pelo HE, ainda que seja semelhante, se comparada durante os períodos de observação, pode não apresentar a mesma densidade, contudo apresentam a mesma área, e estas medidas são transferidas comparativamente, apresentando-se como resultados sem expressão estatística.

6. 1. 2. 2 Coloração *Sirius-red*

O tecido ósseo é composto por uma matriz calcificada, especialmente cristais de hidróxiapatita, e por moléculas orgânicas constituídas basicamente por fibras colágenas (ROSS *et al.*, 1993; LERNER, 2000; GARDNER e HIATT, 2002).

No osso compacto maduro, as fibras colágenas do tipo I representam aproximadamente 90% do componente orgânico (YOUNG e HEATH, 2000), o tecido ósseo lesado por sua vez, tende a ser povoado integralmente por fibras colágenas, especialmente o colágeno imaturo, formando o calo fibroso (CATANZARO GUIMARÃES, 1982; POSPISILOVÁ, 1982). A partir deste estudo procurou-se estabelecer o tipo de colágeno predominante na linha de reparo da fratura óssea e em torno das perfurações para a inserção dos parafusos, a cada período de tempo estabelecido por esta pesquisa. A área e a densidade dos dois tipos de colágeno, o tipo I e o tipo II, foram quantificadas através de uma ferramenta do programa *Image pro plus*.

A predominância significativa do colágeno tipo I, tanto em torno das perfurações quanto na linha de reparo da fratura óssea permite afirmar que a deposição do calo fibroso esteja concluída aos 30 dias. Este colágeno maduro, tipo I, ocupa a maior área dentro das regiões estudadas, se comparado ao colágeno tipo II, sem apresentar variações estatísticas quanto aos períodos de tempo. Na linha de reparo da fratura óssea, o colágeno tipo I pode ser observado com maior predominância no período de 90 dias, sugerindo substituição gradual das fibras de colágeno imaturo, por fibras de colágeno maduro. Em torno das perfurações, o índice destes colágenos se mantém proporcional ao longo dos períodos de tempo de maneira a favorecer a substituição gradual e precoce do colágeno imaturo por fibras maduras, ainda no período de 30 dias.

Como a densidade do colágeno tipo II é predominante, apesar do tipo I apresentar-se com mais frequência, pode-se afirmar que as fibras do colágeno jovem, tipo II, depositadas no início do reparo ósseo ocupam uma pequena

área, pois são substituídas pelo colágeno tipo I, entretanto estas fibras jovens apresentam uma grande densidade. A média da densidade destas fibras colágenas permanece estável durante as fases avaliadas, portanto a densidade do colágeno tipo I não se altera durante o processo de ossificação da linha de fratura. A densidade do colágeno tipo II alcança seu pico em torno dos 60 dias e a partir de então, ocorre sua substituição por fibras maduras dando início ao processo de transformação do calo fibroso em calo ósseo.

Considerando-se que o metabolismo do coelho esteja aumentado em 1,5 aproximadamente, se comparado ao metabolismo humano, segundo NORRIS *et al.* (2001), pode-se afirmar que o processo de ossificação do reparo esteja terminado, com a deposição de fibras colágenas pouco densas e imaturas, aos 30 dias para os coelhos, equivalendo aproximadamente a 45 dias para os humanos. Passados 60 dias da fratura para os coelhos, aproximadamente 90 dias de equivalência ao humano, a linha de reparo da fratura apresenta maturação óssea em atividade, com fibras colágenas tipo II atingindo a maior densidade. Aos 90 dias (135 dias para os humanos), esta linha de reparo apresenta-se como uma área de deposição de fibras colágenas tipo I, como uma trama de fibras maduras, orientadas, contendo no seu interior osteócitos, iniciando o processo de ossificação.

6. 1. 3 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Embora não seja um consenso na literatura, propriedades do titânio como a reatividade, difusão e acúmulo são considerados. O maior cuidado na retenção permanente das miniplacas e parafusos metálicos como o aço e o titânio utilizado na estabilização das fraturas ósseas seria o potencial de corrosão (LINDER *et al.*, 1975) e agregação à cadeia linfática (ONODERA *et al.*, 1993; WEINGARDT *et al.*, 1994). Entretanto, avanços nas técnicas de produção dos materiais de fixação, fazem do titânio o material de eleição para a estabilização das fraturas ósseas, especialmente quando não se tem a intenção de removê-los.

Nos implantes de titânio ocorre à formação espontânea de uma camada de óxido sobre a superfície, e a espessura desta camada pode aumentar durante a implantação devido à incorporação de partículas orgânicas e inorgânicas (SUNDGREN *et al.*, 1986). Esta camada é capaz de promover resistência à corrosão e reduz a difusão do metal aos tecidos adjacentes (ALBREKTSSON *et al.*, 1983).

A microscopia eletrônica de varredura permite a análise por fotoeletro-espectromicroscopia para se determinar as condições químicas da superfície (UNGERSBÖCK *et al.*, 1996). De acordo com as especificações do fabricante, este equipamento é capaz de gerar imagens de amostras isolantes sem a necessidade de metalização, através do modo de baixo vácuo. Este recurso procurou ser praticado por esta pesquisa a fim de se obter amostras sem o revestimento em ouro, pois o pico da transição $K\alpha$ do fósforo, na análise por EDS, são sobrepostos à transição $M\alpha$ do ouro, inviabilizando o aparecimento claro do pico de fósforo, sobreposto ao pico do ouro devido à baixa resolução do detector (BRUNDLE *et al.*, 1992).

O sistema de EDS é capaz de realizar uma análise por pontos, linhas e regiões definidas sobre a imagem adquirida da amostra, gerando um mapa dos elementos sobre a imagem obtida (BRUNDLE *et al.*, 1992). Beneficiando-se destes recursos, este estudo procurou determinar os elementos presentes na linha de reparo da fratura óssea, entretanto, as amostras com 60 e 90 dias tiveram de ser revestidas em ouro, pois, o excesso de tecido mole aderido à peça, inviabilizou a aquisição das imagens com nitidez. A amostra com 30 dias de pós-operatório foi analisada sob revestimento em carbono e este tipo de revestimento, permitiu a identificação do pico de fósforo, essencial para o reparo ósseo.

O sistema de EDS foi aplicado a este estudo para mapear os elementos presentes na superfície óssea adjacente ao sistema de fixação, em diferentes períodos de tempo, entretanto, contrapondo os achados de ROSENBERG *et al.* (1993) e KIM *et al.* (1997) não foram identificados elementos de titânio ou indícios de dissolução superficial, que pudesse solicitar a remoção deste

material, assim como nos achados de MATTHEW *et al.* (1996). Os elementos de titânio encontrados sobre a superfície óssea, em análise de varredura superficial concentravam-se em partículas, bem delimitadas, desprendidas do corpo da placa, apenas na amostra em que foi necessária a utilização de brocas para a remoção do material. Estas partículas desprendidas apresentavam-se incrustadas na superfície óssea e não integradas a elas. A impressão negativa desta partícula foi identificada na análise da superfície da placa de titânio. Em análise por EDS da superfície desta partícula, foram encontrados apenas elementos de titânio.

Corroborando com os estudos de COATHUP *et al.* (1999) e ZAFFE *et al.* (2003), nos resultados encontrados por este estudo observa-se um intenso crescimento ósseo aposicional sobre o material de fixação utilizado na estabilização das fraturas mandibulares em modelo animal. Aos 90 dias de controle, a placa e as cabeças dos parafusos encontravam-se praticamente imersas em osso neoformado.

O sistema de fixação por uma miniplaca e quatro parafusos utilizados para a estabilização das fraturas de ângulo mandibular se mostrou eficaz na estabilização dos segmentos ósseos, permitindo o reparo tecidual da linha de fratura com um calo fibroso aos 30 dias, e posteriormente a substituição deste calo fibroso por um calo ósseo aos 60 dias, composto por osso jovem, desestruturado, iniciando o desenvolvimento dos canais nutricionais constituídos pelos sistemas *haversianos*, que segundo ROSS *et al.* (1993), desenvolvem-se apenas no osso compacto, através do processo de remodelação óssea. Este processo fica evidente aos 90 dias, através da deposição de um tecido estruturado, semelhante ao osso cortical adjacente à linha da fratura.

MATTHEW *et al.* (1996) encontraram as cabeças dos parafusos danificadas pelo processo de inserção. No presente estudo, em análise semelhante, as ranhuras de adaptação da chave, na cabeça do parafuso permaneceram íntegras, sem sinais de danificação da superfície do titânio, devido provavelmente diferença de dureza do titânio comercialmente utilizado

atualmente para a fabricação dos sistemas de fixação. No interior das ranhuras da cabeça dos parafusos observou-se intensa deposição óssea, especialmente no período de controle tardio.

6. 1. 4 Análise por Densitometria Óssea

Inicialmente, a densitometria óssea era determinada a partir de tomadas radiográficas convencionais, submetidas a aparelhos de fotômetro para se quantificar a intensidade da luz incidente em uma determinada região da imagem. Os aparelhos apresentavam um sistema de vedamento, para que a luz externa do ambiente não interferisse nos resultados obtidos, e assim, a região de interesse não poderia ser determinada com precisão.

Atualmente, o aparelho de densitometria permite selecionar uma área dentro de uma imagem, e ainda, empregar a esta aquisição, filtros específicos para o tamanho e a espessura da região a ser analisada. O aparelho trabalha a partir de médias comparativas, entre a área total e a área selecionada, podendo diferenciar-se pelo gênero, idade ou localização do osso a ser investigado no paciente. A metodologia aplicada para se medir a densidade óssea mineral na linha de reparo da fratura é um método pouco descrito na literatura, e que merece pesquisas continuadas a fim de se conhecer não somente os sistemas de fixação, mas também fatores sistêmicos que possam afetar o reparo do tecido lesado.

KIRCHNER *et al.* (1973) afirmam que a calcificação óssea que ocorre transversalmente às fibras colágenas, pode variar de acordo com a quantidade de minerais disponíveis, particularmente o cálcio e o fósforo e ainda, de acordo com determinadas condições químicas e físicas dentro da área da calcificação. Uma deficiência de minerais pode conduzir a uma diminuição da rigidez óssea. Estes viéses da amostra foram minimizados por uma dieta equilibrada, e o controle periódico dos animais.

CASTAÑEDA *et al.* (2006) afirmam que a densitometria óssea é um método seguro para se avaliar as medidas ósseas em coelhos. Portanto, foi empregada neste estudo para qualificar o tipo de osso depositado na linha de reparo da fratura. Concordando com estes achados, pode-se afirmar que a amostra, apesar de reduzida, aplicada a esta pesquisa apresenta valores confiáveis, pois segundo informações técnicas do fabricante do aparelho, os índices de distorção são inferiores a 0,5%.

Entre os diferentes períodos de tempo estabelecidos nesta pesquisa, não foram observadas diferenças significantes entre as medidas de BMC e BMD. Estabelecido o reparo da fratura, o calo ósseo seja composto de osso corticalizado, de densidade padrão. NORRIS *et al.* (2001) afirmam que a vantagem de se trabalhar com coelhos como modelo animal para se compreender o metabolismo ósseo humano concentra-se no curto período de avaliação de meses para o coelho, e não de anos, como nos estudos com humanos. Uma vez atingida a maturidade esquelética, em torno da 28 semanas, e mais quatro a oito semanas de maturação dos osteócitos, as medidas da BMC e BMD alcançam um ponto de equilíbrio, uma média padrão para cada região.

Em concordância com estes achados, os dados analisados nesta pesquisa sugerem que possam ocorrer alterações no índice da BDM até que o reparo ósseo esteja concluído. Como o metabolismo do coelho é de 1,5 se comparado ao do humano, segundo NORRIS *et al.* (2001), admite-se que no período de 30 dias, o reparo da fratura esteja se iniciando, no período de 60 dias em fase de organização da matriz óssea, através da deposição de osso cortical imaturo e desorganizado, porém, de densidade semelhante ao osso maduro presente no período de 90 dias.

A partir deste estudo foi possível mensurar a porção orgânica, através da quantificação das fibras colágenas, e ainda a porção inorgânica da linha de reparo da fratura óssea, pela mensuração dos elementos por EDS e pelo exame de densitometria, constatando que o sistema mostrou-se eficaz para a estabilização das fraturas ósseas.



7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada para análise quantitativa e descritiva dos resultados, nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) O sistema por placas e parafusos de titânio se mostrou eficaz para o tratamento das fraturas de ângulo mandibular, sem propiciar complicações como processos infecciosos ou pigmentação aos tecidos moles adjacentes;
- b) Não foram identificadas reações de corpo estranho ou presença de células de defesa que pudessem sugerir processo inflamatório ativo;
- c) Admite-se que o calo fibroso esteja estabelecido aos 30 dias e o calo ósseo aos 60 dias. Aos 90 dias ocorre a remodelação deste calo ósseo.
- d) O colágeno tipo I, maduro, é predominante na linha de reparo da fratura óssea, especialmente ao período de 60 dias, entretanto a densidade do colágeno tipo II é maior;
- e) O titânio induz ao intenso crescimento ósseo aposicional, sem apresentar potencial de dissolução nos tecidos adjacentes ou complicações que indiquem sua remoção;
- f) Através da densitometria admite-se que estabelecido o reparo da fratura, o calo ósseo seja composto de osso corticalizado, de densidade mineral padrão.



***REFERÊNCIAS**

ALBRECKTSSON T, BRANEMARK PL, HANSSON *et al.* The interface zone of inorganic implants *in vivo*: titanium implants in bone. **Ann Biomed Eng.** 1983; 11:1-27.

ANDREWS EJ, TODD PW, KUKULINSKI NE. Surface charge in foreign body carcinogenesis. **J Biomed Mater Res.** 1979; 13:173-87.

ARENS S, HANSIS M, SCHLEGEL U, EIJER H, PRINTZEN G, ZIEGLER WJ, PERREN SM. Infection after open reduction and internal fixation with dynamic compression plates- Clinical and experimental data. **Injury.** 1996; 27:27-33.

BURKITT HG, YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater's Functional Histology: A text and color atlas.** Hong Kong: Longman Group, 3 ed, 1997.

BRUNDLE CR, EVANS JR CA, WILSON S. **Encyclopedia of materials characterization.** Ed. Butterworth-heinetnann, London, 1992.

CAMPBELL DT, STANLEY JC. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa.** São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1979.

CANCEDDA R, GIANNONI P, MASTROGIACOMO M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials.** 2007; 28:4240-50.

CASTAÑEDA S, LARGO R, CALVO E, RODRIGUEZ-SALVANÉS F, MARCOS M E, DÍAZ-CURIEL M, HERRERO-BEAUMONT G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. **Skeletal Radiol.** 2006; 35:34-41.

CATANZARO GUIMARÃES SA. **Patologia básica da cavidade bucal.** Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1982, p.282-315.

CHAMPY M, LODGÉ JP, SCHMUTT R, JAEGER JH, MUSTER D. Mandibular osteosynthesis by miniature screwed plates via a bucal approach. **J Maxillofac Surg.** 1978; 6:14-21.

COATHUP MJ, BATES P, COOL P, WAKER PS, BLUMENTHAL N, COBB JP, BLUNN GW. Osseo-mechanical induction of extra-cortical plates with reference to their surface properties and geometric designs. **Biomaterials.** 1999 Nov;20:793-800.

*Referências de acordo com as normas de Vancouver

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal.

October 2005.

Consenso Brasileiro em Densitometria Clínica. www.sbdens.org.br. 2003.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**. 2000; 289:1501-4.

ELLIS III E. Treatment methods for fractures of the mandibular angle. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 1999; 28:243-52.

FERGUSON AB, LAING PG, HODGE ES. The ionization of metal implants in living tissues. **J Bone Joint Surg**. 1960; 42:77-90.

GARTNER LP; HIATT J L. **Atlas colorido de histologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002.

GOLDIN, JR. **Pesquisa em saúde: normas leis e diretrizes**. 2ª ed. Porto Alegre: HCPA, 1995. 8.

GRIFFITHS JC. Training in internal fixation of fractures. **British Med J**. 1978 Dec; 9:1615-6.

HILL PA, ORTH M. Bone remodeling. **British J. Orthodontics**. 1998; 25:101-7.

JAQUES B, RICHTER M, ARZA A. Treatment of mandibular fractures with rigid osteosynthesis: using the AO system. **J Oral Maxillofac Surg**. 1997; 55:1402-6.

JOHANSSON A, LINDGREN JU, Nord CE, SVENSSON O. Local plate infections in a rabbit model. **Injury**. 1999; 30:587-90.

JORGENSON DS, CENTENO JA, MAYER MH, TOPPER MJ, NOSSOV PC, MULLICK FG, MANSON PN. Biologic response to passive dissolution of titanium craniofacial microplates. **Biomaterials**. 1999;20:675-82.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 111-128, 1999.

KARSENTY G. Bone formation and factors affecting this process. **Matrix Biology**. 2000; 19:85-9.

KIM YK, YEO HH, LIM SC. Tissue Response to Titanium Plates: A transmitted electron microscopy study. **J Oral Maxillofac Surg**. 1997; 55:322-6.

KRISCHAK GD, GEBHARD F, MOHR W, KRIVAM V, IGNATIUS A, BECK A, WACHTER NJ, REUTER P, ARAND M, KINZL L, CLAES LE. Difference in metallic wear distribution released from commercially pure titanium compared with stainless steel plates. **Arch Orthop Trauma Surg**. 2004; 124:104-13.

KURIAKOSE MA, FARDY M, SIRIKUMARA M, PATTON DW, SUGAR AW. A comparative review of 266 mandibular fractures with internal fixation using rigid (AO/ASIF) plates or mini-plates. **British J Oral Maxillofac Surg.** 1996; 34:315-21.

LANDES CA, KRIENER S. Resorbable Plate Osteosynthesis of Sagittal Split Osteotomies with Major Bone Movement. **Plastic and Reconstr Surg.** 2003; 6:1828-40.

LERNER UH. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biology.** 2000; 19:107-20.

LERNER UH. Cystatin C. an inhibitor of bone resorption produced by osteoblasts. **Acta Physiol. Scand.** 1997; 161:81-92.

LINDER L, LUNDSKOG J. Incorporation of stainless steel, titanium and Vitallium in bone. **Injury.** 1975;6:277-85.

LONG M, RACK HJ. Review- titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. **Biomaterials.** 1998;19:1621-39.

MATTHEW IR, FRAME JW, BROWNE RM, MILLAR BG. *In vivo* surface analysis of titanium and stainless steel miniplates and screws. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1996;25:463-8.

MICHELET FX, DEYMES J, DESSUS B. Osteosynthesis with miniaturized screwed plates in maxillofacial surgery. **J Maxillofac Surg.** 1973; 1:79-84.

MOBERG LE, NORDENRAM A, KJELLMAN O. Metal release from plates used in jaw fracture treatment: A pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1989;18:311-4.

MORAM CA, MULLICK FG, ISHAK KG, JOHNSON FB, HUMMER WB. Identification of titanium in human tissues: Probable role in pathologic processes. **Hum Pathol.** 1991; 22:450-4.

NAZZAL A, LOZANO-CALDERÓN S, JUPITER JB, ROSENZWEIG JS, RANDOLPH MA, LEE SGP. A histologic analysis of the effects of stainless steel and titanium implants adjacent to tendons: as experimental rabbit study. **J Hand Surg.** 2006; 31A:1123-30.

NORRIS S A, PETTIFOR JM, GRAY D A, BUFFENSSTEIN R. Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: effects of dietary calcium intake. **Bone.** 2001; 29:62-9.

ONODERA K, OOYA K, KAWAMURA, H. Titanium lymph node pigmentation in the reconstruction plate system of a mandibular bone defect. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1993;75:495-7.

OH SH, FINÖNES RR, DARAIO C, CHEN LH, JIN S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. **Biomaterials**. 2005; 26:4938-43.

PERREN SM, KLAUE K, POHLER O, Predieri M, Steinemann S, Gautier E. The limited contact dynamic compression plate (PC-DCP). **Arch Orthop Trauma Surg**. 1990; 109:304-10.

PIETRZAK WS, VERSTYNEN ML, SARVER DR. Bioabsorbable Fixation Devices: Status for the Craniomaxillofacial Surgeon. **J of Craniofac Surg**. 1997; 8:92-6.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**. 2006; 21:169-78.

POPAT KC, LEONI L, GRIMES CA, DESAI TA. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. **Biomaterials**. 2007; 28: 3188-97.

POSPISILOVÁ, J. Healing of wounds. **Acta Chir Plast**. 1982; 24:293-303.

RAHN BA, GERBER HW, SIMPSON J, STRAUMANN F, PERREN SM. Cultured cells contacting implant material of different surface treatment. **Biomaterials**. 1980;1:39-44.

ROSENBERG A, GRATZ KW, SAILER HF. Should titanium miniplates be removed after bone healing is complete? **Int J Oral Maxillofac Surg**. 1993; 22:185-8.

ROSS MH, ROMRELL LJ. **Histologia, Texto e Atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, p.141-79.

SALO, J. *et al*. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. **Science**. 1997; 276:270-3.

SCHENK RK. Regeneração óssea bases biológicas. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK RK. **Regeneração óssea Guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence Books, 1996.

SEAL BL, OTERO TC, PANITCH A. A polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science Engineering R**. 2001; 34:147-230.

SHUBERT W, KOBLENIA BJ, POLLOCK RA. Cross-sectional area of the Mandible. **J Oral Maxillofac Surg**. 1997; 55:689-92.

SIDDIQUI A, MARKOSE G, MOOS KF, McMAHON J, AYOUB AF. One miniplate versus two in the management of mandibular angle fractures: A prospective randomized study. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2007; 45:223-5.

SOUTHARD T E, SOUTHARD K A, KRIZAN K E, HILLIS S L, HALLER J W, KELLER J, VANNIER M W. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2000; 89:244-9.

SUNDGREN JE, BODOE P, LUNDSTRÖM I. Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. **J Colloid Interface Sci.** 1986; 110:9-20.

SWAMINATHAN, R. Biochemical markers of bone turnover. **Clin. Chim. Acta.** 2001; 313:95-105.

TAKATSUKA S, TERAJ K, YOSHIDA K, NARINOBU M, UEKI K, NAKAGAWA K, YAMAMOTO E. A comparative study of dislocated mandibular condyle fractures in the rabbit. **J Cranio Maxillofac Surg.** 2005; 33:180-7.

TORGENSEN S, GJERDET NR. Retrieval study of stainless steel and titanium miniplates and screws used in maxillofacial surgery. **J Mater Sci: Mater Med.** 1994;5:256-62.

UNGERSBÖCK A, POHLER OEM, PERREN SM. Evaluation of tissue reactions at the interface of titanium limited contact dynamic compression plate implants with different surface treatments: an experimental sheep study. **Biomaterials.** 1996;17:797-806.

VAES, G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. **Clinical Orthopaedics and Related Research.** 1988; 231:239-71.

YAREMCHUK MJ, POSNICK JC. Symposium- Resolving controversies related to plate and screw fixation in the growing craniofacial skeleton. **J Craniofac Surg.** 1995; 6:525-38.

YOUNG B, HEATH JW. **Histologia funcional: texto e atlas em cores.** 4^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000.

ZAFFE D, BERTOLDI C, CONSOLO U. Element release from titanium devices used in oral and maxillofacial surgery. **Biomaterials.** 2003 Mar;24:1093-9.

ZHANG X, BAO K, DAI KERONG. Stress-relaxation plates and remodeling of callus and cortex under the plate in rabbits. **Chin Med J.** 2000; 113(9):805-9.

WEINGART D, STEINEMANN S, SCHILLI W, STRUB JR, HELLERICH U, ASSENMACHER J, SIMPSON J. Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1994;23:450-2.

WU Z, HE L, CHEN Z. Composite biocoating of hydroxyapatite / Al₂O₃ on titanium formed by Al anodization and electrodeposition. **Materials Letters.** 2007; 61:2952-5.



ANEXO A – Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 13 de novembro de 2007

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob n°: 0061/07
Intitulado: Análise histológica e mecânica das alterações nos tecidos ósseos adjacentes as placas e aos parafusos de titânio e bioabsorvíveis (PLLA/PGA) estudo comparativo em coelhos
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira
Pesquisadores Associados: Gleisse Wantowski; Marina Ribas de Oliveira; Roberto Hübler; Alexandre Cunha; Renata Renz
Nível: Mestrado

Foi *aprovado* pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *19 de outubro de 2007*.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS


Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 209
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal: 1429
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538
e-mail: odontologia-pg@pucrs.br

ANEXO B- Protocolo do Comitê de Ética no uso de Animais da PUCPR.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 02 de julho de 2007.
PARECER N. 60.07/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião realizada no dia 25 de junho do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Análise histológica e mecânica das alterações nos tecidos ósseos adjacentes as placas e aos parafusos de titânio e bioabsorvíveis (PLLA/PGA) - Estudo comparativo em coelhos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 209

O experimento classificado como de categoria C, será realizado com 20 coelhos da linhagem Orictolagos Cuniculos, Albinos que ao final do experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEUA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Presidente do Comitê de Ética No Uso de Animais da PUCPR

Ilma Sra.
Marina de Oliveira

ANEXO C – Normas para prática didático-científica da vivisseção de animais

Art. 1º Fica permitida, em todo o território nacional, a vivisseção de animais, nos termos da lei.

Art. 2º Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º A vivisseção não será permitida:

- I – sem o emprego da anestesia;
- II – em centros de pesquisa e estudos não registrados em órgão competente;
- III – sem supervisão de técnico especializado;
- IV - com animais que não tenham permanecido mais de 15 dias em biotério legalmente autorizados;
- V – em estabelecimento de ensino de 1º e 2º graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4º O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivisseção, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 – Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.

Parágrafo 2 – caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta)

dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5º Os infratores da lei estarão sujeitos:

I – às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688 de 03/10/1941, no caso de ser a primeira infração;

II – à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 6º O poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I – o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;

II – as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III – órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios em centros mencionados no inciso I.

Art. 7º Esta Lei entra em vigor na data da sua publicação.

Art. 8º Revogam-se as disposições em contrário.

ANEXO D – Declaração de permissão de utilização dos Aparelhos de Densitometria e de Mamografia do Hospital São Lucas da PUCRS

Carta de consentimento

Eu, Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider, chefe do serviço de Geriatria e responsável técnico pelo serviço de Densitometria Óssea do Hospital São Lucas da PUC_RS, declaro estar ciente do projeto de pesquisa interinstitucional PUC-PR / PUCRS: **“ANÁLISE HISTOLÓGICA E MECÂNICA DAS ALTERAÇÕES NOS TECIDOS ÓSSEOS ADJACENTES AS PLACAS E AOS PARAFUSOS DE TITÂNIO E BIOABSORVÍVEIS (PLLA/PGA) –ESTUDO COMPARATIVO EM COELHOS”**, apresentado a comissão científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande Do Sul (PUCRS) e protocolado sob o número 061/07 e ao comitê de Ética no uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEUA-PUCRS), protocolado sob o número 60.07, registro 209 como parte dos requisitos para a conclusão do curso de mestrado em CTBMF, promovido pela PUC-RS. Declaro ainda, estar ciente e aprovo a participação desta instituição, na parte de execução da técnica de densitometria óssea deste trabalho.



Prof. Dr. Rodolfo Schneider
Chefe do serviço de Geriatria do Hospital São Lucas da PUCRS

ANEXO E- Tabela da Avaliação Macroscópica (escores)

Coelho	Período de tempo (dias)	Reparo Ósseo (escores)	Crescimento Ósseo Aposicional (escores)
1	30	2	1
2	30	2	3
3	30	1	1
4	30	1	1
5	30	1	1
6	30	2	1
7	60	1	2
8	60	2	2
9	60	1	1
10	60	2	2
11	60	2	2
12	60	1	2
13	90	2	2
14	90	3	3
15	90	3	3
16	90	2	2
17	90	1	2
18	90	2	2

ANEXO F - Reparo ósseo na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)

Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		14	15	17	19	20
30	a	2.839.454	978.066	268.340	623.203	3.494.857
	b	2.222.803	934.443	1.666.467	2.688.621	206.645
	c	3.015.962	1.350.310	1.650.877	1.924.488	129.201
	d	4.648.448	612.329	413.163	1.201.083	213.996
Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		8	9	11	12	13
60	a	4.483.109	892.052	1.681.064	4.210.720	706.663
	b	364.258	99.731	859.214	2.719.654	6.624.082
	c	252.233	315.924	814.179	529.287	1.767.951
	d	3.580.286	423.711	4.259.392	1.958.457	2.563.392
Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		2	3	4	6	7
90	a	2.692.867	1.384.758	907.699	4.020.191	298.940
	b	1.975.075	1.381.438	646.372	3.016.101	2.082.305
	c	1.995.932	967.821	159.578	1.080.903	3.843.990
	d	911.248	952.602	3.001.048	330.437	67.994

* a (superior), em seqüência b e c, d (basal)

ANEXO G - Fibras colágenas na linha de fratura, com coloração HE (μm^2)

Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		14	15	17	19	20
30	a	730.893	446.329	2.809.667	2.649.751	722.207
	b	2.874.901	701.308	1.726.589	1.722.744	2.632.175
	c	947.766	1.607.570	886.785	603.330	1.715.857
	d	663.314	3.528.474	502.347	341.380	1.300.540
Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		8	9	11	12	13
60	a	173.450	2.157.877	222.179	332.909	1.076.509
	b	349.112	4.994.053	162.768	380.856	426.049
	c	2.359.494	4.439.440	779.724	332.747	398.291
	d	1.068.038	885.349	86.782	325.790	640.890
Período de tempo (dia)	Região*	Repetição (coelho)				
		2	3	4	6	7
90	a	254.303	107.062	668.254	184.590	1.375.392
	b	2.280.655	108.132	237.994	344.000	1.104.063
	c	158.085	236.706	449.214	305.923	2.055.589
	d	869.378	207.912	2.777.208	1.201.780	382.130

* a (superior), em seqüência b e c, d (basal)

ANEXO H – Área total do colágeno distribuído nas perfurações e linha de reparo da fratura, com coloração Sirius-red (μm^2)

Período de tempo (dia)	Tipo colágeno*	Região*	Repetições (coelho)				
			14	15	17	19	20
30	1	P	279	171	186	185	173
		L	161	134	91	102	181
	2	P	86	151	67	68	125
		L	181	72	96	21	143
60	1	P	344	180	128	166	164
		L	216	167	160	134	183
90	1	P	156	288	178	184	264
		L	169	246	172	152	359
30	2	P	95	71	101	86	58
		L	112	54	180	187	90
	2	P	9	39	154	39	198
		L	46	59	52	40	309

* Tipo 1 (maduro); tipo 2 (imaturo)

** P (em torno das perfurações); L (na linha da fratura)

ANEXO I – Densidade total do colágeno distribuído nas perfurações e na linha de fratura, com coloração Sirius-red (μm^2)

Período de tempo (dia)	Tipo colágeno*	Região*	Repetições (coelho)				
			14	15	17	19	20
30	1	P	109	105	102	114	108
		L	135	103	83	97	118
	2	P	60	74	58	49	62
		L	85	56	62	32	79
60	1	P	8	9	11	12	13
			116	116	110	96	116
	2	P	128	123	101	89	137
			46	52	47	60	43
		L	61	40	87	128	84
90	1	P	2	3	4	6	7
			99	117	109	103	108
	2	P	93	129	100	97	109
			13	29	68	29	82
		L	33	37	29	27	84

* Tipo 1 (maduro); tipo 2 (imaturo)

** P (em torno das perfurações); L (na linha da fratura)