

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA POR *Sérgio Tadeu*  
*Bernatavicius* E APROVADA  
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *28, 07, 2008*

*Elia*  
ORIENTADOR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA**

# **Aplicação e Caracterização de Microesferas de Poli (L-ácido láctico) Contendo Proteína Morfogenética Óssea (BMP) no Tratamento de Perda do Tecido Dental**

Autor: Sergio Tadeu Bernatavicius  
Orientador: Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA  
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS**

**Aplicação e Caracterização de  
Microesferas de Poli (L-ácido láctico)  
Contendo Proteína Morfogenética Óssea  
(BMP) no Tratamento de Perda do Tecido  
Dental**

Autor: Sergio Tadeu Bernatavicius

Orientador: Profa Dra Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2008  
S.P. – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Bernatavicius, Sergio Tadeu  
B457a Aplicação e caracterização de microesferas de poli (l-ácido-  
lático) contendo proteína morfogenética óssea (BMP) no  
tratamento de perda do tecido dental / Sergio Tadeu  
Bernatavicius.--Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Tecnologia de liberação controlada. 2. Micropartículas.  
3. Poli (ácido lático). I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Mecânica. III. Título.

Titulo em Inglês: Application and Characterization of Microspheres of Poly (L-lactide  
acid) Contends Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in the  
Treatment of Loss of the Tissue Dental

Palavras-chave em Inglês: Controlled liberation, Microspheres, PLLA, Material Direct  
Capeadores, BMP

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília A. de Carvalho Zavaglia, Mércia Tancredo Toledo,  
Arnaldo Santos Junior, Maria Clara Filippini Ierardi

Data da defesa: 28/07/2008

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA  
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS**

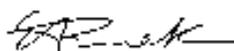
**TESE DE DOUTORADO**

**Aplicação e Caracterização de  
Microesferas de Poli (L-ácido láctico)  
Contendo Proteína Morfogenética Óssea  
(BMP) no Tratamento de Perda do Tecido  
Dental**

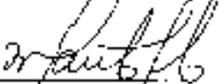
Autor: **Sergio Tadeu Bernatavicius**

Orientador: **Profa Dra Eliana Aparecida de Rezende Duek**

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente**  
Universidade Estadual de Campinas

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Cecília A. de Carvalho Zavanin**  
Universidade Estadual de Campinas - FEM

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Mércia Tancredo Toledo**  
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo - CCMB

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior**  
Universidade Federal do ABC

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Maria Clara Filippini Icardi**  
Universidade Estadual de Campinas - FEM

Campinas, 28 de julho de 2008

## **Dedicatórias**

### À Deus

“No corre-corre do meu dia-dia, esqueço-me tantas vezes de Te agradecer. Obrigado Senhor pelos meus pais e amigos, por todos aqueles que entraram na minha história de vida e me ensinaram a crescer, a ser mais gente; pelo término desta jornada, o mais sincero agradecimento a Ti, que me confiou a vida. Através de minha fé, de minhas orações, de meu amor, agradeço-Te por tudo que fui, que sou e ainda serei e, principalmente, por nunca ter me deixado nos momentos difíceis e por ter me permitido chegar até aqui, dedico-lhe esta vitória.”

### Aos meus pais

“De vocês recebi o Dom mais precioso do universo: a Vida. Já por isso seria infinitamente grato, mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela; revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram a porta do meu futuro iluminando o meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Hoje, neste dia, procuro encontrar entre palavras aquela que gostaria que seus corações ouvissem. E só encontro uma simples e sincera palavra: Obrigado. Dividam comigo, os méritos desta conquista, porque ela lhes pertence; ela é tão sua quanto minha.”

### A minha querida esposa Débora

“A você, que abriu mão de momentos de convívio, que sofreu a minha ausência quando o dever e o estudo me chamavam. A você que agora vê, com muito alívio, este fim de etapa e por mais que não queira demonstrar esta mais feliz do que eu; dedico-lhe este trabalho.”

### A minha pequenina Isabella

“A você obrigado por existir e deixar os meus dias mais iluminados.”

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Eliana Duek o vosso incentivo e orientação na conclusão deste trabalho representa um marco da minha realização profissional. A você muito obrigado.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes pela dedicação, amizade, honestidade e exemplo profissional. Receba a minha gratidão.

Aos amigos Alberto, Helena e Cintia pela amizade, profissionalismo e pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram para a realização deste trabalho.

## Resumo

BERNATAVICIUS, Sergio Tadeu, *Aplicação e caracterização de Microesferas de Poli (L-ácido-láctico) Contendo Proteína Morfogenética Óssea (BMP) no Tratamento de Perda do Tecido Dental*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 103p. Tese (Doutorado)

Um dos pontos que deve ser considerado de difícil solução no Brasil é a perda dentinária. Vários materiais tem sido estudados para minimizar o problema, mas nenhum atende às necessidades de tal aplicação. Nesse sentido, o objetivo do presente avaliar a biocompatibilidade do Poli (L-ácido láctico), PLLA, contendo BMP-2 no tratamento de grandes perdas de dentina onde pode ou não ocorrer a exposição da polpa dental, casos onde a exposição leva ao tratamento endodôntico ou exodontia. Para tanto, foram realizados estudos *in vivo* em coelhos e humanos, ambos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas parecer número 045/2006. Os estudos em coelhos foram realizados utilizando-se de um modelo experimental onde foi implantado as microesferas contendo BMP-2 nos incisivos centrais e após 7, 20, 40, e 60 dias os dentes foram cortados e submetidos à análise histológica. Após 7 dias de implante, verificou-se regiões centrais de hipocalcificações em relação ao implante e formação de pontos de dentina. Não foi localizado processo inflamatório em função da utilização dos implantes. Após 20 dias verificou-se que a calcificação começa por áreas globulosas que crescem e se fundem, porém o processo muitas vezes é imperfeito, resultando áreas de matriz orgânica não calcificada; são as áreas interglobulares. Após 40 dias, verificou-se a formação de tecido de normalidade o que demonstra a eficácia das microesferas com BMP-2 como material reparador. A análise *in vivo* em humanos se fez necessária para avaliar a resposta frente à aplicação do material, seu efeito antiinflamatório e analgésico em casos de exposição pulpar e grande perda

dentinária, além da avaliação do retorno da função ao elemento dental, ou seja, controle da dor e possibilidade de mastigação normal. Observou-se após 60 dias que todos os pacientes implantados não apresentaram dor a nenhum dos testes realizados e mantinham a vitalidade pulpar, as microesferas com BMP-2 aqui também se mostraram eficazes no controle antiinflamatório e infeccioso. O estudo *in vivo* indicou que as microesferas de PLLA contendo BMP-2 apresentam grande potencial para serem utilizadas para aplicação em questão, já que o material favorece a formação de uma neodentina e controla os processos inflamatório e infeccioso.

*Palavras Chave*

Liberação Controlada, Microesferas, PLLA, Materiais Capeadores Diretos, BMP, Regeneração Tecidual Guiada

## **Abstract**

BERNATAVICIUS, Sérgio Tadeu, *Aplication and Characterization of Microspheres of Poly (L-lactide acid) Contends Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in the Treatment of Loss of the Tissue Dental*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 103p. Tese (Doutorado)

One of the points that it should be considered of difficult solution in Brazil, is the loss dentine. Several materials have been studied to minimize the problem, but none assists to the needs of such application. In that sense, the objective of the present to evaluate the biocompatibility of the Poly (L-lactide acid), PLLA, contends BMP-2 in the treatment of great dentin losses where cannot or not to happen the exhibition of the dental pulp, cases where the exhibition takes to the treatment endodontic or exodontia. For so much, studies in was accomplished *In vivo* in rabbits and humans, both approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas to seem number 045/2006. The studies in rabbits were accomplished being used of an experimental model where it was implanted the microesferas contends BMP-2 in the incisive central and after 7, 20, 40, and 60 days the teeth were cut and submitted to the analysis histological. After 7 days of it implants, it was verified central areas of hipocalcification in relation to the it implants and formation of dentin points. Inflammatory process was not located in function of the use of the implants. After 40 days the one was verified that the calcification begins for areas interglobules that grow and they are founded, even so the process a lot of times it is imperfect, not resulting areas of organic matrix not calcified; they are the areas interglobules. After 40 days, the formation of normality tissue was verified that demonstrates the effectiveness of the microspheres with BMP-2 as reparative material. The analysis *in vivo* in humans if made necessary to evaluate the answer front to the application of the

material, its effect antiinflammatory and analgesic in cases of exhibition pulp and great loss dentine, besides the evaluation of the return of the function to the dental element, that is to say, control of the pain and possibility of normal mastication. It was observed after 60 days that all the implanted patients didn't present pain to none of the accomplished tests and they maintained the vitality pulpar, the microspheres with BMP-2 here was shown also effective in the control antiinflammatory and infectious. The study *in vivo* it indicated that the microspheres of PLLA contends BMP-2 they present great potential for they be used for application in subject, since the material favors the formation of a neodentine and it controls the inflammatory and infectious processes.

*Key Words*

**Controlled Liberation, Microspheres, PLLA, Material Direct Capeadores, BMP, Guided Tissue Regeneration**

# Índice

Lista de Figuras	xii
Lista de Tabela	xv
Nomenclatura	xvi
1 Introdução	01
1.1 Objetivos	03
2 Revisão da Literatura	04
2.1 Anatomia dental	04
2.2 Avaliação das Principais Teorias da Cárie	05
2.3 Soluções e Materiais Atuais para Perda do Tecido Dental	08
2.4 Proteínas Morfogenéticas do Osso	11
2.5 Fatores de Crescimento	14
2.6 Mecanismo de ação das BMPs	15
2.7 Biomateriais Poliméricos	15
2.8 Liberação Controlada de Medicamentos	24
2.9 Obtenção das Microesferas	26
2.10 Proteína Óssea Morfogenética Como Agente Capeador	27
3 Materiais e Métodos	31
3.1 Obtenção das Microesferas de PLLA com BMP	31
3.2 Estudo Experimental em Coelhos	31
3.2.1 Método Cirúrgico	32
3.2.2 Procedimentos Histológicos para Microscopia de Luz	33
3.3 Estudo Experimental em Humanos	34
3.3.1 Descrição da População	34

3.3.2 Descrição da Técnica de Aplicação do PLLA em Humanos	34
3.3.3 Análise dos Dados	35
3.4 Estudo Experimental em Humanos (casos de exodontia ortodôntica)	36
3.4.1 Descrição da População	36
3.4.2 Descrição da Técnica de Aplicação do PLLA em Humanos	36
3.4.3 Análise dos Dados	37
3.4.4 Procedimentos Histológicos para Microscopia de Luz	37
4 Resultados e Discussões	39
4.1 Obtenção das Microesferas e Estudo <i>In Vitro</i>	39
4.2 Estudo <i>in vivo</i>	46
4.2.1 Estudo <i>In Vivo</i> em Coelhos	46
4.2.1.1 Microscopia de Luz	48
4.2.2 Estudo <i>In Vivo</i> em Humanos	64
5 Conclusões	73
6 Referências Bibliográficas	75
<b>Anexo I</b>	88
<b>Anexo II</b>	90
<b>Anexo III</b>	95
<b>Anexo IV</b>	101
<b>Anexo V</b>	103

## Lista de Figuras

- 2.1 Esquema para a regulação do metabolismo de glicose do *S. mutans* durante crescimento contínuo sob limitação de glicose (a) e sob limitação de nitrogênio na presença do excesso de glicose (b). G-6-P, glicose 6-fosfato; frutose 1,6-difosfato; GAL-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PK piruvato quinase; LDH, lactato desidrogenase; PFL, piruvato formiato-liase. +, ativação; -, inibição. Letras de imprensa maiúscula, alta concentração de intermediários intracelulares na célula; letras de imprensa minúscula, baixa concentração de intermediários intracelulares na célula (Yamada e Carlsson, 1976). 07
- 4.1 Curva gaussiana da distribuição de diâmetros. 41
- 4.2 Histogramas da distribuição de diâmetros. 42
- 4.3 Morfologia das microesferas de PLLA sem BMP. 43
- 4.4 Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, 400x. 44
- 4.5 Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, porosidade em todo contorno, 1000x. 45
- 4.6 Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, porosidade indicando um material compatível para invasão celular, 1500x. 45
- 4.7 Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, visualização da geometria, 200x. 45

- 4.8 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente normal apresentando esmalte com região de tufos (T), fusos (F) e lamelas (L); na região da dentina observamos a dentina pericanalicular (DP) e os espaços Czermack (EC). Tricrômico de Masson. 400x. 50
- 4.9 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 7 dias. Observa-se regiões centrais de hipocalcificações em relação ao implante (seta). Hematoxilina Eosina. 200x. 51
- 4.10 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se a região do implante com tecido neoformado Hematoxilina Eosina . 200x. 53
- 4.11 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se formação de osteodentina em algumas partes da cavidade, principalmente na parede dentinária adjacente e abaixo da superfície preenchida com BMP mais o PLLA. Hematoxilina Eosina 400x. 54
- 4.12 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se limite amelodentinário com uma grande região de tufos e lamelas (seta). Hematoxilina Eosina. 100x. 55
- 4.13 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se região central destacando o local do implante. Tricrômico de Masson. 200x. 56
- 4.14 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se áreas interglobulares de formação de dentina (seta). Tricrômico de Masson. 400x. 57

- 4.15 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se dentina neoformada e áreas interglobulares de formação de dentina. Tricrômico de Masson. 100x. 58
- 4.16 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com medicamento após 60 dias. Observa-se esmalte com região de tufos (T), fusos (F) e lamelas (L); na região da dentina observamos a dentina pericanalicular (DP) e os espaços Czermack (EC). Azul de Toluidina 400x. 59
- 4.17 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com medicamento após 60 dias. Observa-se tecido de normalidade. Tricrômico de Masson. 400x. 60
- 4.18 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de hidróxido de cálcio após 60 dias. Observa-se que não ocorreu a regeneração do material como apresentado nos casos anteriores. Verifica-se claramente o corte das brocas esféricas demonstrando o espaço deixado pelo material capeador. Tricrômico de Masson. 100x. 61
- 4.19 Radiografia periapical mostrando aumento da massa dentinária sobre a polpa. Evolução bimestral. 68
- 4.20 Fotomicrografia de um corte transversal de um dente humano com PLLA contendo BMP após 40 dias. Observa-se que ocorreu a regeneração parcial da dentina como apresentado nos casos anteriores. Verifica-se claramente os prismas em corte transversal e longitudinal, indicando as bandas claras e escuras (bandas de Hunter-Schreger), além da dentina neoformada, Hematoxilina Eosina aumento 100x. 72

## **Lista de Tabelas**

1	Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (10 dias).	
	ANEXO III	95
2	Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (30 dias).	
	ANEXO III	97
3	Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (60 dias).	
	ANEXO III	99
4.1	Medida do Momento de Massa/Volume (Medida do diâmetro De Brouckere).	40
4.2	Diâmetros médios obtidos em pontos específicos da curva gaussiana.	41

## Nomenclatura

MTA – Mineral Trióxido Agregado

IRM – Cimento Óxido de Zinco e Eugenol

OZE – Cimento Óxido de Zinco e Eugenol

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

TGF – Fatores de Crescimento Transformadores

pH – Potencial Hidrogeniônico

rhBMP-2 – Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana tipo 2

PLGA – Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) ou Poli (L-lactide-co-glicolide)

PLLA – Poli (L-ácido láctico) ou Poli (L-lactide)

Mg(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de Magnésio

PBS – Phosphate Buffered Saline – Tampão Fostato Salina

DMC – Diclorometano

PVAI – Poli (álcool vinílico)

W/O – Emulsão água/óleo

LLS – Luz Laser

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

RPM – Rotações por minuto

D[4,3] – D(4,3) Medida do Momento de Volume/Massa – Diâmetro médio “De Brouckere

D[v,0.5] é o volume médio de diâmetros (D50 or D0.5)

D[3,2] – Medida do Momento de Área Superficial – Diâmetro médio “Sauter”

m – mili (10<sup>-3</sup>)

μ - micro (10<sup>-6</sup>)

# Capítulo 1

## Introdução

A estimativa de pessoas que não tem dentes no Brasil segue em torno de 8 milhões, sendo que outros 30 milhões nunca tiveram tratamento dentário algum, este número é bastante expressivo considerando nossa população de 180 milhões, lembrando ainda que existe dez vezes mais dentistas aqui do que na China. Atualmente existe uma busca muito grande para solução da perda de tecidos dentais, afinal 10 milhões das causas de mortes mundiais são gerados por problemas das condições orais. Dentre alguns problemas de difícil solução na odontologia podemos incluir os casos de grande perda dentinária, onde existem apenas dois tipos de tratamento, a retirada do elemento dentário ou exodontia e o tratamento do canal (endodontia) ou retirada da polpa, o que acarreta a perda da vitalidade do dente. No Brasil, por falta de recursos, a primeira opção é a mais utilizada e em outras localidades no mundo como na África, além de recursos faltam profissionais para os tratamentos mais complexos, estima-se que há no máximo um dentista para uma população de cem mil habitantes na região.

A literatura mostra que não existem antecedentes de materiais que possam ser utilizados sobre a polpa sem que ocorra danos a mesma, portanto, o principal benefício do estudo em questão é a diminuição da perda de elementos dentais pela população de baixa renda, além da diminuição dos casos de endodontia para as demais faixas de renda da população, mantendo a vitalidade pulpar em todos os casos, e nos casos onde não há profissionais especializados possibilitar um tratamento menos complexo e de fácil acesso.

Estudos mostram que a situação do Brasil em relação à saúde bucal é crítica. Em 1996, a Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, em parceria com a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, realizaram um estudo na cidade de São Paulo, em escolares da rede pública e privada de ensino, no qual foram examinadas 89.114 pessoas, nas faixas etárias de 5 a 12, 18, 35 a 44 e 65-74 anos, provenientes de 133 municípios das 24 regiões de saúde. Neste estudo, através do Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal (Estado de São Paulo), foi possível observar as seguintes perdas dentárias por faixa etária, até 12 anos 3,72%, até 18 anos 8,64% e de 35 a 44 anos 20,9% de perdas.

Observa-se, em síntese, que nenhuma meta da OMS (Organização Mundial da Saúde) havia sido atingida pela população do Estado de São Paulo em 1998. Tais características epidemiológicas indicam importante comprometimento das condições de saúde e, portanto, da qualidade de vida, em todas as faixas etárias da população.

Em outro levantamento realizado pelo Ministério da Saúde e publicado pelo Conselho Federal de Odontologia em março de 2004 (CFO num.059) mostrou que junto com as mortes por câncer de boca, o grande número de desdentados é um de nossos principais problemas de saúde bucal. Em todo o país, 75% dos idosos (acima de 60 anos) não têm um dente sequer na boca. Na faixa etária entre 30 e 44 anos, 30% dos adultos são desdentados. Desses, mais de 15% necessitam de dentadura. Dados do Ministério indicam, ainda que há, no país, cinco mil adolescentes desdentados e sem prótese na boca. Somente 10% dos idosos têm 20 ou mais dentes na boca, entre adultos este percentual sobe para 54%, e na faixa etária entre 15 e 19 anos, apenas 55% dos adolescentes têm todos os dentes, estes números apesar do programa Brasil Sorridente ainda continuam altos, principalmente por não existir nenhum tratamento menos complexo para os casos de contaminação pulpar.

Vários estudos tem sido desenvolvidos no sentido de se utilizar materiais para minimizar tais problemas. Apesar dos esforços, ainda não existe um material adequado que possa ser utilizado sobre a polpa sem que ocorra danos a mesma, devolvendo função ao aparelho mastigatório.

Dentre os materiais estudados para diversas aplicações na área médico-odontológica, os polímeros bioreabsorvíveis vem se destacando devido às suas características de biodegradação, o que permite que os mesmos exerçam suas funções como suporte temporário e em seguida são reabsorvidos pelo organismo. Dentre os dispositivos estudados a base desses polímeros, as microesferas são indicadas em aplicações para liberação controlada de medicamentos, e também como fator dentino indutor apresentando como principal vantagem em relação aos sistemas convencionais o fato do medicamento ser ministrado a um nível terapeuticamente desejável no plasma, e os fatores de indução serem depositados de maneira gradual.

## **1.1 OBJETIVOS**

Utilização do poli (ácido láctico) mais BMP na recuperação de tecidos dentinários lesados, em casos onde a polpa não apresenta necrose e existe possibilidade de recuperação da dentina através do estímulo dos odontoblastos.

Desenvolver uma estrutura temporária, para neoformação de dentina e suporte para fixação e separação entre tecidos moles (polpa) e tecido duro (dentina). Recuperação (regeneração guiada de tecido). Controlar o processo inflamatório. Utilizar os arcabouços como carreadores de dispositivos dentinoindutores (BMP).

## **Capítulo 2**

### **Revisão da Literatura**

#### **2.1 Anatomia Dental**

Os componentes do dente, de modo geral, consistem de uma coroa, coberta por esmalte translúcido muito duro e uma raiz coberta por cimento. A dentina contém uma cavidade central, a polpa do dente, a qual se estreita em direção à raiz, como um canal do dente que se abre próximo ou na sua extremidade, através de um forame, denominado de forame apical. A raiz é circundada por osso alveolar, seu cimento é separado do alvéolo ósseo pelo ligamento periodontal. Próximo da margem cervical, o dente, ligamento periodontal e osso adjacente são cobertos pela gengiva, de coloração rosa pálido. A polpa é um tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado, envolvida por dentina. Os corpos celulares dos odontoblastos estão em uma lâmina pseudo-estratificada que reveste a face pulpar. A dentina possui túbulos nos quais se encontram um único processo citoplasmático de um odontoblasto. O ligamento periodontal é um denso tecido conjuntivo que possui, além das células típicas deste tecido, células epiteliais. As principais funções do ligamento periodontal são: manter os dentes presos nos alvéolos e fornecer informação sensitiva a respeito do movimento do dente (PAIVA & ANTONIAZZI, 1988).

O emprego dos materiais odontológicos visa modular a resposta inflamatória e controlar o processo infeccioso tendo, assim, importante papel no sucesso da terapia odontológica. Quando substâncias irritantes são utilizadas no tratamento odontológicos, a concentração de líquido no interior dos canaliculos dentinários pode sofrer alteração de tal modo a provocar a degradação de mastócitos e isso resulta na liberação de histidina, substância P, produzindo a bradicinina ou

prostaglandina, proteínas plasmáticas ativas que desencadeiam a reação inflamatória. O resultado de mediadores endógenos de inflamação é a vasodilatação arterial, elevação da pressão hidrostática capilar, aumento da passagem de proteínas plasmáticas para o interstício pulpar e aumento da pressão no tecido da polpa. Esses eventos conduzem a uma nova redução no fluxo sanguíneo pulpar que permite o aumento da concentração de produtos injuriosos no líquido intersticial. A dor da pulpíte é associada com inflamação pulpar e elevação da pressão tecidual. As reações inflamatórias, desde de que não tratadas em tempo hábil, evoluem para mortificação pulpar (necrose), podendo causar complicação no periodonto apical, uma vez que, tanto as toxinas microbianas, quanto os produtos tóxicos da decomposição pulpar, promovem igualmente a lise dos tecidos periapicais (PAIVA & ANTONIAZZI, 1988).

## **2.2 Avaliação das Principais Teorias da Cárie**

Não há dúvida que os ácidos estão envolvidos na formação da cárie. Na ausência de lesões cariosas e na placa, o pH diminui após um bochecho com um substrato adequado à fermentação bacteriana. Através da inserção de delicados elétrodos de antimônio na placa, em superfície lisa de dentes anteriores, STEPHAN (1940) provou que com dois a quatro minutos de bochecho com soluções de sacarose ou glicose, o pH caía aproximadamente 6,5 para 5,0 e voltava gradualmente para pH original com 40 minutos. Mas recentemente, através do uso da telemetria e de um elétrodo miniatura de vidro, sensor de pH, construído em um aparelho removível, tem sido possível obter-se medidas contínuas e diretas do pH da placa interproximal *in situ* na interface dente-placa pode permanecer por muito tempo. A quantidade e duração da queda do pH são influenciados por: 1) quantidade de placa interdentária; 2) flora predominante; 3) velocidade do fluxo salivar; 4) tipo e concentração do substrato e 5) localização da placa (vestibular ou lingual se comparados com as superfícies interproximais) (ZHANG, 1982).

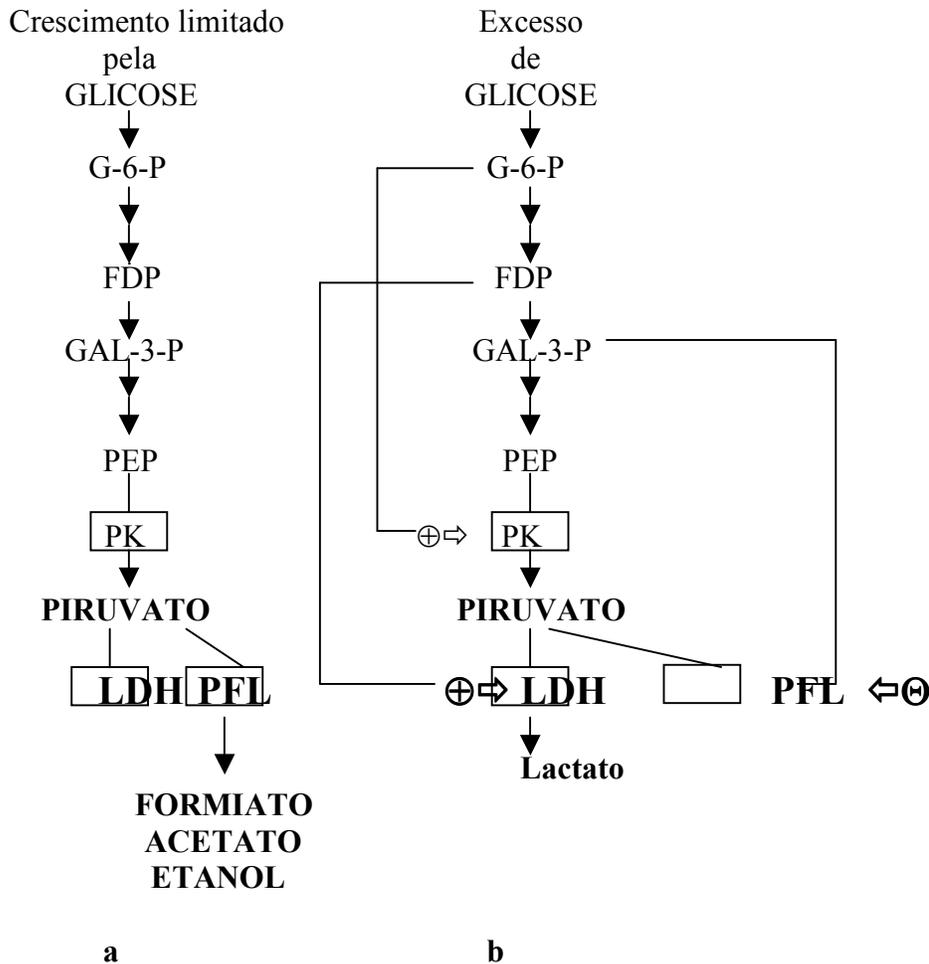
Uma variedade de ácidos orgânicos tem sido identificada através de técnicas cromatográficas específicas na placa dentária, em culturas bacterianas isoladas da placa e em lesões cariosas. Isto inclui os ácidos láctico, acético, propiônico, fórmico e butírico. Entretanto, as concentrações relativas destes ácidos podem variar. Isto pode ser esperado, porque a placa abriga uma população bacteriana mista de microorganismos homo e heteroláctico fermentativos, assim

como microorganismos ácido fermentativos que diferem em suas capacidades fermentativas. Não somente as proporções destes microorganismos possuem uma dinâmica de fluxo diferente, como as proporções relativas dos seus produtos finais não são constantes e são influenciadas por variáveis como pH, tipo e concentração de substrato e tensão de oxigênio (ZHANG,1982).

Diversos estudos têm utilizado colônias puras de microorganismos, de maneira que muito pouco é conhecido sobre a capacidade bioquímica da placa dentária. De acordo com um estudo da placa encubada *in vitro* durante cinco horas, a concentração do ácido láctico foi semelhante ou menor às dos ácidos acéticos ou propiônico. Imediatamente após a ingestão de sacarose, o total de produção de ácido láctico pela placa excede o total de ácidos voláteis; acético maior que propiônico, e somente indícios do ácido n-butírico podem ser detectados. Várias horas depois, os ácidos voláteis (especialmente acético) podem ser considerados no número total de ácido na placa. *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* crescem em meio puro de cultura sob condições limitadas de nitrogênio ou glicose, produzindo produtos finais voláteis. Quando a glicose se encontra disponível e a fonte de nitrogênio limita o crescimento, o lactato torna-se o principal produto fermentado. Entretanto, quando a glicose se encontra limitada (como pode ocorrer em uma placa sem nutrientes) os principais produtos da fermentação são o etanol, acetato e formiato. Os *S. mutans* desenvolvidos em meios de cultura contínuos formam vários produtos fermentáveis além do lactato. Durante o rápido crescimento dos *S. mutans*, o lactato é o produto final mais abundante, enquanto os ácidos voláteis gordurosos predominam durante um crescimento lento (NEWBRUN, 1988).

Um esquema proposto para a regulação do metabolismo do *S. mutans* durante um crescimento contínuo sob limitação de glicose (a) e sob limitação de nitrogênio na presença ou excesso de glicose (b) é mostrado na Figura 2.1. Quando o *S. mutans* cresce em condições limitadas de glicose (a), a baixa concentração intracelular de glicose 6-fosfato restringe a atividade do piruvato quinase e o nível aumentado de fosfoenol piruvato é utilizado para o transporte efetivo de glicose no interior da célula. Em contrapartida, a atividade do piruvato formiato-liase responsável pela formação do formiato, acetato e etanol é terrivelmente aumentada; presumivelmente ela é uma enzima que se pode induzir. Por outro lado, quando o *S. mutans* está crescendo na presença de glicose excessiva (b), esta enzima é inibida pelo d-

gliceraldeído 3-fosfato. Além disso, os níveis de frutose 1-6-disfosfato aumentam, favorecendo a atividade do lactato desidrogenase e conseqüentemente há formação de lactato.



**Figura 2.1.** Esquema para a regulação do metabolismo de glicose do *S. mutans* durante crescimento contínuo sob limitação de glicose (a) e sob limitação de nitrogênio na presença do excesso de glicose (b). G-6-P, glicose 6-fosfato; FDP, frutose 1,6-difosfato; GAL-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PK, piruvato quinase; LDH, lactato desidrogenase; PFL, piruvato formiato-liase. +, ativação; -, inibição. Letras de imprensa maiúscula, alta concentração de intermediários intracelulares na célula; letras de imprensa minúscula, baixa concentração de intermediários intracelulares na célula (YAMADA & CARLSSON, 1976).

Entretanto, o pH da placa não é sempre ácido e pode aumentar após a queda inicial causada pelos substratos fermentáveis. Isto é devido parcialmente à capacidade tampão da saliva, mas

pode também ser explicado por outros processos metabólicos da placa. A flora mista da placa dentária pode descarboxilar certos aminoácidos (arginina, ácido aspártico, glutâmico, histidina, lisina e ornitina) e formar dióxidos de carbono e as respectivas aminas.

Portanto podemos dizer que cárie dentária é uma doença multifatorial, onde se verifica a interação de três fatores principais: o hospedeiro (principalmente a saliva e os dentes), a microbiota e o substrato ou dieta; além de um quarto fator – o tempo – que deve ser considerado em qualquer discussão sobre a etiologia da cárie. Diagramaticamente, estes fatores podem ser vistos como quatro círculos justapostos. Para que ocorra a cárie, deve haver condições favoráveis a cada um destes fatores. Em outras palavras, a cárie requer um hospedeiro susceptível, uma microbiota bucal cariogênica e um substrato adequado que devem estar presentes em um período de tempo suficiente. Reciprocamente, a prevenção da cárie baseia-se nas tentativas de: 1) aumentar a resistência do hospedeiro (terapia com flúor, selantes oclusais, imunização), 2) diminuir o número de microorganismos que estão em contato com os dentes (controle de placa), 3) modificar o substrato através da seleção de gêneros alimentícios não cariogênicos e 4) reduzir a permanência do substrato na boca, limitando a frequência da ingestão (NEWBRUN, 1988).

### **2.3 Soluções e Materiais Atuais Para Perda do Tecido Dental**

Devido a grande ocorrência de grandes perdas dentais (esmalte, dentina, perfurações cervicais ou radiculares), houve a necessidade de estudos, por um material que preenchesse os requisitos ideais para um perfeito selamento destas perdas; os materiais mais comumente utilizados são o IRM (cimento óxido de zinco e eugenol), MTA (Mineral Trióxido Agregado®), Hidróxido de Cálcio e Amálgama.

Segue abaixo comparativo em relação a adaptação marginal, capacidade bactericida, toxicidade, indução de tecido ósseo.

O Hidróxido de cálcio parece preencher melhor os requisitos para estimular o selamento das perfurações, pois além da facilidade de sua inserção, eventuais extravasamentos seriam rapidamente reabsorvidos, inclusive na luz da perfuração, propiciando, teoricamente, a

reorganização do tecido periodontal e o conseqüente selamento biológico por tecido mineralizado (BRAMANTE 1980).

De acordo com LEE *et al.* (1993) o MTA foi desenvolvido para ser utilizado principalmente, após a realização de cirurgias paraendodônticas e em casos de perfurações radiculares iatrogênicas, reabsorções internas, apicificação, capeamento pulpar e pulpotomias.

TORABINEJAD *et al.* (1995a) estudou o MTA como material para retrobturação em dentes de cães, comparando-o ao amálgama de prata. A resposta tecidual perirradicular avaliada histologicamente por um período de 2, 5, 10 e 18 semanas após a cirurgia perirradicular, observou-se, estatisticamente que o MTA mostrou menor inflamação e cápsulas fibrosas adjacentes ao MTA, constatou-se também presença de cimento ao redor da superfície da retrobturação.

No que concerne ao efeito antimicrobiano do MTA, TORABINEJAD *et al.* (1995b) verificaram sua ação contra as bactérias facultativas. *S. falcalis*, *S. mitis*, *S. mutuans*, *S. salivarius*, *lactobacilus sp*, *S. aureus*, *S. epidermites*, *Bacilus subtilis* e *Escherichia coli B* e sete anaeróbicas estritas *Prenotellas (Bacteróides) Melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum*, que freqüentemente infectam os canais radiculares. Após o crescimento dessas bactérias em meio sólido, os MTA experimentais foram colocados sobre esses meios. Constatou-se que o agregado tem efeito antibacteriano sobre algumas bactérias facultativas e nenhum efeito sobre as bactérias anaeróbicas estritas.

SOARES (1996) avaliando, histologicamente, a resposta pulpar do MTA comparado ao hidróxido de cálcio, em dentes de cães submetidos à pulpectomia, concluiu que a formação de barreira de tecido duro ocorreu em 91,66% dos dentes tratados com Hidróxido de Cálcio e em 96,43% dos casos em que foi utilizado o MTA (casos sem contaminação).

TORABINEJAD *et al.* (1997) avaliaram a resposta tecidual da região periapical subjacente ao material retrobturador, utilizando o MTA e o Amálgama em dentes incisivos superiores de macacos. Retalhos mucoperiostal foram realizados e as aberturas ósseas realizadas com brocas,

assim como o preparo da cavidade no terço apical dos dentes. As cavidades foram preenchidas com o MTA e Amálgama. Após cinco meses, a resposta tecidual foi avaliada adjacente ao ápice que continham o MTA. Apresentaram, também, camadas de cimentos sobre a obturação. As cavidades que continham o Amálgama mostraram inflamação ao redor da região perirradicular e ausência de cimento.

BARBOSA *et al.* (1997) comparou o Hidróxido de Cálcio com a clorexidina e o paramonoclorofenol canforado quanto ao efeito antibacteriano. Neste utilizaram a difusão em Agar para avaliar a atividade inibitória destes medicamentos sobre bactérias achadas ao interior do canal radicular. Não houve diferença estatisticamente significante na avaliação dos medicamentos testados. No entanto o paramonoclorofenol canforado mostrou maior zona de inibição frente às colônias de bactérias estudadas.

A sua vez, FISCHER *et al.* (1998) determinaram o tempo necessário para a bactéria *Serratia marcescens* penetrar em uma espessura de 3 mm dos seguintes materiais: Amálgama sem zinco, IRM, Super-EBA e o MTA, quando utilizado com material retrobturador. Foram utilizados 56 dentes uniradiculares humanos extraídos. Os dias requeridos para a penetração *S. marcescens* foram no Amálgama sem zinco começou a penetrar em 10 a 63 dias, IRM em 28 a 91 dias; Super-EBA, em 42 a 101 dias. No MTA não houve penetração bacteriana até 49º dia.

SHABAHANG *et al.* (1999) fizeram um estudo em raízes imaturas, a fim de comparar a indução de formação de tecido duro usando a proteína osteogênica-1, Hidróxido de Cálcio e o MTA em dentes de cães. O grau de formação de tecido duro foi analisado e a quantidade de inflamação avaliada através de estudo histomorfológico.

Comparando algumas propriedades do MTA com as do Hidróxido de Cálcio, observa-se algumas similaridades entre elas, principalmente com respeito a disposição de novo tecido duro, com o propósito de procurar desvendar o mecanismo de ação do MTA, até então desconhecido, HOLLAND *et al.* (1999) desenvolveram um estudo conjuntivo de ratos implantado tubos de dentina preenchidos com o MTA ou Hidróxido de Cálcio. Com avaliações à luz da microscopia

polarizada e reações histoquímicas, esse experimento demonstrou que os resultados obtidos com Hidróxido de Cálcio foram iguais aos obtidos com o MTA.

HOLLAND *et al.* (1999) trabalhando com os dentes de cães, fizeram um estudo histopatológico, comparando o MTA com os cimentos OZE consistente, IRM e Super-EBA. Os resultados, 180 dias pós-operatórios, demonstraram que o único material que exibiu tecido tipo cementóide, em íntimo contato com o material retrobturador foi o MTA

TORABINEJAD & CHIVIAN (1999) fizeram um estudo experimental com o material MTA, uma vez que este material tem apresentado, *in vitro*, ser um material que previne a microinfiltração, é biocompatível, e promove a regeneração dos tecidos originais quando colocado em íntimo contato com a polpa dental ou tecidos perirradiculares.

RIBEIRO *et al.* (2001) avaliaram o comportamento clínico e os aspectos radiográficos do MTA em procedimento cirúrgico paredodônticos, foram selecionados treze dentes portadores de lesões periapicais crônicas refratárias ao tratamento endodôntico convencional. Os espécimes foram submetidos à apicetomia, retropreparados por meio de pontas ultra-sônicas (Enac) e retrobturados com MTA. Os dentes foram submetidos, periodicamente, a análise clínica e radiográfica. No final do período de um ano preservando, puderam ser observados, sinais clínicos e radiográficos de reparação tecidual em todos os espécimes. Em função dos resultados obtidos, o MTA parece apresentar-se viável como material retrobturador nos procedimentos cirúrgicos relacionados com dentes portadores de infecções periapicais persistentes pós-terapia endodôntica.

## **2.4 Proteínas Morfogenéticas do Osso**

A matriz colagenosa do osso é rica em fatores de crescimento, incorporados a ela durante o processo de formação óssea. Vários estudos têm-se direcionado aos fatores de crescimento derivados do osso, principalmente a um grupo de proteínas com potencial de indução óssea, as proteínas morfogenéticas do osso (*bone morphogenetic proteins* – **BMPs**). As BMPs, liberadas da matriz durante a reabsorção óssea osteoclástica, induzem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, presentes na região medular e nos tecidos moles adjacentes, em

osteoblastos, estimulando desta forma a formação de osso nos processos de remodelação e reparo (MANOLAGAS & JILKA, 1995).

Os experimentos para identificação e purificação das BMPs começaram quando URIST (1965) induziu neoformação de cartilagem e osso em sítios ectópicos, implantando fragmentos de osso desmineralizado no interior de tecidos muscular e subcutâneo de camundongos. Sabe-se, hoje, que o potencial osteogênico e dentinogênico das matrizes óssea e dentinária deve-se à presença de BMPs, que são sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e odontoblastos. Na última década, por meio de técnicas moleculares, evidenciou-se uma família de BMPs estruturalmente relacionadas (são 9 proteínas com capacidade de indução óssea ectópica), encontradas em humanos e em diferentes espécies animais (GONÇALVES *et al.*, 1998).

A ação das BMPs sobre células mesenquimais indiferenciadas consiste de quimiotaxia (promovendo migração de células mesenquimais indiferenciadas e monócitos para local do implante), estímulo à proliferação celular e diferenciação em condroblastos e osteoblastos, à síntese dos componentes da matriz, à maturação, mineralização e finalmente remodelação, resultado na formação de um ossículo (KIRKER-HEAD, 1995).

O uso de BMPs para a indução da osteogênese em procedimentos reconstrotores representa uma alternativa para os enxertos ósseos. No entanto, a dificuldade para sua utilização clínica está no fato de que, por serem solúveis em água e rapidamente difusíveis, elas devem estar associadas a um carregador. Um pretense carregador de BMPs deve ser biocompatível e insolúvel no meio tissular, deve ser imunologicamente inerte e proteger as BMPs contra atividades proteolíticas, deve ser biodegradável num ritmo compatível ao da neoformação óssea, mecanicamente estável e permitir a liberação lenta das BMPs por meio de degradação biológica controlada (GONÇALVES *et al.*, 1998).

Numerosas pesquisas têm-se voltado para o desenvolvimento de substratos carreadores que permitem o uso clínico de BMPs com atividade osteoindutora intacta. Entre os biomateriais testados estão os vários componentes da matriz extracelular, isolados ou combinados (colágeno,

fibronectina, glicosaminoglicano) e também materiais sintéticos como a hidroxiapatita e o fosfato de cálcio (RUTHERFORD *et al.*, 1994).

BEKKE & TOTH (1998) listaram os requisitos necessários para que substâncias osteoindutivas possam substituir enxertos ósseos:

- biocompatibilidade;
- classificação química (chemotaxis);
- qualidade da arquitetura do dispositivo;
- osteoindução;
- angiogênese e vascularização;
- liberação e controle da proteína osteoindutiva.

As BMPs fazem parte de uma superfamília de fatores de crescimento: os TGF $\beta$ . Possuem de baixa massa molar, são solúveis em água e se difundem facilmente em fluidos corpóreos (RENGACHARY, 2002). Entretanto ao contrário de outros fatores de crescimento as proteínas morfogenéticas exibem um papel mais avançado e sofisticado, pois atuam em uma vasta gama de atividades celulares que incluem crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular. São encontradas particularmente em ossos, plaquetas e cartilagens por exemplo (LIEBERMAN *et al.*, 2002).

Tipo e funções das BMPs (adaptada de RENGACHARY, 2002):

BMP-2	Osteoindutiva, apoptose, diferenciação de osteoblastos
BMP-3	Inibe osteogênese, é a mais abundante
BMP-4	Osteoindutiva, desenvolvimento do pulmão e olhos
BMP-5	Condrogênese
BMP-6	Condrogênese, diferenciação de osteoblastos
BMP-7	Osteoindutiva, desenvolvimento do fígado e olhos
BMP-8	Osteoindutiva
BMP-9	Hepatogênese, sistema nervoso
BMP-10	Desenvolvimento cardíaco

BMP-11	Morfogênese do sistema nervoso, órgãos de origem mesodérmica
BMP-12	Induz formação de tendões e ilíacos
BMP-13	Induz formação de tendões e ligamentos
BMP-14	Condrogênese
BMP-15	Modifica atividade de hormônio folículo estimulante

## 2.5 Fatores de crescimento

São substâncias que estimulam a proliferação celular resultando em maior atividade regenerativa. Estruturalmente são polipeptídeos de baixo peso molecular produzidos fisiologicamente por osteoblastos em pequenas concentrações e armazenados na matriz óssea (SOLHEIN, 1998).

Segundo TRIPPEL *et al.* (1996), um fator de crescimento pode ter múltiplos efeitos em vários tipos de células induzindo com isto uma gama de funções celulares em diferentes tecidos.

Três tipos básicos de ações dos fatores de crescimento são possíveis segundo LIEBERMAN *et al.* (2002):

- **Autógena:** fatores de crescimento que atuam em células de mesma origem ou de mesmo tipo;
- **Parácrina:** fatores de crescimento que atuam em células adjacentes ou vizinhas de diferente tipo;
- **Endócrina:** fatores de crescimento que atuam em células de diferente linhagem em um local anatomicamente remoto.

Os fatores de crescimento são liberados no local da doença por injeção do veículo com a substância ou via implante (WOZNEY, 2001). A primeira dá pela encapsulação ou imobilização do fator de crescimento em veículos específicos com as micro e nanoesferas que podem ser simplesmente injetadas no local da regeneração (BURKE, 1998). Podem ainda ser incorporados em arcabouços (*scaffolds*) onde várias maneiras e vários tipos de substrato são possíveis. Neste caso a proteína pode ser diretamente acoplada ou imobilizada no artefato (MALAFAYA *et al.*, 2002).

O arcabouço ocupa o espaço do defeito ósseo impedindo a migração de células epiteliais e conjuntivas permitindo assim que células osteoblásticas ou odontoblásticas tenham acesso ao tecido em regeneração. Simultaneamente à cura ou a neoformação, o arcabouço tem sua estrutura degradada. Além disto os *scaffolds* atuam como veículos para fármacos indutores de regeneração tecidual. Com isto estes dispositivos tendem a substituir outras formas clássicas de formação de tecido, como os enxertos autógenos. A capacidade destas substâncias de produzir osso ectopicamente em grande quantidade além de acelerar o processo de cicatrização, as BMPs tem grande potencial de utilização, como em aplicações ortopédicas (espinha bífida, cicatrização de fraturas) e odontológicas (CAMPOS Jr., 2004).

Estudos realizados por KOKUBO *et al.* (2003), utilizaram um arcabouço de PLGA impregnado com rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea recombinante humana). No estudo, dispositivos foram obtidos com diferentes concentrações da proteína (0,1 0,4 e 1,0 mg/cm<sup>3</sup>) mostrando-se eficientes na indução de tecido ósseo em locais ectópicos e efetivos no reparo de ulna de coelhos.

## **2.6 Mecanismo de ação das BMPs**

Quando implantadas as BMPs ligam-se a receptores celulares específicos. Com a ligação BMP/receptor estabilizada é gerado um sinal intracelular que ativa o sistema de transdução produzindo uma resposta biológica. Os receptores possuem domínios extra e intracelulares, onde os primeiros ligam-se as proteínas (ligantes) e os intracelulares por que vez ligam-se aos sistemas de sinais de transdução (LIEBERMAN *et al.*, 2002).

## **2.7 Biomateriais Poliméricos**

DUAILIBI *et al.* (2004) demonstraram o sucesso da engenharia tecidual da estrutura dental madura desde suspensão simples de células até cultivos de células tronco de dentes de ratos, que células dentarias de ratos (roedores em geral) são ótimas para pesquisas, e que os resultados da bioengenharia de dentes de ratos desenvolveram realmente em 12 semanas. Também

demonstraram que cadeias de PLGA e PLLA (Biomateriais Poliméricos) apresentam crescimento de estrutura dental madura.

A definição adotada em 1982 na NIH Consensus Development Conference é a de que biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, de natureza natural ou sintética, que pode ser usado por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema, para aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Até onde alcançam as considerações da engenharia, existe uma quantidade de materiais que pode ser utilizada para desenvolver e/ou fabricar um dispositivo implantável. Mas, os requisitos médicos são mais constringentes, porque o dispositivo implantável, enquanto restaura a função comprometida, deve também garantir que não exerça, a longo ou médio prazo, qualquer distúrbio ao corpo do paciente. Portanto, a escolha do material é crítica. Obter a biocompatibilidade representa uma tarefa interdisciplinar, que envolve pesquisadores de várias áreas (SCHALDACH, 2000).

Um outro fator que deve ser levado em conta é o limite de tolerância que o tecido apresenta no que se refere à remoção dos produtos de degradação, já que se for ultrapassado esse limite, pode ocorrer inflamações no tecido, diminuição do tempo de vida útil do dispositivo, reabsorção óssea ou mesmo necrose do tecido. Dentre os biomateriais, os mais usados são os metálicos, cerâmicos e polímeros. Os dispositivos metálicos, que são mais rígidos do que o osso são frequentemente usados na fixação interna de fraturas. As vantagens deste tipo de implante são basicamente: um curto período de recuperação e exata reposição do osso fraturado (PISTNER *et al.*, 1992).

Entretanto suas desvantagens são inúmeras: possível *stress* do osso e relativa perda de massa óssea, devido à ausência de um funcionamento normal de carga no local do implante; reações alérgicas contra os diferentes componentes do metal (STEINHAUSER, 1968a, STEINHAUSER, 1968b; AKESON *et al.*, 1975; BRADLEY *et al.*, 1979); problemas de corrosão (COHEN & WULF, 1972; THULL & SCHALDACH, 1975; MEACHIM & WILLIAMS, 1981; MEACHIM & PEDLEY, 1981); sensibilização (BLACK, 1986; WEILER *et al.*, 1996), uso de

equipamentos de Raios-X e em casos de dispositivos temporários existe, muitas vezes, a necessidade de uma segunda cirurgia para a remoção do implante, o que representa, sem dúvida, um incômodo ao paciente e encarecimento do seu tratamento.

Estes problemas expostos acima praticamente deixam de existir quando nos referimos aos implantes de polímeros bioreabsorvíveis, que vem a ser implantes que cumprem somente uma função temporária no corpo, sendo que depois do tecido ou órgão ter sido regenerado, eles degradam no ambiente em que se encontram na forma de compostos atóxicos, que por sua vez são eliminados pelo organismo através de uma absorção ou excreção.

Essa biodegradabilidade vem acompanhada de outras vantagens, como por exemplo, a transferência gradual de carga do implante para o osso em recuperação, o que não é possível no caso dos implantes metálicos, já neste tipo a transferência de carga é realizada pelo material metálico, o que pode acarretar uma re-fratura no mesmo local onde houve a remoção do material implantado (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

Os polímeros bioreabsorvíveis podem ser naturais ou sintéticos, como exemplo de biomateriais poliméricos podemos citar os policarbonatos, poliuretanos, polianidros e os poliésteres alifáticos, sendo que os sintéticos, em geral, oferecem maiores vantagens sobre os materiais naturais, já que podem ser elaborados de maneira a propiciar uma variedade muito grande em termos de propriedades, quando comparados aos de fontes naturais (BARROWS, 1986).

Os fatores que afetam o desempenho dos polímeros bioreabsorvíveis são aqueles já bem conhecidos no ambiente científico. São estes: seleção do monômero, seleção do iniciador, condições do processo e a presença de aditivos (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Estes fatores, por sua vez, influenciam a hidrofiliabilidade do polímero, a cristalinidade, a temperatura de transição vítrea, a temperatura de fusão, massa molar, grupos finais, seqüência de distribuição (ao acaso X blocos) e a presença de resíduos de monômeros ou aditivos (ODIAN, 1981).

De maneira geral, o critério na seleção de um polímero para uso como biomaterial envolve dois fatores: as propriedades mecânicas e o tempo de degradação em função das necessidades da aplicação (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Um polímero ideal para uso como biomaterial deve apresentar as seguintes características:

- não provocar respostas tóxicas/inflamatórias no tecido no qual foi implantado;
- ser metabolizado pelo organismo após ter cumprido sua proposta de recuperação, sem deixar traços;
- ser facilmente processado na form de um produto final;
- ser facilmente esterelizável.

Dentre os polímeros bioreabsorvíveis o poli (ácido láctico) e o poli (ácido glicólico) estão entre os raros usados clinicamente (DOMB *et al.*, 1994; LEWIS, 1990). Este interesse por estes tipos de polímeros vem do fato deles já terem aprovação para um certo número de aplicações clínicas pelo *U.S. Food and Drug Administration*, órgão responsável pela liberação de alimentos e drogas nos EUA (ENINK, 1987).

O campo de aplicações destes polímeros é vasto e já data de um período relativamente longo, sendo estes materiais empregados como dispositivos em: implantes (KULKARNI *et al.*, 1996), materiais de suturas (CUTRIGHT *et al.*, 1971), próteses, materiais de reparação ortopédica (LENSLAG *et al.*, 1987; ROZEMA *et al.*, 1991), pinos intramedulares (MANMINEM *et al.*, 1992) na área odontológica (ZISLIS *et al.*, 1989; IKADA, 1989) e em liberação controlada de drogas (DOMB *et al.*, 1994).

O poli (L-Lactide), PLLA, é um polímero semicristalino com ponto de fusão ao redor de 180°C e uma cristalinidade por volta de 70%, tornando-o dentre os poli (lactides), o que possui a menor taxa de degradação. As propriedades mecânicas apresentadas por este polímero são muito boas, já que apresentam uma boa resistência à tração e um alto módulo de Young (VERT *et al.*, 1995).

Enquanto que para PLLA o tempo de reabsorção do material pelo organismo pode levar mais de 36 meses, para o copolímero esse tempo pode ser reduzido para aproximadamente 6

meses, dependendo da proporção existente entre os meros. Essa capacidade de controlar o tempo de degradação no organismo é, sem dúvida, notável, o que justifica a grande quantidade de pesquisas que vem sendo feitas com esse material (PLGA).

A copolimerização é m processo que resulta numa grande versatilidade de propriedades e desempenho que se pode obter dos materiais. Copolímeros são polímeros que apresentam em sua estrutura dois ou mais tipos de meros. Para um copolímero a porcentagem dos componentes (comonomeros) bem como o tipo de distribuição dos meros nas macromoléculas são características muito importantes, as quais interferem nas propriedades. Essa diferenciação é ainda mais acentuada quando comparamos o copolímero PLGA com o homopolímero PLLA.

As características de bioabsorção, propriedades mecânicas e biocompatibilidade dos polímeros absorvíveis, principalmente do PLLA, têm colocado-os como fortes candidatos para substituição dos dispositivos metálicos, pois torna uma segunda cirurgia para remoção dos mesmos após a recuperação do osso, desnecessária. Isso diminui custos hospitalares, riscos de complicações cirúrgicas e o tempo de recuperação do paciente.

O desempenho de um dispositivo ortopédico depende de uma série de fatores. Primeiro o dispositivo deve ter o projeto próprio com resistência adequada. Deve ser manufaturado sobre controle suficiente de forma a não incorporar defeitos no implante. A seleção do material é importante e deve garantir biocompatibilidade e resistência a corrosão durante o tempo necessário para recuperação do osso.

O uso de materiais absorvíveis é baseado no seguinte conceito: quando a resistência do local fraturado aumenta devido ao processo natural de recuperação a absorção começa a ocorrer. O implante suporta uma elevada fração da carga transmitida ao osso durante os primeiros estágios do processo de recuperação. A redução gradual da resistência do implante, devido à absorção, transfere uma percentagem crescente da carga ao osso em recuperação. Como resultado, o local da fratura recuperada deve desenvolver uma resistência comparável àquela do osso original. De forma ideal esses processos devem ocorrer de maneira simultânea.

LEENSLAG *et al.* (1987) sintetizaram poli (L-láctico) com alta massa molecular (massa molar média =  $1 \times 10^5$ ), à temperatura de 100-120°C, e estudaram suas propriedades mecânicas e morfológicas. Placas e parafusos deste material foram utilizados no tratamento de fraturas mandibular de cães e ovelhas. A cura do osso foi excelente e procedeu-se sem formação de calos ou sinal de inflamações. Além disso, acompanhou-se o processo de degradação durante a cura. As placas foram moldadas por compressão do material ( $T = 200^\circ\text{C}$  e  $P = 18 \times 10^3 \text{ Kg}$ ). Após 11 semanas de implantação verifica-se a degradação, a qual entre outros fatores foi atribuída a microporosidade do implante.

MANNIMEN *et al.* (1992) realizaram um estudo comparando propriedades mecânicas de parafusos de PLLA reforçado com fibras, implantando parafusos de metal e de PLLA para fixação de ossos em ovelhas. As dimensões para parafusos foram de 50mm de comprimento, 3,2mm na parte central e 4,5mm de diâmetro das linhas externas. Os parafusos de PLLA foram moldados por compressão nas mesmas dimensões. As radiografias entre 6 a 12 semanas mostraram a união do osso sem sinais de inflamações e com enfraquecimento do osso para o caso do parafuso metálico enquanto com parafusos de PLLA houve um aumento da resistência. As forças no osso agem principalmente na direção do parafuso, a rigidez do parafuso metálico o qual passa através do osso carrega parte dessas forças. Os estudos indicam que o uso de parafusos de PLLA, ao invés de metálico, na fixação de osso em ovelhas evita a proteção ao *stress* e enfraquecimento do osso. Entretanto, parafusos de PLLA não são recomendados para uso sem suporte externo em regiões de alto esforço mecânico. Os autores comentam a dificuldade em se comparar os dispositivos devido a incompletas informações moleculares, estruturais e mecânicas.

BÖSTMAN *et al.* (1992a) verificaram a migração de partículas poliméricas durante a degradação de implantes poli (ácido glicólico) em fêmur de coelho, utilizando parafusos e pinos. Os resultados mostraram que a partir de 6 semanas de implante ocorreu a união do osso e os orifícios intra-articulares dos canais do implante foram preenchidos com um tecido fibro-conectivo e fragmentos do polímero migraram para o tecido hospedeiro a uma distância de aproximadamente 0,85 mm a partir do implante original. Pouco mais tarde esses autores (BÖSTMAN *et al.*, 1992b) realizaram um estudo mais detalhado através de dados histológicos, histomorfométricos e verificaram os primeiros sinais de invasão do tecido no implante após 40

dias. Após 7 dias verificaram a formação de uma camada de fibroblastos circundando o implante. Analisaram a variação do volume do osso e contagem de células.

Além de pinos e parafusos, outra possibilidade é a utilização de haste implantadas na parte intramedular do osso. KUMTA *et al.* (1992) estudaram a degradação de PLGA e copolímeros PLGA-PLLA após implantação intramedular e subcutânea em coelhos. Após 2 semanas, o material perdeu 73% da resistência no implante intramedular e 64% no subcutâneo. Implante de PLGA foram comparados com hastes Kirschner para fixação de pequenas fraturas intra-articulares de mão. Em seis meses não foram verificadas nenhuma diferença entre os 2 grupos, nem reação alérgica.

Além de testes em animais, trabalhos recentes mostram a viabilidade de aplicação para fixação de fraturas em seres humanos, com resultados satisfatórios. (NAKAMURA *et al.*, 1993; PIHLAJAMÄKI *et al.*, 1992).

Segundo BÖSTMAN (1991) um estudo envolvendo 516 pacientes nos quais foram implantados com pinos de PLGA ou PLGA-PLLA, em uma clínica de trauma em Helsinki, Finlândia, revelou as seguintes falhas dos implantes poliméricos que necessitaram recuperação:

- falha na fixação da fratura – 1,2%
- infecção bacteriana – 1,7%
- inflamação não infecciosa após cerca de 20 semanas de implante – 7,9%

BÖSTMAN (1991) conclui que esta taxa de cerca de 8% de complicação nos implantes deve ser sempre analisada comparando-a com a necessidade de se executar uma segunda operação no caso implantes metálicos.

Outro tipo de material utilizado para fixação de fraturas são os materiais reforçados. Consistem de materiais absorvíveis, por ex: PLGA/PLLA reforçado com aproximadamente 60% de fibras do próprio polímero (TÖRMALA *et al.*, 1987). VAINIOMPAA *et al.* (1987) estudaram o poli glicólico (PLGA) reforçado com fibras e verificaram alta resistência mecânica, como

conseqüência da adesão entre as fibras e a matriz. Outra possibilidade consiste em materiais poliméricos reforçados com hidroxiapatita. (TÖRMALA, 1991).

Além dos dispositivos ortopédicos, os polímeros absorvíveis podem ser incluídos em outra linha de pesquisa relacionada: o estudo de proteínas morfogenéticas induzindo crescimento ósseo. Nesse caso, o PLLA pode ser útil como um composto com polietileno glicol (PEG) ou hidroxiapatita funcionando como um carregador para proteína. Proteínas morfogenéticas são capazes de induzir a diferenciação de células tipo mesênquima na cartilagem e no osso através do processo de ossificação endocondral (MIYAMOTO *et al.*, 1993).

Também sob a forma de membranas, os polímeros são usados em tecidos ósseos. Regeneração tecidual guiada (RTG), é uma técnica usada para o tratamento de defeitos ósseos em regiões nas quais o osso está em íntimo contato com um tecido mole. Consiste em separar através de uma membrana absorvível ou não, os dois tipos de tecido, impedindo que haja invasão de regiões que devem ser preenchidas com tecido ósseo em recuperação pelo tecido mole (ZELLIN *et al.*, 1995).

ROBERT *et al.* (1993) avaliaram a biocompatibilidade e degradação de membranas de PLLA com alta massa molecular e com adição de até 30% em peso de oligômeros de PLLA obtidas com o intuito de servirem como implantes periodontais para RTG. Eles implantaram as membranas sob a derme no abdômen de ratos. Os resultados obtidos mostraram que essas membranas são muito bem toleradas pelo tecido. Quanto maior a concentração de polímero com baixa massa molecular, maior a taxa de degradação. A absorção dos implantes foi completa após 60 dias. As membranas foram progressivamente substituídas por tecido conjuntivo fibroso.

ZELLIN *et al.* (1995) testou 10 diferentes tipos de membranas absorvíveis e não absorvíveis, indicadas para RTG periodontal. Furos passantes de 5 mm de diâmetro nas mandíbulas de ratos adultos foram realizados e cobertos com as membranas. As análises foram efetuadas após 6 semanas do implante. O estudo mostrou que diferentes membranas variam fortemente em termos de eficácia em promover a reconstrução óssea, mesmo sendo

quimicamente semelhantes. Além disso, membranas desenhadas especificamente para aplicações em periodontia podem não ser adequadas para recuperação de regiões ósseas.

PIATTELLI *et al.* (1996) avaliou a possibilidade de regeneração óssea utilizando novas membranas absorvíveis e não absorvíveis comercialmente disponíveis (Guidor Matrix Barrier® e Gore-Tex®) indicadas a princípio para aplicações em periodontia. Os ensaios foram realizados através de implantes em tíbias de ratos. Concluíram que a degradação das membranas não interferiu na recuperação dos ossos.

PINEDA *et al.* (1996) implantaram membranas de PLLA com poros de vários tamanhos em 15 coelhos para cobrir um largo defeito ósseo de 10mm criado propositadamente. Radiografias pós-implante revelaram um hematoma na região do defeito que foi desaparecendo à medida que a formação de um novo tecido ósseo foi ocorrendo, independentemente do tipo de membrana utilizada. Os autores concluíram que a função primária das membranas usadas para cobrir defeitos ósseos é a de preservar componentes osteogênicos presentes no espaço sob a membrana e garantir o crescimento das células na cavidade medular.

LAM *et al.* (1994) realizaram um estudo abrangente e detalhado *in vitro* e *in vivo* analisando a degradação de membranas porosas e não porosas de poli (L-ácido láctico) que poderiam ser utilizadas tanto em RTG quanto em suporte para cultura de células. Analisaram as mudanças na massa molecular, na polidispersividade, na temperatura de fusão, na energia de fusão, na resistência a tração, no módulo de elasticidade, na massa e na área superficial das membranas sob degradação. Estes autores constataram que as membranas porosas apresentam os maiores valores de massa molecular e temperatura de fusão e degradam mais rapidamente em relação às membranas não porosas. No entanto, as membranas não porosas apresentaram os maiores valores de energia de fusão, indicando a presença de moléculas pequenas formando domínios cristalinos mais facilmente.

SILVA *et al.* (1985) utilizou tri-etil-citrato para preparar pequenos tubos flexíveis de PLLA absorvíveis para RTG de nervos rompidos em ratos adultos. Os resultados indicaram um significativo aumento de células em função do tempo quando comparado com o grupo de controle.

## 2.8 Liberação Controlada de Medicamentos

Por algumas décadas partes do corpo tem sido substituídas ou reparadas com materiais naturais ou materiais sintéticos previamente selecionados. Dispositivos biomédicos têm sido desenvolvidos atualmente por engenheiros, químicos e bioquímicos pela modificação da composição e conseqüentemente das propriedades de materiais poliméricos.

Diante deste quadro, companhias farmacêuticas e pesquisadores de medicamentos têm muitas razões para acreditar no crescente interesse do desenvolvimento de drogas poliméricas.

Nesta última década há uma crescente atenção para o desenvolvimento de dispositivos para a liberação controlada de drogas, pesticidas, nutrientes, produtos agrícolas e fragrâncias. (LANGER, 1989). Entretanto, na área farmacêutica quase todos os sistemas que haviam sido desenvolvidos até 1976 eram incapazes de promover a liberação gradual de drogas com peso molecular ponderal médio acima de 600 Daltons ( $M_w > 600$ ). Até meados da década de 70 sistemas efetivos para a liberação controlada de macromoléculas não podiam ser desenvolvidos (KOST, 1988).

Contudo segundo LANGER & FOLKMAN (1976) citado por DUMITRIU & DUMITRIU (1993) após árduos esforços, foram desenvolvidos sistemas de liberação controlada que permitiam a liberação de agentes bioativos com massa molar de  $2 \cdot 10^6$  Daltons.

O uso do termo Sistemas Poliméricos (“*Polymeric System*”) significando controle de drogas tem sido chamado **Tecnologia de Liberação Controlada**. Entretanto autores como LANGER & PEPPAS (1981), definem que o termo Liberação Controlada como sendo a duração da ação em liberar o medicamento em um ou mais dias.

O termo “*polymeric drugs*” inclui polímeros que contém um medicamento ou uma unidade quimioterapêutica como parte de sua estrutura. Para isto o polímero deve possuir unidades ativas como grupos pendentes ou grupos terminais na cadeia polimérica. Podem ainda ser encontrados polímeros que atuam apenas como veículos para liberação de medicamentos, sendo comumente

designados como “*polymeric drug carries*” e a escolha do material está diretamente ligada a sua inatividade biológica.

Entretanto segundo DUMITRIU *et al.* (1989), para que o material polimérico possa ser escolhido, este deve possuir propriedades específicas que são listadas abaixo por ordem de importância:

- o polímero deve ser solúvel e facilmente sintetizável sendo que sua massa molar deve ser finita e com estreita distribuição;
- o polímero deve promover sítios onde a droga possa ser acoplada ou então que promova ligações entre ele e a droga. Estes sítios e ligações devem possuir estabilidade controlada;
- o polímero deve ser diretamente predestinado ao tipo de tecido pela suas características físico-químicas ou pela adição de aditivos específicos;
- deve ser compatível com o meio biológico, ou seja, não tóxico e não antigênico;
- deve ser biorreabsorvível ou ser eliminado do organismo após o cumprimento da sua função.

A liberação controlada de drogas oferece inúmeras vantagens em relação ao sistema convencional de dosagem de medicamentos. Entre elas pode-se citar a redução da toxicidade, onde a droga é mantida a um nível terapêuticamente desejável no plasma. Observa-se também uma maior conveniência para os pacientes, uma vez que os efeitos colaterais gerados pelo sistema convencional de administração da droga podem ser minimizados pelas pequenas quantidades de medicamento que o sistema de liberação controlada aplica. Do ponto de vista econômico os sistemas de liberação controlada de medicamentos são potencialmente mais baratos e geram um menor desperdício do medicamento, maior eficiência do processo (LANGER; PEPPAS, 1981), permitindo que tratamentos que não eram possíveis tornassem rotineiros (KUMAR, 2000).

Há vários meios de se promover a liberação controlada de drogas, mas duas formas vêm se destacando pelas suas propriedades diferenciadas: as nano e as micropartículas. Durante estas últimas duas décadas, diversos materiais têm sido utilizados para este fim, entre eles as poliamidas, poliuretanos e poliacrilamidas (JAIN, 2000), no entanto são os poliésteres alifáticos PLLA, PLGA e especialmente o PLGA copolímero (ácido láctico-glicólico) que têm despertado

um enorme interesse para este tipo de aplicação devido as suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade (JALIL e NIXON, 1990).

O PLLA homopolímero (estrutura estereoisomérica do ácido láctico), também tem sido bastante utilizado com veiculo para liberação de fármacos. Entretanto este material apresenta elevado tempo de degradação (ZOPPI *et al.*, 2001). Uma alternativa para alterar este longo tempo de degradação tem sido obter blendas do PLLA com outro polímero que pode ser biodegradável ou não. Além de alterar o tempo de degradação a blendas geram uma melhora nas propriedades e mecânicas do composto final (NIJENHUIS *et al.*, 1996).

## 2.9 Obtenção das microesferas

Segundo KUMAR (2000), microesferas são a rigor partículas esféricas ocas ao passo que microcápsulas são definidas como partículas de tamanho entre 50 nm a 2 mm contendo uma substância como núcleo. Entretanto nota-se que a designação de microesferas e microcápsulas são utilizadas como sinônimos. Partículas esféricas e esferas também são utilizadas, entretanto a morfologia rígida e o maior tamanho nesta definição estão implícitos.

Segundo JALIL & NIXON (1990) um grande numero de técnicas têm sido desenvolvidas para a obtenção das microesferas. Sendo assim para a escolha da técnica deve-se observar:

- polímero a ser utilizado;
- droga a ser encapsulada;
- duração do tratamento;
- aplicação das microesferas no paciente (JALIL e NIXON, 1990; WU, 1995b; LEWIS, 1990).

A técnica escolhida deve assegurar a estabilidade e a atividade biológica da droga durante e ao final do processo de encapsulamento. Ao final deste processo as microesferas deve possuir tamanho inferior a 250  $\mu\text{m}$  (idealmente este valor deve estar abaixo de 125  $\mu\text{m}$ ) e não devem exibir agregados ou aderência. Além disto a qualidade das microesferas bem como o perfil da liberação do principio ativo devem ser reprodutíveis (JAIN, 2000).

## 2.10 Proteína Óssea Morfogénica Como Agente Capeador

NILSSON (1986) utilizou BMP em cachorros e relataram que quando empregada sem qualquer tipo de carreador, uma grande quantidade de BMP é necessária para uma adequada formação óssea ser alcançada.

BESSHO (1989) mostrou que a BMP purificada apresenta alta solubilidade *in vivo* quando utilizada sem nenhum condutor, dispersando-se imediatamente após sua colocação.

LYONS (1990) mostrou que uma família de proteínas (BMP) apresentam propriedades indutora, interferindo nas funções de vários tipos celulares. Todas parecem capazes de induzir a reparação tecidual, porém cada uma apresenta uma função específica durante a embriogênese.

NAKASHIMA (1990) fez estudos *in vivo*, utilizando a BMP no tratamento conservador da polpa, e observou que esta proteína pode ter um efeito mitogênico nas células mesenquimais, além de estimular a formação de células semelhantes a osteodentinócitos, e este tecido resultante pode ter um papel na diferenciação de osteoblastos. Já *in vitro*, esta proteína não foi capaz de induzir a proliferação de células mesenquimais da polpa, no entanto, estimulou a diferenciação de células pulpares em odontoblastos. Observou ainda que a permanência de inflamação pulpar no período de até uma semana após o emprego da BMP como agente capeador e encontrou formação de ponte dentinária oito semanas após capeamento pulpar direto com BMP.

WANG (1990) estudou a rhBMP-2 produzidas de células mamárias obtidas dos ovários de hamsters chineses, e inoculo-as com gene contendo o código da BMP-2 humana demonstrando resultados positivos na formação tecidual.

TORIUMI (1991) destacou as propriedades para que um carregador seja ideal, dentre elas temos a biocompatibilidade, o caráter biodegradável e sua formulação. Relatou que os polímeros vão sendo totalmente reabsorvidos à medida que são substituídos por tecido natural.

BESSHO (1991) observou que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a BMP de origem óssea estimula a atividade da fosfatase alcalina no processo de diferenciação e de regeneração tecidual. As BMPs podem ser encontradas na cortical óssea e na matriz dentinária, e a expressão de genes destas proteínas foi observada em odontoblastos.

NAKASHIMA (1992) fez estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram que a BMP estimula a atividade da fosfatase alcalina que reflete o estágio de manutenção das células pulpares, favorecendo a neoformação de dentina.

WOZNEY (1992) mostrou que a BMP também pode favorecer a formação de dentina, estimulando a diferenciação de células pulpares em odontoblastos, através da ativação da síntese da osteocalcina.

RUTHERFORD (1993) em seu estudo com animais demonstraram que, quando implantada em tecido muscular de ratos, a BMP extraída e purificada da matriz dentinária é capaz de induzir a neoformação óssea, da mesma forma que, quando a BMP de origem óssea é colocada sobre tecido pulpar exposto, há formação de dentina. Utilizaram BMP combinada com um material carreador à base de colágeno insolúvel sobre exposição mecânica da polpa de dentes de macacos e demonstraram que a mistura BMP/colágeno foi capaz de preservar a vitalidade pulpar e induzir a formação de ponte dentinária quando esta foi mantida sobre o tecido pulpar por seis semanas

VAINIO (1993) mostrou que a BMP induz formação de osso ou dentina, através da reparação tecidual interferindo em vários tipos celulares.

LIANJIA (1993) realizou estudos utilizando BMP como agente capeador e após uma semana todas as polpas capeadas apresentavam sinais de inflamação, após duas semanas, a BMP havia sido totalmente reabsorvida e o tecido pulpar estava livre de inflamação e após o período de três semanas a ponte dentinária está completa, iniciando o processo de calcificação.

NAKASHIMA (1994a) relatou que a quantidade, em espessura, de dentina formada variou de acordo com o volume de medicamento utilizado, sendo tal propriedade nunca antes atribuída a

um agente capeador pulpar. Mostrou também que a utilização de colágeno como agente capeador pulpar não demonstrou, a capacidade de induzir a formação de dentina, além de, após sua aplicação, ter sido totalmente reabsorvido.

NAKASHIMA (1994b) avaliou o efeito da BMP sobre a polpa exposta de dentes de animais evidenciando que a formação de dentina ocorre logo abaixo da área que recebeu o composto contendo a BMP, não tendo sido observado a formação de dentina na polpa radicular, sendo esta de superfície uniforme devido à qualidade da ponte dentinária.

JEPSEN (1997) mostrou que a BMP é capaz de induzir a formação de osso ou dentina, dependendo do local onde é implantada, através da reparação tecidual. Colocando-a sobre tecido pulpar exposto observaram formação de dentina, no qual apresenta um aspecto regular. Também evidenciaram a presença de infiltrado inflamatório durante o processo de formação de tecido dentinário induzido pela BMP.

NAKASHIMA (1998) relatou oito BMPs, também conhecidas como Proteínas osteogênicas, foram purificadas e clonadas, as quais são identificadas como: BMP-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, também conhecida como proteína osteogênica -1 (OP -1), 3 -8, que pode ser encontrada na literatura como proteína osteogênica -2 (OP-2). Todas as BMPs, com exceção da BMP-1, pertencem à família do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sendo que a superfamília TGF- $\beta$  é um grupo de proteínas sinalizadoras que possuem múltiplas atividades biológicas, as quais incluem o controle do crescimento e diferenciação celular, a indução embrionária e a morfogênese de uma grande quantidade de tipos celulares.

WOZNEY (1998) relatou em seu estudo que as BMPs recombinantes são freqüentemente produzidas utilizando células mamárias, sendo que a rhBMP (proteína óssea morfogenética humana recombinante) é livre de contaminação por outras proteínas e tem um risco significativamente reduzido de transmitir infecção.

LOPES & SIQUEIRA Jr. (1999) mostraram em seu estudo que a fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica que promove a liberação de fosfato inorgânico a partir de ésteres fosfóricos. Os

íons fosfato liberados podem reagir com íons cálcio provenientes dos tecidos, formando precipitados de fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatita, sobre a matriz orgânica, o que caracteriza o processo de mineralização.

## **Capítulo 3**

### **Materiais e Métodos**

#### **3.1 Obtenção das Microesferas de PLLA Contendo BMP**

As microesferas de PLLA serão obtidas pelo processo de dupla emulsão onde, uma solução de 0,25% de rh-BMP-2 e 3% Mg(OH)<sub>2</sub>, em tampão fosfato salino (PBS) foi preparada (pH=7) e adicionada a fase orgânica BMP (PLLA em solvente orgânico - DMC). O sistema foi severamente agitado com auxílio de um agitador mecânico da marca MARCONI por 30 segundos formando uma emulsão água/óleo (W/O). A esta primeira emulsão foi adicionada uma solução aquosa de PVAL 1% ainda sob forte e constante agitação. Após 30 segundos todo o conteúdo do béquer foi então vertido em solução de PVAL 0,2% formando assim a segunda. Após 1 minuto todo o conteúdo foi derramado em um béquer contendo solução aquosa de álcool isopropílico (2,5%) para a solidificação das micropartículas. Este béquer encontrava-se sob um banho com água a 20°C para a retirada lenta e gradual do solvente orgânico que se deu por evaporação através da agitação do sistema. As micropartículas foram então coletadas por filtração a vácuo, secas e estocadas em dissecador.

#### **3.2 Estudo Experimental em Coelhos**

Para a realização do estudo histológico da interação das microesferas com medicamento com os tecidos dentais de coelhos, foram utilizados dez animais da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos, de mesma linhagem, com peso médio de 3 quilogramas, do Centro de bioterismo do CCMB-PUC-SP.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Biotério do Centro de bioterismo do CCMB-PUC-SP. Neste período os coelhos foram submetidos a uma dieta com ração e água à vontade, sendo mantidos em gaiolas metálicas individualizadas, sob condições controladas de iluminação (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (21 a 25°C).

No período pré-operatório os animais receberam terapêutica profilática composta de dipirona diluída em água (500 mg/ml).

Como medicação anestésica foi administrado em cada animal um medicamento sedativo, analgésico e relaxante muscular na dosagem de 5mg/kg (Rompum®-Bayer do Brasil); após um período de 20 minutos, foi administrado um medicamento neuropilético e tranquilizante na dosagem de 0,5mg/kg (Xilasina-Anasedan®) e em seguida foi administrado o anestésico geral cloridrato de ketamina, na dosagem de 0,2mg/kg (Ketamina-Dopalen®). Com essa dosagem conseguiu-se uma sedação profunda por aproximadamente 90 a 120 minutos.

### **3.2.1 Método Cirúrgico**

A abertura da câmara pulpar foi realizada nos incisivos superiores com broca esférica número dois montada em micromotor.

Os incisivos do lado direito constituíram o grupo experimental, estes foram abertos sem irrigação e com broca não estéril. Após exposição pulpar, foi implantado no interior da cavidade da polpa dental, com o auxílio de espátula de inserção, as microesferas contendo BMP. A seguir, procedeu-se à restauração temporária com cimento fosfato de zinco (SS White).

Como controle foram utilizados os incisivos do lado esquerdo. Nestes foram abertos sem irrigação e com broca não estéril o fechamento da cavidade pulpar foi feito com restauração provisória, de hidróxido de cálcio e com cimento fosfato de zinco (SS White), usado rotineiramente em Odontologia.

O acompanhamento pós-operatório foi realizado verificando-se diariamente o bom estado geral dos coelhos, sendo que nos seis primeiros dias foi administrado analgésico (dipirona gotas) na água dos animais.

### **3.2.2 Procedimentos Histológicos para Microscopia de Luz**

Após 20, 40, 60 dias os animais foram anestesiados. Como medicação anestésica foi administrada em cada animal um medicamento sedativo, analgésico e relaxante muscular na dosagem de 5mg/kg (Rompum®-Bayer do Brasil); após um período de 20 minutos, foi administrado um medicamento neuropilético e tranqüilizante na dosagem de 0,5mg/kg (Xilasina-Anasedan®) e em seguida foi administrado o anestésico geral cloridrato de ketamina, na dosagem de 0,2mg/kg (Ketamina-Dopalen®). Com essa dosagem conseguiu-se uma sedação profunda por aproximadamente 90 a 120 minutos, após este procedimento realizamos o corte do incisivo central através de um disco diamantado, sendo que o corte foi realizado próximo a região gengival.

A fixação dos dentes foi realizada com a imersão em solução neutra de formol a 10% por 24 horas. Após 24 horas os dentes passaram para etapa de descalcificação. A descalcificação foi realizada com uma solução de ácido nítrico 10%.

Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente durante 12 horas e em seguida submetidas à desidratação crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto).

As amostras foram diafanizadas por imersão em xilol, passo seguinte foi embolcar metade dos dentes em parafina e a outra metade em historesina. Ao ser emborcado em parafina, o material sofreu cortes de 0,4 micrômetros e então as lâminas obtidas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Masson (CHUNG, 2007). Já o material emborcado em historesina sofrerá cortes de 0,4 micrômetros, porém suas lâminas foram coradas pelo azul de toluidina (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Os cortes foram fixados entre lâmina e lamínula com o uso do entelan (Merk), para análise histológica.

As lâminas foram coradas pela técnica Tricômio de Masson, H.E. e Azul de toluidina. A coloração possibilita a visualização de tecido conjuntivo, citoplasma, fibroblastos, vasos sanguíneos, queratina e fibras musculares, corados em vermelho/rosa; cartilagem e tecido ósseo em azul e o núcleo celular em azul escuro. As laminas foram fotografadas em microscópio Nikon E-800.

### **3.3 Estudo Experimental em Humanos**

Esta etapa teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas parecer numero 045/2006 (anexo V).

#### **3.3.1 Descrição da População**

A influência do material restaurador vai ser testada em 20 voluntários humanos sadios (dez mulheres, dez homens; de 26 anos de idade em média). Sendo excluídos indivíduos com problemas de saúde e mulheres grávidas.

Os voluntários serão recrutados através da gravidade da perda dentinária, em todos os casos foi aplicado hidróxido de cálcio antes do implante com PLLA.

#### **3.3.2 Descrição da Técnica de Aplicação do PLLA com BMP em Humanos**

- a. Avaliação da extensão da perda dentinária através de exame clínico.
- b. Avaliação radiográfica do elemento dental escolhido, verificando a proximidade da perda em relação a polpa.
- c. Teste de vitalidade pulpar através de temperatura (Frio e Calor), é fundamental resposta positiva frente ao teste (responder com pequeno choque-dor).
- d. Processo anestésico local através de mepivacaina.

- e. Limpeza da cavidade através de caneta de baixa rotação e brocas multilaminadas (irrigação com água).
- f. Condicionamento de esmalte por 15-30 segundos com gel ácido a base de clorhexidina 2%, lavagem com jato de água por 15-20 segundos e secagem com jato de ar.
- g. Aplicação e fotopolimerização de adesivo dentinário na região do esmalte.
- h. Aplicação do PLLA com BMP através de espátula de inserção, de 10 a 20mg em média, deve variar em função do tamanho da cavidade.
- i. Fechamento da cavidade com resina fotopolimerizável.
- j. Exame radiográfico bimestral no primeiro ano e semestral no segundo e terceiro anos.(visitas de controle e tempo de acompanhamento).

Obs. O material foi considerado aceito a partir da segunda semana da aplicação na cavidade, desde que não cause desconforto ao paciente (dor), e sua função devolvida assim que foi realizado o fechamento da cavidade com a resina fotopolimerizável, não acarretando custo algum aos pacientes testados tanto no resultado positivo quanto no negativo.

A avaliação do processo inflamatório foi em função do desconforto do paciente (dor), sendo que nos casos onde não ocorreu possibilidade de controle através de anti-inflamatório (no caso será usado piroxicam) o processo foi descontinuado sendo realizado o tratamento usual, endodontia nos casos de não lesão de furca nas raízes e exodontia nos casos onde as mesmas estivessem afetadas, (a observação também é válida em casos de desistência do paciente durante o processo).

Lembrando que não houve custo algum para os pacientes testados em qualquer etapa do tratamento.

### **3.3.3 Análise dos Dados**

As comparações entre os resultados dos grupos controles (todos foram implantados com hidróxido de cálcio) e dos implantados foram realizadas pelos testes estatísticos não paramétricos (comparações múltiplas), informados nas tabelas 1,2 e 3 (anexo III).

### **3.4 Estudo Experimental em Humanos (casos de exodontia ortodôntica)**

Esta etapa teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas parecer número 045/2006 (anexo V).

#### **3.4.1 Descrição da População**

A influência do material restaurador vai ser testada em voluntários humanos sadios que estejam sendo tratados ortodonticamente e que devem receber exodontia em função da necessidade do tratamento. Sendo excluídos indivíduos com problemas de saúde e mulheres grávidas.

Os voluntários foram recrutados através do tipo de tratamento ortodôntico.

#### **3.4.2 Descrição da Técnica de Aplicação do PLLA com BMP em Humanos**

- a. Avaliação da extensão da perda dentinária através de exame clínico.
- b. Avaliação radiográfica do elemento dental escolhido, verificando a proximidade da perda em relação a polpa.
- c. Teste de vitalidade pulpar através de temperatura (Frio e Calor), é fundamental resposta positiva frente ao teste (responder com pequeno choque-dor).
- d. Processo anestésico local através de mepivacaina.
- e. Limpeza da cavidade através de caneta de baixa rotação e brocas multilaminadas (irrigação com água).
- f. Condicionamento de esmalte por 15-30 segundos com gel ácido a base de clorhexidina 2%, lavagem com jato de água por 15-20 segundos e secagem com jato de ar.
- g. Aplicação e fotopolimerização de adesivo dentinário na região do esmalte.
- h. Aplicação do PLLA com BMP através de espátula de inserção, de 10 a 20mg em média, deve variar em função do tamanho da cavidade.
- i. Fechamento da cavidade com resina fotopolimerizável.
- j. Exame radiográfico (visitas de controle e tempo de acompanhamento).
- k. Exodontia ortodôntica após 40 dias da aplicação do implante.

Obs. O material foi considerado aceito a partir da segunda semana da aplicação na cavidade, desde que não causasse desconforto ao paciente (dor), e sua função devolvida assim que foi realizado o fechamento da cavidade com a resina fotopolimerizável, não acarretando custo algum aos pacientes testados tanto no resultado positivo quanto no negativo.

A avaliação do processo inflamatório foi em função do desconforto do paciente (dor), sendo que nos casos onde não ocorreu possibilidade de controle através de anti-inflamatório (no caso foi usado piroxicam) o processo será descontinuado sendo realizado o tratamento preconizado, exodontia do elemento dental, a observação também foi válida em casos de desistência do paciente durante o processo.

Lembrando que não houve custo algum para os pacientes testados em qualquer etapa do tratamento.

### **3.4.3 Análise dos Dados**

As comparações entre os resultados dos grupos controles (todos foram implantados com hidróxido de cálcio) e dos implantados, com PLLA contendo BMP, foram realizadas pelos testes estatísticos não paramétricos (comparações múltiplas), informados nas tabelas 1, 2 e 3 (anexo III).

### **3.4.4 Procedimentos Histológicos para Microscopia de Luz**

Após a exodontia a fixação dos dentes foi realizada com a imersão em solução neutra de formol a 10% por 24 horas. Após 24 horas os dentes passaram para etapa de descalcificação. A descalcificação foi realizada com uma solução de ácido nítrico 10%.

Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente durante 12 horas e em seguida submetidas à desidratação crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto).

As amostras foram diafanizadas por imersão em xilol, passo seguinte foi embolcar metade dos dentes em parafina e a outra metade em historesina. Ao ser emborcado em parafina, o

material sofreu cortes de 0,4 micrômetros e então as lâminas obtidas serão coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Masson (CHUNG, 2007). Já o material emborcado em historesina sofreu cortes de 0,4 micrômetros, porém suas lâminas foram coradas pelo azul de toluidina (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Os cortes foram fixados entre lâmina e lamínula com o uso do entelan (Merk), para análise histológica.

As lâminas foram coradas pela técnica Tricômio de Masson, HE e azul de toluidina. A coloração possibilita a visualização de tecido conjuntivo, citoplasma, fibroblastos, vasos sanguíneos, queratina e fibras musculares, corados em vermelho/rosa; cartilagem e tecido ósseo em azul e o núcleo celular em azul escuro. As lâminas foram fotografadas em microscópio Nikon E-800.

## Capítulo 4

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.1 Obtenção das Microesferas e Estudo *in vitro*

Avaliando-se a extensão do problema da perda de elementos dentais, nesse trabalho propôs-se a aplicação de microesferas de PLLA contendo BMP, obtidas pelo processo de dupla emulsão visando a recuperação de tecidos dentinários lesados, para esta aplicação foi trabalhado *in vitro* o tamanho e distribuição (LLS) das microesferas bem como morfologia inicial (MEV), fundamental para o sucesso do tratamento *in vivo*.

O tamanho e distribuição de tamanhos das microesferas foram determinados através da técnica de Espalhamento de Luz Laser (LLS), onde o tamanho da partícula determinado será inversamente proporcional ao desvio do ângulo da luz espalhada pela partícula. Com este equipamento, em específico, são medidas partículas e tamanho entre 0,05 a 3500 micra.

Para as análises de distribuição de diâmetros o equipamento de espalhamento de luz laser nos fornece um importante dado dentre outros: o  $D[4,3]$  que é a medida do momento de massa/volume (Medida do diâmetro de De Brouckere). Este dado indica um ponto central pela qual a distribuição de massa/volume se concentra e é análogo ao centro de gravidade de um corpo de determinado volume. A grande vantagem deste tipo de medida é que não há necessidade de se conhecer o número de partículas, parâmetro que é eficiente apenas em análises onde o número de partículas é pequeno. A fórmula de  $D[4,3]$  pode ser vista na tabela 4.1.

Os valores obtidos das microesferas que podem ser observados revelam que as microesferas de PLLA contendo BMP apresentam um momento massa em torno de 266  $\mu\text{m}$ .

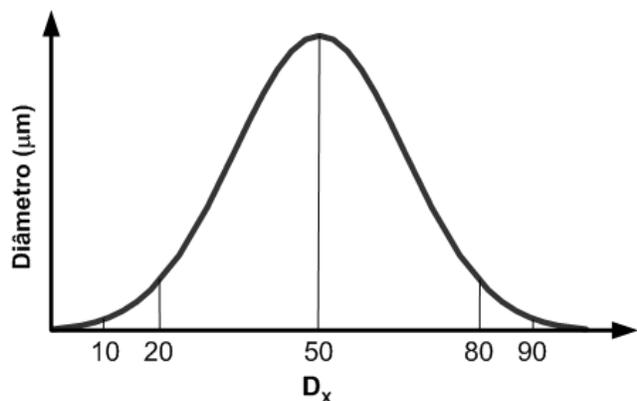
**Tabela 4.1** Medida do Momento de Massa/Volume (Medida do diâmetro De Brouckere).

Nome	Designação	Fórmula
Medida do Momento de Massa/Volume (Medida do diâmetro De Brouckere)	D[4,3]	$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$

Os dados do equipamento mostram que as microesferas de PLLA contendo BMP apresentaram uma distribuição de diâmetros de partículas mais larga se tomarmos como base a curva gaussiana. A figura 4.1 mostra uma distribuição gaussiana de diâmetros onde pontos específicos da curva foram analisados para o estudo.

Segundo JAIN (2000), um sistema de liberação de fármacos deve apresentar partículas com diâmetros médios que não excedam 250  $\mu\text{m}$ .

O valor de diâmetro médio da distribuição ( $D_{50}$ ) das microesferas de PLLA contendo BMP são apresentados na tabela 4.2 e verifica-se que os mesmos estão ligeiramente acima do valor máximo (250  $\mu\text{m}$ ), o que segundo JAIN (2000) pode influenciar o processo de encapsulação de fármacos e o rendimento das microesferas. Porém verificou-se nos estudos *in vivo* que esta pequena variação não afetou os resultados.

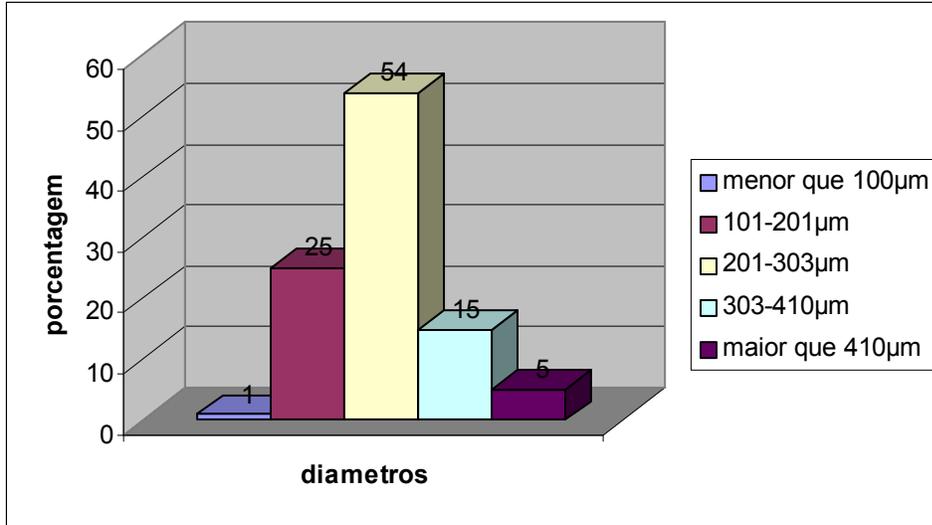


**Figura 4.1** Curva gaussiana da distribuição de diâmetros.

**Tabela 4.2** Diâmetros médios obtidos em pontos específicos da curva gaussiana.

<b>Diâmetro</b>	
<b>(µm)</b>	
<b>PLLA + BMP</b>	
D <sub>10</sub>	143,45
D <sub>20</sub>	174,15
D <sub>50</sub>	253,23
D <sub>80</sub>	370,70
D <sub>90</sub>	412,95

A figura 4.2 mostra um histograma dos diâmetros das microesferas da PLLA contendo BMP, considerando a porcentagem das faixas de diâmetros obtidas. Verifica-se nitidamente que com esse processo, obtém-se uma maior porcentagem de microesferas com diâmetro na faixa 200 a 300 µm.



**Figura 4.2** Histogramas da distribuição de diâmetros.

Os demais dados obtidos do equipamento MARTERSIZER S podem ser observados nos anexos I e II.

De acordo com JAIN (2000) e YANG *et al.* (2001), os vários parâmetros do processo por dupla emulsão afetam significativamente as microesferas em seu estado final e conseqüentemente na taxa de liberação das mesmas.

RUAN *et al.* (2002), afirmam que um dos fatores determinantes do tamanho e da distribuição de tamanhos das microesferas é o solvente utilizado na dissolução dos polímeros, pois a baixa taxa de evaporação do mesmo pode resultar em microesferas mais uniformes e menos defeituosas.

Segundo BRITAIN (2001) e RAWLE (2002) o conceito de tamanho de partícula é inequivocamente derivado da forma e da morfologia da mesma visto que, a idéia de uma partícula esférica são conceitos preconcebidos.

RUAN *et al.* (2002), afirmam que o tamanho de partículas pode também ser controlado de poucos micrômetros a dezenas de micra pela variação da agitação na produção da segunda emulsão. Emulsificação sob agitação severa resulta em partículas menores, entretanto mesmo sob

agitação de 3000 rpm's o fato do material biológico (rhBMP-2) ter sua viscosidade aumentada na primeira emulsão pode ter levado aos valores registrados pelo equipamento, indicando uma distribuição de diâmetros mais larga.

As eletromicrografias obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitem indicar as diferenças morfológicas das microesferas de PLLA, bem como das microesferas de PLLA contendo BMP, figuras 4.3 e 4.4. Enquanto as microesferas de PLLA apresentaram uma estrutura basicamente densa e lisa, as microesferas nas quais foi adicionado o BMP, apresentaram uma estrutura completamente porosa e rugosa. Em maiores magnitudes, verifica-se a presença de pontos de rugosidade na superfície das microesferas que se espalham uniformemente.

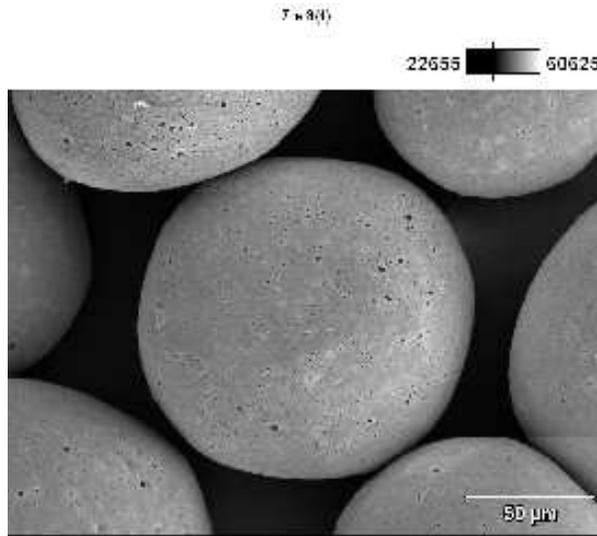
A morfologia das microesferas, principalmente no que diz respeito ao tamanho e distribuição dos poros, exerce fundamental importância na adesão celular. Uma microesfera porosa tende a ser mais frágil quanto a esforços mecânicos, porém deve-se levar em consideração a necessidade das microesferas possuírem a porosidade para uma possível invasão celular e produção de matriz extracelular em conjunto com a microesfera, que pode acabar por reforçar a mesma.

A seqüência de eletromicrografias a seguir mostra o aspecto das microesferas com e sem BMP em diferentes magnitudes.

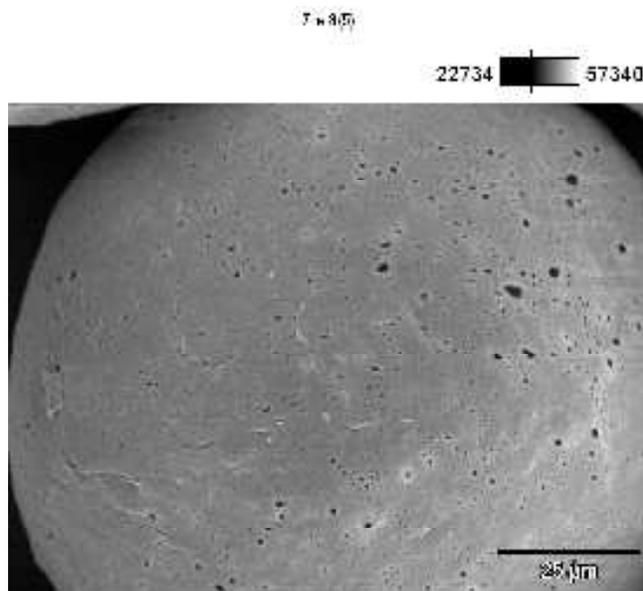


(a)

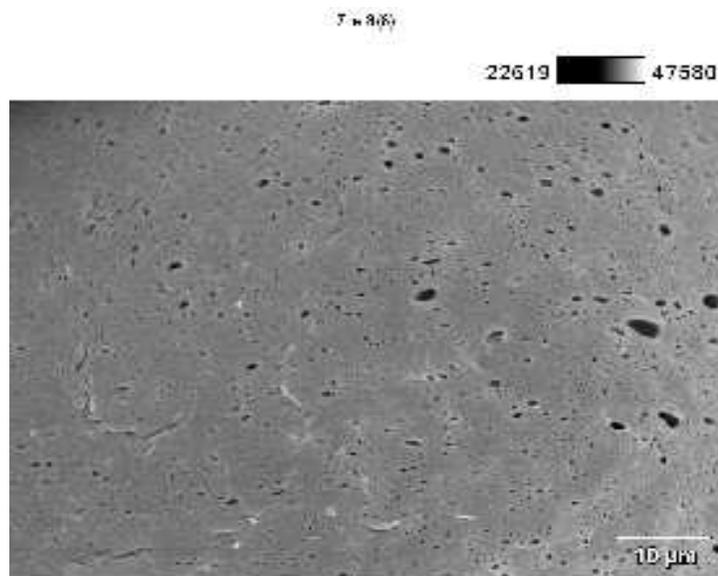
**Figura 4.3** Morfologia das microesferas de PLLA sem BMP.



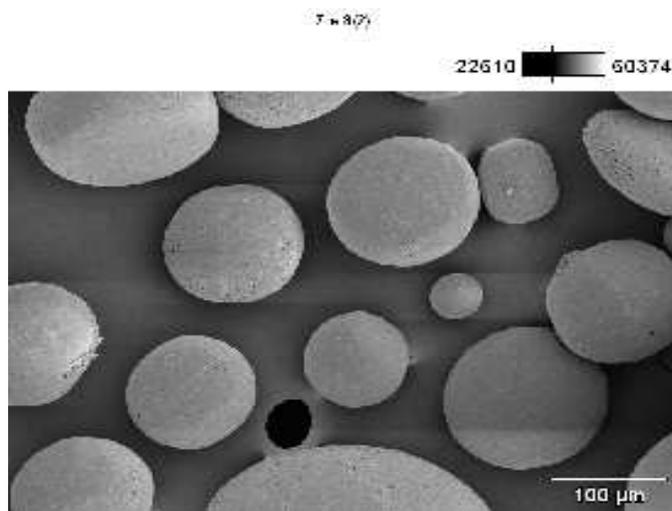
**Figura 4.4** Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, 400x.



**Figura 4.5** Morfologia das microesferas de PLLA com BMP, porosidade em todo contorno, 1000x.



**Figura 4.6** Morfologia das microsferas de PLLA com BMP, porosidade indicando um material compatível para invasão celular, 1500x.



**Figura 4.7** Morfologia das microsferas de PLLA com BMP, visualização da geometria, 200x.

Claramente, quando a porosidade de um material aumenta, a resistência e a adesão variam. Geralmente a resistência diminui com o aumento da porosidade, devido não somente a diminuição da quantidade de material, mas também devido a fatores relacionados a concentração de tensões. Uma taxa de perda de propriedades mecânicas da microsfera é um fator determinante

no sucesso do implante, porém esta taxa deve ser compatível com a invasão celular e produção de matriz extracelular que irá substituir a mesma.

## **4.2 Estudo *in vivo***

### **4.2.1 Estudo *In Vivo* em Coelhos**

A análise *in vivo* é necessária para avaliar a resposta do tecido ao material. Algumas características fundamentais devem ser atendidas para que o material possa ser aplicado sobre os tecidos dentais e serão discutidas a seguir.

O material deve ser poroso e com diâmetros de poros de tamanho adequado para permitir a invasão do tecido, pois no caso de tecido dental o crescimento ocorre por ancoragem, os prolongamentos dos odontoblastos (células formadoras de dentina) tendem a penetrar entre os espaços das microesferas e em suas porosidades estabelecendo assim o meio adequado para uma neoformação de dentina, portando, a interconexão entre os poros e o tamanho destes, em função do tamanho de células invasoras, também são fatores fundamentais. Materiais macroporosos têm provado ser muito importante para neoformação de tecidos.

Além disso, deve haver uma boa adesão entre o tecido e o material. Outras características importantes são a biocompatibilidade, a taxa de degradação, a resistência mecânica e o design apropriado. A principal dificuldade encontrada quanto a um biomaterial é conciliar suas propriedades físicas, químicas e mecânicas para a funcionalidade do implante com um nível aceitável de reação inflamatória, a qual geralmente é causada por moléculas solúveis ou íons liberados dos materiais utilizados como implantes.

Sabe-se da literatura que o PLLA é amplamente utilizado clinicamente em pacientes em uma série de aplicações, sendo considerado biocompatível, além de que os polímeros bioreabsorvíveis são excelentes substratos para cultura de células.

Nesse sentido, as microesferas de PLLA com medicamento foram implantadas nos coelhos para avaliação dos diferentes tipos de resposta biológicas.

Estudos *in vivo*, utilizando a BMP no tratamento conservador da polpa (vitalidade), indicam que esta proteína pode ter um efeito mitogênico nas células mesenquimais, além de estimular a formação de neodentina resultante pode ter um papel na diferenciação de osteoblastos (NAKASHIMA, 1990; NAKASHIMA, 1994a). Já *in vitro*, esta proteína não foi capaz de induzir a proliferação de células mesenquimais da polpa, no entanto, estimulou a diferenciação de células pulpares em odontoblastos (NAKASHIMA, 1990; VAINIO, 1993). Aliado a isto, estudos têm demonstrado a existência de receptores celulares na polpa que interagem com sinais específicos da BMP, transmitindo-os para que as células reajam a estes sinais, induzindo a formação de tecido dentinário (WOZNEY, 1992, 1998).

Até o presente momento, calcado na ausência de maiores evidências científicas, parece lícito afirmar que o BMP mais PLLA como carreador estimula o processo de diferenciação e proliferação de células pulpares. Na polpa do dente existe o chamado tecido conjuntivo mucoso, um resquício do tecido mesenquimal, rico em células tronco mesenquimais; daí a plasticidade das células da polpa. O efeito descrito não é observado de forma tão intensa em outros tecidos.

Estudos *in vivo (coelhos)* demonstraram que a BMP estimula a atividade da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica que promove a liberação de fosfato inorgânico a partir de ésteres fosfóricos. Os íons fosfato liberados podem reagir com íons cálcio provenientes dos tecidos, formando precipitados de fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatita, sobre a matriz orgânica, o que caracteriza o processo de mineralização (LOPES & SIQUEIRA Jr. 1999). Além disto, percebemos que esta enzima reflete o estágio de manutenção das células pulpares. Assim, embora NAKASHIMA (1992) tenha demonstrado que este efeito ocorre apenas no estágio inicial de calcificação, a BMP pode favorecer a neoformação de dentina e regular o processo de maturação de células pulpares através da ativação da enzima fosfatase alcalina.

Tem sido relatado que a BMP induz a expressão de osteocalcina (NAKASHIMA, 1992; WOZNEY, 1992). A osteocalcina é um marcador específico para diferenciação de odontoblastos

(WOZNEY, 1992). Assim, a BMP também pode favorecer a formação de dentina, estimulando a diferenciação de células pulparem em odontoblastos, através da ativação da síntese desta glicoproteína.

Pelo exposto, quando do emprego da BMP mais PLLA como agente capeador pulpar, parece mesmo funcionar como um agente indutor, que estimula a diferenciação e proliferação de células pulparem, através da ativação de uma série de fatores que recapitulam a dentinogênese embrionária.

Em nossos estudos nenhum dos casos foi notado regiões que pudessem indicar necroses ou qualquer reação através de análise macroscópica da região implantada (dente) durante a retirada das amostras. Não houve sinais de alteração no comportamento em nenhum dos coelhos e não foi observada nenhuma diferença significativa entre os coelhos de um mesmo grupo quanto à resposta aos implantes.

#### **4.2.1.1 Microscopia de Luz**

A análise ao microscópio de luz do fragmento de tecido dental onde foi realizado o implante das microesferas demonstra que nos cortes foi possível manter os fragmentos das microesferas, ficando o registro de sua presença através da marca deixada e do tecido dental neoformado (dentina).

Os dados colhidos através dos exames histológicos foram classificados por ordem de tempo de implantação das microesferas de PLLA com medicamento, o grupo controle com hidróxido de cálcio foi analisado apenas com 60 dias.

#### Avaliação histológica de um corte do dente (sem implante)

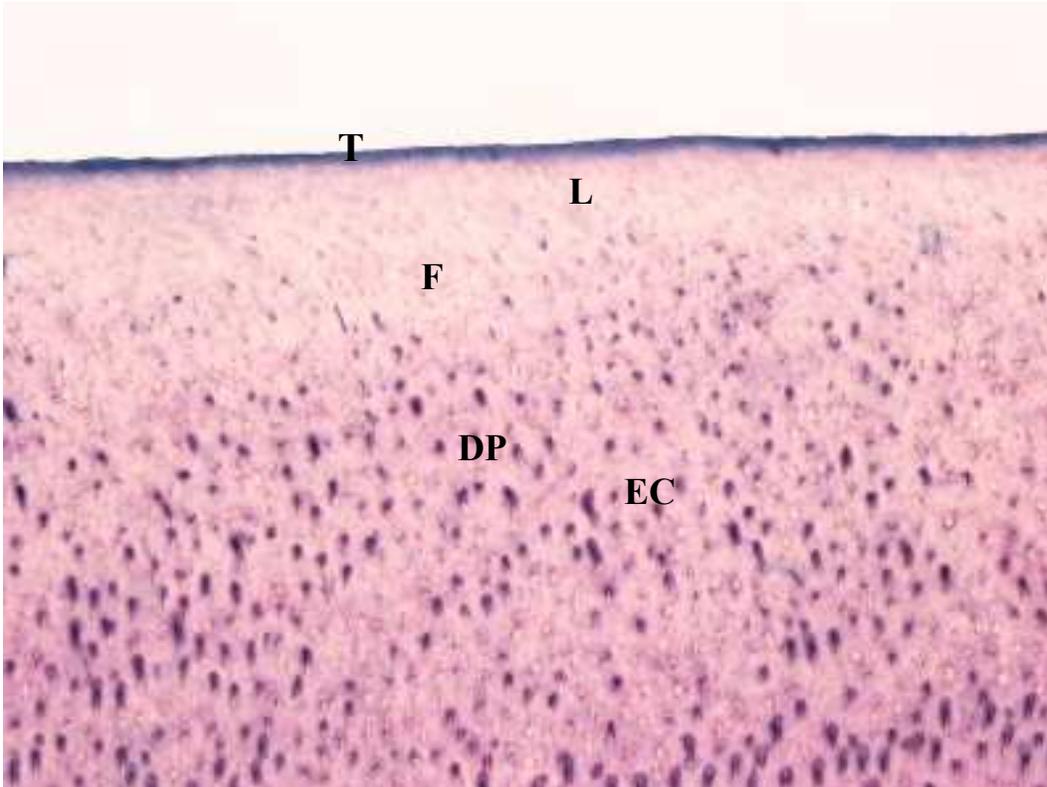
Podemos verificar através da (Figura 4.8) a região de adesão do esmalte com a dentina, denominada limite amelodentinário, a qual é subdividida em três regiões: tufos, fusos, lamelas.

Avaliando a formação do esmalte de dentro para fora, verifica-se que o mesmo é acelular, avascular e as células que o constituem tem vida curta. Quando ele está totalmente formado as células que o secretam deixa de existir; por isso, este tecido jamais será reparado biologicamente, quando agredido.

A dentina apresenta canaliculos no seu interior, onde se encontram os prolongamentos das células odontoblásticas que se localizam na polpa, esses prolongamentos apresentam ramificações em seu trajeto. Esses prolongamentos são chamados de **fibrila de Tomes**.

As paredes dos canaliculos preenchidos pelas fibrilas de Tomes apresentam uma concentração maior de hidroxiapatita, são hipermineralizadas e são denominadas de dentina intercanalicular ou pericanalicular (Substância Orgânica = 10% e Substância Mineral = 90%).

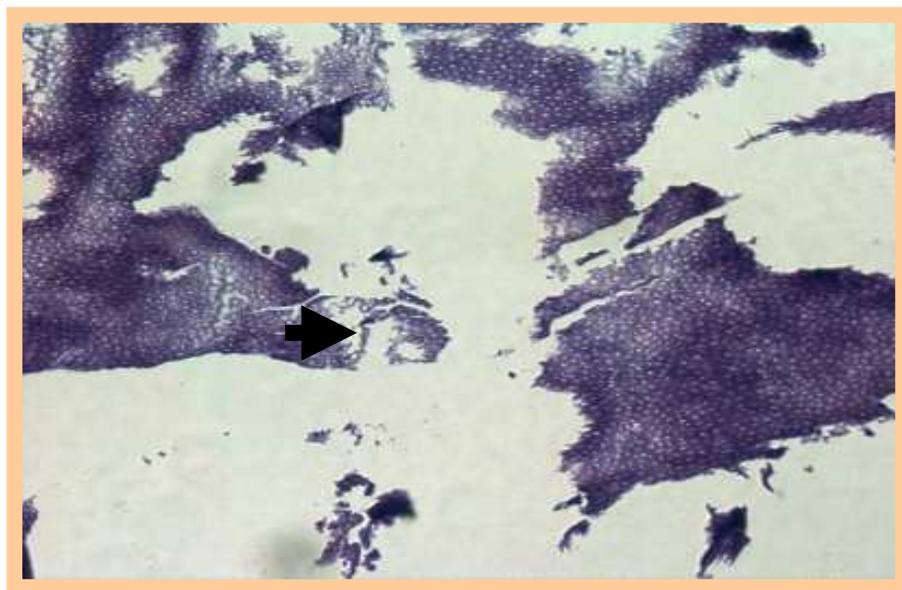
A hidroxiapatita tem forma arredondada, e isso pode gerar regiões hipomineralizada, resultando em uma massa dentinária com espaços, onde os cristais não se fusionaram. Esses espaços hipocalcificado quando presente na dentina coronária são denominados **espaços de Czermack** e quando localizados na dentina radicular são chamados de **zona granulosa de Tomes** (SOARES, 1996).



**Figura 4.8.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente normal apresentando esmalte com região de tufos (T), fusos (F) e lamelas (L); na região da dentina observamos a dentina pericanalicular (DP) e os espaços Czermack (EC). Tricrômico de Masson. 400x.

Avaliação histológica com implante de microesferas com BMP após 7 dias.

Observa-se ainda, com aumento de 20x (Figura 4.9), que a região central apresenta uma hipocalcificação em função do defeito provocado para o implante do material. Não foi possível verificar em nenhum momento infiltrado inflamatório.



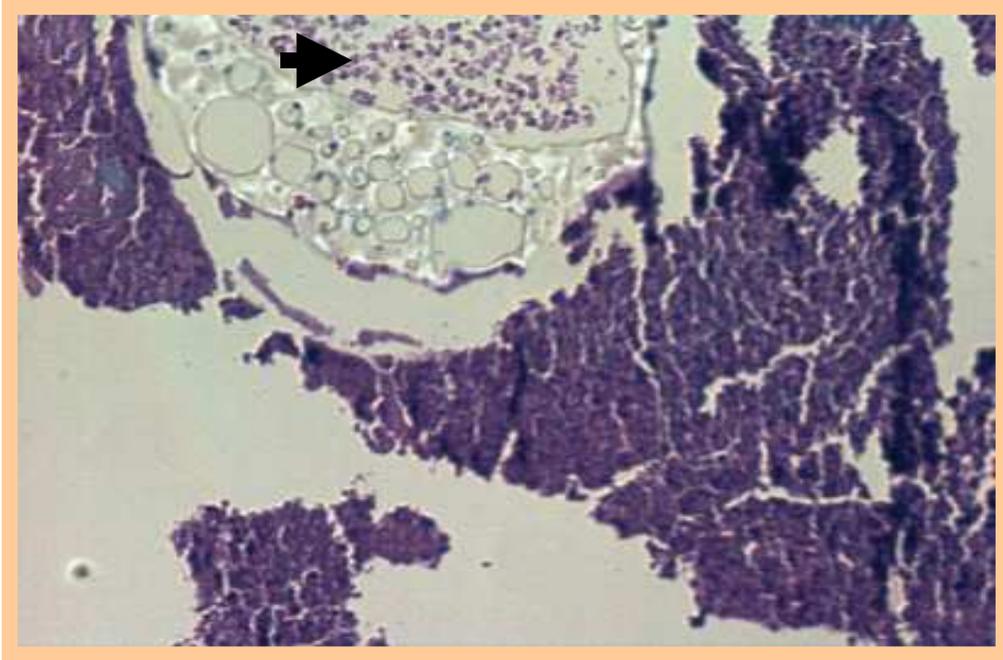
**Figura 4.9.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 7 dias. Observa-se regiões centrais de hipocalcificações em relação ao implante (seta). Hematoxilina Eosina. 200x.

De acordo com (NAKASHIMA, 1990), e podemos perceber na fotomicrografia acima, no primeiro estágio, a BMP provoca uma leve resposta de células mediadoras. No segundo estágio, que ocorre entre a primeira e a segunda semana, a BMP apresenta-se quase totalmente reabsorvida, e as células mesenquimais migram para a região exposta e proliferam, em nosso caso devido ao agente carreador (PLLA) a BMP não será totalmente reabsorvida, prolongado assim a ação da mesma. Células endoteliais também podem ser encontradas nesta fase. Indicando sinais de neovascularização. O terceiro estágio, que ocorre no período entre a segunda e quarta semana, é caracterizado pela formação de osteodentina em algumas partes da cavidade, principalmente na parede dentinária adjacente e abaixo da superfície preenchida com BMP. Além disto, nesta fase, também pode ser observada a diferenciação de tecido neo formado. No quarto estágio, que ocorre entre a quarta e oitava semana, os odontoblastos se diferenciam em dentina tubular e depois em osteodentina, como veremos nas próximas fotomicrografias.

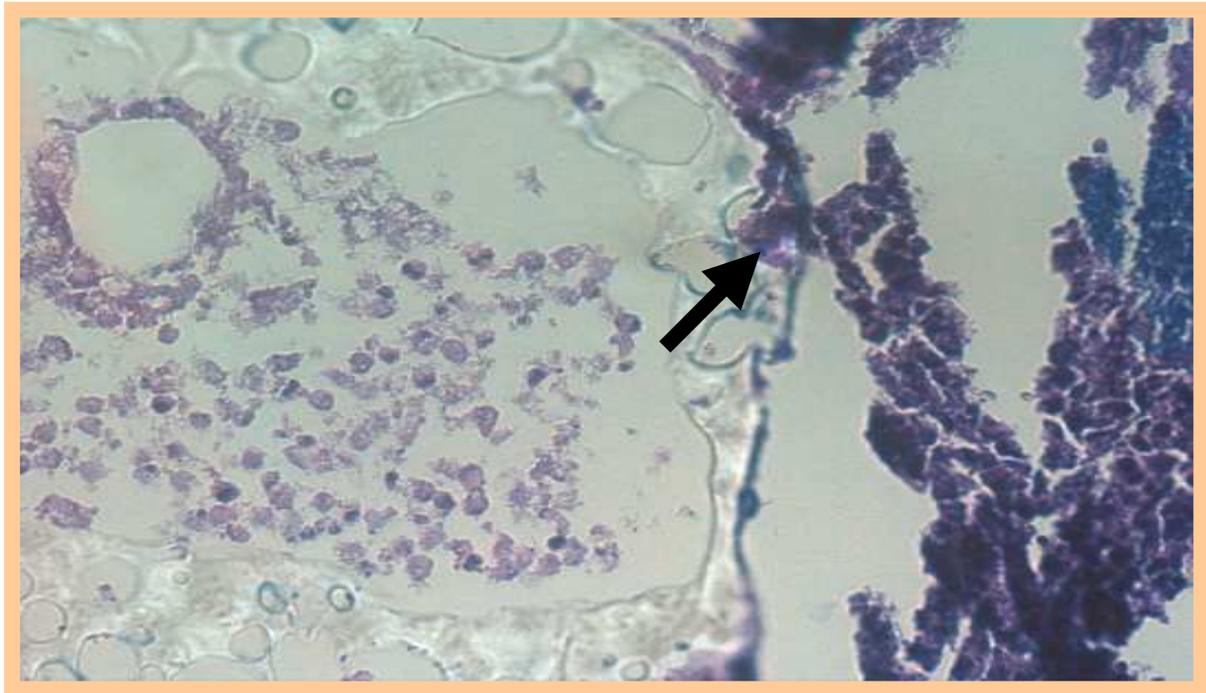
### Avaliação histológica com implante de microesferas com BMP após 20 dias.

Em todos os espécimes, foram observadas pontes dentinárias constituídas de material amorfo, de contorno irregular, com variação de mineralização (região periférica) e com inclusão de células odontoblásticas no seu interior (Figuras 4.10, 4.11, 4.12). Verifica-se através das fotomicrografias a adesão do esmalte com a dentina e o limite amelodentinário com uma grande região de tufos e lamelas; percebemos formação de osteodentina em algumas partes da cavidade, principalmente na parede dentinária adjacente e abaixo da superfície preenchida com BMP mais o PLLA. Além disto, nesta fase também pode ser observada a região da microesfera bem delineada com região de neotecido em seu interior.

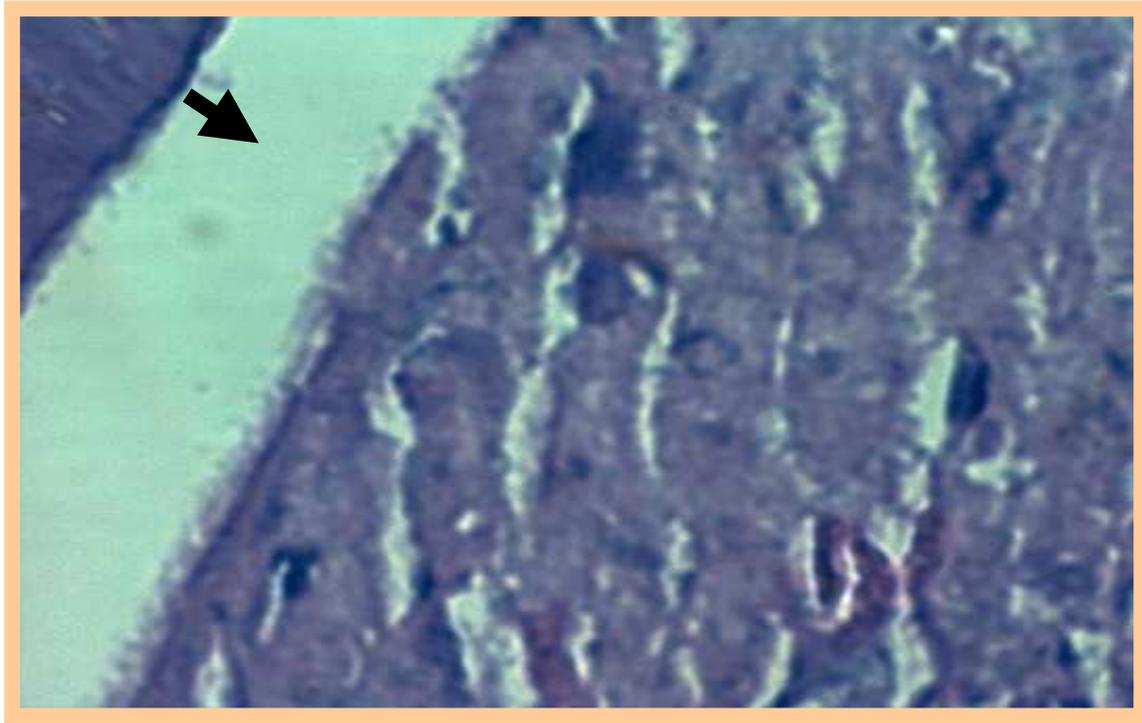
A dentina formada geralmente apresenta um aspecto regular, com células colunares e polarizadas, núcleos circulares ou ovoídes, e processo citoplasmático estendendo-se para dentro da nova matriz mineralizada. Podem ser observados dois tipos de dentina reparadora quando do emprego da BMP como agente capeador pulpar: osteodentina (com células ovóides) e dentina regular (com túbulos dentinários). O tempo de aplicação da BMP sobre o tecido pulpar, o tipo de carreador e a matriz dentinária têm sido apontados como os possíveis fatores que determinam qual destes tipos de dentina estarão presentes na área amputada (NAKASHIMA, 1994a; RUTHERFORD, 1993). Quando utilizamos o PLLA como agente carreador, percebemos a formação de dentina regular (com túbulos dentinários).



**Figura 4.10.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se a região do implante com tecido neo formado Hematoxilina Eosina . 200x.



**Figura 4.11.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se formação de osteodentina em algumas partes da cavidade, principalmente na parede dentinária adjacente e abaixo da superfície preenchida com BMP mais o PLLA. Hematoxilina Eosina 400x.



**Figura 4.12.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 20 dias. Observa-se limite amelodentinário com uma grande região de tufos e lamelas (seta). Hematoxilina Eosina. 1000x.

#### Avaliação histológica com implante de microesferas com BMP após 40 dias.

Os espécimes exibiram ponte dentinária regular na sua formação, com graus de mineralização variáveis (Figuras 4.13 e 4.14).

As pontes dentinárias desse grupo eram mais espessas (Figura 4.14) que as obtidas anteriormente, (Figura 4.11), com a formação de túbulos dentinários, com maior inclusão de células odontoblásticas e maior grau de calcificação.

A calcificação da dentina, (Figura 4.13) mostrada na microscopia demonstra lacunas deixadas pelas microesferas mais também comprova que a calcificação começa por áreas globosas que crescem e se fundem, porém o processo muitas vezes é imperfeito, resultando áreas

de matriz orgânica não calcificada, são as áreas interglobulares (Figuras 4.13 e 4.14). Verifica-se as diferentes direções da dentina em formação na Figura 4.14., além da região central do implante na Figura 4.13. Não foi possível verificar em nenhum momento infiltrado inflamatório em função do implante.



**Figura 4.13.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se região central destacando o local do implante. Tricrômico de Masson. 200x.



**Figura 4.14.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se áreas interglobulares de formação de dentina (seta). Tricrômico de Masson. 400x.

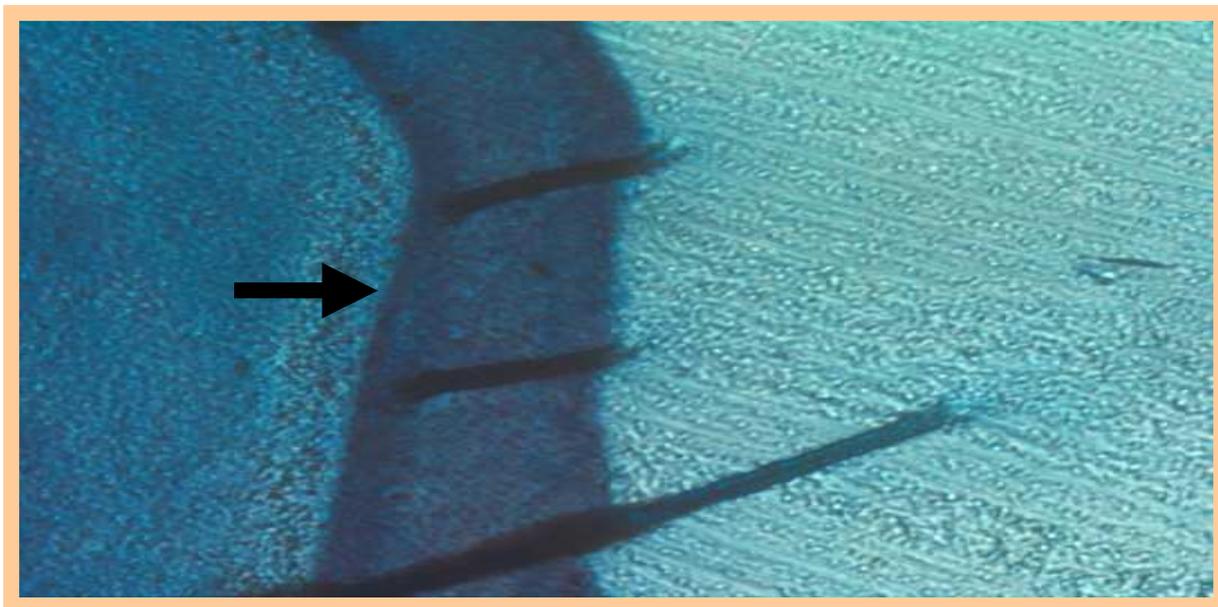


**Figura 4.15.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com BMP após 40 dias. Observa-se dentina neoformada e áreas interglobulares de formação de dentina. Tricrômico de Masson. 100x.

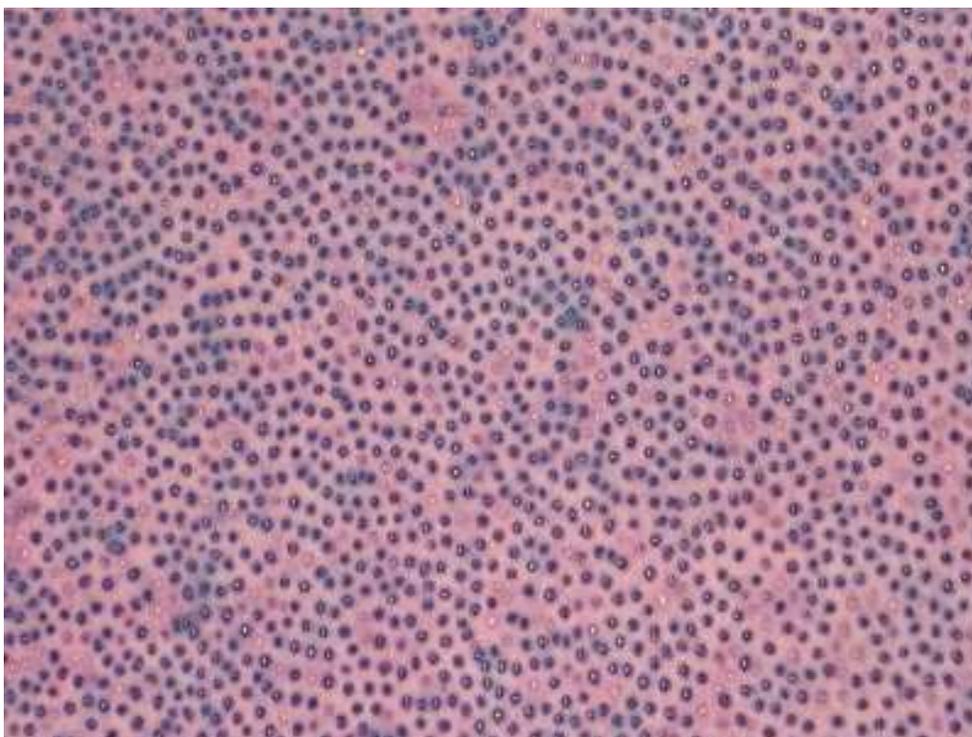
Avaliação histológica com implante de microesferas com BMP após 60 dias.

Verifica-se através da fotomicrografia (Figuras 4.16 e 4.17) a adesão do esmalte com a dentina o limite amelodentinário e as estruturas **tufos** – região do esmalte que se localizam no limite amelodentinário; **fusos** – projeções da estrutura da dentina (prolongamentos do odontoblasto); **lamelas** – estrutura hipocalcificada que está em toda extensão do esmalte.

Observa-se também no seu interior, canálculos, contendo prolongamentos das células odontoblásticas que se localizam na polpa. Esses prolongamentos apresentam ramificações em seu trajeto, as paredes dos canálculos preenchidos pelas fibrilas de Tomes e regiões hipomineralizada, devido à formação da massa dentinária, apresentando espaços onde os cristais não se fusionaram, Figura 4.17.



**Figura 4.16.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com medicamento após 60 dias. Observa-se esmalte com região de tufos, fuso e lamelas; na região da dentina observamos a dentina pericanalicular e os espaços Czermack. Azul de Toluidina 400x.



**Figura 4.17.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de microesferas de PLLA com medicamento após 60 dias. Observa-se tecido de normalidade. Tricrômico de Masson. 400x.

#### Avaliação histológica do hidróxido de cálcio após 60 dias.

Não foram observadas pontes dentinárias constituídas de material amorfo, de contorno irregular, com variação de mineralização.

Também não foi observado a regeneração do material como apresentado nos casos anteriores. Verifica-se claramente na figura 4.18 o corte das brocas esféricas demonstrando o espaço deixado pelo material capeador, não foi observado regeneração nos casos observados (antes de 60 dias).



**Figura 4.18.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente com implante de hidróxido de cálcio após 60 dias. Observa-se que não ocorreu a regeneração do material como apresentado nos casos anteriores. Verifica-se claramente o corte das brocas esféricas demonstrando o espaço deixado pelo material capeador. Tricrômico de Masson. 100x.

A presença de bactérias é apontada como a responsável por respostas pulpares indesejáveis. Diversos autores demonstraram que, garantindo-se o vedamento marginal, ocorre a ausência de resposta inflamatória e a formação de ponte dentinária frente a diversos materiais.

O hidróxido de cálcio tem demonstrado, por muitos anos, a sua eficiência na indução de formação de barreiras mineralizadas (HOLLAND *et al.*, 1999).

Por outro lado, várias limitações têm sido atribuídas ao hidróxido de cálcio, como a indução de “barreiras mineralizadas” com defeitos em “túnel”, falta de adesão ao material restaurador e dissolução do cimento abaixo das restaurações. Outra limitação descrita é que, apesar de muitos comprovarem seus efeitos antimicrobianos, outros demonstraram que esse efeito seria restrito a alguns grupos de bactérias e de curta duração.

A grande vantagem que se pode atribuir a combinação BMP e PLLA é o fato da resposta celular ser dose-dependente. Esta afirmativa é confirmada por estudos realizados por NAKASHIMA (1994a) e RUTHERFORD (1993), nos quais estes autores relatam que a quantidade, em espessura, de dentina formada variou de acordo com o volume de medicamento utilizado. Esta é uma propriedade nunca antes atribuída a um agente capeador pulpar.

Aliado a isto, nossos estudos mostraram o efeito do PLLA e BMP sobre a polpa exposta de dentes de animais evidenciaram que a formação de dentina ocorre logo abaixo da área que recebeu o composto contendo a BMP, não tendo sido observado a formação de dentina na polpa radicular. Esta propriedade deve ser ressaltada, pois quando se tem a intenção de estimular a formação dentinária, uma das preocupações existentes é a possível mineralização da polpa com consequente obliteração dos canais radiculares.

No que se refere à qualidade da ponte dentinária formada, podemos relatar o fato do material ser totalmente reabsorvido impedindo que haja falhas, como as que ocorrem quando do emprego do hidróxido de cálcio como agente capeador pulpar, originando uma superfície uniforme.

Assim, embora outros agentes há tenham sido utilizados em estudos clínicos e laboratoriais, poucos demonstram ser tão eficientes quanto a BMP mais o PLLA na indução de formação de tecido dentinário. Além disto, a maioria deles pode apresentar efeitos citotóxicos e resultados indesejáveis, que dificultam ou impossibilitam a realização do tratamento endodôntico, caso este tornar-se necessário (LIANJIA, , 1993).

A utilização do Tricrômico de Masson nos permitiu, em função da coloração azulada, a visualização do tecido neoformado dentina e rósea nos tecidos normais nos diferentes estágios de tempo do implante, o mesmo com a utilização da Hematoxilina Eoxina, no caso do Azul de Toluidina o objetivo foi a melhor visualização de tecidos dentais já formandos.

No grupo controle onde foi implantado apenas o hidróxido de cálcio e o fechamento com fosfato de zinco não apareceu neoformação de tecido, verifica-se a região periférica demonstrando o corte da broca esférica (Figura 4.18).

Nos grupos onde foram implantadas as microesferas, verifica-se que a partir de 7 dias e se prolongando até 20 dias há grande formação de tecido dental; sendo que com 40 dias praticamente toda a estrutura dental está formada, ficando apenas pequenas lacunas deixadas pelas microesferas.

Não ocorreu grande reação inflamatória, o que demonstra a eficiência dos materiais implantados.

Em todos os casos não foi detectada qualquer presença de tecido necrosado, demonstrando a manutenção da vitalidade pulpar.

A análise dos implantes de microesferas de PLLA contendo BMP revelou a formação de um tecido calcificado duro em função da matriz que contém glicoproteínas e colágeno, além de cristais de hidroxiapatita; sendo que a formação deste tecido se deu em função da deposição das microesferas próximo a polpa, o que estimulou os prolongamentos citoplasmático dos odontoblastos internos aos túbulos da dentina à formação do neotecido. Além de promover a recuperação de tecidos dentinários lesados, permitiu função estrutural temporária e suporte para fixação e separação entre tecidos moles (polpa) e tecido duro (dentina), como também o controle do processo inflamatório e infeccioso permitindo a manutenção da vitalidade pulpar.

A calcificação da dentina demonstra lacunas deixadas pelas microesferas mas também comprova que a calcificação começa por áreas globulosas que crescem e se fundem, porém o

processo muitas vezes é imperfeito, resultando em áreas de matriz orgânica não calcificada, são as áreas interglobulares .

Na utilização dos implantes de microesferas com BMP, a presença ou ausência do isolamento absoluto não interferiu nos resultados, ocorrendo a formação de 100% de barreiras dentinárias completas.

Quanto aos defeitos e áreas hipomineralizadas, até os 60 dias, a provável presença delas não evidenciou nenhuma resposta pulpar, pois 100% das polpas exibiram características de normalidade. Estudos com maior período de observação são necessários, não para averiguar o efeito do implante de microesferas sobre a polpa, mas sim para verificar a durabilidade do selamento marginal oferecido pelas restaurações adesivas e também para regeneração tecidual.

Demonstrou-se também que as polpas permaneceram normais, pois a barreira neoformada não seria tão permeável, devido a sua característica morfológica osteóide que dificultaria o contato dos agentes irritantes com os processos odontoblásticos.

Os resultados demonstraram que o capeamento pulpar com microesferas de PLLA com BMP oferecem resultados muito favoráveis.

Como nenhum material até os dias atuais demonstrou ser totalmente efetivo no selamento marginal, a presença de uma barreira mineralizada, mesmo que porosa, seria mais interessante biologicamente do que nenhuma barreira. Assim, o emprego de microesferas é muito promissor.

#### **4.2.2 Estudo *In Vivo* em Humanos**

A análise *in vivo* em humanos se fez necessária para avaliar a resposta frente à aplicação do material, seu efeito antiinflamatório e analgésico em casos de exposição pulpar e grande perda dentinária, além da avaliação do retorno da função ao elemento dental, ou seja, controle da dor e possibilidade de mastigação normal.

Todos os pacientes antes do implante das microesferas com medicamento foram examinados quanto à vitalidade pulpar, item fundamental para o sucesso do tratamento.

Todos os pacientes antes de receberem os implantes de microesferas nos dentes em questão, tiveram como tratamento inicial a tentativa de recuperação através do tratamento com hidróxido de cálcio, já citado na literatura como melhor possibilidade frente aos casos de grandes perdas dentinárias e proximidade a polpa.

Os casos onde ocorreram negativa quanto ao tratamento com hidróxido de cálcio foram encaminhados para o implante com microesferas com medicamento.

A dentina é sensível a estímulos diversos, como calor, frio, ácidos e traumatismos. Como o número de fibras nervosas que nela penetram é pequeno e restrito a 1/3 profundo (pulpar), há quem admita que a sensibilidade dentinária seja mais devida a um mecanismo hidrodinâmico do fluido contido no canalículo dentinário. De acordo com esta teoria movimentos de fluidos estimulariam as terminações nervosas localizadas nos canalículos e em torno dos odontoblastos. Qualquer que seja o estímulo recebido pela dentina, a sensação percebida será uma sensação dolorosa.

Portanto se faz necessário um material que consiga aliar estas necessidades, além de possuir uma estrutura que promova a resistência à mastigação.

O tratamento por meio de capeamento pulpar direto deve não somente induzir a formação de tecido calcificado sobre a área amputada, mas também manter a polpa vital e saudável. Para tanto, é necessário a utilização de um agente que promova a regeneração pulpar e estimule a formação de dentina, sem causar um trauma que possa suprimir a atividade celular, causando a interrupção de seus processos vitais, como a síntese protéica e a respiração, o que ocasiona a necrose do tecido pulpar remanescente.

Em seu estudo, NAKASHIMA (1990) observou a permanência de inflamação pulpar no período de até uma semana após o emprego da BMP como agente capeador. LIANJIA (1993)

reportaram que após uma semana todas as polpas capeadas com BMP apresentavam sinais de inflamação, e diversos pedaços desta proteína ainda podiam ser observados. Após duas semanas, a BMP havia sido totalmente reabsorvida e o tecido pulpar estava livre de inflamação. JEPSEN (1997) também evidenciaram a presença de infiltrado inflamatório durante o processo de formação de tecido dentinário induzido pela BMP.

Assim, apesar de ser considerada um agente capeador biológico, a BMP parece induzir um trauma no tecido pulpar nos estágios iniciais. Outrossim, na ausência de infecção a polpa se restabelece e fica em condições apropriadas para iniciar o processo de reparo.

A avaliação do material se deu através de um questionário feito aos pacientes que foram traduzidas nas tabelas 1, 2, 3 (anexo III) bem como pelo exame radiográfico bimestral (anexo IV).

Pacientes com oito meses do implante já demonstraram pequeno aumento da lâmina de dentina que separa a polpa, vale a observação que diferente dos coelhos, o crescimento da dentina em humanos é bem mais lento. Tomando como base o tecido ósseo nos casos de exodontia, o reparo é considerado completo quando o alvéolo apresenta-se preenchido por trabéculas ósseas espessas, com pequenos espaços medulares e com a crista alveolar remodelada, o que leva cerca de 21 dias nos coelhos, 48 dias nos cães e 64 dias na espécie humana (CARVALHO & MARTINS, 1987).

A princípio é preciso considerar que o surgimento da dor é sempre em seqüência a um envolvimento inflamatório agudo sediado em alguma parte ou todo tecido conjuntivo do órgão dental (polpa). Nos casos onde foi implantado as microesferas com BMP, 100% não apresentaram dor pós-implante e tiveram função mastigatória normal.

Foram realizados diversos testes pra verificar a efetividade do implante. Segue abaixo a discussão dos resultados dos mesmos.

Na palpação realizada intrabucalmente, pressionando o dedo indicador contra a gengiva, nas circunvizinhanças da região periapical do dente implantado, não foi detectado tumefações endurecidas ou amolecidas, e extrabucalmente, a palpação não demonstrou nenhuma flutuação ou abscesso exteriorizado. Um dos pacientes apresentou dor a palpação após dez dias do implante em função do mesmo apresentar uma pulpíte em relação a um problema periodontal.

Frente ao teste de mobilidade dental, os dentes implantados não apresentaram movimentação no sentido vestibulo-lingual ou palatino, pois havendo mobilidade está abalado o sistema de sustentação dental.

Na percussão vertical, através de leves batidas de um instrumento metálico na coroa dental no sentido do longo eixo do dente, permitindo verificar se a presença da dor está relacionada a eventos inflamatórios sediados ao redor do periápice, aconteceram 3 casos nos primeiros 30 dias sendo que após os 60 dias a sintomatologia desapareceu, provavelmente em função da reação tecidual frente aos implantes.

Com relação aos testes térmicos que envolvem a aplicação de frio e calor sobre a estrutura dental na expectativa de que o mesmo se transfira para polpa, a fim de determinar, pela resposta dolorosa e o grau de comprometimento inflamatório deste tecido conjuntivo, o material se mostrou eficiente, 100% dos pacientes apresentaram condições de vitalidade pulpar e normalidade frente aos estímulos térmicos.

O teste térmico sempre deve ser realizado comparativamente entre a polpa do dente doente com outra supostamente normal. Como norma, uma polpa normal reage quando provocada dentro de curto período de tempo, em contraposição àquelas inflamadas, cujas respostas se faz dolorosamente; as polpas necrosadas quase nunca acusam a agressão, dentro do grupo de pacientes apenas um apresentou dor após 60 dias frente ao estímulo de frio, detectado em função de uma retração gengival grande em relação ao dente tratado.

Com relação ao exame radiográfico verifica-se que a cárie dentária estimula a formação de dentina secundária na superfície da parede pulpar situada diretamente abaixo daquela. Se o

processo carioso progride com lentidão, a deposição de dentina secundária pode, em uma certa medida, manter um ritmo igual com seu avanço e, portanto, evitar a exposição da polpa dentária.

A radiografia é importante porque revela a extensão da formação de dentina secundária e a quantidade e espessura de dentina que separa a polpa da lesão cariosa, freqüentemente se encontrará uma cárie muito extensa que seja suscetível de ser reparada com um tratamento que não exponha a polpa ou que não necessite recorrer a terapia endodôntica, como verifica-se no caso da utilização das microesferas de PLLA com BMP.

A deposição de dentina secundária em grau variável continua depois da inserção de um material restaurador, e na radiografia isto é comumente evidenciado pela obliteração dos cornos pulpaes dos molares (Figura 4.19).



**Figura 4.19** Radiografia periapical mostrando aumento da massa dentinária sobre a polpa. Evolução bimestral.

Esta deposição da dentina pode ser o resultado dos procedimentos operatórios para inserção da restauração em um dente com vitalidade e também do estímulo promovido pelas microesferas com medicamento.

Verifica-se que com oito meses do implante já se percebe lamina de dentina mesmo onde ocorreu exposição pulpar (Figura 4.13).

Como comentado anteriormente, a cinética de formação óssea varia de animal para animal e seguramente a de dentina também para a espécie humana, por isso o estudo *in vitro* e *in vivo* em animais fornece dados aproximados quando se compara com os casos de implantes em seres humanos, onde se avaliam apenas os dados radiográficos.

Para a formação de tecido dentinário ocorrer, a BMP deve estar imobilizada no sítio de ação durante um período de tempo suficiente para influenciar a resposta pulpar. Tem sido relatado que quando empregada sem qualquer tipo de carreador, uma grande quantidade de BMP é necessária para uma adequada formação óssea ser alcançada (NILSSON, 1986), e nosso caso com o uso do PLLA isto não ocorreu. Além disto, a BMP purificada mostrou alta solubilidade *in vivo* quando utilizada sem nenhum condutor, dispersando-se imediatamente após o implante (BESSHO, 1989). Estes achados indicam que um dos fatores a serem considerados para a obtenção do sucesso, quando do emprego desta proteína diretamente sobre o tecido pulpar é o material carreador.

Algumas propriedades devem ser consideradas para que um carreador seja considerado ideal (TORIUMI, 1991), dentre elas podemos destacar a biocompatibilidade, o caráter biorreabsorvível e sua formulação, que deve permitir ajustes de acordo com as características do local de ação. Além disto, estes devem aumentar a exposição dos tecidos à substância indutora e assegurar uma distribuição uniforme desta sobre o local onde a exposição pulpar está presente. Tem sido relatado que durante o processo de reparação dentinária, células semelhantes a fibroblastos migram para região abaixo do tecido pulpar e proliferam (JEPSEN, 1997; NAKASHIMA, 1994a, 1994b; RUTHERFORD, 1993). Assim, o carreador também deve proporcionar um sítio local conveniente para adesão das células pulpares, provendo um meio ambiente adequado para diferenciação.

Embora os estudos da degradação *in vitro*, realizados por Ceroni (CERONI, 2004), tenham mostrado que o processo de degradação das microesferas de PLLA, foi detectado após 9 semanas de degradação, o estudo da liberação de cloridrato de vancomicina em microesferas de PLLA, realizado pelo mesmo autor, através de análises cromatográficas, mostrou uma liberação expressiva do medicamento nas primeiras 48 horas, sendo que após esse período a liberação do medicamento tornou-se gradual. LI *et al.* (1999), em estudo da liberação controlada de vancomicina, verificaram a presença do antibiótico após 40 dias de estudo. Nos casos da BMP esta liberação tende a se tornar mais gradual, principalmente por se tratar de um processo de regeneração.

Segundo DASH & CUDWORTH II (1998), o processo de liberação de fármacos em polímeros bioreabsorvíveis é mais complexo, comparado à dispositivos de materiais não bioreabsorvíveis, pois a última etapa da liberação é regida pela degradação do material.

Segundo ZHANG *et al.* (1994) a cinética de liberação controlada é regida por 3 etapas: a primeira é dependente da concentração do fármaco na superfície do dispositivo, a segunda é regida por processos difusivos e a terceira pela degradação do material. Por isso para que haja uma liberação contínua do medicamento, estes mecanismos, difusão e degradação devem se sobrepor.

No estudo em questão, onde foram implantadas as microesferas de PLLA contendo BMP em dentes de coelhos e humanos, verificou-se que a resposta à inflamação que é uma resposta inespecífica do organismo a estímulos etiopáticos de natureza diversa na prática clínica, está mais frequentemente associada a traumatismos, infecções, depósitos de cristais ou de complexos antígeno-anticorpo que tem por objetivo a reparação tecidual após a lesão, que foi comprovado no estudo.

Porém em algumas situações e doenças, esta resposta inflamatória pode ser exagerada e sustentada sem qualquer benefício aparente levando a necrose do tecido, neste caso pode ser controlada graças a ação controlada da liberação do BMP.

Este controle de liberação acaba por favorecer assim a regeneração tecidual, a formação de um tecido calcificado duro em função da matriz que contém glicoproteínas e colágeno, além de cristais de hidroxiapatita; sendo que a formação deste tecido se deu em função da deposição das microesferas próximo a polpa, o que estimulou os prologamentos citoplasmático dos odontoblastos internos aos túbulos da dentina à formação do neo tecido sem porém causar tamanha inflamação que induzisse o tecido a necrose.

Estes resultados indicam que as microesferas de PLLA com medicamento apresentam um grande potencial para serem utilizadas para aplicação em questão, já que o material parece induzir a formação de uma neodentina, além de controlar a dor e processo inflamatório e manter a vitalidade pulpar.

Em relação aos pacientes tratados com microesferas de BMP mais PLLA, que sofreram exodontia em função de tratamento ortodôntico (exodontia depois de 40 dias), podemos relatar que a atividade dos odontoblastos foi aumentada devido a deposição das microesferas, levando a uma produção de dentina, também conhecida como dentina de reparação, podemos verificar na figura 4.20 que a dentina de reparação é caracterizada por canalículos tortuosos e irregulares, percebemos a mineralização da dentina originadas das microesferas que funcionam como centros iniciais de nucleação, sobre estas ocorre uma continua deposição de cristais de hidroxiapatita, demonstrando o crescimento de uma neodentina, já verificado anteriormente apenas com a radiologia.

No dente humano preparado pode ser observado a junção amelodentinária, percebemos também prismas em corte transversal e longitudinal, indicando as bandas claras e escuras(bandas de Hunter-Schreger), além da dentina neoformada, vide fotomicrografia abaixo (figura 4.20).



**Figura 4.20.** Fotomicrografia de um corte transversal de um dente humano com PLLA contendo BMP após 40 dias. Observa-se que ocorreu a regeneração parcial da dentina como apresentado nos casos anteriores. Verifica-se claramente os prismas em corte transversal e longitudinal, indicando as bandas claras e escuras(bandas de Hunter-Schreger), além da dentina neoformada, Hematoxilina Eosina aumento 100x.

## **Capítulo 5**

### **Conclusões e Sugestões para Próximos Trabalhos**

Com o estudo dos implantes de microesferas de PLLA com BMP em coelhos, verificou-se que nos primeiros vinte dias o material apresentava-se em processo de degradação e com invasão de tecido dentinário, após quarenta dias este processo já se mostrava bastante avançado, a calcificação da dentina já aparece em processo, sendo que as lacunas deixadas são principalmente pelo processo de formação da neo dentina através de áreas interglobulares e após sessenta dias o tecido já apresentava normalidade com a formação de todas as estruturas dentais, principalmente entre o esmalte e a dentina. Em nenhuma das fases estudadas ocorreu processo inflamatório ou infeccioso que pudesse comprometer a vitalidade pulpar. Apesar dos tempos de regeneração diferenciados em coelhos (em torno de 3 vezes mais rápido) e humanos parece licito afirmar que os dados aqui apresentados podem ser extrapolados para os casos em humanos.

Em humanos, as microesferas com BMP se mostraram efetivas, principalmente no que diz respeito ao controle do processo inflamatório e ao controle da dor, bem como a manutenção da vitalidade pulpar e produção de dentina de reparação.

A função de mastigação também foi comprovada no estudo demonstrando que as microesferas com medicamento também são eficazes no que diz respeito à função estrutural funcional.

Nos casos mais avançados em humanos (oito meses) ocorreu a formação de dentina sobre a polpa o que comprova sua regeneração.

As microesferas de PLLA com BMP apresentam grande potencial para ser utilizado no tratamento da perda do tecido dental, já que o material induz a formação de uma neodentina.

As microesferas de PLLA com BMP também se mostram interessantes no tratamento com implantes metálicos, sendo possível a sua utilização em conjunto na loja óssea formada, sugestão para um trabalho futuro.

## Capítulo 6

### Referências Bibliográficas

Ali, S. A. M.; Doherty, P. J.; Williams, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices, 2. Poly (DL-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.1409-1418, 1993.

Akeson, W. H.; Woo, S. L. Y.; Coutts, R. D.; Matthews, J. V.; Gonçalves, M. Quantitative histological evaluation of early fracture healing of cortical bones immobilized by stainless steel and composite plates. *Calcif. Tissue Res.*, v.19, p.27-37, 1975.

Barbosa, C. A.; Gonçalves, R. B.; Siqueira Junior, J. F.; Uzeda, M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod*, v.23, n.5, p.297-300, May 1997.

Barrows, T. H. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin. Mater*, v.1, p.233-257, 1986.

Bekke, J. H.; Toth, J. M. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, v.43, p.380-398, 1998.

Bessho, K. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res*, v.70, n.3, p.171-175, 1991.

- Bessho, K. Purification of bone morphogenetic protein derived from bone matrix. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, v.165, n.2, p.595-601, 1989.
- Black, C. M.; Paliescheskey, M.; Beaman, B. L. Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by *Nocardia* asteroid. *J. Infect. Dis.*, v.154, n.6, p.952-958, 1986.
- Böstman, O. M. Current concepts review, absorbable implants for the fixation of fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.73-A, n.1, p.148-153, 1991.
- Böstman, O. M.; Päivärinta, V.; Partio, E.; Manninen, M. J.; Vasenius, J.; Majola, A.; Rokkanen, P. The tissue-implant interface during degradation of absorbable polyglycolide fracture fixation in the rabbit femur. *Clin. Orthop. and Related Research*, v.285, p. 263-272, 1992.a.
- Böstman, O. M.; Päivärinta, V.; Manninen, M. J.; Rokkanen, P. Polymeric debris from absorbable polyglycolide screws and pins. *Acta Orthop. Scand.*; v.63, n.5, p.555-559, 1992.b.
- Bradley, G. W.; Mackenna, G. B.; Dunn, H. K.; Daniels, A. V. Effects of flexural rigidity of plates on bone healing. *J. Bone Joint Surg.*, v.61, p.866-872, 1979.
- Bramante, C. M. Tratamento de perfurações radiculares com pasta de hidróxido de cálcio e iodofórmio: influência do período de troca – estudo histológico em dentes de cães. Bauru: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1980. 30f. Tese (Livre – Docência).
- Brittain, H. G. Particle-Size Distribution, Part I Representations of Particle Shape, Size, and Distribution December 2001. Reprinted from Pharmaceutical Technology North America Disponível em <http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/KBPD?OpenForm&Count=100&PDLINK=Mas tersizer+2000>. Acesso em: 01/07/2008.

- Campos Jr, A. Fundamentos de uso de produtos regenerativos para periodontia e implantodontia. *Künzel Brasil*, disponível em <http://kunzel.com.br/kunzel/download/fundamentos.pdf>.
- Carvalho, C. L.; Martins, E. M. O significado da saúde e da doença na sociedade. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento de Recursos Humanos para o SUS, v.1, p.91-114, 1998.
- Ceroni Filho, A. S. *Obtenção, Caracterização e Estudo In Vitro de Microesferas de PLLA e da blenda PLLA/PEO para Liberação Controlada do Cloridrato de Vancomicina*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 95p. Tese (Mestrado).
- Chung, I. H.; Chong, P. H.; Kang, Y. H.; Chung, J. H.; Chong, Y. H.. Regulating the role of bone Morphogenetic Protein 4 in tooth bioengineering. *Rev J Oral and Maxillafacial Surgenos*, n.65, p.501-507, 2007.
- Cohen, J.; Wulf, F. J. Clinical failure caused by corrosion of a vitallium plate. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.54, p.617, 1972.
- Cutright, D. E.; Hunsuck, E. E.; Beasley, J. D. Fracture reduction using a biodegradable material, polylactic acid. *J. Oral Surg.*, v.29, p.393-397, 1971.
- Dash, A. K., Cutworth II, G. C. Therapeutic, Application of Implantable Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.40, n.1, p.1-12, 1998.
- Duailibi, M. T.; Duailibi, S. E.; Young, C. S.; Bartlett, J. D.; Vacanti, J. P.; Yelick, P. C. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells, *J Dent Res*, v.83, n.7, p.523-528, 2004.
- Duek, E. A. R.; Zavaglia, C. A. C.; Belangero, W. D. In vitro study of poly (lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v.40, p.64-65, 1999.

- Dumitriu, S.; Popa, M.; Dumitriu, M. Polymeric biomaterials as enzyme and drug carries. III. Polymeric drugs and polymeric delivery systems. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.4, p.57-73, 1989.
- Domb, A. J.; Amsalem, S.; Langer, R.; Maniar, M. *Polyanhydrides as carriers of drugs*. In: Shalaby SW, editor. Biomedical polymers Designed to degrade systems, New York, Hanser, p.69-96, 1994.
- Enink, M. J. PHD Thesis Twente University, 1987.
- Gonçalves, E. A. L.; Guimarães, S. A. C.; Garcia, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Rev Odontol Univ São Paulo*, v.12, n.3, p.299-304, jul-set, 1998.
- Holland, R.; Souza, V.; Nery, M. J.; Otobony Filho, J. A.; Barnabé P. F.; Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implamed dentin tubes filled with min aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*, v.25, n.3, p.161-166, Mar. 1999.
- Ikada, Y. Periodontium regenerierend Materialien S. Gen (G-C Dental Industrial Corp) Offenlegungsschrift DE, Al date of filing, Aug. 1989.
- Jain, A. R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-coglycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v.21, p.2475-2490, 2000.
- Jalil, R.; Nixon, J. R. Biodegradable poly (lactide acid) and poly (lactide acid-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release proprieties. *Journal of Microencapsulation*, v.7, p.297-325, 1990.
- Jespen, S. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J. Endod*, v.23, n.6, p.376-382.

- Kirker-Head, C. A. Recombinant bone morphogenetic proteins: novel substances for enhancing bone healing. *Veterinary Surg*, v.24, p.408-419, 1995.
- Kokubo, S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials*, v.24, p.1643-1651, 2003.
- Kost, J. Polymeric controlled Drug Delivery Systems. *Israel Journal of Technology*, v.24, p.653-660, 1988.
- Kulkarni, R. K.; Pani, K. C.; Neuman, C.; Leonard, F. Polylactid acid for surgical implants. *Arch. Surg.*, v.93, p.839-843, 1966.
- Kumar, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3, n.2, p.234-258, 2000.
- Kumta, S. M.; Spinner, R.; Leung, P. C. Absorbable intramedullary implants for had fractures, Animal experiments and clinical trial. *The J. of Bone and Joint Surg*, v.743, n.4, p. 563-1992.
- Lam, K. H.; Nieuwenhuis, P.; Molenaar, I.; Esselbrugge, H.; Feijen, J.; Dijkstra, P. J.; Schakeraad, J. M. Biodegradation of porous versus non porous poly(L-lactic acid) films, *J. of Mater. Sci.: Mater, in Med.*, v.5, p. 181-189, 1994.
- Lam, K. H.; Schakenraad, J. M.; Esselbrugge, H.; Feijen, J.; Nieuwenhuis, P. The effect of phagocytosis of poly (L-lactic acid) fragments on cellular morphology and viability, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.1569-1577, 1993.
- Langer, R. Polymers in controlled release system. *IBC Paper*, v.1, p.1-24, 1989.
- Langer, R. S.; Peppas, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, v.2, n.4, p.201-214, 1981.

- Langer, R.; Folkman, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules, *Nature*, 463, p.797-800, 1976 In DUMITRIU, S.; DUMITRIU, M. Polymeric Drug Carriers. In Severian Dumitriu, Polymeric Biomaterials (Ed). By Severian Dumitriu v.14, p.435-724, 1993.
- Lantz, B; Persson, P. A. Periodontal tissue reactions after perforations in dogs teeth: a histological study. *Odontol TIDSKR*, v.75, n.3, p.209-237, June, 1967.
- Lee, S. L.; Monsef, M.; Torabinejad, M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforation. *J. Endod*, v.19, n.11, p.541-544, Nov. 1993.
- Leenslag, J. W.; Pennings, A. J.; Bos, R. R. M.; Rozema, F. R.; Boering, G. Resorbable materials of poly (L-lactide). VI. Plates and Screws for internal fracture fixation. *Biomaterials*, v.8, p.70-73, 1987.
- Lewis, D. H. *Controlled release of biologically active from lactide/glycolide polymers*. In: Chasen M.; Langer editors. Biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker, p.1-41, 1990.
- Li, S. M.; Garreau, H.; Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly ( $\alpha$ -hydroxy acids) in aqueous media. Part 2: degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *J. Mater. Sci: Mater In Med.*, v.1, p.131, 1990.
- Lianjia, Y. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clin Orthop*, v.295, p.305-312, 1993.
- Lieberman, J. R.; Daluiski, A.; Einhorn, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone J Surgery*, v.84A, n.6, p.1032-1044, 2002.

- Lopes, H. P.; Siqueira Jr. J. F. *Endodontia – Biologia e técnica*. 1.ed. Rio de Janeiro; Medici 1999, 650p.
- Lyons, K. M. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein - 2<sup>a</sup> (BMP-2A). *Development*, v.109, n.4, p.833-844, 1990.
- Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Baran, E. T.; Reis, L. R. Drug delivery therapies II. Strategies for delivering bone regenerating factors. *Materials Science*, v.6, p.297-312, 2002.
- Manninen, M. J.; Päivärinta, U.; Taurio, U.; Törmälä, P. Polylactide screws in the fixation of olecranon osteotomies. *Acta Orthop. Scand.*, v.63, n.4, p.437, 1992.
- Manolagas, S. C.; Jilka, R. L. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *New Engl J Med.*, v.332, n.5, p.305-311, 1995.
- Meachim, G.; Pedley, R. B. The tissue response at implant sites. *Fundamental Aspects of Biocompatibility*, v.1, p.107-144, 1981.
- Meachim, G.; Williams, D. F. Changes in monosseous tissue adjacent sites. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981.
- Middleton, J. C.; Tipton, A. J. Synthetic Biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.20, p.2335-2346, 2000.
- Miyamoto, S.; Takaoka, K.; Okada, T.; Yoshikawa, H.; Hashimoto, J.; Suzuki, S.; Ono, K. Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer, *Clin Orthop. and Related Research*, v.294, p. 333, 1993.
- Nakamura, S.; Ninomija, S.; Takatori, Y.; Morimoto, S.; Kusaba, I.; Kurokawa, T. Polylactide screws in acetabulat osteotomy, *Acta Orthop. Scand.*, v.64, n.3, p. 301, 1993.

- Nakashima, M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic proteins. *Archs Oral Biol*, v.35, n.7, p.493-497, 1990.
- Nakashima, M. Mitogenetic and dentin-inductive of crube bone morphologic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.73, n.4, p.484-489, 1992.
- Nakashima, M. Induction of dentin formation on canine amputation pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and 4. *J. Dent Res*, v.73, n.9, p.1515-1522, 1994a.
- Nakashima, M. Induction of dentin in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins -2 and -4 with collagen matrix. *Arche Oral Biol*, v.39, n.12, p.1085-1089, 1994b.
- Nakashima, M. Transforming growth factor- $\beta$  superfamily members expressed in rat incisor pulp. *Arche Oral Biol*, v.43, n.9, p.745-751, 1998.
- Newbrun, E. *Cariologia 2<sup>a</sup>* ed. Santos Editora, 1988. Cap.1: História e Teorias Iniciais Sobre a Etiologia das Cáries, p.1-16.
- Nijenhuis, A. J.; Colstee, E.; Grijpma, D. W.; Pennings, A. J. High molecular weight Poly (L-lactide) and poly (ethylene oxide) blends: thermal characterization and physical proprieties. *Polymer*, v.37, n.26, p.5849-5857, 1996.
- Nilsson, O. S. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in limiar defects in dogs. *J. Bone Joint Surg.*, v. 68, n.4, p.635-642, 1988.
- Odian, G. Principles of polimerization. *Wiley Interscience*, 2<sup>a</sup>edition, New York, 1981.

- Piattelli, A.; Scarano, A.; Russo, P.; Matarasso, A. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia bioresorbable and non-resorbable membranes, *Biomaterials*, v.17, n.8, p.791-796, 1996.
- Pihlajamäki, H.; Böstman, O.; Hirvensalo, E.; Törmälä, P.; Rokkanen, P. Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies, *The J. of Bone and Joint Surg.*, v.748, n.6, p. 853, 1992.
- Pineda, L. M.; Büsing, M.; Meinig, R. P.; Gogolewski, S. Bone regeneration with resorbable polymeric membrane. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, p. 385-394, 1996.
- Pistner, H.; Bendix D. R.; Muehling, J.; Reuther, J. F. Poly (L-lactide): a long term degradation study in vivo. *Biomaterials*, v.14, p.291-298, 1992.
- Rengachary, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, v.13, n.6, p.1-6, 2002.
- Ribeiro, F. C.; Roldi, A.; Pereira, R. S.; Intra, J. B. G.; Adão, A. S.; Rody, M. B. Z. Clinical and radiographic feature of teeth with therapy – resistant periapical lesions retrofilled with mineral trioxide aggregate – MTA. *UFES Rev Odontol*, v.3, n.2, p.40-51, Jul.-Dez. 2001.
- Robert, P.; Mauduit, J.; Frank, R. M.; Vert, M. Biocompatibility and resorbability of a polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration, *Biomaterials*, v.14, n.5, p. 353, 1993.
- Rozema F. R.; Boering, G. *Biomaterials*, v.12, p.32, 1991.
- Ruan, G. F.; Feng, S. S.; Li, Q. T. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. *Journal of Controlled Release*, v.84, p.151-160, 2002.

Rutherford, R. B. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Archs Oral Biol*, v.38, n.7, p.571-576, 1993.

Rutherford, R. B.; Charete, M.; Rueger, D. Role of osteogenic (bone morfogenetic) protein and platelet-derived growth factor in periodontal wound healing. In: Genko, R. et al. *Molecular basis of periodontal disease*. Whashington: American Society for Microbiology, v.34, p.427-437, 1994.

Schaldach, M. *Cardiologia cirurgica perspectivas para o ano 2000*. Biomateriais – Cap.3, 2000.

Shabahang, S.; Torabinejad, M.; Boyne, P. P.; Abedi, H.; McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, ca hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J. Endod*, v.25, n.1, p.1-5, Jan. 1999.

Silva, C. F.; Madison, R.; Dikkes, P; Chiu, T.; Sidman, R. L. An In Vivo Model to Quantify Motor and Sensory Peripheral Nerve Regeneration Using Bioresorbable Nerve Guide Tubes, *Brain Research*, n. 342, p.307-315, 1985.

Soares, I. M. L. *Resposta pulpar ao MTA – agregado de trióxido mineral – comparada ao hidróxido de cálcio, em pulpotomias: histológico em dentes de cães*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. 74p. Tese (Doutorado).

Solheim, E. Growth factors in bone. *Int Orthop*, v.22, p.410-416, 1998.

Steinhauser, E. Unterkieferre-Konstrution durch intraorale Knochentrans-plantate, deren Eunheilung und Beeinflus-sung durch die Kunktion-Eine tierex perimentelle Studie, Teil 1. *Schwiz Mschr Zanheilk*, v.78, p.213, 1968.a.

Steinhauser, E. Unterkieferre-Konstrution durch intraorale Knochentrans-plantate, deren Eunheilung und Beeinflus-sung durch die Kunktion-Eine tierex perimentelle Studie, Teil 2. *Schwiz Mschr Zanheilk*, v.78, p.375, 1968.b.

- Stephan, R. M. Changes in the hydrogen ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. *JADA*, v.27, p.718, 1940.
- Thull, R.; Schaldach, M. Physikalisch-chemische Aspekte chirurgischer Metallimplantate. *Fortschritte der Kiefer-und Gesicht Chirurgie*, Bd XIX (Ed. K. Schuchardt) p.56-59, Germany, 1975.
- Torabinejad, M.; Hong, C. U.; Lee, S. J.; Monsef, M.; Pitt Ford, T. R. Investigation of Mineral Trioxide Aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*, v.21, n.12, p.603-307, Dec. 1995.a.
- Torabinejad, M.; Hong, C. U.; Pitt Ford, T. R.; Kettering, J. D. Antibacterial effects of some root endo filling materials. *J. Endod*, v.21, n.8, p.403-406, Aug. 1995.b.
- Torabinejad, M.; Pitt Ford, T. R.; McKendry, D. J.; Abed, H. R.; Miller, D. A. Kariyawan histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*, v.23, n.4, p.225-228, Apr. 1997.
- Torabinejad, M.; Chivan, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J. Endod*, v.25, n.3, p.197-205, Mar. 1999.
- Toriumi, D. M. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional histologic and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v.117, n.10, p.1101-1112, 1991.
- Tormala, P.; Vainionpaa, S.; Kilpikari, J.; Rokkanen, P. The effects of fibre reinforcement and gold plating on the flexural and tensile strength of PGA/PLA copolymer materials in vitro. *Biomaterials*, v.8, p.42, 1987.
- Tormala, P.; Vasenius, J.; Vainionpaa, S.; Laiho, J.; Pohjomen, T.; Rokkanen, P. Ultra-high-strength absorbable self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) composite rods for internal

fixation of bone fractures: in vitro and in vivo study, *J. Biomed. Mater. Res.* V.25, p.1, 1991.

Trippel, S. B.; Coutts, R. D.; Einhorn, T. A.; Mundy, G. R.; Rosenfeld, R. G. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg Am*, v.78, p.1272-1286, 1996.

Urist, M. R. Bone formation by autoinduction. *Science*, v.150, n.3, p.893-899, 1965.

Vanio, S. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*, v.75, n.1, p.45-58, 1993.

Vainiopaa, S.; Kilpikari, J.; Laiho, J.; Helevirta, P.; Rokkanen, P.; Tormala, P. Strength and strength retention in vitro, of absorbable, self-reinforced polyglycolide (PGA) rods for fracture fixation, *Biomaterials*, v.8, p. 46, 1987.

Vert, M.; Schwach, G.; Coudane, J. Present and future of PLLA polymers. *J. Mater. Sc. Pure Appl. Chem.*, v.32, p.593-597, 1995.

Wang, E. A. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci*, v.87, n.6, p.2220-2224, 1990.

Weiler, W.; Gogolewoki, S. Enhancement of the mechanical properties of polylactides by solid-state extrusion. *Biomaterials*, v.17, p.529-535, 1996.

Wozney, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, v.32, n.2, p.160-167, 1992.

Wozney, J. M. The bone morphogenetic protein family; multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci*, v.106, suppl.1, p.156-159, 1998.

- Wu, X. S. Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise *et al.*, editors Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. New York: Marcel Dekker. 1015-1054, 1995.
- Yamada, T.; Carlsson, J. The role of pyruvate formate-lyase in glucose metabolism of *Streptococcus mutans*. *Sp. Suppl. Microbiol. Abstr.*, v.3, p.809-819, 1976.
- Yang, Y. Y.; Chung, T. S. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, v.22, p.231-241, 2001.
- Zellin, G.; Gritli-Linde, A.; Linde, A. Healing of mandibular defects with different biodegradable membranes: an experiment study in rats. *Biomaterials*, v.16, n.8, p. 601-609, 1995.
- Zhang, Y. Z. Dental disease of Neolithic age skulls excavated in Shaanxi Province. *Chinese Med. J.*, v.95, p.391-396, 1982.
- Zhang, X.; Wyss, U. P.; Pichora, D.; Goosen, M. F. A Biodegradable Controlled Antibiotic Release Devices for Osteomyelitis: Optimization of release Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.46, p.718-724, 1994.
- Zislis, T.; Martin, S. A.; Cerbas, E.; Heath J. R.; Mansfield, J. L.; Hollinger, J. O. A scanning electron microscopic study of in vitro toxicity of ethylene-oxide sterilized bone repair materials. *J. Oral Implants*, v.25, p.41-46, 1989.
- Zoppi, R. A.; Duek, E. A. R.; Coraça, D. C.; Barros, P. P. Preparation and Characterization of Poly (L-Lactic Acid) and Poly (Ethylene Oxide) Blends. *Materials Research*, v.4, n.2, p.117-125, 2001.

## Anexo I

Tabela A- Diâmetros de partículas obtidos das microesferas contendo BMP, e sua porcentagem acumulada.

<b>Diâmetro</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>%</b>
48,27	0
56,23	0,02
65,51	0,07
76,32	0,25
88,91	0,79
103,58	2,07
120,67	4,66
140,58	9,21
163,77	16,27
190,80	26,01
222,28	38,20
258,95	52,16
301,68	67,28
351,46	80,12
409,45	89,58
477,01	95,85
555,71	99,19
647,41	100,0
754,23	100,0
878,67	100,0

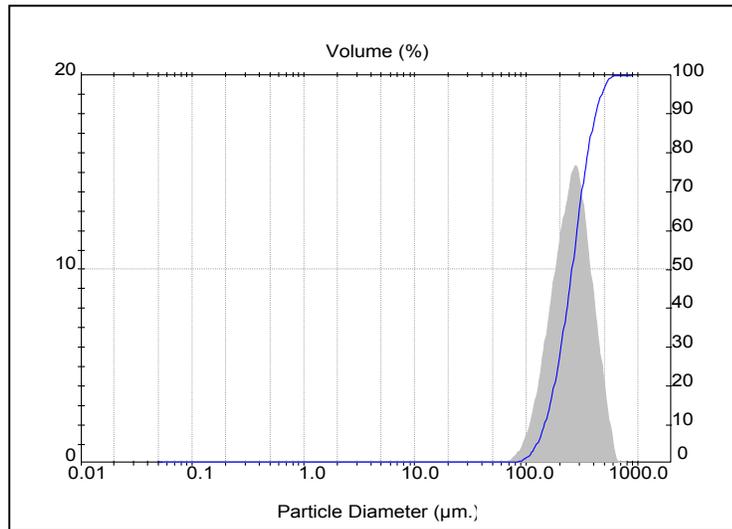
Tabela B- Fórmulas dos diâmetros médios.

	3	2	1	0
D[4,N]	$D = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$	$D = \frac{\sum d^4}{\sum d^2}$	$D = \frac{\sum d^4}{\sum d^1}$	$D = \frac{\sum d^4}{\sum d^0}$
D[3,N]	-	$D = \frac{\sum d^3}{\sum d^2}$	$D = \frac{\sum d^3}{\sum d^1}$	$D = \frac{\sum d^3}{\sum d^0}$
D[2,N]	-	-	$D = \frac{\sum d^2}{\sum d^1}$	$D = \frac{\sum d^2}{\sum d^0}$
D[1,N]	-	-	-	$D = \frac{\sum d^1}{\sum d^0}$

## Anexo II

Amostra PLLA + BMP

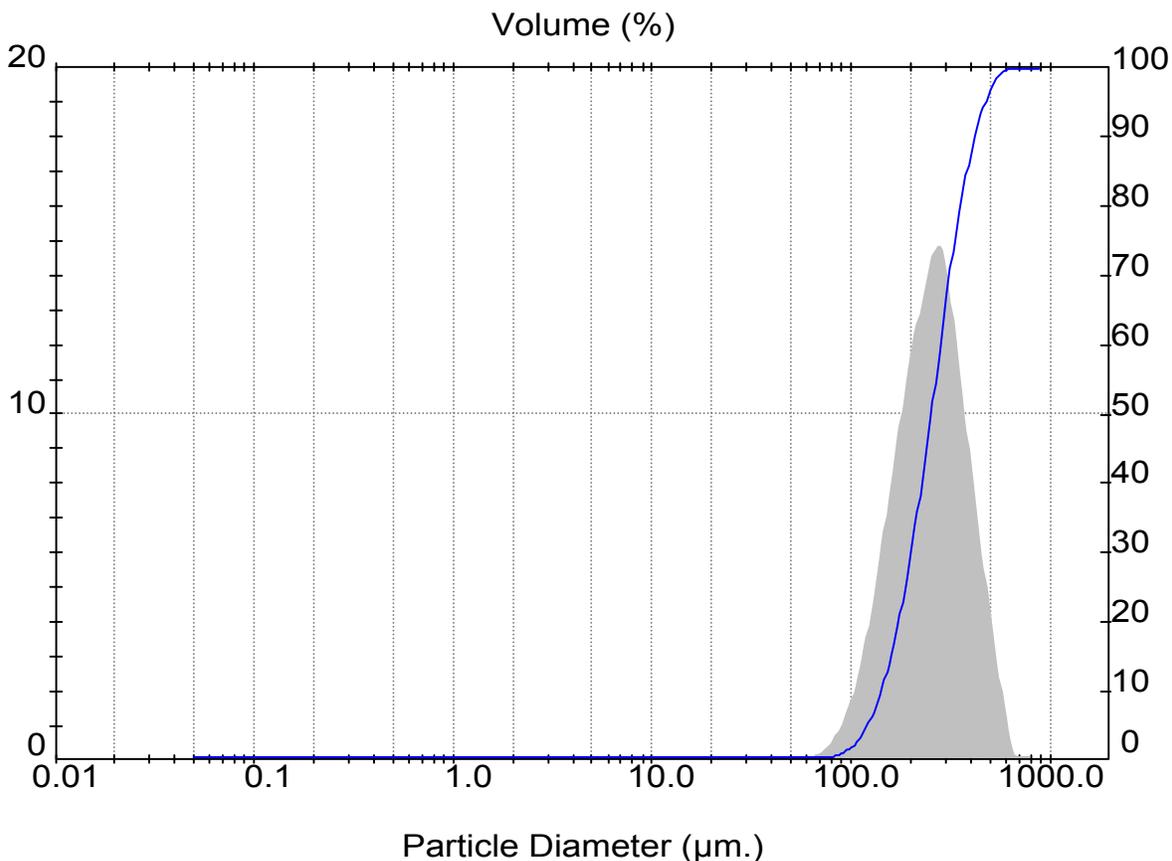
Leitura 1



Result: Analysis Table

ID: PLLA + BMP Rep.1		Run No: 1		Measured: 4/7/08 14:21			
File: 040708		Rec. No: 1		Analysed: 4/7/08 14:21			
Path: C:\USUARIOS\ALBERTO\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS14			
Presentation: 3OHD		Analysis: Polydisperse		Obs: 11.3 %			
Modifications: None				Residual: 6.284 %			
Conc. = 0.3849 %Vol		Density = 1.120 g/cm <sup>3</sup>		S.S.A = 0.0232 m <sup>2</sup> /g			
Distribution: Volume		D[4, 3] = 272.10 µm		D[3, 2] = 231.28 µm			
D(v, 0.1) = 146.45 µm		D(v, 0.5) = 258.29 µm		D(v, 0.9) = 420.51 µm			
Span = 1.061E+00		Uniformity = 3.286E-01					
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	0.00	120.67	4.22
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	0.00	140.58	8.46
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	0.00	163.77	15.13
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	0.00	190.80	24.49
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	0.00	222.28	36.38
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	0.00	258.95	50.25
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	0.00	301.68	65.56
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	0.00	351.46	78.79
0.17	0.00	2.28	0.00	30.53	0.00	409.45	88.62
0.20	0.00	2.65	0.00	35.56	0.00	477.01	95.25
0.23	0.00	3.09	0.00	41.43	0.00	555.71	98.92
0.27	0.00	3.60	0.00	48.27	0.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	0.00	56.23	0.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	0.00	65.51	0.04	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	0.00	76.32	0.20		
0.49	0.00	6.63	0.00	88.91	0.68		
0.58	0.00	7.72	0.00	103.58	1.84		

Leitura 2



Result: Analysis Table

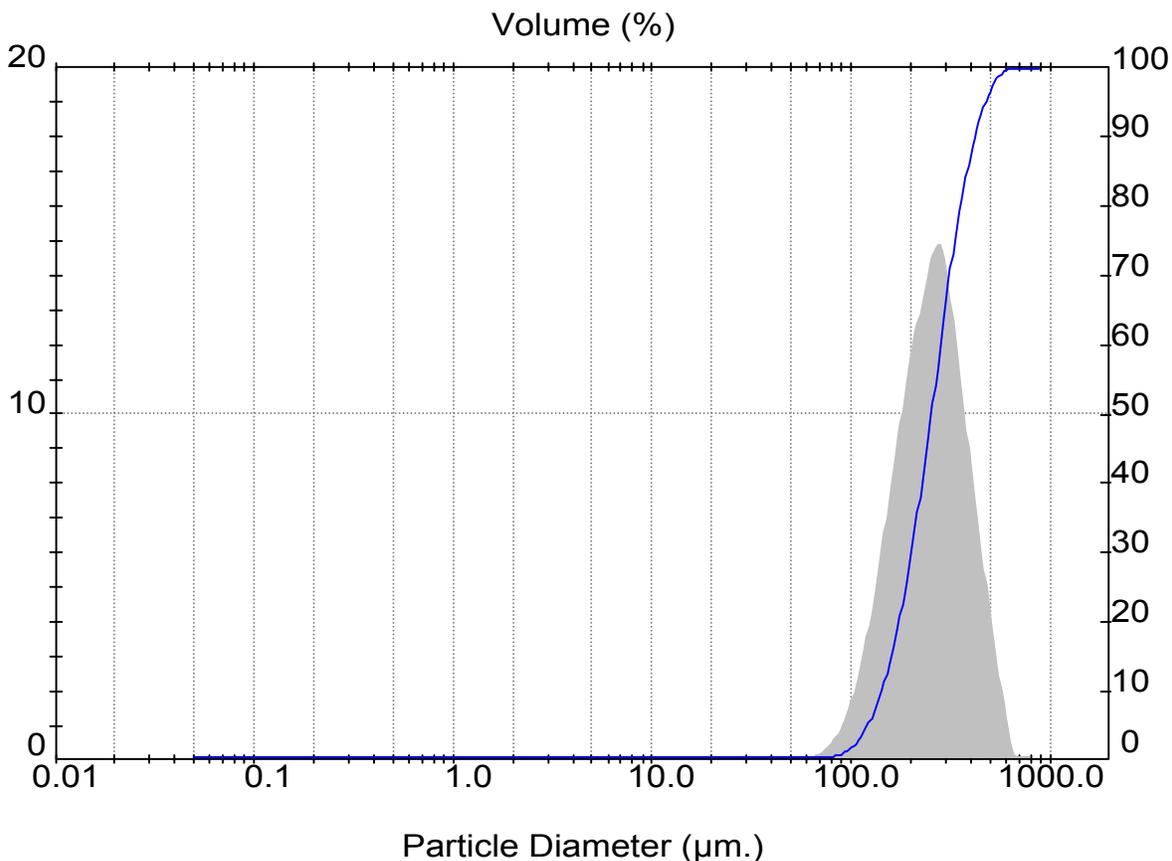
ID: PLLA + BMP Rep.1	Run No: 2	Measured: 4/7/08 14:22
File: 040708	Rec. No: 2	Analysed: 4/7/08 14:22
Path: C:\USUARIOS\ALBERTO\		Source: Analysed

Range: 300RF mm	Beam: 2.40 mm	Sampler: MS14	Obs': 10.8 %
Presentation: 3OHD	Analysis: Polydisperse		Residual: 6.072 %
Modifications: None			

Conc. = 0.3603 %Vol	Density = 1.120 g/cm <sup>3</sup>	S.S.A. = 0.0236 m <sup>2</sup> /g
Distribution: Volume	D[4, 3] = 268.99 µm	D[3, 2] = 226.80 µm
D(v, 0.1) = 142.47 µm	D(v, 0.5) = 254.16 µm	D(v, 0.9) = 419.90 µm
Span = 1.092E+00	Uniformity = 3.379E-01	

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	0.00	120.67	4.88
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	0.00	140.58	9.48
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	0.00	163.77	16.52
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	0.00	190.80	26.15
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	0.00	222.28	38.11
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	0.00	258.95	51.76
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	0.00	301.68	66.56
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	0.00	351.46	79.25
0.17	0.00	2.28	0.00	30.53	0.00	409.45	88.73
0.20	0.00	2.65	0.00	35.56	0.00	477.01	95.18
0.23	0.00	3.09	0.00	41.43	0.00	555.71	98.82
0.27	0.00	3.60	0.00	48.27	0.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	0.00	56.23	0.02	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	0.00	65.51	0.08	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	0.00	76.32	0.28		
0.49	0.00	6.63	0.00	88.91	0.87		
0.58	0.00	7.72	0.00	103.58	2.22		

Leitura 3



Result: Analysis Table

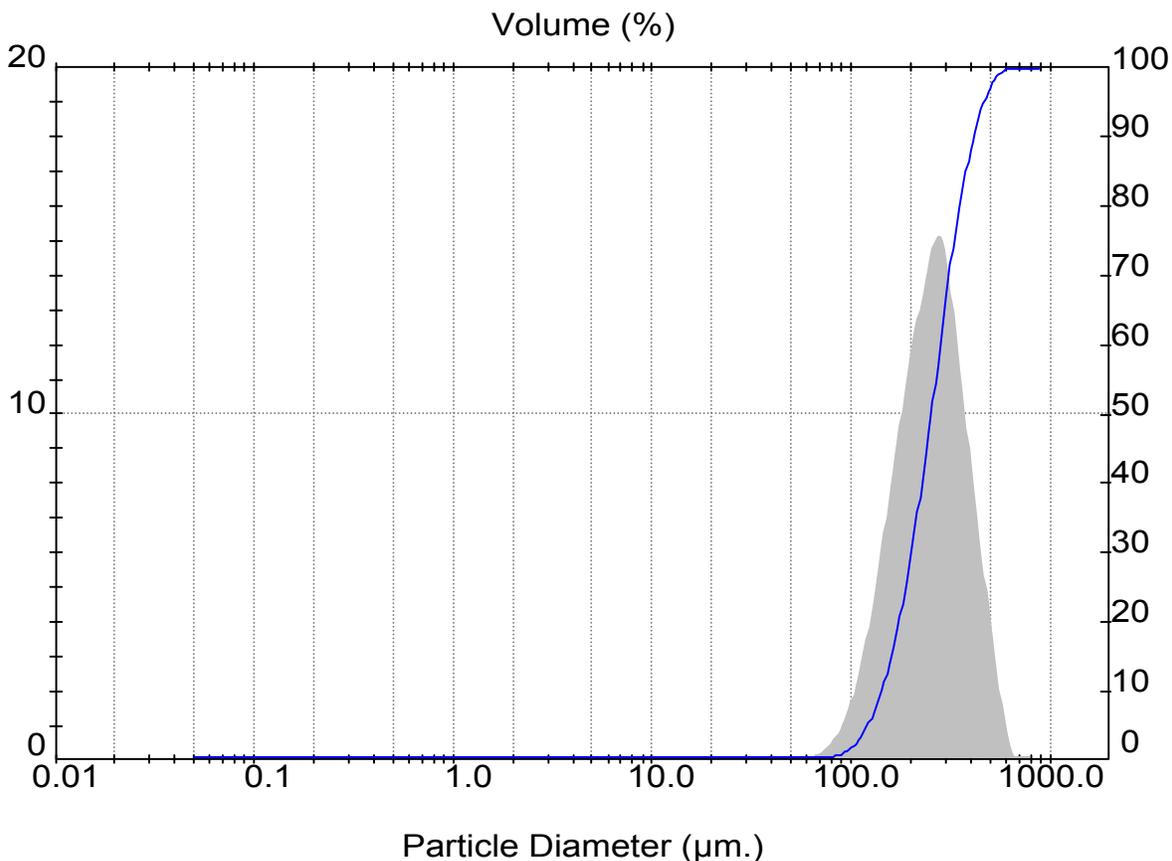
ID: PLLA + BMP Rep.1	Run No: 3	Measured: 4/7/08 14:22
File: 040708	Rec. No: 3	Analysed: 4/7/08 14:22
Path: C:\USUARIOS\ALBERTO\		Source: Analysed

Range: 300RF mm	Beam: 2.40 mm	Sampler: MS14	Obs': 11.2 %
Presentation: 3OHD	Analysis: Polydisperse		Residual: 6.119 %
Modifications: None			

Conc. = 0.3745 %Vol	Density = 1.120 g/cm <sup>3</sup>	S.S.A. = 0.0236 m <sup>2</sup> /g
Distribution: Volume	D[4, 3] = 269.61 µm	D[3, 2] = 227.46 µm
D(v, 0.1) = 143.01 µm	D(v, 0.5) = 254.67 µm	D(v, 0.9) = 420.84 µm
Span = 1.091E+00	Uniformity = 3.376E-01	

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	0.00	120.67	4.78
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	0.00	140.58	9.33
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	0.00	163.77	16.33
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	0.00	190.80	25.93
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	0.00	222.28	37.90
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	0.00	258.95	51.58
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	0.00	301.68	66.40
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	0.00	351.46	79.11
0.17	0.00	2.28	0.00	30.53	0.00	409.45	88.62
0.20	0.00	2.65	0.00	35.56	0.00	477.01	95.10
0.23	0.00	3.09	0.00	41.43	0.00	555.71	98.78
0.27	0.00	3.60	0.00	48.27	0.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	0.00	56.23	0.02	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	0.00	65.51	0.07	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	0.00	76.32	0.27		
0.49	0.00	6.63	0.00	88.91	0.84		
0.58	0.00	7.72	0.00	103.58	2.16		

Leitura 4



Result: Analysis Table

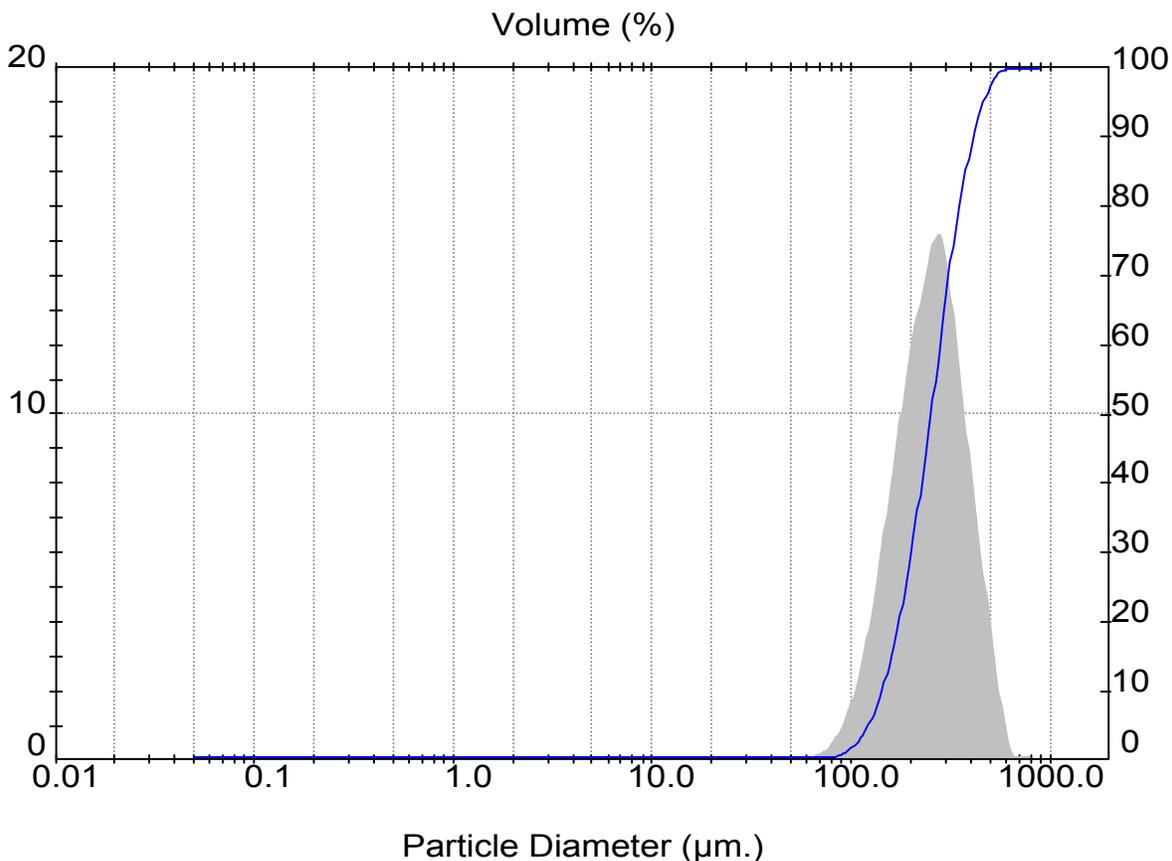
ID: PLLA + BMP Rep.1	Run No: 4	Measured: 4/7/08 14:22
File: 040708	Rec. No: 4	Analysed: 4/7/08 14:22
Path: C:\USUARIOS\ALBERTO\		Source: Analysed

Range: 300RF mm	Beam: 2.40 mm	Sampler: MS14	Obs': 10.9 %
Presentation: 3OHD	Analysis: Polydisperse		Residual: 6.160 %
Modifications: None			

Conc. = 0.3625 %Vol	Density = 1.120 g/cm <sup>3</sup>	S.S.A. = 0.0236 m <sup>2</sup> /g
Distribution: Volume	D[4, 3] = 267.70 µm	D[3, 2] = 226.79 µm
D(v, 0.1) = 143.06 µm	D(v, 0.5) = 254.13 µm	D(v, 0.9) = 414.72 µm
Span = 1.069E+00	Uniformity = 3.312E-01	

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	0.00	120.67	4.77
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	0.00	140.58	9.32
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	0.00	163.77	16.32
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	0.00	190.80	25.95
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	0.00	222.28	37.97
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	0.00	258.95	51.80
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	0.00	301.68	66.90
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	0.00	351.46	79.82
0.17	0.00	2.28	0.00	30.53	0.00	409.45	89.36
0.20	0.00	2.65	0.00	35.56	0.00	477.01	95.71
0.23	0.00	3.09	0.00	41.43	0.00	555.71	99.12
0.27	0.00	3.60	0.00	48.27	0.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	0.00	56.23	0.02	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	0.00	65.51	0.07	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	0.00	76.32	0.27		
0.49	0.00	6.63	0.00	88.91	0.84		
0.58	0.00	7.72	0.00	103.58	2.16		

Leitura 5



Result: Analysis Table

ID: PLLA + BMP Rep.1	Run No: 5	Measured: 4/7/08 14:22
File: 040708	Rec. No: 5	Analysed: 4/7/08 14:22
Path: C:\USUARIOS\ALBERTO\		Source: Analysed

Range: 300RF mm	Beam: 2.40 mm	Sampler: MS14	Obs': 10.9 %
Presentation: 3OHD	Analysis: Polydisperse		Residual: 6.036 %
Modifications: None			

Conc. = 0.3636 %Vol	Density = 1.120 g/cm <sup>3</sup>	S.S.A. = 0.0236 m <sup>2</sup> /g
Distribution: Volume	D[4, 3] = 266.92 µm	D[3, 2] = 226.64 µm
D(v, 0.1) = 143.45 µm	D(v, 0.5) = 253.23 µm	D(v, 0.9) = 412.95 µm
Span = 1.064E+00	Uniformity = 3.297E-01	

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	0.00	120.67	4.66
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	0.00	140.58	9.21
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	0.00	163.77	16.27
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	0.00	190.80	26.01
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	0.00	222.28	38.20
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	0.00	258.95	52.16
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	0.00	301.68	67.28
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	0.00	351.46	80.12
0.17	0.00	2.28	0.00	30.53	0.00	409.45	89.58
0.20	0.00	2.65	0.00	35.56	0.00	477.01	95.85
0.23	0.00	3.09	0.00	41.43	0.00	555.71	99.19
0.27	0.00	3.60	0.00	48.27	0.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	0.00	56.23	0.02	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	0.00	65.51	0.07	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	0.00	76.32	0.25		
0.49	0.00	6.63	0.00	88.91	0.79		
0.58	0.00	7.72	0.00	103.58	2.07		

## Anexo III

Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (10 dias)

PACIENTE num.	ANÁLISE PRÉ IMPLANTE										
	IDADE	PESO(Kg)	TIPO DE PATOLOGIA	ESTADO DO DENTE	FATOR CAUSADOR ETIOLOGIA	CONTAMINAÇÃO SIM / NÃO	ESTADO DA POLPA	SAÚDE GERAL	CONDIÇÃO DE APARECIMENTO DA DOR	DURAÇÃO E FREQUÊNCIA DA DOR	SEDE DA DOR
1	23	49	inflamação crônica da polpa	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
2	31	74	pulpite	cárie oclusal 2/3 da coroa	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	localizada
3	20	71	pulpite	cárie oclusal c/ exp.Pulpar	física ( amalg.) condensação	não	c/ vitalidade	hipertenso	espontânea	prolongada / contínua	localizada
4	20	57	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	localizada
5	27	65	pericementite aguda	abrasão oclusal	rangimento dos dentes	não	c/ vitalidade	problema oclusal	espontânea	prolongada / contínua	localizada
6	24	56	hiperemia pulpar	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
7	30	74	inflamação crônica da polpa	cárie oclusal c/ exp.Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
8	21	68	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
9	27	76	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
10	28	65	inflamação crônica da polpa	cárie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
11	26	62	pulpite	destruído c/ exp.Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
12	30	72	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	difusa
13	18	75	inflamação crônica da polpa	destruído c/ exp.Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	hipertenso	provocada	curta / intermitente	localizada
14	32	71	pulpite	destruído c/ exp.Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
15	33	61	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
16	27	68	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
17	28	65	inflamação crônica da polpa	cárie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
18	26	62	pulpite	destruído c/ exp.Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada /	difusa

PACIENTE num.	ANÁLISE PÓS IMPLANTE ( 10 dias )				
	TESTE DE MOBILIDADE DENTAL	PALPAÇÃO GENGIVAL	PERCUSSÃO DENTAL VERTICAL	TESTE TÉRMICO FRIO	TESTE TÉRMICO QUENTE
1	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
2	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
3	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
4	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
5	sim	s/tumefação s/dor	c/dor	c/dor	s/dor
6	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
7	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
8	não	s/tumefação s/dor	c/dor	c/dor	s/dor
9	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
10	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
11	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
12	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
13	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
14	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
15	não	c/tumefação c/dor	c/dor	c/dor	s/dor
16	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
17	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
18	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor

Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (30 dias)

PACIENTE num.	ANÁLISE PRÉ IMPLANTE										
	IDADE	PESO(Kg)	TIPO DE PATOLOGIA	ESTADO DO DENTE	FATOR CAUSADOR ETIOLOGIA	CONTAMINAÇÃO SIM / NÃO	ESTADO DA POLPA	SAÚDE GERAL	CONDIÇÃO DE APARECIMENTO DA DOR	DURAÇÃO E FREQUÊNCIA DA DOR	SEDE DA DOR
1	23	49	inflamação crônica da polpa	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
2	31	74	pulpite	cárie oclusal 2/3 da coroa	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	localizada
3	20	71	pulpite	cárie oclusal c/ exp. Pulpar	física ( amalg.) condensação	não	c/ vitalidade	hipertenso	espontânea	prolongada / contínua	localizada
4	20	57	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	localizada
5	27	65	pericementite aguda	abrasão oclusal	rangimento dos dentes	não	c/ vitalidade	problema oclusal	espontânea	prolongada / contínua	localizada
6	24	56	hiperemia pulpar	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
7	30	74	inflamação crônica da polpa	carie oclusal c/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
8	21	68	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
9	27	76	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
10	28	65	inflamação crônica da polpa	carie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
11	26	62	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
12	30	72	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	difusa
13	18	75	inflamação crônica da polpa	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	hipertenso	provocada	curta / intermitente	localizada
14	32	71	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
15	33	61	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
16	27	68	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
17	28	65	inflamação crônica da polpa	carie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
18	26	62	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada /	difusa

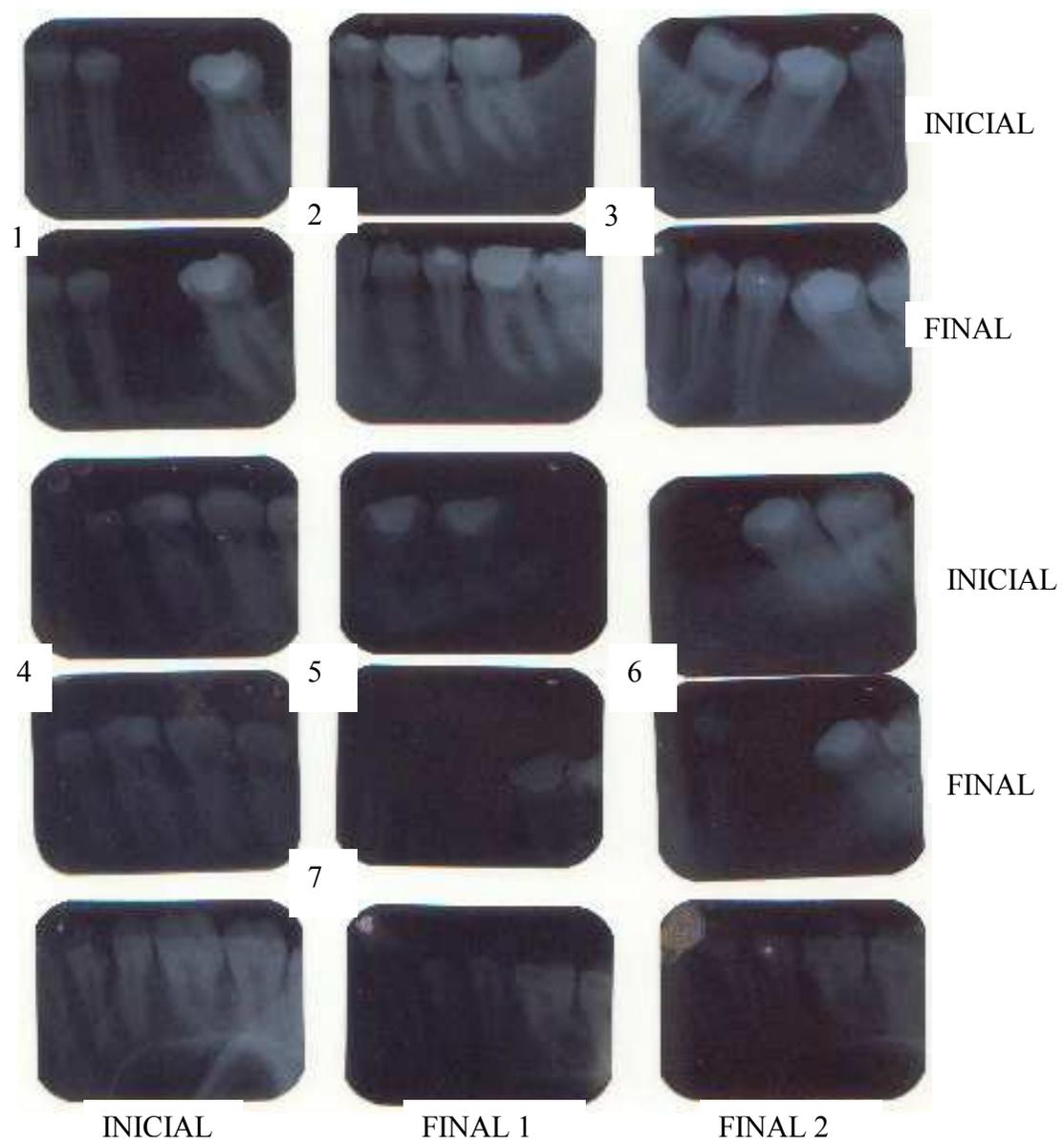
PACIENTE num.	ANÁLISE PÓS IMPLANTE ( 30 dias )				
	TESTE DE MOBILIDADE DENTAL	PALPAÇÃO GENGIVAL	PERCUSSÃO DENTAL VERTICAL	TESTE TÉRMICO FRIO	TESTE TÉRMICO QUENTE
1	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
2	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
3	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
4	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
5	não	s/tumefação s/dor	s/dor	c/dor	s/dor
6	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
7	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
8	não	s/tumefação s/dor	c/dor	s/dor	s/dor
9	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
10	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
11	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
12	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
13	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
14	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
15	não	c/tumefação s/dor	c/dor	s/dor	s/dor
16	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
17	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
18	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor

Tabela de Resultados dos Implantes de Microesferas com Medicamento (60 dias)

PACIENTE num.	ANÁLISE PRÉ IMPLANTE										
	IDADE	PESO(Kg)	TIPO DE PATOLOGIA	ESTADO DO DENTE	FATOR CAUSADOR ETIOLOGIA	CONTAMINAÇÃO SIM / NÃO	ESTADO DA POLPA	SAÚDE GERAL	CONDIÇÃO DE APARECIMENTO DA DOR	DURAÇÃO E FREQUÊNCIA DA DOR	SEDE DA DOR
1	23	49	inflamação crônica da polpa	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
2	31	74	pulpite	cárie oclusal 2/3 da coroa	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	localizada
3	20	71	pulpite	cárie oclusal c/ exp. Pulpar	física ( amalg.) condensação	não	c/ vitalidade	hipertenso	espontânea	prolongada / contínua	localizada
4	20	57	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	localizada
5	27	65	pericementite aguda	abrasão oclusal	rangimento dos dentes	não	c/ vitalidade	problema oclusal	espontânea	prolongada / contínua	localizada
6	24	56	hiperemia pulpar	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
7	30	74	inflamação crônica da polpa	carie oclusal c/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
8	21	68	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
9	27	76	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
10	28	65	inflamação crônica da polpa	carie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
11	26	62	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
12	30	72	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	diabetes	espontânea	prolongada / contínua	difusa
13	18	75	inflamação crônica da polpa	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	hipertenso	provocada	curta / intermitente	localizada
14	32	71	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
15	33	61	pupite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
16	27	68	pulpite	destruído s/ exp. Pulpar	microbiano	não	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada / contínua	difusa
17	28	65	inflamação crônica da polpa	carie oclusal 2/3 da coroa	químico( resina)	não	c/ vitalidade	boa	provocada	curta / intermitente	localizada
18	26	62	pulpite	destruído c/ exp. Pulpar	microbiano	sim	c/ vitalidade	boa	espontânea	prolongada /	difusa

PACIENTE num.	ANÁLISE PÓS IMPLANTE ( 60 dias )				
	TESTE DE MOBILIDADE DENTAL	PALPAÇÃO GENGIVAL	PERCUSSÃO DENTAL VERTICAL	TESTE TÉRMICO FRIO	TESTE TÉRMICO QUENTE
1	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
2	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
3	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
4	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
5	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
6	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
7	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
8	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
9	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
10	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
11	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
12	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
13	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
14	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
15	não	c/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
16	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
17	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor
18	não	s/tumefação s/dor	s/dor	s/dor	s/dor

**Anexo IV**



I  
N  
I  
C  
I  
A  
L  
  
F  
I  
N  
A  
L

9



10



11



12



14



13



15



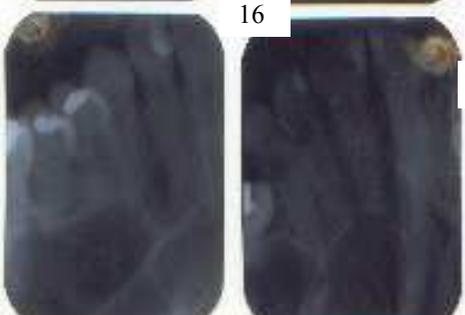
16



17



18



## **Anexo V**

Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas, número 045/2006. Disponível em: [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html).