

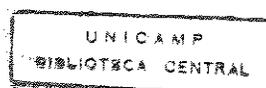
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

ENXERTO PERIOSTAL E DE HIDROXIAPATITA NO
TRATAMENTO DE FALHA ÓSSEA PRODUZIDA NA
PRÉ-MAXILA DE RATOS

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO CAMILLI

Campinas, 1999



UNIDADE BC
N.º CHAMADA: UNICAMP
63912
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 40402
PROC. 278/2000
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 17-02-00
N.º CPD _____

CM-00138022-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Caria, Paulo Henrique Ferreira

C191e Enxerto periosteal e hidroxiapatita no tratamento da falha óssea
Produzida na pré-maxila de ratos/Paulo Henrique Ferreira Caria. --
Campinas, SP: [s.n.], 1999.
90f: ilustr.

Orientador: José Ângelo Camilli
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Hidroxiapatita. 2. Enxerto periosteal. 3. Regeneração óssea. I.
Camilli, José Ângelo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SEC
PÓS-GR
L

PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

ENXERTO PERIOSTAL E HIDROXIAPATITA NO
TRATAMENTO DE FALHA ÓSSEA PRODUZIDA NA
PRÉ-MAXILA DE RATOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Paulo Henrique Ferreira Caria
e aprovada pela Comissão Julgadora.

29/11/99


Tese apresentada ao
Instituto de Biologia
para obtenção do
Título de Mestre em
Biologia Celular e
Estrutural na área de
Anatomia.

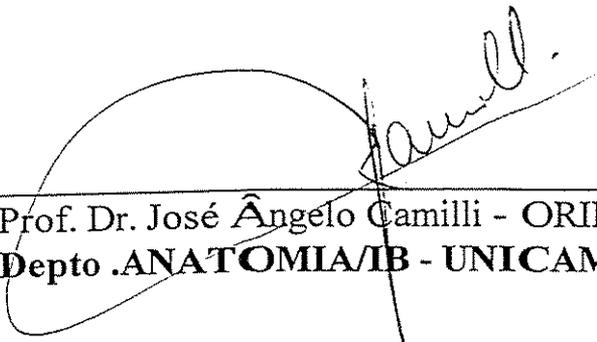
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO CAMILLI

Campinas, 1999

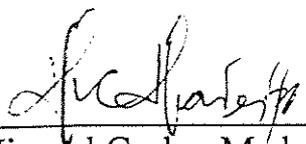
0000-2792

Defesa da tese realizada em: 29/11/1999.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Ângelo Camilli - ORIENTADOR
Depto. **ANATOMIA/IB - UNICAMP**



Prof. Dr. Miguel Carlos Madeira
Depto. **ANATOMIA - UNIMEP e UNIPAR**



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran
Depto. **QUÍMICA/IQ - UNICAMP**

Prof. Dr. Gérson Eduardo Rocha Campos - SUPLENTE
Depto. **ANATOMIA/IB - UNICAMP**

DEDICO

À minha mãe Elizabeth,
que com amor e dedicação nunca mediu esforços para minha realização pessoal

DEDICO

À minha irmã Andréa, ao meu cunhado Marco Antônio
e às minhas sobrinhas Alessandra e Carolina,
vocês que sempre me deram amor, carinho e força para continuar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS:

À Deus por ter me guiado com segurança por todos os caminhos que percorri.

À minha mãe pelo amor, incentivo e compreensão permanentes.

À minha família, que sempre soube entender minha ausência, me recebendo com carinho.

Ao meu amigo Prof. Miguel Carlos Madeira pelo incentivo, atenção, companheirismo e carinho dedicados em todos esses anos.

À Denise, que sempre me acolheu com compreensão e afeto.

Ao meu cunhado Marco Antônio pela amizade e suporte técnico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador Dr. José Ângelo Camilli por ter dirigido meus passos, visando meu aprimoramento didático e científico.

Aos senhores diretores: da Faculdades Salesianas de Lins, na pessoa do Pe. Afonso de Castro e da Faculdade de Odontologia de Lins - UNIMEP, na pessoa do Prof. Dr. Carlos Wagner de Araújo Werner pelo auxílio financeiro e atenção com que sempre me receberam.

Às amigas Djanira Aparecida da Luz, Raquel de Mendonça Rosa e todos os colegas de pós-graduação do Departamento de Anatomia da UNICAMP pela amizade e companheirismo compartilhados durante todo o curso.

À amiga Gláucia Monteiro de Castro pelos ensinamentos e amizade dedicados.

Aos colegas do Departamento de Anatomia da UNICAMP pelos incentivos e colaborações, especialmente à Prof^a. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete pelo carinho e amizade. Ao Prof. Humberto Santo Neto, Prof^a. Evanisi T. Palomari pela amizade compartilhada, aos professores Gérson Eduardo Rocha Campos pelos valorosos conselhos na qualificação, José Meciano Filho, Alexandre Oliveira, Marco César Sommaz, Maria Júlia Marques e Armando Mâncio de Camargo pela amizade e convivência salutar.

À Prof.^a Iara Maria Silva De Luca, do Departamento de Histologia e Embriologia - UNICAMP pelas orientações nas descrições histológicas.

Aos amigos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, do Departamento de Anatomia - UNICAMP. Nori e Marquinho, obrigado pela amizade, atenção e dedicação.

À sra. Marlene Lima Francisco, do Depto. de Anatomia - UNICAMP, pela manutenção e cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho.

Às sras. Lourdes Pinheiro e Sílvia Helena Burghi Kalaf pelo convívio, atenção e respeito que me dispensaram.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia - UNICAMP que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À srta. Helena, secretária da pós-graduação, e aos demais funcionários da pós-graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP pela atenção e respeito dedicados.

Ao professor Dr. Celso Ap. Bertran, do Instituto de Química - UNICAMP, pela confecção da hidroxiapatita utilizada neste trabalho.

À Capes e CNPq pela bolsa concedida, viabilizando a realização deste trabalho.

À FAEP pelo auxílio financeiro na compra dos materiais utilizados neste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO:	1
2. LITERATURA	3
2.1 - <u>ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO:</u>	3
2.2 - <u>TIPOS DE OSSIFICAÇÃO:</u>	5
2.3 - <u>PROCESSO DE REPARO ÓSSEO:</u>	6
2.4 - <u>HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS:</u>	7
2.5 - <u>PERIÓSTEO COMO FONTE DE CÉLULAS OSTEOGÊNICAS:</u>	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 - CONFECÇÃO E POROSIDADE DA HIDROXIAPATITA	14
3.1.1 <u>Confecção da Hidroxiapatita</u>	14
3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL	15
3.2.1 <u>Procedimentos Cirúrgicos e organização dos grupos experimentais</u>	15
3.2.2 <u>Técnica cirúrgica para obtenção do retalho periosteal do fêmur</u>	18
3.3 - ESTUDO RADIOGRÁFICO.....	19
3.4 - ESTUDO HISTOLÓGICO.....	19

4. RESULTADOS	20
4.1 OBSERVAÇÕES RADIOGRÁFICAS.....	20
<i>Grupo 1 – <u>FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA</u></i>	20
<i>Grupo 2 – <u>FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA POROSA</u></i>	21
<i>Grupo 3 – <u>FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DO FÊMUR ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA POROSA</u></i>	22
<i>Grupo 4 – <u>FALHA RECOBERTA COM O ENXERTO PERIÓSTAL DO FÊMUR</u></i>	23
4.2 OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS.....	28
<i>Grupo 1 – <u>FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA</u></i>	28
<i>Grupo 2 – <u>FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA POROSA</u></i>	29
<i>Grupo 3 <u>FALHA RECOBERTA COM O ENXERTO PERIÓSTAL DO FÊMUR ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA POROSA</u></i>	30
<i>Grupo 4 – <u>FALHA RECOBERTA COM ENXERTO PERIÓSTAL DO FÊMUR</u></i>	31
5. DISCUSSÃO:	37
6. CONCLUSÕES	48
7. BIBLIOGRAFIA	49

RESUMO

O enxerto ósseo autógeno tem sido freqüentemente usado no tratamento de fendas palatinas e defeitos ósseos no crânio, porém seu volume muitas vezes é insuficiente e o manuseio difícil. Assim sendo, existe o interesse em desenvolver um substituto para este método. No presente trabalho, falhas ósseas foram produzidas cirurgicamente na pré-maxila de ratos e tratados com enxerto periostal e hidroxiapatita. Os 80 ratos foram divididos em quatro grupos: G1- a falha foi recoberta pelo periósteo da pré-maxila; G2- a falha foi recoberta com o periósteo da pré-maxila associada a hidroxiapatita; G3- a falha foi recoberta com o periósteo do fêmur associado a hidroxiapatita; G4- a falha foi recoberta com o enxerto periostal livre do fêmur. Posteriormente foram sacrificados após 2, 4, 8 e 16 semanas e a falha foi examinada radiográfica e histologicamente. Espículas radiopacas partindo da margem da falha, foram os primeiros sinais radiográficos de formação óssea, após a quarta e a oitava semanas, em todos os grupos. Pontos radiolucidos no interior do implante foram mais evidentes, nos animais do grupo 3, após a oitava semana. Formação óssea partindo da margem da falha pôde ser vista em todos os grupos. Com oito e 16 semanas, ilhas de osso maduro puderam ser vistas ao redor do implante. A falha recoberta com o periósteo do fêmur apresentou melhor reparo quando comparada com a falha recoberta com o periósteo da pré-maxila, oito e 16 semanas após a cirurgia. Os resultados indicam que o enxerto periostal livre contribuiu para a produção de osso e que o implante de HA ofereceu suporte satisfatório para a neoformação óssea.

ABSTRACT

Bone regeneration of defects resulting from maxillary alveolar cleft, as well as in bone clefts of the palate, is important for the restoration of lost form and function. Autogenous bone grafts have been used to treat these lesions. However, they may be difficult to handle and the amount of available bone is sometimes insufficient. Therefore, there is interest in developing a substitute to autogenous bone grafts. The aim of the present investigation was to study the use of porous hydroxyapatite with free periosteal graft, to repair a defect produced in the premaxillary of rats. A cavity was made in the premaxillary bone of 80 rats, 8 weeks old, using a surgical trephine and a low-speed dental engine as a model of cleft palates. Four groups were made : 1st) treated with the periosteal from the premaxillary; 2nd) treated with porous HA and the periosteal from the premaxillary; 3rd) treated with porous HA and free periosteal graft from the femur; 4th) treated with only free periosteal graft from the femur. The animals were killed after 2, 4, 8 and 16 weeks, and the defect was radiographically and histologically examined. The radiographic study showed no signs of bone formation after 2 weeks. The first signs of bone formation appeared after 4 and 8 weeks. The 2nd and 3rd groups, exhibited a large area of radiopacity. After 2 weeks, bone formation could be seen around the border of the defects in all cases. Cell proliferation and osteoblastic differentiation occurred from the periosteal grafts. Islands of mature bone, without fibrous tissue, were seen around of the HA implants, after 16 weeks. The results indicate that free periosteal graft produces bone into to the defect and provide a rigid satisfactory support to the HA implant.

1. INTRODUÇÃO:

O reparo de defeitos ósseos do crânio de origem congênita ou resultante de ressecções tumorais, infecções e traumatismos mecânicos é um problema de difícil resolução, bem como de fundamental importância para restabelecer a forma e as funções do esqueleto cefálico (TAKANO-YAMAMOTO et al. 1993).

O enxerto de osso autógeno obtido da tíbia, costela, crista ilíaca e mais recentemente da protuberância mentoniana tem sido utilizado no tratamento de defeitos ósseos. Embora consideráveis sucessos tenham sido relatados após o uso deste tratamento, a obtenção dos enxertos pode provocar complicações como a reabsorção da área enxertada, recuperação prolongada com pós-operatório hemorrágico, infecções, hematomas, dores crônicas, nevralgias e mais especificamente no osso ilíaco, distúrbios de desenvolvimento no paciente jovem. Em complemento, a quantidade de osso disponível às vezes é insuficiente (GLOWACKI et al, 1981; TAKANO-YAMAMOTO et al, 1992; KOSTOPOULUS & KARRING, 1995; KURZ et al, 1998; RANSFORD et al, 1998).

A busca de alternativas para evitar os riscos e inconvenientes do uso do enxerto autógeno levou à procura de materiais aloplásticos que pudessem substituir o tecido ósseo. Os materiais cerâmicos porosos, em especial a hidroxiapatita (HA), recebeu maior atenção, pois foi demonstrada sua capacidade de integrar-se ao leito do receptor e de ser osteocondutora, apresentando êxito na reconstrução de falhas ósseas nas áreas médica e odontológica (PIECUCH, 1982; CHANG et al, 1983; DROBECK, 1984; MISIEK, 1984; OHGUSHI et al, 1990; DEBONI, 1991; ROSSA, 1991)

Estudos experimentais da aplicação da HA granular em tecidos moles e em tecido ósseo têm demonstrado pouca ou nenhuma resposta inflamatória, com conseqüente deposição de tecido

ósseo ao redor dos grânulos (GUMAER et al, 1986; DONATH, 1987; LEHTINEN et al, 1990; YLINEN et al, 1991; KLINGE et al, 1992; DONOHUE & MASCRES, 1993). Biópsias de áreas implantadas com HA em humanos têm confirmado sua biocompatibilidade, com a presença de osso neoformado (CHLAO et al, 1987; DONATH, 1987; BLIJDORP et al, 1988).

Com o mesmo propósito de substituir os enxertos ósseos autógenos, experimentos comprovaram que o enxerto periostal livre apresenta capacidade osteogênica e que o perióstio do fêmur possui maior potencial que o do crânio (FANG & MILTNER, 1933; MELCHER, 1969; ALHOPURO, 1978; UDDSTRÖMER & RITSILÄ 1978; VAN DEN WILDENBERG et al, 1983; SANT'ANNA, 1997). Por apresentar essa propriedade, entre as aplicações clínicas do enxerto de perióstio incluem o reparo de fendas palatinas (RITSILÄ et al, 1972a) e reconstrução de cartilagem articular (SHENG et al, 1989; SAKAI et al, 1991).

Com as evidências da contribuição da HA no reparo de tecido ósseo e do potencial osteogênico do perióstio, a proposta do presente trabalho foi estudar o reparo de falhas ósseas produzidas na pré-maxila de ratos, quando tratadas com HA e enxerto periostal livre obtido do fêmur e com o perióstio da própria pré-maxila.

2. LITERATURA

A literatura será apresentada levando-se em consideração a estrutura do tecido ósseo e seu processo de reparo. Em seguida serão abordados estudos sobre o uso da hidroxiapatita no reparo de defeitos ósseos e o periósteo como fonte de células osteogênicas em enxertos livres e revascularizados.

2.1 – Estrutura do tecido ósseo:

O conhecimento das características e estrutura do tecido a ser substituído são importantes para avaliação de qualquer biomaterial proposto. A inspeção macroscópica de cortes longitudinais ou transversais de ossos longos ou chatos, como os do crânio, mostra que independente de seus diferentes aspectos externos, possuem uma estrutura comum com duas formas arquitetônicas: a cortical ou compacta óssea e o osso esponjoso. O osso cortical é uma massa sólida com espaços microscópicos, em contraste com o osso esponjoso que apresenta-se como uma rede tridimensional constituída por hastes que formam arcos conhecidos como trabéculas ósseas, que delimitam o espaço ocupado pela medula óssea (WEISS, 1983).

A estrutura microscópica do osso de um indivíduo adulto pode ser classificada como primária ou imatura e lamelar ou madura. O osso primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem qualquer organização, e maior porcentagem de osteoblastos, osteócitos e pequena quantidade de minerais (HANCOX, 1972). O osso lamelar apresenta estrutura com o aspecto de lâminas curvadas, organizadas paralela ou concentricamente chamadas de lamelas. As lamelas ósseas delimitam cavidades denominadas lacunas que apresentam um osteócito no seu interior. Das lacunas partem canaliculos que permitem a comunicação entre elas. Os osteócitos

vizinhos comunicam-se por meio de seus prolongamentos, o que permite o fluxo intercelular de metabólitos essenciais para a manutenção do tecido ósseo.

As lamelas ósseas variam de tamanho e podem apresentar de 4 a 20 camadas, arranjadas concentricamente ao redor de um canal vascular formando uma estrutura denominada sistema de Havers ou osteônio. Os canais de Havers comunicam-se com o periósteo e com o canal medular por meio de canais dispostos transversal e obliquamente, os canais de Volkmann (WEISS, 1983).

A matriz orgânica do tecido ósseo apresenta 90% de colágeno na sua constituição, além de proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos secretados por células osteogênicas. A substância fundamental amorfa, conhecida por conter fosfoproteínas, glicoproteínas, ácido carboxiglutâmico, contendo proteínas (osteocalcina, BGP, proteína óssea GLA) e uma pequena quantidade de proteoglicanos, lipídios e peptídios. Todos esses componentes desempenham funções na mineralização e apresentam grande tendência de agregação, em particular ao íon cálcio.

O componente mineral do tecido ósseo constitui 75% do seu peso e está presente na forma de hidroxiapatita. No osso maduro a hidroxiapatita aparece na forma de cristais com 15 a 30 Å de espessura e 100 Å de comprimento.

Estes cristais são diminutos e contém cálcio, fósforo e íons hidroxila. Além disso, existe uma quantidade substancial de carbonato, citrato de sódio e magnésio no osso mineral; o magnésio e o citrato estão na superfície e a quantidade de flúor é variável. Vestígios de ferro, zinco, cobre, lítio, manganês, alumínio, estrôncio, boro, estanho e silício também têm sido encontrado.

Os cristais de hidroxiapatita são regularmente distribuídos em intervalos de 600 a 700 Å ao longo dos prolongamentos das fibras colágenas. A substância fundamental contorna e

estabiliza esses cristais. Essa interação da hidroxiapatita com as fibras colágenas e com as proteínas não-colagenosas conduz à solidez e à rigidez do osso (WEISS, 1983).

2.2 - Tipos de ossificação:

O desenvolvimento do osso é tradicionalmente classificado como endocondral, no caso de um modelo de cartilagem servir de precursor do osso ou intramembranoso, se o osso for formado sem um precursor cartilaginoso. Os ossos do esqueleto apendicular e partes do esqueleto axial que suportam mais peso desenvolvem-se através da ossificação endocondral. Os ossos chatos do crânio, a mandíbula e a clavícula desenvolvem-se por ossificação intramembranosa.

Devido à rápida remodelação que ocorre durante o desenvolvimento ósseo, o tecido ósseo, depositado por ossificação endocondral ou intramembranosa é logo substituído. O osso formado é depositado sobre o osso já existente no processo chamado crescimento aposicional, idêntico na ossificação endocondral e na intramembranosa.

Embora o osso longo seja classificado como de ossificação endocondral, no seu desenvolvimento ocorre a histogênese de osso endocondral e também de osso membranoso. A histogênese membranosa ocorre graças à atividade do perióstio (WEISS, 1983).

2.3 - Processo de reparo ósseo:

O reparo do tecido ósseo ocorre em dois grandes estágios: o reparo inicial, também chamado de primário e o secundário ou de remodelação. No estágio inicial o reparo do osso ocorre sem a formação de calo ósseo, já no secundário, existe a formação de calo ósseo. (HENCH & ETHRIDGE, 1982). O exemplo clássico do reparo ósseo está na cicatrização da fratura, inicialmente ocorre hemorragia entre o final da fratura, o perióstio subjacente e o músculo. O

reparo começa com a absorção do sangue extravasado e pelo crescimento do tecido de granulação.

Reparada a lesão do periósteo do endósteo e do osso medular adjacente à fratura, o suprimento celular que proliferou e diferenciou-se dá origem ao calo ósseo. Ele proporciona uma armação provisória que poderá substituir o osso. O osso novo é formado pelo periósteo e endósteo, que substitui o calo ósseo. No processo de reparo ósseo, a fixação rígida dos segmentos favorece a sua formação. O tecido danificado também parece introduzir fatores locais que estimulam a osteogênese. A velocidade desses eventos depende de fatores locais, tais como a magnitude do defeito, fatores sistêmicos, idade, estado nutricional etc. Desse modo, o reparo é mais rápido em indivíduos jovens, ocorrendo a formação óssea em 48 horas (FROST, 1973).

2.4 - Hidroxiapatita no reparo de defeitos ósseos:

Nos campos da Medicina e Odontologia, a utilização de materiais biocerâmicos têm sido pesquisada para o tratamento e restabelecimento de perdas ósseas, como uma alternativa de substituição do enxerto de osso autógeno. Dessa forma, com os avanços na biotecnologia e na engenharia de materiais, muitos materiais aloplásticos têm sido desenvolvidos com grande entusiasmo, baseados em experiências laboratoriais e posteriormente clínicas.

Os materiais cerâmicos porosos, em especial as formas sintéticas de HA, receberam maior atenção, pela capacidade de se integrarem ao leito receptor e de serem osteocondutores (OHGUSHI et al, 1990; DEBONI 1991; ROSSA, 1991). Estudos experimentais da aplicação da HA granular, em tecidos moles ou em tecido ósseo, têm demonstrado pouca ou nenhuma resposta inflamatória, deposição de tecido conjuntivo fibroso e neoformação óssea ao redor das partículas (YLINEN et al, 1991, KLINGE et al, 1992, DONOHUE & MASCRETS, 1993).

A apatite ou hidróxido de fosfato pentacálcico ou hidroxiapatita de cálcio que apresenta a seguinte fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é o componente mineral principal de todos os tecidos mineralizados do corpo humano, tais como o esmalte, dentina e osso. É um dos materiais mais biocompatíveis tanto em tecidos moles e duros, e a sua principal função é a osteocondução, pois o fosfato de cálcio proporciona uma matriz para que se deposite osso novo entre as partículas do implante e o osso subjacente. A HA pode ser produzida para o uso clínico em blocos ou em pó, podendo ainda ser encontrada em blocos densos ou porosos, com diferentes granulações e associada a diversos materiais como colágeno (MEHLISCH et al., 1988), matriz óssea desmineralizada (ALPER et al., 1989), osso medular (EICH et al., 1990) e proteína osteogênica (DAMIEN et al., 1990).

Antes do emprego clínico, vários estudos foram realizados avaliando as reações da HA porosa em fendas artificiais na pré-maxila de ratos, encontrando tecido ósseo maduro oito semanas após a cirurgia (REUTERS et al., 1985), resultados que já apontavam para as vantajosas propriedades da HA na condução do crescimento ósseo. Utilizando o mesmo modelo experimental YAMAMOTO et al., (1994), trataram defeitos ósseos com matriz óssea desmineralizada. Os resultados indicaram que não houve cicatrização da falha óssea. Segundo os autores, o modelo experimental pode ser utilizado para estudar o desempenho de biomateriais no tratamento de fendas palatinas e falhas ósseas na região alveolar.

HÖNIG et al. (1998) avaliaram as diferenças entre o aumento do tecido ósseo, supra e subperiostealmente, no osso frontal de 16 cobaias, empregando duas diferentes formas de HA, granular e em blocos. Com três semanas, as mudanças da HA e do tecido ósseo subimplantado foram evidentes, com a migração dos grânulos para o seio frontal. Em contraste, as partículas de HA implantadas sobre o perióstio não migraram para o interior do osso, independentemente do

tipo de HA. Nesse grupo o periosteio assumiu a função de uma membrana limitante, mantendo a HA no local implantado.

A HA, com as propriedades que apresenta, vem sendo usada como um substituto do enxerto ósseo em situações como o aumento e manutenção do rebordo alveolar (DENISSEM & DE GROOT, 1979), defeitos periodontais (KENNEY et al. 1985; 1986; BOU-ABBOUD et al. 1994), cirurgias buco-maxilo-faciais (FRAME, 1987), cirurgia ortognática (WOLFORD et al. 1987) e mais recentemente em associação com implantes de titânio (SCHLIEPHAKE et al. 1991). Avaliações clínicas do uso da HA porosa como substituto do enxerto ósseo em cirurgia ortognática em 46 pacientes, indicam ser um valioso material para o preenchimento e interposição às osteotomias (ROSEN, 1988). Posteriormente, ROSEN & ACKERMAN (1991), também obtiveram resistência e estabilidade em todos os 72 pacientes tratados com a HA. Os controles histológicos e radiográficos com 16 meses de pós-operatório confirmaram o comportamento biológico favorável da cerâmica no esqueleto maxilofacial.

SATOH & NAKATSUKA (1996) trataram 21 pacientes (15 com deformidades lábio-palatais e seis por razões estéticas) empregando HA porosa. Os resultados foram satisfatórios em todos os pacientes, demonstrando ser a HA uma boa alternativa para osteotomias de caráter funcional e estético.

Acompanhando a evolução clínica e radiográfica de 245 pacientes tratados com HA porosa, COTTRELL & WOLFORD (1998) concluíram que este material apresentou-se como um excelente substituto do enxerto de osso autógeno, com alta porcentagem de sucesso e eficiência nas cirurgias ortognáticas.

2.5 - Periosteio como fonte de células osteogênicas:

A superfície externa da maioria dos ossos, exceto as superfícies articulares, são recobertas pelo periosteio. Este é constituído por uma camada externa de tecido conjuntivo fibroso e uma camada interna a *camblum layer*. Na camada externa encontram-se poucas células e vasos, enquanto que na interna estão as células osteoprogenitoras, com uma vasta rede de vasos sanguíneos em contato direto com o osso (HAM, 1983; WLODARSKI, 1988).

Desse modo, o emprego clínico dos enxertos periostais está baseado no fato de que quando o periosteio é retirado do osso ele carrega consigo essas células osteoprogênitoras ou quando um segmento ósseo for retirado junto com o periosteio subjacente, esse periosteio poderá produzir osso novo a partir da proliferação das células da camada interna (McKIBBIN, 1978).

A camada interna do periosteio contém pré-osteoblastos e osteoblastos que contribuem para o crescimento normal do osso na osteogênese em fraturas e em retalhos periostais usados como transplantes. A ação do periosteio como fonte de tecido ósseo tem sido objeto de estudos desde 1742 com DUHAMEL, observando o espessamento e a contribuição do periosteio na formação do calo ósseo após uma fratura. Em 1763, VON HALLER negou a capacidade osteogênica do periosteio atribuindo a ele apenas a função de suporte de vasos sanguíneos, que seriam os verdadeiros responsáveis pela osteogênese no local da fratura. Desse modo, duas vertentes foram se formando, a que atribuía ao periosteio um potencial osteogênico e outra vertente negando essa afirmação.

A história do transplante periostal tem início com os estudos de OLLIER em 1867, observando que as células da camada interna do periosteio, quando removidas com fragmentos ósseos, apresentavam potencial para produzir osso novo. A proliferação e a capacidade

osteogênica das células da camada interna do periósteo foram confirmadas nos trabalhos de BASSET (1962); RITSILÄ (1972a); UDDSTRÖMER & RITSILÄ (1979) e RUBAK, (1983).

OLLIER (1867) e AXHAUSEN (1956) observaram que o enxerto de periósteo com o osso adjacente podia sobreviver e em condições apropriadas tornava-se osteogênico, e que sua capacidade decrescia nos transplantes homólogos e heterólogos. Os experimentos de OLLIER (1867) foram repetidos por MACEWEN (1912) que não observou a formação de osso a partir de enxertos periostais. Ele afirmou que o periósteo atua apenas como uma membrana limitante, contendo a proliferação dos osteoblastos na superfície do osso.

PHEMISTER (1914) publicou em seu trabalho um estudo partindo da opinião que “o transplante periostal produz pouco ou nenhum osso”. MAYER & WEHNER (1914) observaram a formação óssea após transplante autógeno de periósteo livre da superfície intramuscular da tíbia de cães. Também contrários às afirmações de OLLIER, DAVIS & HUNNICUTT (1915) não conseguiram obter osso a partir do periósteo livre ou pediculado, transplantado para o tecido subcutâneo e para o músculo de 16 cães e cinco coelhos. Segundo os autores, a presença de fragmentos de osso cortical junto ao periósteo é que promoveram a formação óssea. LERICHE & POLICARD (1928) acreditavam que OLLIER, na grande ansiedade de produzir osso, incluiu fragmentos de osso junto com o enxerto. Esses autores não acreditavam na capacidade osteogênica do periósteo.

Estudando o papel do periósteo no reparo de fraturas, HALDEMAN (1932), realizou fraturas no rádio e fíbula de coelhos e observou que nos ossos onde houve a retirada do periósteo não ocorreu a consolidação da fratura. BURMAN & UMANSKY (1930) utilizaram periósteo da tíbia de coelhos jovens e inseriram o enxerto não vascularizado ao redor do tendão do músculo tibial anterior. Seus resultados mostraram que não houve formação óssea quando a camada interna do periósteo estava ausente, ao contrário do que ocorria na sua presença.

PENTEADO et al. (1990) estudaram a vascularização do periósteo dos ossos dos membros superior e inferior do homem. Concluíram que todos os ossos longos podem fornecer retalhos de pequenas dimensões, mas há principalmente três locais onde os retalhos periostais vascularizados podem ser melhor obtidos: da fossa ilíaca, do terço médio do úmero e do terço distal do fêmur. Dos três retalhos, o mais utilizado pelos autores na reconstrução de defeitos ósseos tem sido o do terço distal do fêmur, que pode ser obtido como um retalho músculo-periostal com dimensões razoáveis.

Em experimentos com enxerto periostal livre, RITSILÄ et al. (1972 b) relataram que o periósteo da tibia apresenta maior capacidade de produzir osso do que o periósteo da calvária, quando avaliados sob as mesmas condições, no músculo tibial anterior e em falha óssea produzida no ramo da mandíbula de 152 coelhos. UDDSTRÖMER (1978) também chegou às mesmas conclusões quando o periósteo da tibia foi enxertado no crânio e vice-versa. O periósteo da tibia apresentou o triplo do potencial osteogênico do periósteo local, quando ambos foram enxertados no crânio.

BARRO & LANTHAM (1981) observaram diferenças no potencial osteogênico do periósteo do palato de cães jovens, quando o mesmo foi levantado e posteriormente reposicionado em seu leito para recobrir uma falha óssea produzida no local. Seus resultados sugerem a formação óssea a partir das superfícies que já apresentavam tecido ósseo.

Embora a divergência sobre a capacidade osteogênica do periósteo permanecesse, enxertos periostais e osteoperiostais passaram a ter aplicações clínicas, com bons resultados no tratamento de fendas palatinas (RITSILÄ et al., 1972 b), fusão espinal em escolioses (SNELLMAN & RITSILÄ, 1977), reconstruções de defeitos em cartilagens articulares (RITSILÄ et al., 1994), lesões patológicas como tumores, cistos e osteomielites (SHENG et al., 1989) e fraturas não consolidadas (SAKAI et al., 1991).

O entusiasmo original pelo enxerto ósseo como tratamento de fenda palatina e defeitos ósseos na região alveolar ocorreu na década de cinquenta, com os estudos de NORDIN & JOHANSON (1955) e SCHMID (1955). Esses estudos foram realizados apenas em crianças, estimulando assim o interesse no reparo de defeitos ósseos na maxila. Posições favoráveis ao uso do enxerto ósseo em indivíduos jovens também foram relatadas por STELLMACH (1959a); BÄCKDAL & NORDIN (1961); JOHANSON & OHLSON (1961); MATTHEWS et al., (1970).

Estes estudos foram criticados por GABKA & RITTER (1959,1966) por resultar na inibição do crescimento da maxila. Posteriormente, PRUZANSKY (1964) revendo 1000 pacientes com fenda labial e palatina tratados com os métodos convencionais, concluiu que o enxerto ósseo foi inútil, pois muitos pacientes obtiveram os mesmos resultados espontaneamente sem o enxerto ósseo.

NORDIN(1955) e depois JOHANSON(1961), que desenvolveram o uso do enxerto ósseo primário, condenaram esta técnica no final da década de sessenta, também por verificar a inibição do crescimento da maxila. Assim, a insatisfação com os resultados do tratamento de fenda palatina e defeitos ósseos na região alveolar com enxerto ósseo continuou e novas técnicas foram desenvolvidas. Observações de que o perióstio mantém sua capacidade osteogênica mesmo em mal formações ósseas congênitas, levaram SKOOG (1965) a desenvolver uma técnica que utilizava um retalho de perióstio da maxila na correção de fenda palatina. Os resultados preliminares dessa técnica foram promissores, de forma que em 1967 SKOOG descreveu o acompanhamento de 52 casos operados com excelentes resultados sem prejuízo para a área doadora.

Devido a difícil obtenção de retalho periostal da maxila com dimensões apropriadas, e baseados em seus estudos a respeito da capacidade osteogênica do perióstio, RITSILÄ et al. (1972) usaram em 11 pacientes retalho periostal livre da tíbia no tratamento de fenda palatina.

Observaram após duas semanas a presença de calo ósseo na área transplantada e osso definitivo, seis semanas após.

Nos últimos anos, vários estudos têm sido feitos empregando o perióstio na correção de fenda palatina. Com uma pequena modificação da técnica de SKOOG, LUPO & RONCHI (1987) obtiveram em 75% dos casos clínicos tratados com enxerto periostal, continuidade satisfatória no arco alveolar da maxila, com a presença de tecido ósseo vitalizado entre os dois segmentos ósseos. Bons resultados também foram alcançados por DELAIRE et al., (1988) no tratamento de pacientes com fendas labial e palatina, utilizando a técnica de SKOOG combinada com uma meticulosa reconstituição do equilíbrio muscular nasogenal. RINTALA & RANTA (1989) fizeram um acompanhamento de pacientes que tiveram fendas palatinas tratadas com perióstio da maxila ou com o perióstio livre retirado da tibia. Notaram que o perióstio da tibia mostrou-se superior na produção de osso para a união da fenda, demonstrando a eficiência do perióstio no tratamento dessas patologias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar com oito semanas de idade e aproximadamente 250g de peso, fornecidos pelo CEMIB da UNICAMP. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 20, mantidos em gaiolas com cinco ratos e alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*.

3.2 - Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com Ketamina (1ml/kg), associado ao cloridrato de xylazina 2% (0,1ml/kg) administrados por via intramuscular. A seguir foi feita uma incisão na mucosa da pré-maxila ao longo da rafe palatina, a mucosa foi afastada cuidadosamente e separada do periósteo subjacente (figura 1). Posteriormente o periósteo foi incisado e afastado (figura 2). Com uma broca esférica multilaminada de 2mm de diâmetro acoplada a um micromotor odontológico de baixa rotação e sob umidificação permanente do local, foi preparada uma falha óssea na pré-maxila, atrás dos incisivos superiores dos ratos (figura 3).

Nos animais do grupo 1, o periósteo do local foi reposicionado sobre a falha (figura 4), os do grupo 2 receberam o implante de hidroxiapatita e a falha foi recoberta com o próprio periósteo da pré-maxila (figura 5). No grupo 3, a falha recebeu o implante de HA e foi recoberta com o periósteo retirado do fêmur do mesmo animal (figura 6) e no grupo 4 a falha recebeu somente o enxerto de periósteo do fêmur (figura 7).

Nos grupos 1 e 2, o periósteo do local foi reposicionado e suas bordas suturadas com fio de seda 8.0 de forma que a falha ficasse totalmente recoberta. Nos grupos 3 e 4, o retalho periostal do fêmur também foi suturado com fio 8.0 nas bordas do periósteo do local, para

favorecer sua nutrição e retenção mecânica. Posteriormente, em todos os animais a mucosa palatina foi cuidadosamente reposicionada e suturada (figura 8).

Os animais foram sacrificados com vapores de éter a 2, 4, 8 e 16 semanas após a cirurgia. A seguir a mandíbula foi removida e os crânios radiografados e fixados em formol.

3.2.1.- Obtenção do retalho periosteal do fêmur

Esse procedimento foi realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópico de mesa, modelo MC - M9 (DF Vasconcelos). Após a tricotomia foi feita uma incisão na face medial da coxa do animal e os músculos foram afastados até a exposição do fêmur. Com uma lâmina de bisturi delimitou-se o perióstio a ser removido na face ântero-medial do terço distal do fêmur. O perióstio foi levantado raspando-se firmemente a cortical do osso, de tal forma que a camada interna osteogênica do perióstio *cambium layer* também fosse removida. Em seguida, o retalho periosteal foi suturado nas bordas do perióstio da pré-maxila. Tomou-se o cuidado de manter o tecido umedecido com solução fisiológica até o final do procedimento.



Imagem da cabeça do rato indicando (seta) o local da falha óssea produzida

Figuras ilustrativas dos procedimentos executados nos diferentes grupos experimentais:

Figura 1 - Incisão da mucosa da pré-maxila ao longo da rafe palatina. A mucosa foi afastada do periósteo subjacente.

A - Vista inferior

B - Corte longitudinal

Figura 2 - Periósteo da pré-maxila incisado e afastado.

A - Vista inferior

B - Corte longitudinal

Figura 3 - Falha óssea na pré-maxila confeccionada atrás dos incisivos superiores.

A - Vista inferior

B - Corte longitudinal

Figura 4 - Implante de HA no interior da falha. Animais do grupo 2.

Corte longitudinal

Figura 5 - Falha recoberta com o periósteo da pré-maxila.

Corte longitudinal.

Figura 6 - Falha com HA recoberta com enxerto periostal livre do fêmur. Animais do grupo 3.

Corte longitudinal.

Figura 7 - Falha recoberta com enxerto periostal livre do fêmur. Animais do grupo 4.

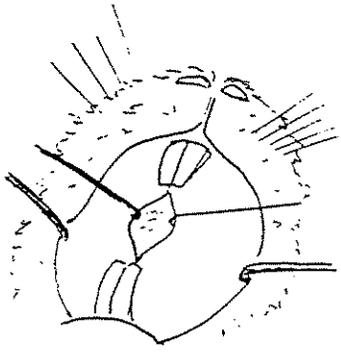
Corte longitudinal.

Figura 8 - Reposicionamento e sutura da mucosa bucal após a sutura do periósteo sobre falha

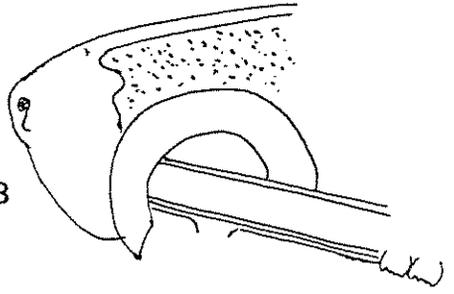
Corte longitudinal

1

A

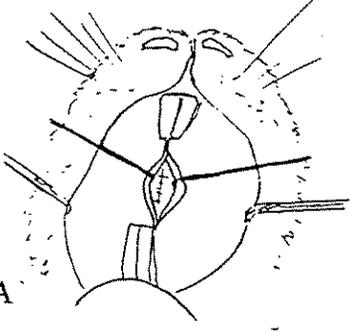


B

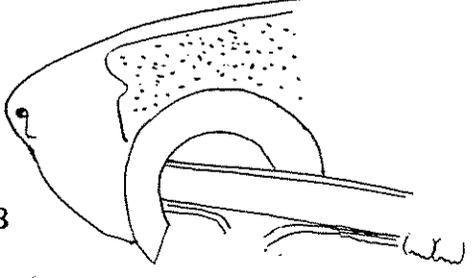


2

A

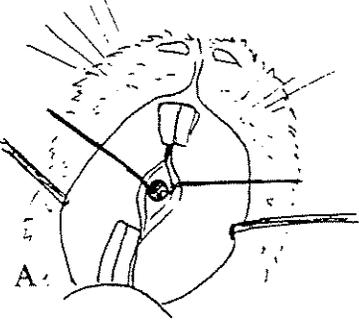


B

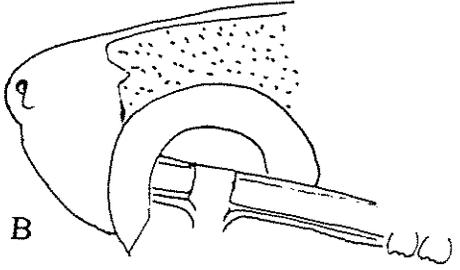


3

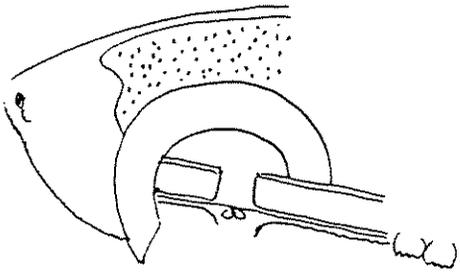
A



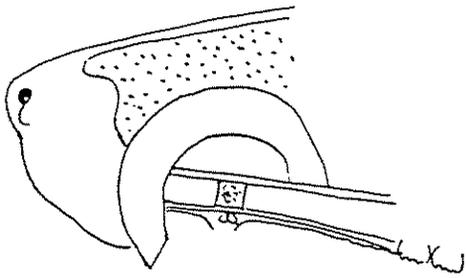
B



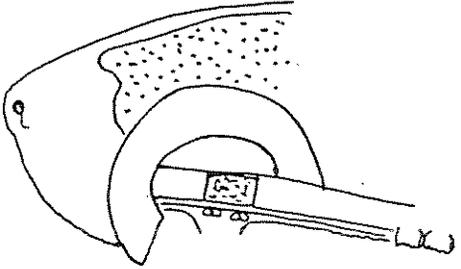
4



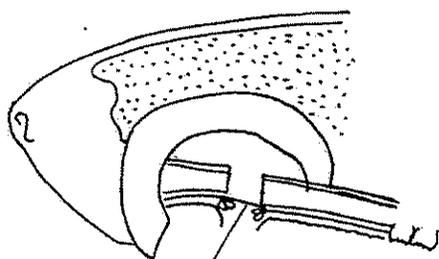
5



6

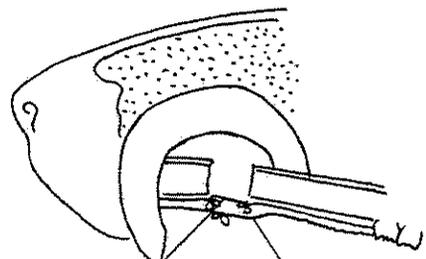


7



periósteo do fêmur suturado
no periósteo da pré-maxila

8



periósteo do fêmur suturado
no periósteo da pré-maxila
mucosa bucal
suturada

3.3 - Hidroxiapatita

A hidroxiapatita utilizada neste experimento foi sintetizada pelo Instituto de Química da UNICAMP através do método de precipitação a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio e uma solução de ácido fosfórico (OSAKA et al., 1991).

Adicionou-se à solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,3 mol/L sob agitação magnética e temperatura reacional de $60^\circ C$, uma suspensão contendo 0,5 mol de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) dispersa em um litro de água com velocidade de 7 ml/min. O pH da reação foi mantido em torno de 8 com adição de hidróxido de amônio (NH_4OH). A suspensão foi mantida sob agitação a $60^\circ C$ por 24 horas. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a $60^\circ C$. A seguir o material foi triturado até atingir fina granulação.

Para a preparação da hidroxiapatita porosa foi misturado 50% de massa de hidroxiapatita e sacarose molhada com solução de álcool polivinílico (0,2%). A mistura foi saturada com sacarose e lavada à estufa para secar a $60^\circ C$ por um período de uma hora e sinterizada a $1000^\circ C$ por cinco horas. Em seguida este material foi levemente desagregado, separado granulometricamente em peneira de 0,053mm e misturado com 25% de sacarose molhada com

solução de PVA. Estes materiais foram prensados em cilindros de vidro de 3,0 mm de diâmetro interno. A compactação foi feita com auxílio de um pequeno tubo de vidro de diâmetro igual ao do cilindro, formando assim um bastão de aproximadamente 1cm de comprimento que foi extrudado. A seguir o bastão confeccionado foi levado à estufa a 60°C e seco por um período mínimo de uma hora e posteriormente sinterizado a 1000°C por três horas (KAWACHI et al., 1997).

A análise dos tamanhos dos poros da HA foi realizada por porosimetria de intrusão de mercúrio em um equipamento Porosizer da Micromeritics modelo 9320. A porosimetria da cerâmica de HA confeccionada para este experimento revelou microporos nas faixas de 0,4µm a 100µm de diâmetro. A grande quantidade de poros diminuiu sensivelmente a resistência da cerâmica, no entanto foi possível manipular o material sem que ela se desagregasse.

3.5 - Estudo Radiográfico

As radiografias foram feitas em um aparelho radiográfico Rigaku RU-200 com ponto focal de 0,8x 0,8mm. A radiação empregada foi de cobre filtrado por níquel ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$). A corrente elétrica utilizada foi de 60KVp/ 10MA, e a distância entre o filme e o feixe de radiação foi de 10cm, com tempo de exposição de quatro segundos. Utilizou-se películas radiográficas odontológicas oclusais Kodak de tamanho (7,6 x 5,7cm).

3.6 - Estudo Histológico

A fixação dos crânios foi feita com formalina 10% por 72 horas. A seguir permaneceram mergulhados em uma solução descalcificante de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante quinze dias. Posteriormente as peças foram reduzidas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes frontais semi-seriados do terço médio do local operado, com 7 μ m de espessura e corados com HE.

4.- RESULTADOS

4.1 - OBSERVAÇÕES RADIOGRÁFICAS

Grupo 1 – FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA

Duas semanas após a cirurgia as radiografias mostraram uma imagem radiolúcida de forma arredondada e margem bem definida da falha óssea. Estes dados não indicam qualquer indício de crescimento ósseo para o interior da falha (fig. 1a).

Com quatro semanas a falha ainda apresentou contorno nítido em alguns pontos, porém foram observados discretos pontos de radiopacidade partindo da margem óssea (fig. 1b). Oito semanas após a cirurgia as radiografias apresentaram evidentes pontos de radiopacidade junto à margem da falha óssea, invadindo a imagem circular radiolúcida (fig.1c). Estes são aspectos radiográficos que sugerem a presença de tecido ósseo.

Dezesseis semanas após a cirurgia observou-se uma imagem radiopaca difusa que ainda persistia no interior da falha, seu contorno outrora nítido apresentou-se pouco evidente (fig.1d). São aspectos radiográficos que sugerem neoformação óssea, porém não preenchendo completamente o local operado.

Radiografia da cabeça de animais do grupo 1, que tiveram a falha recoberta com o periósteo da pré-maxila.

Figura 1a - Duas semanas após a cirurgia. A imagem radiolúcida de forma circular com limites nítidos (seta), representa a falha óssea produzida.

Figura 1b - Quatro semanas após a cirurgia. Notar a presença de imagem radiopaca (seta) partindo da margem da falha que se apresenta de forma circular e com limites pouco precisos, que representa uma discreta formação óssea.

Figura 1c - Oito semanas após a cirurgia. A imagem radiopaca mostra limites imprecisos e presença de espícula óssea (seta), representando uma discreta formação óssea.

Figura 1d - Dezesesseis semanas após a cirurgia, a imagem radiolúcida da falha é menos evidente,. Notar imagem levemente radiopaca invadindo a falha (seta), representando tecido ósseo em formação.

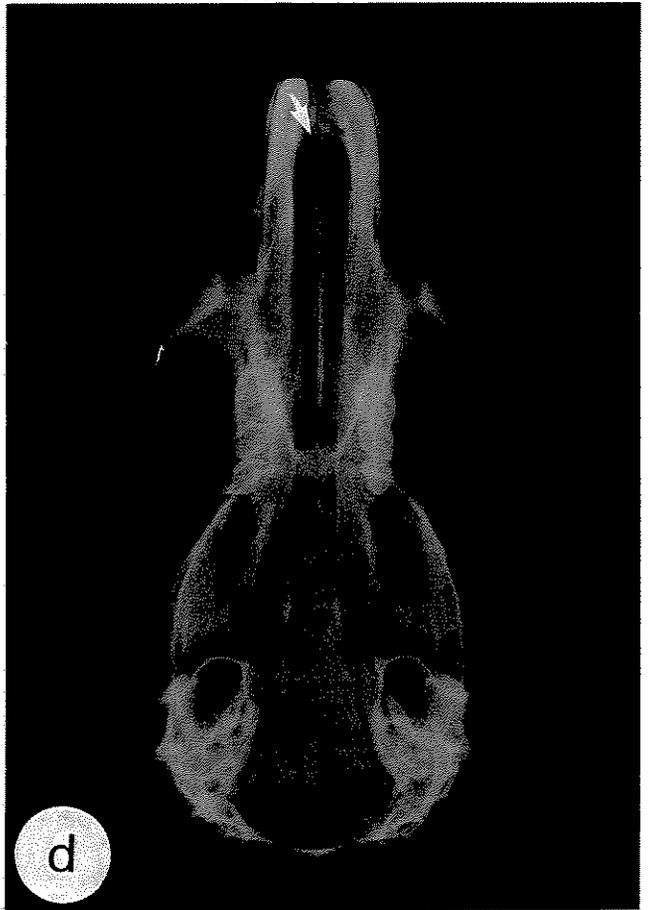


FIGURA 1

Grupo 2 – FALHA RECOBERTA COM PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA ASSOCIADA À HIDROXIAPATITA POROSA.

Duas semanas após a cirurgia a HA implantada apresentou imagem radiopaca com contornos nítidos e pontos de radiolucidez no interior do implante. A falha óssea, de imagem radiolúcida, apresentou limites precisos em todos os animais do grupo (fig.2a). Estes dados radiográficos indicam a não formação de tecido ósseo a partir da associação proposta.

A presença de pontos de radiolucidez no interior do bloco implantado também foi observado com quatro semanas após a cirurgia em todos os animais sacrificados neste período. Os limites da HA implantada apresentaram-se nítidos e o contorno radiolúcido da falha foi evidente (fig.2b).

Oito semanas após a cirurgia a HA apresentou imagem radiográfica com contorno nítido e persistiram os pontos de radiolucidez em seu interior. A falha apresentou imagem radiolúcida, porém com limite pouco preciso em alguns pontos (fig.2c)

Dezesseis semanas após a cirurgia a falha óssea apresentou imagem sem contorno nítido. Os pontos de radiolucidez no interior da HA implantada tornaram-se pouco evidentes (fig.2d). A falha também não apresentou a mesma nitidez de seus limites como nos períodos anteriores. Estes aspectos radiográficos indicam a presença de tecido ósseo a partir da associação proposta. Nenhuma área de reabsorção óssea foi observada nos animais estudados neste grupo.

Radiografia da cabeça de animais do grupo 2 que tiveram a falha preenchida com HA e recoberta com o periósteo da pré-maxila.

Figura 2a - Duas semanas após a cirurgia. Falha óssea radiolúcida (seta), com limites nítidos. Notar imagem radiopaca da HA implantada .

Figura 2b - Quatro semanas após a cirurgia. Notar limites pouco precisos do contorno da falha. Pontos radiopacos partindo da margem da falha (seta), correspondendo à tecido ósseo em formação.

Figura 2c - Oito semanas após a cirurgia. No centro da falha, observar a imagem radiopaca da HA (seta), com pontos radiolúcidos em seu interior. Notar espículas radiopacas em contato com o implante. Os limites pouco precisos da falha.

Figura 2d - Dezesesseis semanas após a cirurgia, observar a imagem radiopaca da pré-maxila e discretos pontos de radiolucidez no interior da HA. Notar que a margem da falha não apresenta limites nítidos. Indícios radiográficos de tecido ósseo ao redor e no interior do implante.

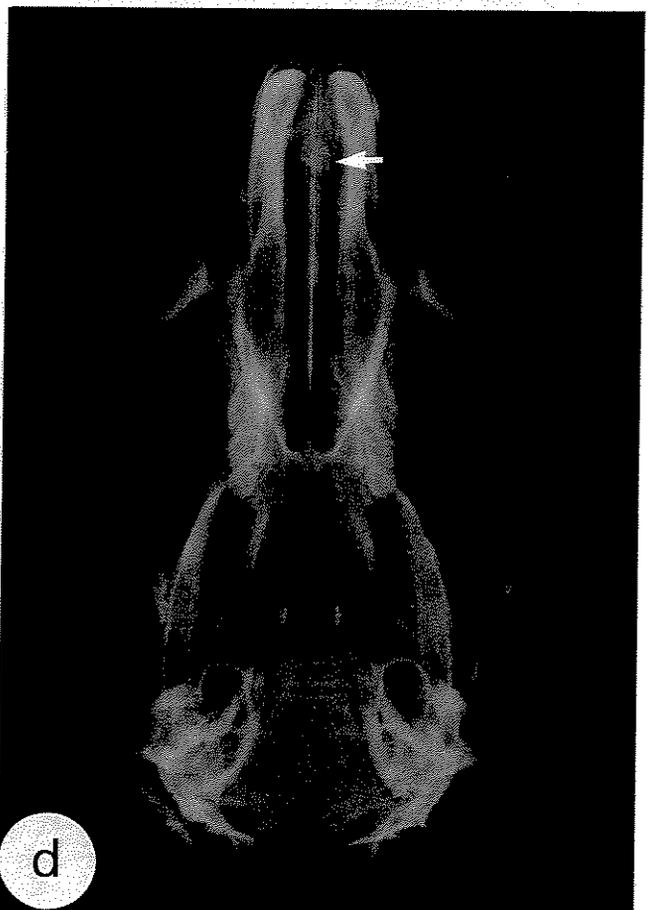
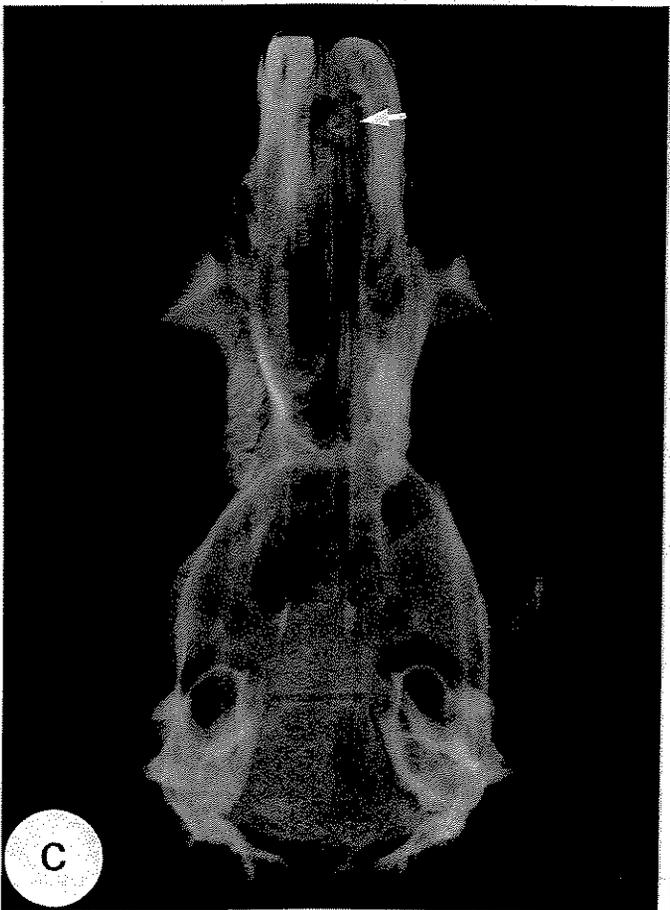
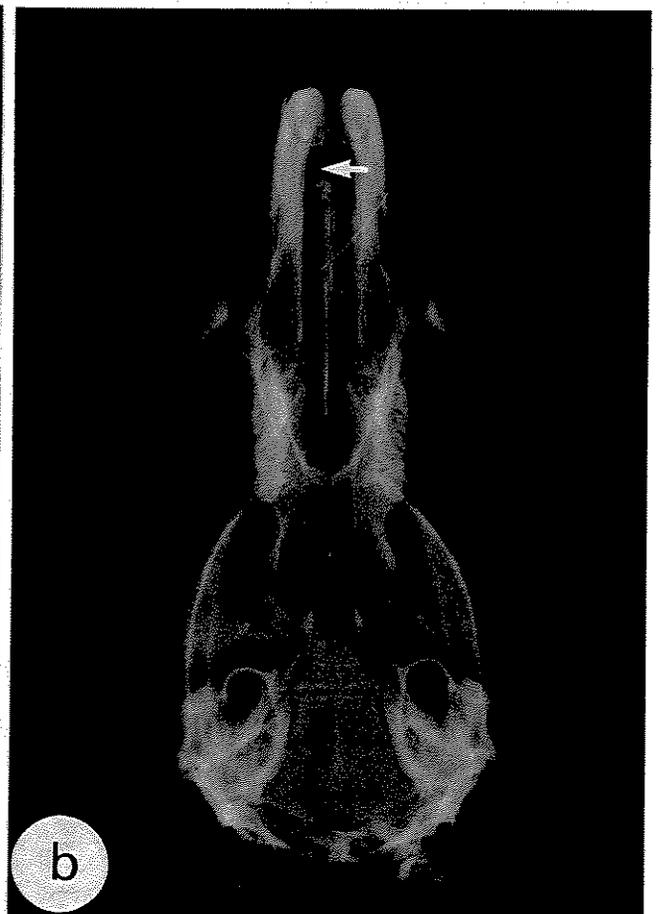


FIGURA 2

Grupo 3 – FALHA RECOBERTA COM PERIÓSTEO DO FÊMUR ASSOCIADO À HIDROXIAPATITA POROSA

Duas semanas após a cirurgia o implante de HA preencheu a falha óssea e apresentou-se radiograficamente como uma sombra radiopaca, com limites evidentes e discretos pontos de radiolucidez em seu interior (fig.3a). O contorno radiolúcido da falha também apresentou limites precisos em todos os animais do grupo.

Imagem radiopaca da HA com contorno pouco nítido foi observada quatro semanas após a cirurgia em quatro animais deste período (fig.3b). A observação de pontos de radiolucidez ao redor e no interior do bloco implantado tornaram-se menos evidentes.

Com oito semanas a falha óssea não apresentou contorno nítido como nos períodos anteriores (fig.3c). Houve um aumento nos pontos de radiolucidez no interior e ao redor do implante. Saliências radiopacas partindo da borda da falha também puderam ser observadas, o que indica tecido ósseo em formação.

O bloco de HA não apresentou limites nítidos 16 semanas após a cirurgia, confundindo-se em alguns pontos com o contorno radiopaco da falha. Notou-se também uma diminuição dos pontos de radiolucidez no interior do bloco, indícios radiográficos da presença de tecido ósseo no interior do implante (fig.3d). Não foi notada área de reabsorção em nenhum dos animais deste grupo.

Radiografia da cabeça de animais do grupo 3 que tiveram a falha preenchida com HA e recoberta com o perióstio do fêmur.

Figura 3a - Duas semanas após a cirurgia, no centro da falha óssea, que apresenta limites nítidos, nota-se a imagem radiopaca da HA, com discretos pontos de radiolucidez em seu interior (seta).

Figura 3b - Quatro semanas após a cirurgia, no centro da falha óssea a imagem radiopaca da HA implantada, com discretos pontos de radiolucidez, notar espículas radiopacas partindo da margem da falha (seta).

Figura 3c - Oito semanas da cirurgia. Notar espícula radiopaca partindo da margem da falha (seta), em direção a HA implantada. A falha apresentou limites imprecisos em alguns pontos.

Figura 3d - Dezesesseis semanas de pós-operatório. Imagem radiopaca da HA implantada (seta) sem limites precisos, notar a presença de espículas radiopacas partindo da margem da falha, em direção a HA. Imagem radiografia que sugere o crescimento ósseo em direção ao implante.

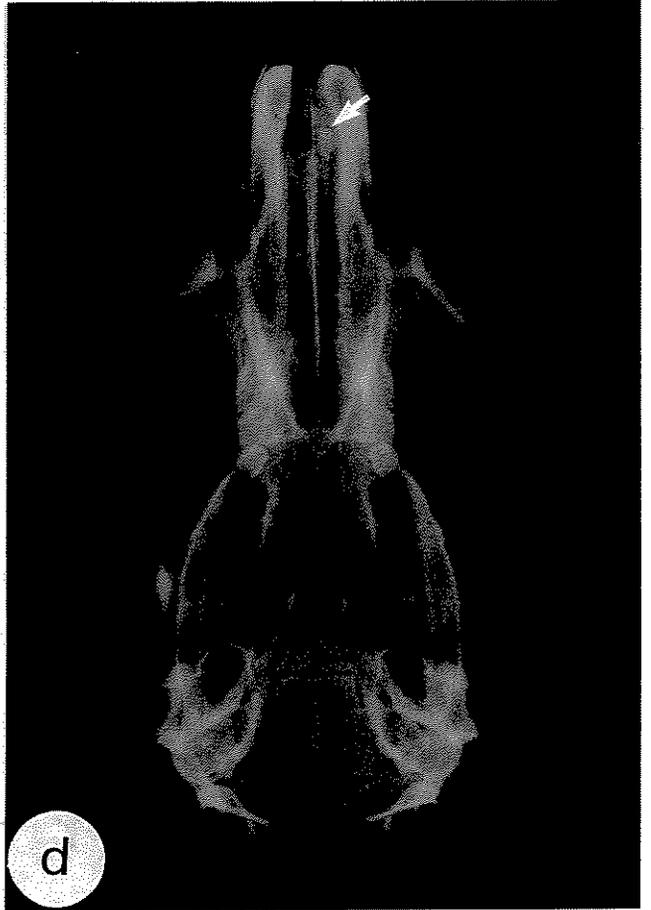


FIGURA 3

Grupo 4 - FALHA RECOBERTA COM PERIOSTEO DO FÊMUR

Duas semanas após a cirurgia pôde-se observar a imagem radiográfica de uma circunferência radiolúcida com contorno bem definido, referente ao local da falha óssea (fig.4a). Neste período não se pôde notar qualquer evidência de formação óssea.

O contorno da falha óssea tornou-se pouco evidente quatro semanas após a cirurgia. Um discreto contorno radiolúcido pôde ser observado no centro da falha. Observou-se um aumento dos pontos de radiopacidade no interior da falha quando comparado ao período anterior (fig.4b).

Imagem radiopaca no interior da falha marcou as radiografias dos animais com oito semanas de pós-operatório. Os limites imprecisos da falha dão a conotação de formação de tecido ósseo partindo da margem da falha (fig.4c).

Nos animais com 16 semanas pôde-se notar um discreto contorno radiolúcido representando a falha óssea, porém com saliências radiopacas em seu interior (fig.4d). Essas observações indicaram a presença de osso no interior da falha sem contudo preenchê-la totalmente.

Radiografia da cabeça de animais do grupo 4, que tiveram a falha recoberta com o periósteo do fêmur.

Figura 4a- Duas semanas após a cirurgia. A imagem radiolúcida, de forma circular(seta), representa radiograficamente, a falha óssea produzida

Figura 4b - Quatro semanas após a cirurgia. A falha apresenta discreta imagem radiolúcida de formato circular, com a presença de espícula radiopaca partindo da margem da falha (seta). Representação radiográfica de tecido ósseo partindo da margem da a falha óssea.

Figura 4c - Oito semanas de pós-operatório. A radiografia apresenta uma imagem radiolúcida com limites imprecisos no local da falha(seta). Representação radiográfica de tecido ósseo partindo da margem da a falha óssea.

Figura 4d - Dezesesseis semanas da cirurgia. A radiografia apresenta uma imagem radiolúcida com limites imprecisos com espículas radiopacas partindo em direção ao centro da falha (seta).

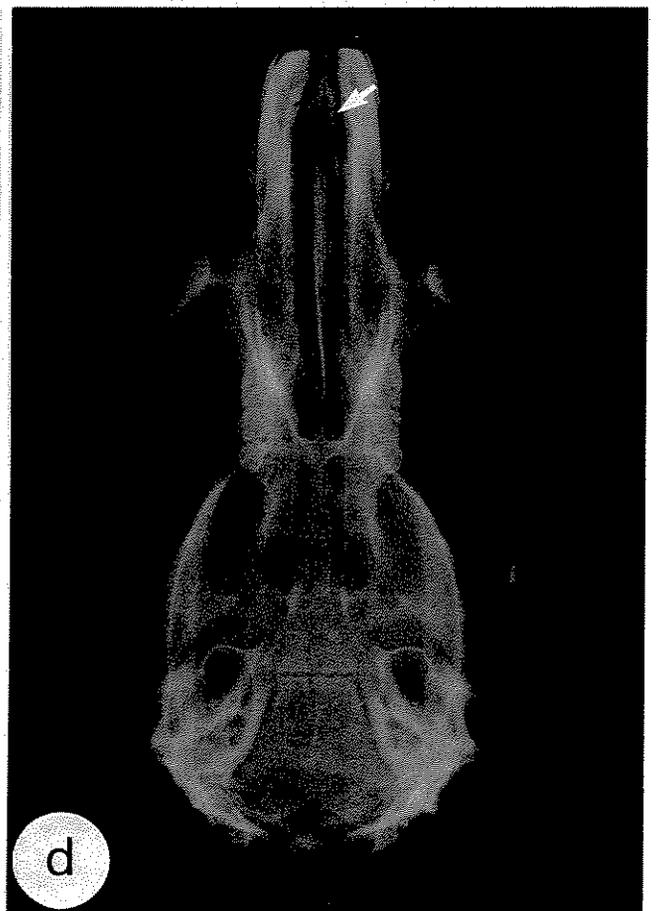
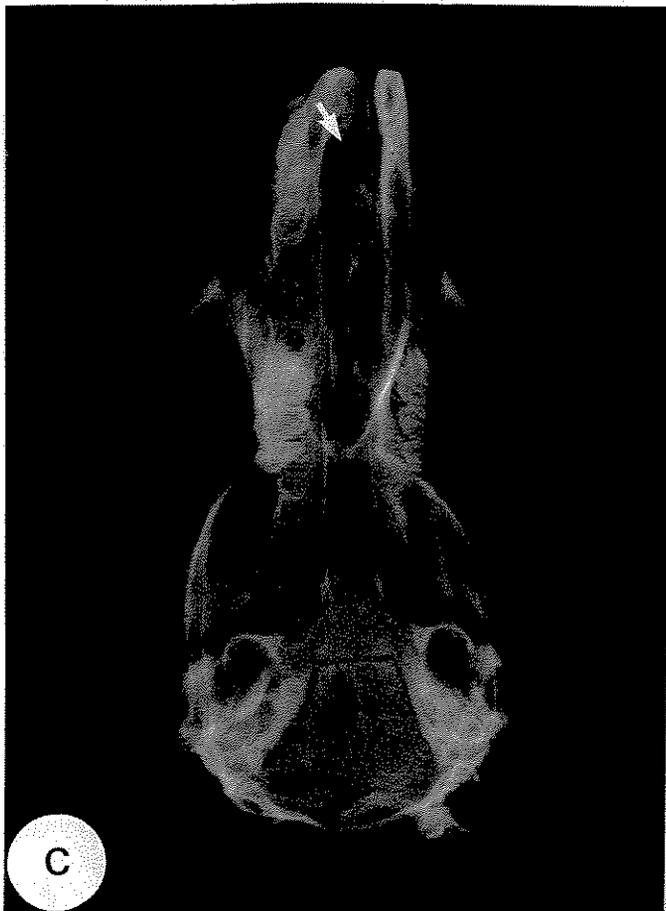
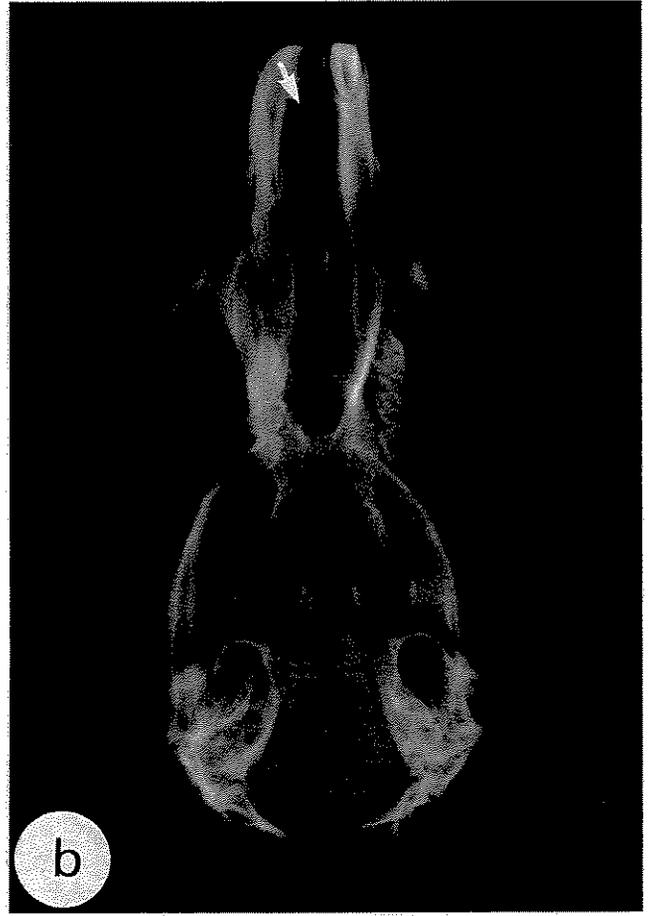


FIGURA 4

4.2 OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS

Grupo 1 - FALHA RECOBERTA COM O PERIÓSTEO DA PRÉ – MAXILA

Na segunda semana após a cirurgia observou-se osso neoformado partindo da margem da falha e também do septo nasal em três animais. Nos demais ocorreu a formação de osso apenas junto à margem da falha. Notou-se também vasos sanguíneos e osteoblastos junto às trabéculas neoformadas (fig.5a). Células indiferenciadas provenientes da camada interna proliferativa do perióstio invadiram o local operado. Não foram vistas células inflamatórias próximas ao local da lesão.

Na quarta semana a falha óssea estava quase totalmente preenchida por tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e células semelhantes a fibroblastos. Foi notada pequena quantidade de tecido ósseo formado a partir da borda da falha. O limite entre o osso maduro e o novo era evidente. Alguns osteoclastos foram encontrados junto das trabéculas ósseas neoformadas. O perióstio que recobriu a falha era mais espesso em relação ao perióstio da área vizinha que permaneceu inalterado (fig.5b).

Verificou-se a presença de infiltrado inflamatório na submucosa respiratória em dois animais do grupo após oito semanas da cirurgia. O crescimento de vasos sanguíneos e a migração de células semelhantes a fibroblastos para o interior da falha também foi observado. O osso neoformado ainda com características de osso imaturo, partiu da margem da falha óssea e do septo nasal (fig.5c).

Dezesseis semanas após a cirurgia o defeito ósseo persistiu contendo osso neoformado junto à margem da falha (fig.5d). O limite entre o osso maduro e o osso novo, outrora nítido, não

pôde ser mais notado. Tecido conjuntivo frouxo com células semelhantes a fibroblastos e vasos sangüíneos preencheu o restante da falha.

Corte frontal da pré-maxila de animais que tiveram a falha recoberta com o periósteo do local.

Figura 5A - Duas semanas após a cirurgia notar a discreta formação óssea (*) partindo das extremidades do osso da pré-maxila. A falha foi preenchida por tecido conjuntivo frouxo (tc) com células indiferenciadas. Notar o espessamento do periósteo(seta). Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn) (HE - 32x).

Figura 5B - Quatro semanas após a cirurgia, o tecido ósseo neoformado (*) partindo das extremidades do osso da pré-maxila. A falha foi preenchida por tecido conjuntivo frouxo(tc), o periósteo apresentou-se espessado(seta). Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 5C - Oito semanas após a cirurgia, notar a formação de tecido ósseo (*) partindo das extremidades do osso da pré-maxila, A falha foi preenchida por tecido conjuntivo denso(tc) e o periósteo apresentou-se menos espessado que nos períodos anteriores. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn).(HE - 32x).

Figura 5D - Dezesesseis semanas de pós-operatório, observar o tecido ósseo neoformado (*) partindo das extremidades do osso da pré-maxila. Tecido conjuntivo denso(tc) preencheu a falha e o periósteo (seta) permaneceu delgado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn).(HE - 32).

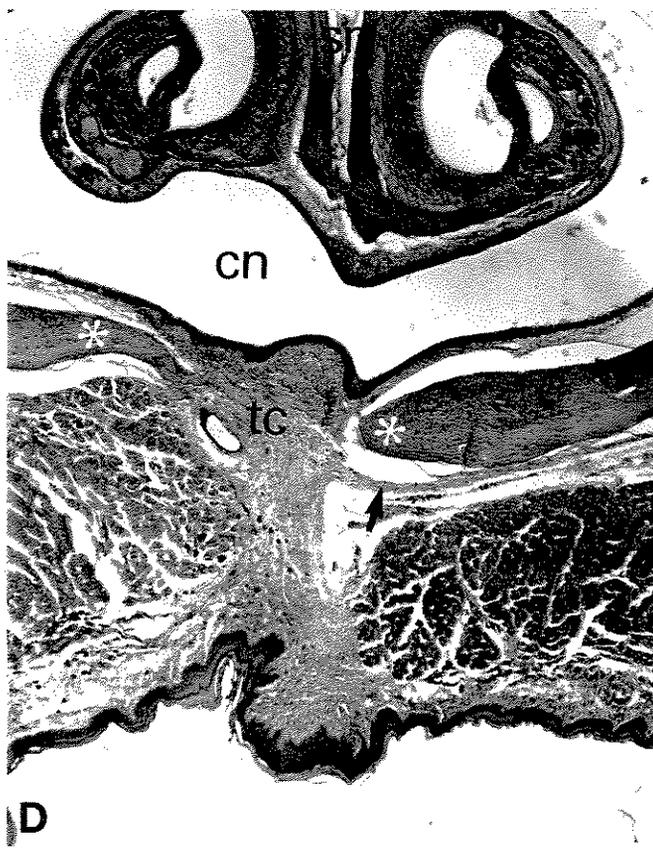
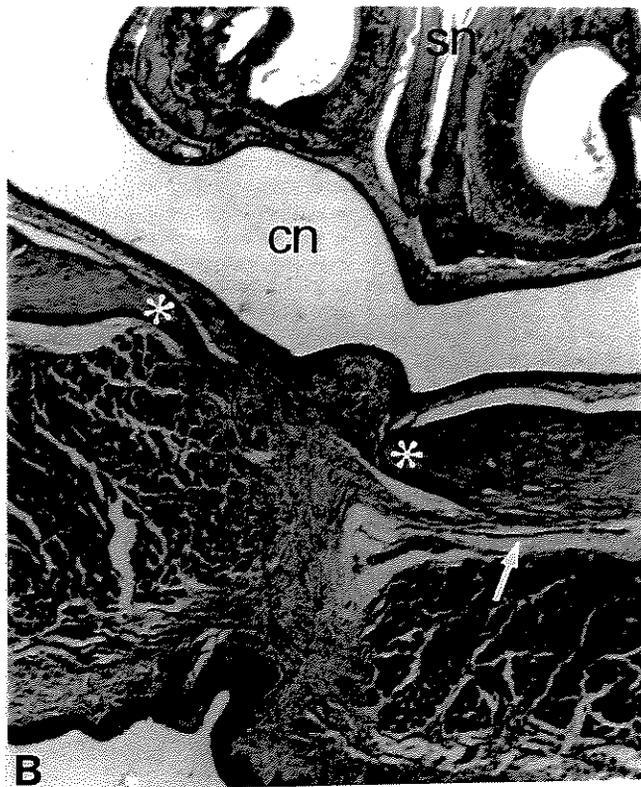
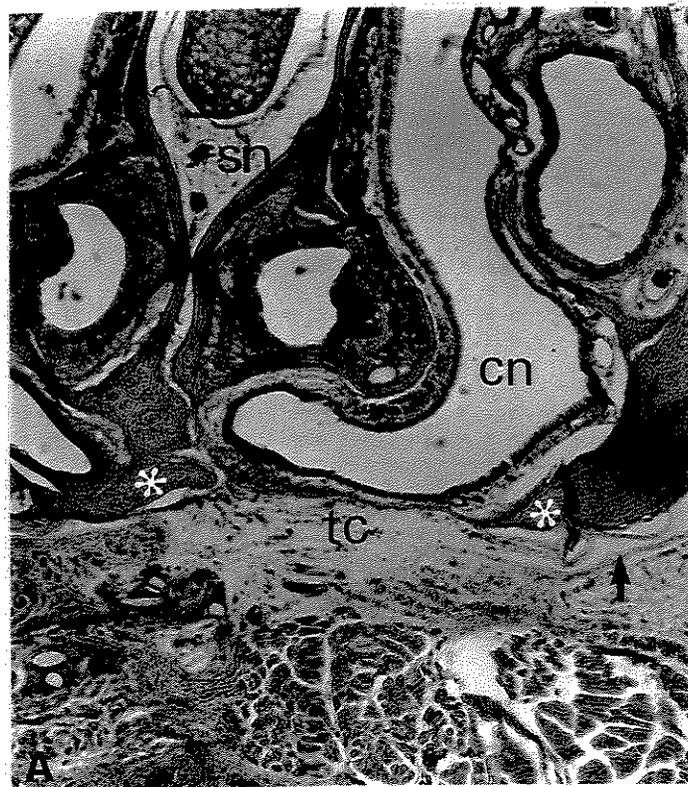


FIGURA 5

Grupo 2 – FALHA RECOBERTA COM PERIÓSTEO DA PRÉ-MAXILA ASSOCIADO À HA POROSA

Na segunda semana após a cirurgia foi notada a formação de osso a partir da margem da falha e em contato direto com alguns grânulos de HA implantados. Não foi observada a formação de tecido conjuntivo na interface do osso com o implante. O osso neoformado apresentou-se imaturo com matriz osteóide disposta ao redor dos grânulos de HA (fig.6a).

Na quarta semana foi encontrado osso neoformado ao redor dos grânulos de HA, localizados próximos à margem da falha. Em todos os animais foi encontrado vasos sanguíneos e células semelhantes a fibroblastos no tecido conjuntivo que, junto com a HA, preenchiem a falha (fig.6b).

Em comparação com o período anterior, após oito semanas, o osso novo ocupava mais espaços entre os grânulos de HA. Verificou-se o contato direto entre o tecido ósseo e o material implantado, sem a interposição de tecido conjuntivo. Em todos os animais, o tecido conjuntivo preencheu os espaços restantes da falha óssea (fig.6c). Ocorreu o deslocamento de grânulos de HA para o interior da cavidade nasal em dois animais deste período.

Dezesseis semanas após a cirurgia foi evidente a formação de tecido ósseo envolvendo continuamente os grânulos de HA que preenchiem a falha. Entre os grânulos também apareceram células semelhantes a fibroblastos ocupando alguns espaços da falha (fig.6d). Parte da HA implantada migrou para o interior da cavidade nasal em dois animais. O tecido ósseo formado a partir do septo nasal também contribuiu para o preenchimento da falha.

Corte frontal da pré-maxila de animais que tiveram a falha preenchida com HA recoberta com perióstio do local.

Figura 6A - Duas semanas após a cirurgia, notar o tecido ósseo neoformado (*) partindo da margem da falha e a hidroxapatita(ha) no seu interior. O perióstio (seta) permaneceu inalterado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 6B - Quatro semanas após a cirurgia, notar a presença de tecido ósseo (*) partindo da margem da falha e em contato direto com os grânulos de hidroxapatita (ha), o perióstio (seta) apresentou-se inalterado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 6C - Oito semanas de pós-operatório, o perióstio apresentou-se delgado (seta). Notar a presença de tecido ósseo neoformado(*) ao redor dos grânulos de hidroxapatita (ha) e partindo da margem da falha. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 6D - Dezesesseis semanas após a cirurgia, Notar o tecido ósseo em formação(*), a partir da margem da falha e ao redor dos grânulos de hidroxapatita (ha), o perióstio permaneceu delgado Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 64x).

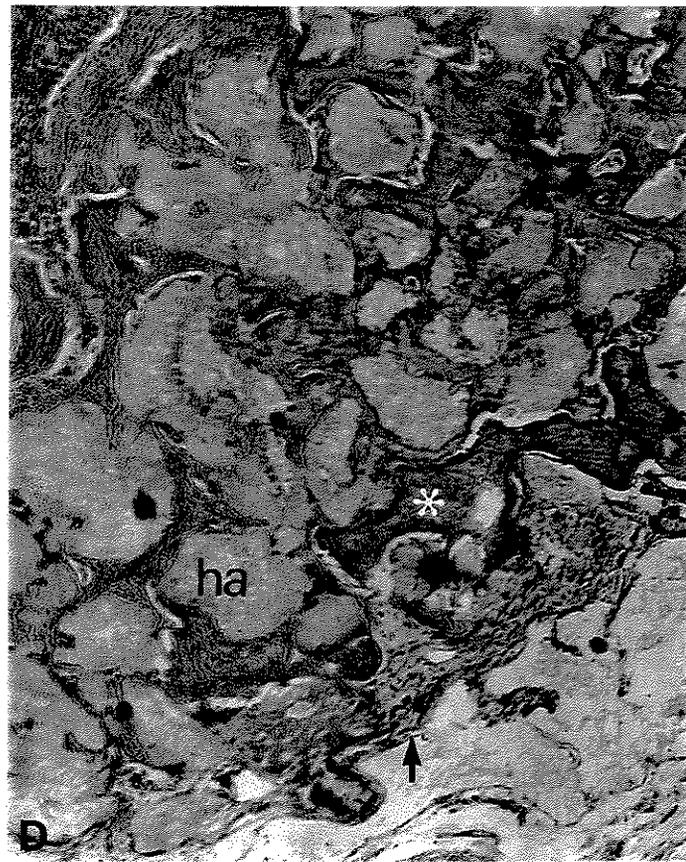
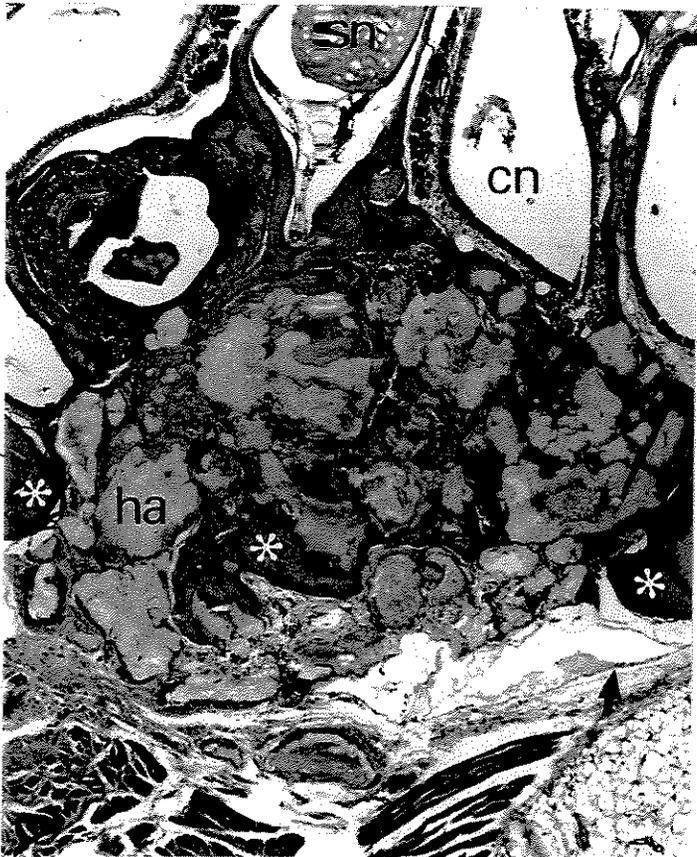
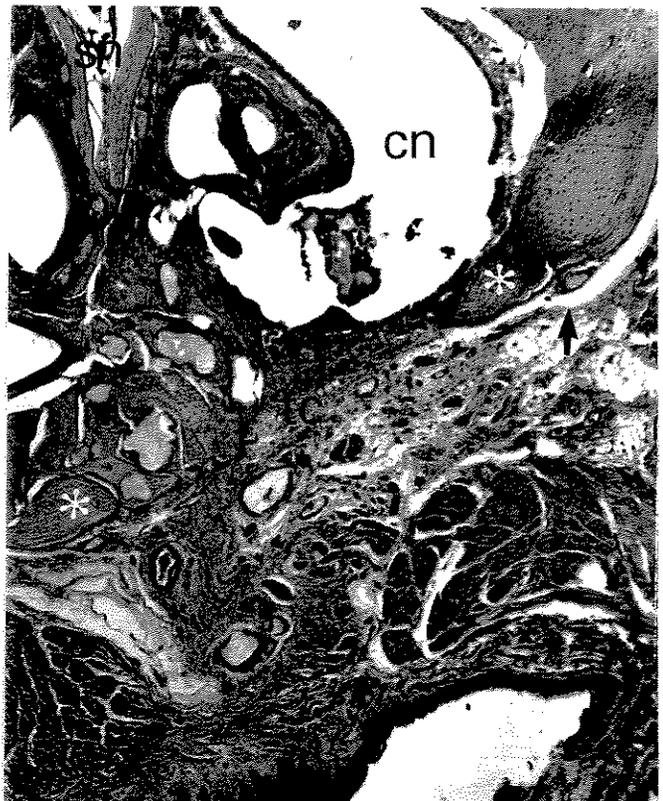
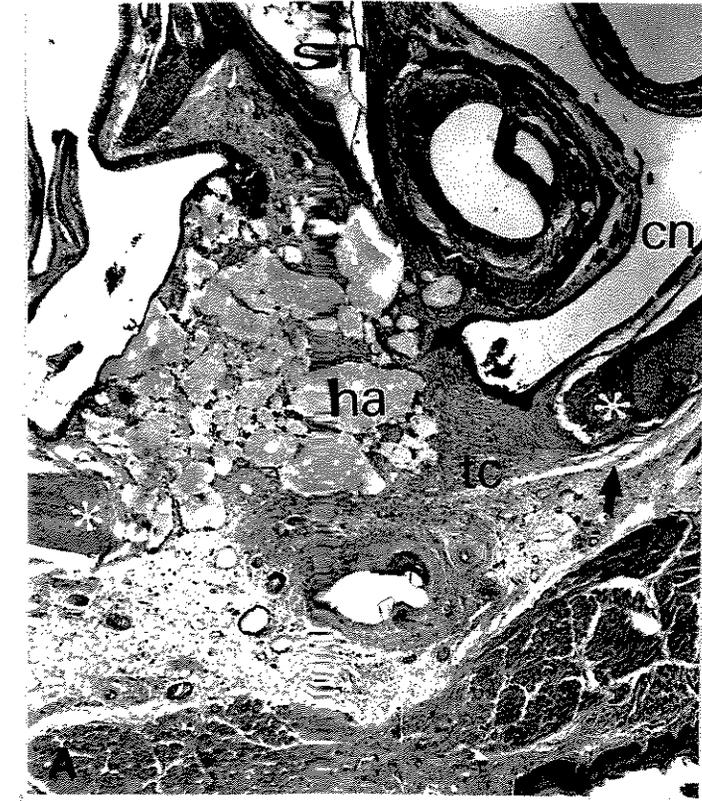


FIGURA 6

Grupo 3 - FALHA RECOBERTA COM ENXERTO PERIOSTAL DO FÊMUR ASSOCIADO À HA POROSA

Com duas semanas de pós-operatório, em todos os casos foi observada a presença de tecido ósseo crescendo a partir da margem da falha. Também foi observado osso novo nos espaços entre os grânulos, sem a interposição de tecido conjuntivo. Presença de infiltrado de células semelhantes a fibroblastos junto aos grânulos de HA foi observado em todos os animais (fig.7a).

Quatro semanas após a cirurgia não ocorreu o reparo completo da falha. Em dois animais a HA deslocou-se para o interior da cavidade nasal. O tecido ósseo neo-formado foi encontrado ao redor dos grânulos de HA, junto ao perióstio que recobriu a falha e na margem da falha (fig.7b). O tecido conjuntivo com células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos preencheu os demais espaços da falha. O perióstio não apresentou alteração na sua espessura.

Após oito semanas o osso novo em contato com os grânulos de HA era abundante. O tecido ósseo formado ao redor dos grânulos era contínuo ao osso do septo nasal e da pré-maxila em três animais do grupo, entretanto, não houve reparo completo da falha. Tecido conjuntivo com células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos também foram notados. O perióstio apresentou-se mais espessado que no período anterior (fig.7c).

Dezesseis semanas após a cirurgia os resultados foram semelhantes àqueles encontrados nos animais com oito semanas. Em dois animais os grânulos de HA migraram para o interior da cavidade nasal, e nos demais os grânulos permaneceram na falha. Tecido conjuntivo com células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos completavam os espaços que não foram ocupados por osso (fig.7d).

Corte frontal da pré-maxila de animais que tiveram a falha preenchida com HA recoberta com enxerto periosteal livre do fêmur.

Figura 7A - Duas semanas após a cirurgia, notar o tecido ósseo neoformado (*) partindo da margem da falha e junto a HA(ha) implantada. O periósteeo (seta) permaneceu inalterado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 7B - Quatro semanas após a cirurgia, notar a presença de tecido ósseo (*) partindo da margem da falha e em contato direto com os grânulos de hidroxiapatita(ha), o periósteeo (seta) apresentou-se inalterado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 7C - Oito semanas de pós-operatório, o periósteeo apresentou-se delgado (seta). Notar a presença de tecido ósseo neoformado(*) ao redor dos grânulos de HA (ha) e partindo da margem da falha. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 64x).

Figura 7D - Dezesesseis semanas após a cirurgia, notar o tecido ósseo neoformado(*) a partir da margem da falha e ao redor dos grânulos de HA (ha), o periósteeo permaneceu delgado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 64x).

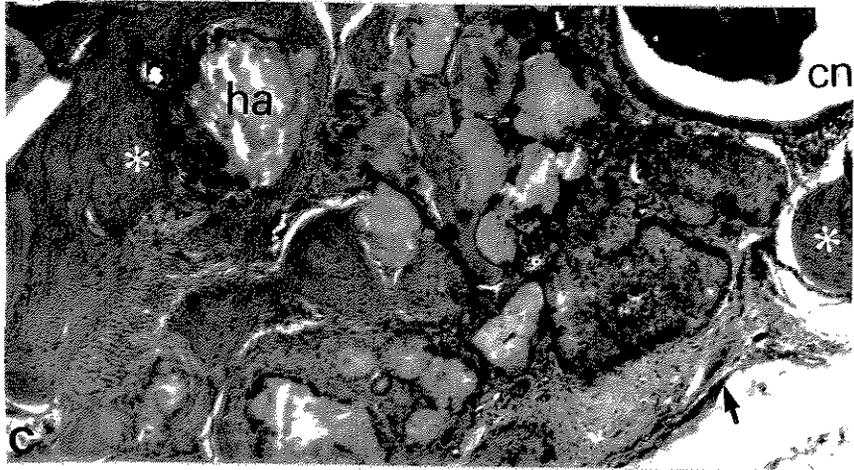
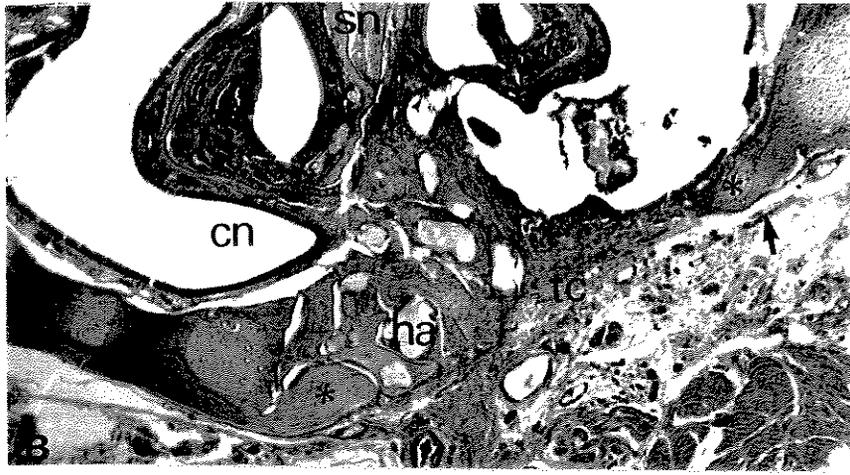
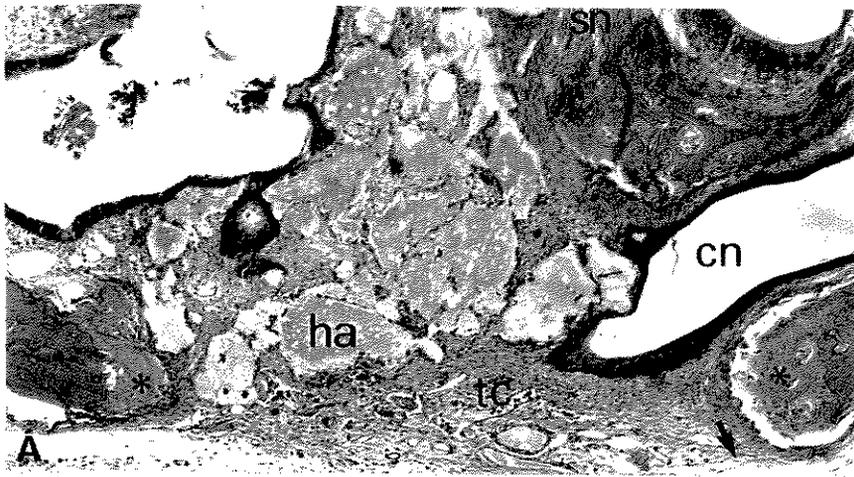


FIGURA 7

Grupo 4 - FALHA RECOBERTA COM ENXERTO PERIOSTAL DO FÊMUR

Em todos os animais com duas semanas de pós-operatório foi observada a presença de tecido conjuntivo com infiltrado de células mononucleares e vasos sanguíneos preenchendo a falha. A discreta presença de tecido ósseo partindo da margem da falha e do septo nasal foi observada em três animais. O perióstio não apresentou alteração na sua espessura (fig.8a).

Após quatro semanas da cirurgia a formação óssea era mais evidente na margem da falha e a partir do septo nasal. Presença de células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos foi notada no interior da falha. O perióstio implantado apresentou duas camadas com limites claros, porém com pouca atividade osteogênica (fig.8b).

Oito semanas após a cirurgia discreta quantidade de tecido ósseo partindo da margem da falha e do septo nasal pôde ser notada em três animais. Tecido conjuntivo com células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos preencheram alguns espaços da falha. Eventualmente foram vistos osteoclastos junto às trabéculas do osso imaturo. A camada interna do perióstio que revestiu a falha apresentou-se espessa e com células em processo de diferenciação (fig.8c).

Dezesseis semanas após a cirurgia houve um maior crescimento do tecido ósseo a partir do septo nasal e da margem da falha, quando comparado aos períodos anteriores. O perióstio era menos espesso e pequena quantidade de células indiferenciadas foi observada (fig.8d).

Corte frontal da pré-maxila de animais que tiveram a falha recoberta com o enxerto periosteal livre do fêmur.

Figura 8a - Duas semanas de pós-operatório, notar a presença de tecido ósseo em formação (*) a partir da margem da falha, que foi preenchida por tecido conjuntivo (tc). Notar o perióstio espessado (seta). Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 8B - Quatro semanas após a cirurgia, notar o osso neoformado (*) partindo da margem da falha, que foi preenchida por tecido conjuntivo (tc). O perióstio (seta) neste período, apresentou-se espessado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 8C - Oito semanas após a cirurgia, tecido ósseo neoformado (*) a partir da margem da falha e o tecido conjuntivo (tc) no seu interior. Notar o perióstio (seta) que permaneceu espessado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 32x).

Figura 8D - Dezesesseis semanas da cirurgia, notar o tecido ósseo (*) partindo da margem da falha, que foi preenchida por tecido conjuntivo (tc). O perióstio(seta) já não se apresentou espessado. Cavidade Nasal(cn), Septo Nasal(sn). (HE - 64x).

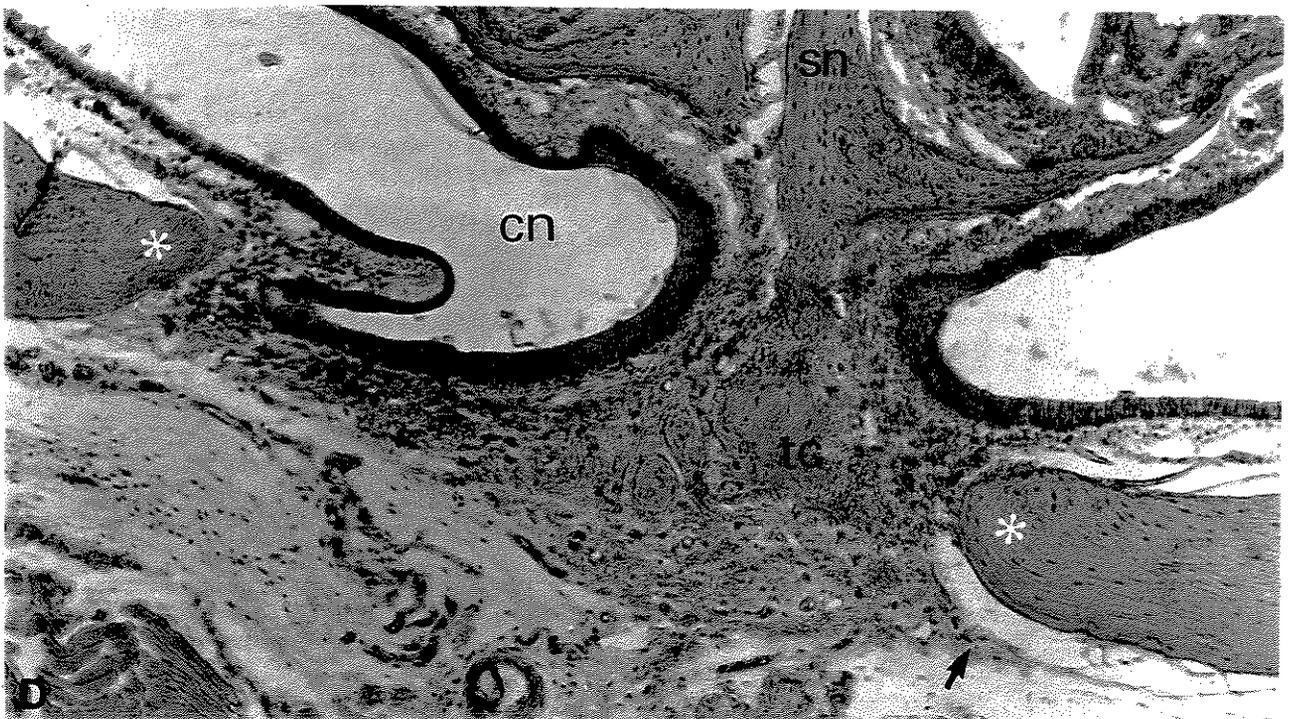
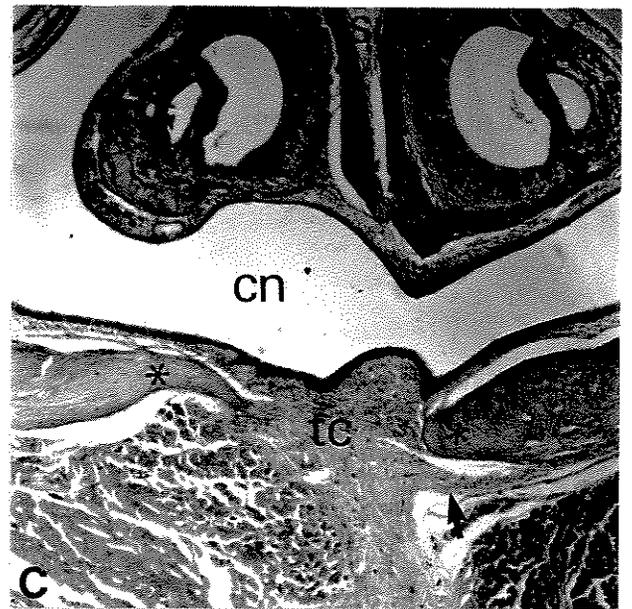
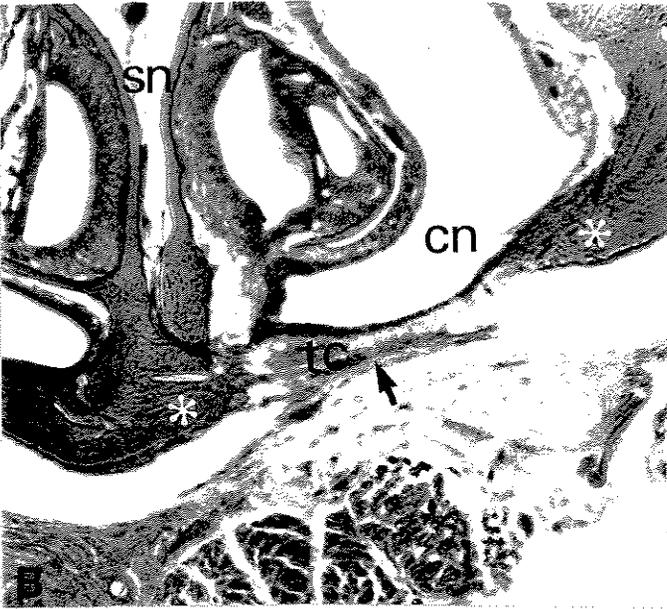
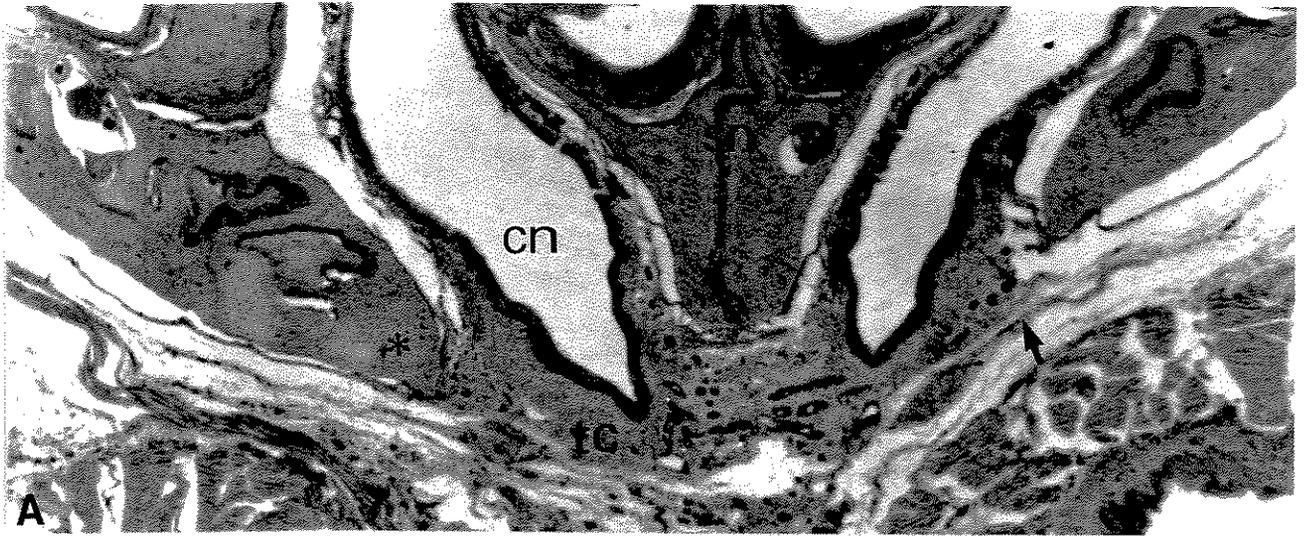


FIGURA 8

5 - DISCUSSÃO:

Para superar as limitações dos estudos clínicos que frequentemente apresentam desvantagens, tais como falta de grupo controle e amostras não representativas, pesquisas são feitas com animais (MORRIS, 1988). Desta forma, muito do que se conhece atualmente sobre cicatrização de fraturas é proveniente de estudos experimentais, os quais têm ajudado a compreender o processo de reparo ósseo em humanos. Problemas que não podem ser resolvidos através de observações clínicas, tais como defeitos ósseos congênitos e biocompatibilidade de materiais em cirurgias buco-maxilo-faciais, podem ser avaliados em animais de laboratório.

Cada modelo animal apresenta suas vantagens e limitações de acordo com o experimento. A interpretação dos resultados não deve ir além das limitações impostas pelo modelo biológico empregado. Desta forma, é importante formular hipóteses que dêem condições ao próprio experimento de respondê-las. Quando consideramos um modelo experimental apropriado para cirurgias ortopédicas, intuitivamente buscamos um animal mais semelhante à espécie humana. Entretanto, o uso de primatas é limitado por aspectos físicos e financeiros. O emprego de coelhos e ratos é mais barato, viáveis e seus resultados podem ser futuramente estendidos para o homem.

O uso de um biomaterial depende da análise particular do seu desempenho junto ao tecido enxertado, porém isto não pode ser provado por estudos clínicos em humanos. Desta forma, um modelo animal para simular fenda palatina tornou-se necessário. A indução de fenda palatina em animais experimentais pode ser realizada de duas maneiras: na primeira o defeito é criado cirurgicamente, porém não deve apresentar cicatrização espontânea, na segunda através da administração de agentes teratogênicos em fêmeas prenhes (GIBSON & BECKER, 1968; McLURE et al.,1979, SULIK et al.,1979)

A criação cirúrgica da fenda palatina foi relatada na literatura por HARVOLD (1950), que produziu uma fenda de 2mm no palato duro de macacos Rhesus. Este defeito foi produzido diretamente através da remoção do tecido ósseo e compressão do local para promover a reabsorção das margens da fenda. CHIERICI et al. (1970) modificaram a técnica de Harvold, produzindo uma fenda de 3mm na pré-maxila e no palato duro de trinta Macaca mulatta.

BOYNE (1974) e mais tarde EL-DEEB et al. (1985) também usaram o macaco como modelo para criação de fendas bilaterais. Ambas as técnicas envolveram a exodontia dos incisivos centrais e a remoção de 1cm de segmento ósseo. O método de Boyne consistiu na sutura da mucosa nasal diretamente na mucosa bucal, através da falha, para manter o defeito.

Cães foram utilizados primeiramente por JONSSON & STENSTROM (1978), que criaram cirurgicamente fendas com 5mm de diâmetro no palato duro. Fendas palatinas submucosas também foram produzidas em gatos domésticos por FRENG (1979). O método cirúrgico incluiu a remoção de 5mm do palato ósseo e posterior sutura da mucosa palatina sobre o defeito. Roedores também foram empregados com relativo sucesso em pesquisas com fendas palatinas. As maiores dificuldades na produção de fendas, quando são utilizados estes modelos biológicos, são o pequeno tamanho do local e o limitado acesso ao campo cirúrgico.

TAKANO-YAMAMOTO et al. (1992) utilizaram ratos como modelo experimental para reproduzir uma fenda palatina que não sofresse cicatrização espontânea. Para isso foram feitos defeitos ósseos circulares com 2mm de diâmetro na pré-maxila de ratos, exatamente atrás dos incisivos. Segundo os autores, o rato apresentou ser um modelo apropriado para estudar o tratamento de fendas palatinas e alveolares. Para FREEMAN & TURNBULL (1973) defeitos com 2mm de diâmetro realizados no osso parietal de ratos, com até oito semanas de pós-operatório, não apresentaram cicatrização espontânea.

Em nosso trabalho também empregamos o rato como modelo. Com uma broca esférica de 2mm de diâmetro padronizamos o tamanho da falha. Nossos procedimentos estão de acordo com os dos autores citados, confirmando assim ser apropriado o modelo experimental bem como o diâmetro do defeito ósseo para avaliar o desempenho da HA.

O enxerto de osso autógeno é freqüentemente empregado no tratamento de fenda palatina, porém outros materiais como enxerto de periósteo da maxila (SKOOG,1965; HÖNIG, et al., 1998), enxerto periosteal livre (RITSILÄ et al.,1976; SCHULTZ,1984) e materiais aloplásticos como a hidroxiapatita (REUTERS et al.,1985; COTTRELL & WOLFORD, 1998) também têm sido utilizados com sucesso.

A utilização do enxerto ósseo está indicada em cirurgias ortognáticas para tratar defeitos de continuidade, melhorar a cicatrização e para promover estabilidade ao local operado, tradicionalmente desfavorecido pela movimentação ortognática. A utilização da HA porosa como um material aloplástico de implantação oferece vantagens como ausência de resposta auto-imune e apresenta rápida e fácil manipulação, com quantidade ilimitada.

A avaliação clínica da HA pode ser feita através de controles radiográficos ou de biópsias. A execução de biópsias submetem o paciente a um segundo trauma e às vezes o local operado é de difícil acesso. KLEIN et al. (1983), utilizando o método radiográfico para avaliar a formação de osso junto ao implante de HA na tíbia de ratos, encontraram imagens que sugeriram a presença de tecido ósseo depositado bem próximo aos implantes. Essas imagens perderam gradualmente sua radiopacidade nos períodos de seis e nove meses após a implantação, indicando a ocorrência de remodelação óssea.

Também com o propósito de avaliar a formação óssea ao redor de implantes de HA em ratos, TAKESHITA et al. (1997), empregando microscopia confocal, relataram que houve

formação óssea do décimo quarto ao vigésimo oitavo dia, e que a porcentagem de tecido ósseo em contato com a HA foi maior que a do titânio, outro material avaliado no experimento.

Em nossa avaliação radiográfica observamos a diminuição gradativa do contorno radiolúcido da falha produzida, que continha HA recoberta tanto com o periósteo da pré-maxila como do fêmur. Essa observação foi possível quatro semanas após a cirurgia. A diminuição dos pontos de radiolucidez no interior do implante e as saliências radiopacas partindo da margem da falha foram melhor observadas, oito e 16 semanas após a cirurgia, nos animais tratados com HA associada ao periósteo do fêmur. Esses resultados representam radiograficamente a presença de osso ao redor e no interior do implante.

YAMACHITA et al (1998) e COTTRELL & WOLFORD (1998) utilizaram a radiografia e tomografia computadorizada para avaliar a estabilidade dos blocos de HA porosa em pacientes submetidos a cirurgias ortognáticas. Eles observaram a permanência dos blocos de HA no local implantado um ano após a cirurgia. ROSEN & ACKERMAN (1991) empregando a HA porosa, também avaliaram a estabilidade dos implantes através de radiografias, notando áreas radiopacas ao redor e no interior do implante, em 76 pacientes submetidos a cirurgia ortognática. Através das nossas radiografias, pudemos comprovar a permanência dos blocos de HA no interior da falha, na maioria dos animais estudados durante todo os períodos avaliados.

Avaliando o potencial osteogênico do periósteo da maxila, SKOOG (1965) relatou o desenvolvimento espontâneo de uma "ponte" óssea unindo as margens da fenda palatina em oito crianças, quando utilizou retalho periostal do local. RITSILÄ et al. (1976) após analisar as radiografias de 26 pacientes com fenda palatina congênita, tratadas com o periósteo da tíbia, afirmaram ser incontestável o potencial osteogênico deste enxerto. Baseados em análises radiográficas foi observada a formação de uma "ponte" de tecido ósseo partindo da margem da

falha após duas semanas de pós-operatório. Com seis semanas o defeito fora quase que completamente preenchido.

SCHULTZ (1984) também empregou tomadas radiográficas 2, 6, 12, 24 e 52 semanas após a cirurgia, para avaliar o desempenho do enxerto periostal livre da tíbia, no tratamento de 14 pacientes com fenda palatina. Observou a formação de uma "ponte" óssea preenchendo a falha, após o último controle. A tomografia computadorizada também foi empregada, confirmando os achados radiográficos.

Resultados semelhantes foram relatados por RINTALA & RANTA (1989) após avaliação radiográfica de 67 pacientes com fenda palatina tratados com enxerto periostal da maxila e com enxerto periostal livre da tíbia. Suas radiografias oclusais indicaram a presença de uma "ponte" óssea bem definida, partindo das margens da fenda, em 65% dos pacientes tratados com o perióstio da maxila e 85% dos pacientes tratados com o perióstio da tíbia.

Nossas observações radiográficas evidenciaram o crescimento ósseo, uma vez que foram observadas pequenas espículas radiopacas partindo da margem da falha, quando empregado o enxerto periostal livre do fêmur associado ou não à HA oito e 16 semanas após a cirurgia. O perióstio da pré-maxila, associado ou não à HA, também apresentou resultados favoráveis, porém as espículas radiopacas foram menos evidentes que nos outros grupos analisados, representando um desempenho inferior em comparação com o enxerto periostal do fêmur.

Quanto aos aspectos histológicos, empregando enxerto periostal da maxila no tratamento de 52 crianças com fenda palatina, SKOOG (1967) obteve resultados favoráveis. Biópsias demonstraram a presença de osso neoformado partindo da margem da pré-maxila, preenchendo a fenda. Também foi observada proliferação de osteoblastos e de vasos sanguíneos em uma estrutura fibrilar. Essas células tinham origem tanto na superfície óssea quanto no perióstio enxertado, que se apresentava espessado.

As pesquisas com enxertos periostais livres foram estimuladas pela insuficiência de tecido ósseo obtido quando se empregava o perióstio da maxila no tratamento de fendas palatinas. RITSILÄ et al. (1972 b) estudando o potencial osteogénico do perióstio da maxila em 63 pacientes com fenda palatina observaram a formação de uma ponte óssea em 54% dos pacientes operados. Empregando enxerto periostal livre da tibia em 26 pacientes também portadores de fenda palatina obtiveram êxito em 77% dos casos. Concluíram então que o enxerto periostal livre produz mais osso em menor tempo e com menor possibilidade de falha. Novos estudos realizados por RITSILÄ et al. (1976) apresentaram resultados semelhantes, isto é, o perióstio da tibia enxertado em fenda palatina produz mais osso que o perióstio do local.

UDDSTRÖMER & RITSILÄ (1978) avaliaram, em 43 coelhos, o potencial osteogénico do enxerto periostal da tibia no tratamento de defeito ósseo produzido na calvária e vice-versa. De acordo com esses autores, o perióstio da tibia demonstrou ser capaz de promover o completo reparo da falha, enquanto o perióstio da calvária não apresentou potencial osteogénico para tal. Também foram vistos pequenos vasos sanguíneos invadindo a falha com a utilização do perióstio da tibia. Em nosso estudo, duas e quatro semanas após a cirurgia, o perióstio da tibia apresentou-se espessado e sua camada interna com proliferação osteoblástica. Nestes períodos não foi encontrado osso em formação. Após seis e oito semanas, o perióstio da tibia diminuiu sua espessura e o osso novo em formação apresentou-se disposto sobre o osso compacto das margens da falha.

Em nosso estudo, a análise histológica da falha recoberta com o perióstio da pré-maxila ou com o perióstio do fêmur apresentou, após duas e quatro semanas, a presença de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e células semelhantes a fibroblastos preenchendo o local. Tanto o perióstio da pré-maxila, quanto o perióstio do fêmur, apresentaram-se discretamente espessados e em pouca atividade osteogénica. Nestes períodos observou-se osso em formação

partindo da margem da falha. Após oito e 16 semanas o perióstio apresentou menor espessamento e o osso neoformado, que partiu da margem da falha, foi mais abundante que nos períodos anteriores.

Embora não tenham sido submetidos a uma análise quantitativa e os resultados analisados não tenham oferecido diferenças significativas do melhor desempenho do perióstio da pré-maxila em relação ao perióstio do fêmur, de acordo com os nossos resultados, os animais tratados com o enxerto periostal do fêmur apresentaram radiograficamente resultados mais satisfatórios.

Segundo GALLIE (1931) e BRUWELL (1969), independente do tempo de desvascularização, a membrana periostal atua como uma barreira semipermeável que contém células osteoprogenitoras e substâncias de indução óssea. Essa característica inerente aos enxertos periostais livres, bem como a baixa capacidade osteogénica do perióstio do crânio (ONO et. al., 1993, DONOHUE & MACRÉS, 1993) devem ser, em nossa opinião, os responsáveis pelo melhor desempenho do perióstio do fêmur.

Os princípios que envolvem a utilização do enxerto periostal livre, baseados no seu potencial osteogénico e em promover uma continuidade óssea prevenindo o colapso da maxila, foram alcançados em nosso estudo. Os animais com oito e 16 semanas de pós-operatório, tratados com o perióstio do fêmur, apresentaram resultados satisfatórios. Embora o retalho periostal do fêmur tenha sido cuidadosamente removido do seu leito, a camada celular osteogénica pode não ter sido bem preservada, o que impede o seu efetivo desempenho.

Com relação ao estudo histológico dos grupos tratados com o enxerto periostal da pré-maxila e com o enxerto periostal livre do fêmur, associados à hidroxiapatita, não se observou reparação total da falha óssea, bem como presença de processo inflamatório no local operado nos períodos estudados. Entretanto, notou-se a presença de tecido ósseo partindo da margem da falha e em contato direto com os grânulos de HA, a partir da segunda até a quarta semana. Com oito e

16 semanas observou-se um maior volume de tecido ósseo circundando os grânulos de HA, sem a interposição de tecido fibroso, quando comparado aos períodos anteriores. A presença de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e células semelhantes a fibroblastos foi observada preenchendo os espaços restantes da falha na maioria dos animais tratados. Isso aconteceu tanto na associação da HA com o perióstio da pré-maxila, quanto na associação da HA com perióstio do fêmur.

Resultados semelhantes foram obtidos por TAKANO-YAMAMOTO et al. (1992) quando avaliaram a regeneração de defeito ósseo produzido na pré-maxila de ratos tratados com estimulação ultra-sônica e matriz óssea desmineralizada. Segundo os autores, 35 dias após a cirurgia o tecido ósseo neoformado partiu da margem da falha que fora preenchida por tecido conjuntivo.

Avaliando o potencial osteogênico de biomateriais implantados no palato de cobaias, NAAMAN BOU-ABB OUD et al. (1993) em suas análises histológicas não observaram a presença de processo inflamatório ou necrose. Seis meses após a cirurgia foram encontradas células semelhantes a fibroblastos e vasos sanguíneos no interior do tecido conjuntivo presente na falha. O tecido ósseo circundava os grânulos de hidroxiapatita.

WIESE & MERTEN (1993) avaliaram o papel do perióstio na osteointegração de hidroxiapatita granular, concluíram que o perióstio desempenha importante papel, agindo como membrana limitante e guia para o tecido ósseo em regeneração. A integridade do perióstio ao redor do implante deve ser mantida para favorecer a união do tecido ósseo com os grânulos e para evitar a invasão do tecido conjuntivo fibroso.

ANDRADE (1998) estudando a osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos produzidos em cavidades de fêmures de ratos, encontrou trabéculas ósseas ao redor do implante de hidroxiapatita porosa, uma semana após a cirurgia. Com duas e quatro semanas notou o crescimento de tecido ósseo com aspecto lamelar no interior dos poros e nos animais com oito e

16 semanas o tecido ósseo circundava quase todos os grânulos sem a interposição de tecido conjuntivo fibroso. Notou-se que o perióstio contribuiu para a permanência dos implantes na cavidade produzida no fêmur e serviu como fonte de osteoblastos para o reparo ósseo.

Em nosso estudo ficou evidente a atuação do perióstio da pré-maxila e do fêmur como barreira limitante, impedindo a invasão da falha pelo tecido conjuntivo adjacente. Serviu também como guia para o tecido ósseo em regeneração, já que o osso novo que partiu da margem da falha cresceu em direção aos grânulos implantados.

Sob o ponto de vista clínico, COTTRELL & WOLFORD (1998) afirmam que a hidroxiapatita porosa em forma de blocos apresenta alta porcentagem de sucesso e eficácia como substituto de enxertos ósseos em cirurgias ortognáticas. Segundo os autores, também a adequada cobertura dos implantes com o perióstio é de grande importância para o sucesso dos implantes no palato. Dos 245 pacientes tratados houve 86% de sucesso.

Em nosso experimento alguns grânulos foram deslocados do local implantado para a cavidade nasal. Isto pode ter ocorrido devido a função mastigatória pós-operatória sem restrições. Outros fatores como a ruptura da membrana da mucosa nasal durante a cirurgia e o maior diâmetro da cavidade produzida na pré-maxila, sempre maior que a do bloco de hidroxiapatita implantada, também podem ter sido os responsáveis pelo deslocamento do implante para o interior da cavidade nasal.

Nos resultados encontrados por REUTERS et al. (1985) em reparos de falhas ósseas produzidas na pré-maxila de ratos tratados com hidroxiapatita porosa, o implante estava sempre separado do osso da pré-maxila por uma zona de tecido conjuntivo. Somente após oito meses encontrou-se pela primeira vez, osso neoformado sobre a superfície da HA. A partir do décimo mês até o décimo sexto os poros internos da cerâmica também foram preenchidos com tecido ósseo maduro. Para esses autores essa neoformação óssea não pode ser resultado de um

crescimento contínuo do osso da pré-maxila e sim que o modelo experimental empregado apresentou uma osteogênese independente originada pela transformação de células osteoprogenitoras locais em osteoblastos.

Em nossos estudos encontramos tecido ósseo partindo da margem da falha a partir da segunda semana após a cirurgia e em contato direto com os grânulos de HA implantada. Apresentou, ainda, condições biomecânicas e rede osteogênica definidas, oito e 16 semanas após o implante. A associação do periósteo do fêmur com a HA apresentou melhor desempenho que o periósteo da pré-maxila associado à HA.

De acordo com DELLING et al. (1969) a calcitonina acelera o processo de cicatrização e contribui para a formação do calo ósseo. UCHIDA et al. (1988), sugerem que a calcitonina regula o processo de cicatrização da fratura por estimulação da síntese de proteoglicanas pelas células periostais, isto é, sintetizam mais proteoglicanas em condições especiais como nas fraturas ou estimulação elétrica. Sabe-se também que SHEDDEN et al. (1976) verificaram que a fosfatase alcalina nas células periostais dos ossos longos de ratos é maior que em outros locais. Deste modo, a fosfatase alcalina e a síntese de proteoglicanas nas células periostais apresentam-se como indicadores do metabolismo celular e do melhor desempenho do periósteo do fêmur quando comparado ao periósteo da pré-maxila.

Em alguns animais do nosso estudo houve o deslocamento de grânulos de HA para a cavidade nasal, o fato da nutrição oral dos animais ter sido continuada sem a interrupção pós operatória, pode ter provocado uma desordem mecânica com micromovimentação do implante na fase inicial do reparo. Outros fatores como a ruptura da membrana da mucosa nasal durante a cirurgia e o maior diâmetro da cavidade produzida na pré-maxila, sempre maior que do bloco de hidroxiapatita implantada, podem ter sido os responsáveis por esse deslocamento.

Nossos resultados demonstram que a neoformação óssea no local do implante é o resultado de um crescimento continuado do osso da pré-maxila, e que graças a ação do periósteo do fêmur que recobriu o local houve a formação de osso novo dentro e sobre a cerâmica implantada. Independentemente da confirmação de que a estabilização primária e o contato de grandes superfícies representem condições essenciais para uma cicatrização óssea com sucesso, o experimento demonstrou uma ligação óssea entre o osso da margem da falha e o implante de hidroxiapatita, bem como a biocompatibilidade e a osteocondutividade da hidroxiapatita avaliada e as propriedades osteogênicas do periósteo do fêmur.

6. CONCLUSÕES

A hidroxiapatita que vem sendo desenvolvida pelo Instituto de Química da UNICAMP apresenta biocompatibilidade, oferecendo estabilidade ao local operado permitindo o crescimento ósseo para o interior da falha produzida, tornando-se um possível substituto para o enxerto de osso autógeno.

Tanto o enxerto periosteal livre obtido do fêmur quanto o periósteo da pré-maxila contribuíram como barreira limitante, mantendo a HA no interior da falha. O enxerto periosteal livre do fêmur apresentou maior potencial osteogênico do que o da pré-maxila.

O osso neofomado manteve contato direto com a HA implantada, sem a interposição de tecido conjuntivo.

Os achados radiográficos foram confirmados pela análise histológica.

A associação proposta demonstrou ser favorável à reparação óssea do local e o modelo experimental empregado bem como a metodologia utilizada revelaram-se adequados para alcançar os objetivos propostos nesse trabalho.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALHOPURO, S. Premature fusion of facial sutures with free periosteal grafts. Scand. J. Plast. Reconst. Surg. Supl.17, 1978.
- ALPER, G. et al. Osteogenesis in bone defects in rats: The effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. Am. J. Med. Sci. v.298, p.371-376. 1989.
- ANDRADE, J.C. T. Osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita em cavidades produzidas no fêmur do rato. Campinas: UNICAMP, 1998. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- AXHAUSEN, G. Histologische Untersuchungen Über Knochentransplantation am Menschen. Deutsch Zeitschr F. Chir. v.91, p.388-428, 1909. Apud CHASE, S.W. & HERNDON, C.H. 1955.
- AXHAUSEN, W. The osteogenic phases of regeneration of bone. The Journal of bone Joint Surgery, v. 38, n° 3, p. 593 - 600, 1956.
- BÄCKDAL, M., NORDIN, K.E. Replacement of the maxillary bone defect in cleft palate. A new procedure. Acta Chir. Scand. v.122, p. 131-136, 1961.

- BARRO, W.B., LATHAM, R. A. Palatal periosteal response to surgical trauma. Plastic and reconstructive Surgery. v.67, p.6-16, 1981.
- BASSET, C.A.L. Currents concepts of bone foemation. J. Bone Joint Surg. v.44 , p.1217-1244, 1962.
- BLIJDORP, P. A. et al. The hydroxylapatite-bone interface. Studies on a human biopsy. J. Oral Maxillofa Surg. v.17, n°6, p.354-357,. 1988.
- BOYNE, P.J. Use of marrow-cancelous bone grafts in maxillary alveolar and palatal clefts. J. Dent. Res. V. 53, p.821 - 824, 1974.
- BOU-ABBOUD, N. N., PATAT, J. L., GUILLEMIN, G., ISSAHAKIAN, S., FOREST, N., OUHAYOUN, J.P. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the paladal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. Biomaterials. v. 15, n°3, p. 201 - 207, 1994.
- BROWN, W.L. & BROWN, C.P. Preliminary report on experimental bone and pariosteal transplantation. Surg. Gynec. Obstet. v.17, p.681, 1913.
- BRUWELL, R.G. The fate of bone grafts. Recent advances in orthopaedics. Ed Appley A.G., Churchill, Londin. 115-191, 1969.

- BURMAN, M.S., UMANSKY, M. Na experimentalstudy of free periosteal tranplants, wrapped around tendon. J. Bone Jt. Surg. v.12, p.579-594, 1930.
- CHANG, C.S. et al. Histologic study of hydroxyapatite as na implant material for mandibular au gmentation. J. Oral Maxillofac. Surg. v.41, n° 11, p.729-737, 1983.
- CHAO, S.Y., POON, C.K. Histologic study of tissue response to implanted hydroxylapatite in two patients. J. Oral Maxillofac. Surg. v.45, n°4, p.359-362, 1987.
- CHIERICI, G., HARVOLD, E.P., DAWSON, W.J. Primate experiments on facial assimetry. J. Dent. Res. V. 49, p. 847 - 851, 1970.
- COTTRELL, D. A., WOLFORD, L. M. Long-term evaluation of the use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. J. Oral. Maxillofac. Surg. v.56, p. 935-942, 1998.
- DALIA EL-BOKLE, B.D.S., SMITH, S., GERMANE, N., SHARAWY, M. New technique for creating permanent experimental alveolar clefts in a rabbit model. Cleft Palate-Cranofacial Journal. V.30, n°6, p.545 - 547, 1993.
- DAMIEN,C.J. et al. Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with na osteoinductive factor. J. Biomed. Mater. Res. v.24, p.639-654, 1990.

DAVIS, J. S., HUNNICUTT, J.A. The osteogenic power of periosteum with a note on bone transplantation. Ann Surg. v.61, p.672-677, 1915.

DEBONI, M.C.Z. Hidroxiapatita em Odontologia. Principais aspectos do seu uso na recomposição do rebordo alveolar mandibular. São Paulo. USP: 1991. 86p. Dissertação (Mestrado- Faculdade de Odontologia de São Paulo). Universidade de São Paulo.

DELAIRE, J., PRECIOUS, D. S., GORDEEF, A. The advantage of wide subperiosteal exposure in primary surgical correction of labial maxillary clefts. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v. 22, p. 147- 151, 1988.

DELLING, G., SCHAFER, A., ZIEGLER, R. The effect of calcitonin on fracture healing and ectopic bone formation in the rat. In: Proc Second International Symposium, London . 1969.

DENISSEM, H.W. & DE GROOT, K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. J. Prosthet. Dent. v.42, nº5, p.551-556, 1979.

DONATH, K. Mobile and immobile hydroxyapatite integration and resorption and its influence on bone. J. Oral Odontol. V.13, nº1, p.120-127, 1987.

- DONOHUE, W.B., MASCRETS, C. A comparison of the effects of two hydroxyapatites and a metacrylate resin on bone formation in the rat ilium. Int. J. Oral Maxillofac Implants. V.8, n°1, p.75-82, 1993.
- DROBECK, H.P. - Histologic observation of soft tissue responses to implanted. Multifaceted particles and discs of hydroxylapatite. J. Oral Maxillofac. Surg. v.42, n°3, p. 143-149, 1984.
- DUHAMEL, H.L. Sur le developpement et le crue des os des animaux. Mém. De L'Acad. Roy des Sciences, Paris. V.55. p.354-370,1742. Apud CHASE, S.W.& HERNDON, C.H.,1955.
- EICH, J.D. et al. Mechanical behavior of mandibular continuity defects reconstucted using combinations of hydroxylapatite and autogenous bone. J. Oral. Maxillof. Surg. v.48, n°8, p.823-830, 1990.
- EL-DEEB, M., HORSEWELL, B., WAITE, D.E. A primate model for producing experimental alveolar clefts defects. J. Oral. Maxillof. Surg. v. 43, p. 523 - 527, 1985.
- ENGDAHL, E. Bone regeneration in maxillary defects. Scand. J. of Plastic and Reconstr. Surg. Supplementum 8, p. 1-73, 1972.
- FANG, H.C., MILTNER, L.J. Comparison of osteogenic power of periostal transplants from rib and tibia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. V.31, p.1239-1240, 1933;

- FRAME, J.W. Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. v.16, p. 642-655, 1987.
- FREEMAN, E., TURNBULL, R.S. The value of osseous coagulum as a graft material. J. Periodont. Res. v.8, p.229, 1973.
- FRENG, A. Single layered periosteoplasty in experimental mid-palatal clefts. A histological study in cat. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v. 13, p. 401 - 408, 1979.
- FROST, H.M. Bone modeling and skeletal modeling errors. Springfield, Ill. C.C. Thomas. 1973 .
- GABKA, J. Hasenscharten und Wolfsrachen. Entstehung, Behandlung und Operationsverfahren. Berlin: De Gruyter, 1964.
- GALLIE, W.E. The transplantation of bone. Bri. Med. V. 2, p.840-844, 1931.
- GIBSON, J.E., BECKER, B.A. The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. Cancer Res. V. 28, p.475 - 480, 1968.
- GLOWACKI, J., KABAN, L.M., MURRAY, J.E., FOLKMAN, J., MULLIKEN, J.B. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet. v.1, p.959-961, 1981.

- GUMAER, K.I. Tissue response in dogs to dense hydroxylapatite implantation in the femur. J. Oral Maxillofac Surg. v.44, p.618-627, 1986.
- HALDEMAN, K. O. .The rôle of periosteum in the healing of fractures. Arch. of Surg. v. 24, p.440 - 450, 1932.
- HAM, A.W.HistoIogical study of the early phases of bone repair. J. Bone Joint. Surg. V.12, p.827-844, 1930.
- HANCOX, N.M. The biology of bone. Cambridge: Cambridge University Press. 1972.
- HARVOLD, E. Cleft palate, an experiment. Acta Odontol. Scand. V.9, p.84 - 87, 1950
- HENCH, L.L. Bioceramics: From concept to clinic. J. Am. Ceram. Soc. v.74, n.7, p.1487-1510, 1991.
- _____, ETHRIDGE, E.C. Biomaterials: An Interfacial Approach. New York: Academic Press. 1982.
- HÖNIG, J. F., MERTEN, H. A., WILTFANG, J. Significance of the periosteum in onlay craniofacial augmentation. The Journal of Craniofacial Surgery. v. 9, n°3, p. 260 - 266, 1998.

JOHANSON, B., OHLSON, A. Bone grafting and dental orthopedics in primary and secondary cases of cleft lip and palate. Acta Chir. Scand. v.122, p.112-116, 1961.

JONSSON, G., STENSTROM, S. Maxillary growth after palatal surgery. Na experimental study on dogs. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v.42, p.3-9, 1978.

KAWACHI, R.Y., BERTRAN, C.A., KUBOTA, L.T. Fosfato de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo. Campinas: UNICAMP, 1997. 93p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

KENNEY, E.B., LEKOVIC, V., HAN, T., et al. The use of porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. J. Periodontol. v.56, p.82-87, 1985.

KENNEY, E.B., LEKOVIC, V., SÁFERREIRA, J.C., et al. Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. J. Periodontol. v.57, p.57-61, 1986.

KLEIN, C.P.A.T., DRIESSEN, A. A., GROOT, K. HOOF, A. VAN DEN. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. J. Biom. Mat. Res. v.17, p. 769 - 784, 1983.

- KLINGE, B. et al. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. J. Oral Maxillofac. Surg. v.50, n°3, p.241-249, 1992.
- KURZ, L.T., STEVEN, R.G., BOOTH JR, R.E. Iliac bone grafting: techniques and complications of harvesting. Clin Orthop. Rel Res. n° 241, 1988.
- KOSTOPOULUS, L., KARRING, T. Role of periosteum in the formation of jaw bone. An experiment in the rat. J. Clin. Periodontol. V. 22, p.247-254, 1995.
- LERICHE, R. & POLICARD, A. The normal and pathological physiology of bone. St. Louis Hosby, 1928.
- LEHTINEN, R. et al. Bone response to hydroxylapatite particles of different shapes in rabbit tibia. J. Oral Maxillofac. Surg. v.48, n°10, p.1075-1078, 1990
- LUPO, G., RONCHI, P. Long term results in cleft and palate repair with modified periosteal flap technique. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v. 21, p.115-117, 1987.
- MACEWEN, W. The growth of bone. Observations on osteogenesis. The experimental inquiry into the development and reproduction of diaphyseal bone. Glasgow, James Mclehorse and Sons, 1912, Apud BASSET, C.A.L., 1962.

- MATTHEWS, D., BROOMHEAD, I., GROSSMANN, W., GOLDIN, H. Early and late bone grafting in cases of cleft lip and palate. Br. J. Plast. Surg. v.23, p.115-119, 1970.
- MAYER, L., WIEHNER, E. Neue Versuche zur Frage der Bedeutung der einzelnen Komponenten des Knochengewebes bei der Regeneration und Transplantation von Knochen. Arch. Klin. Chir. v.103, p. 732-737, 1914.
- McCLURE, H.M., WILK, A.L., HORIGAN, E.A., PRATT, R.M. Induction of craniofacial malformations in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with cyclophosphamide. Cleft Palate J. v.16, p. 248 - 256, 1979.
- McKIBBIN, B. The biology of fracture healing in long bones. J. Bone Jt. Surg. v.60, p.150-162, 1978.
- MELCHER, A.H. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. Archs. Oral. Biol. V.14, p.1101-1112, 1969.
- MEHLISCH, D.R. et al. Collagen/hydroxyapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges. Twelve-month clinical data. J. Oral Maxillofac. Surg. v.46, p.839-843, 1988.
- MISIEK, D. Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shape. J. Oral Maxillofac. Surg. v.71, n°3, p.150-160, 1984.

MORRIS, R.W. A statistical study of papers in the Journal of Bone and Joint Surgery. J. Bone Joint Surg. v. 70 - B, p. 242 - 246, 1988.

NAAMAN BOU—ABBOUD, N., PATAT, J.L., GUILLEMIN, G., ISSAHAKIAN, S., FOREST, N., OUHAYOUN, J.P. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. Biomaterials. v.15, n°3, p. 201-207, 1993.

NORDIN, K.E. & JOHANSON, B. Freie knochentransplantation bei Defekten im alveolarkamm nach kieferorthopädischer Einstellung der maxilla bei lipen-Kiefer-Gaumensplatten. Fortsch Kiefer-Gesichtschir. V.1, p.168-171, 1955.

OHGUSHI, et al. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxylapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. J. Biomed. Mater. Res. v.24, n°12, p.1563-1570, 1990.

OLLIER, L. Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. Paris, Victor Masson et Fils. V.63, 1867. Apud CHASE, S.W. & HERNIMON, C.H. 1955.

ONO I, SUDA K., TAKESITA, T., GUNJI, H. Analysis of strength and bone conduction of hydroxyapatite ceramics. J. Jpn Plast. Reconstr. Surg. v. 13, p.561-571, 1993.

OSAKA, M., MIURA, Y., TAKEUCHI, K., ASADA, M., TAKAHASHI, K. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. J. Mater. Sci.: Mater. Med. v.2, p.51-55, 1991.

PENTEADO, C.V., MASQUELET, A.C., ROMANA, M.C., CHEVREL, J.P. Periosteal flaps: anatomical bases of sites of elevation. Surg. Radiol. Anat. v.12, p.3-7, 1990.

PHEMISTER, D.B. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg. Gynec. Obstet. v.41,p.70, 1914.

PIECUCH, J.F. Extraskelatal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic. J. Dent. Res. v.61, n°1 2, p.1458-1460, 1982.

PRUZANSKY,S. Pre-surgical orthopedics and bone grafting for infants with cleft lip and palate: Cleft Palate J. v.1, p.164-168, 1964.

RANSFORD, A. O., MORLEY, T., EDGARD, M. A., WEBB,P. PASSITI, N., CHOPIN, D., MORIN, C., MICHEL, F., GARIN, C.,PRIES, D. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. The J. Bone Joint Surg. v. 80, n°3, p. 13 - 18, 1998.

REUTERS, U., OSBORN, J. F., DONATH, K. Untersuchungen nach implantation von Hydroxylapatikeramik in artefizialle kiefersplatten der Ratte. Fortsch Kiefer Gesichtschir. p.1990-1992, 1985.

RINTALA, A. E. → RANTA, R. Periosteal flaps and grafts in primary clefts repair: A follow-up. Plast. Reconstr. Surg. v. 83 n° 1, p.17-24, 1989.

RINTALA, A., et al. On the bone-forming capacity of periosteal flap in surgery for cleft lip and palate. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v.8 (1-2), p.58-61, 1974.

RITSILÄ, V., ALHOPURO, S., GYLLING, V., RINTALA, A. The use of free periosteum for bone formation in congenital clefts of the maxilla. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v. 6, p. 57- 60, 1972 a.

RITSILÄ, V., ALHOPURO, S., RINTALA, A. Bone formation with free periosteum. Scand. J. Plast. Surg. v.6, p.51-56, 1972 b.

RITSILÄ, V., ALHOPURO, S., RINTALA, A. Bone formation with free periosteal grafts in reconstruction of congenital maxillary clefts. An. Chirurg Gynaeco. v. 65, p.342-344, 1976.

RITSILÄ, V. A, SANTAVIRTA, S., ALHOPURO, S., POUSSA, M., JAROMA, H., RUBAK, J. M. ESKOLA, A, SNELLMAN, O, OSTERMAN, K. Periosteal and pericondral grafting in reconstructive surgery. Clin. Orthop. Related Res. n°302, p. 259-265, 1994.

RITTER, R. Beurteilung des zwischenkiefers bei spaltkindern von seiten des kieferchirurgen des orthopäden und des prothetikers. Fortsch Kiefer Gesichtschir. v.5, p.242-248, 1959.

RITTER, R. Funktionelle geischtspunkte bei der spaltoperation ohne knochenplastik. Acta chir. Plast.(Prague). v.8, p.164-167, 1966.

ROSEN, H.M. Surgical correction of the vertically deficient chin. Plasti. Reconstr. Surg. v.82, p.247-255, 1988.

ROSEN, H. M., ACKERMAN, J. L. Porous block hydroxyapatite in orthognathic surgery. The Angle Orthodontist. v.61, n°3, p. 185 - 192, 1991.

ROSEN, H. M. Porous block hydroxyapatite as na interpositional bone graft substitute in orthognathic surgery. Plasti Reconst. Surg.. v. 83, n°6, p. 985 - 993, 1997.

ROSSA, R. Hydroxylapatite reconstruction of facial bones. J. Oral Implantol. v.17, n°2, p.184-192, 1991.

RUBAK, J.M. Osteochondrogenesis of free periostel grafts in the rabbit iliac crest. Acta Orthop. Scand. V.54, p.826-831, 1983.

SAKAI, K. DOI, K., KAWAKI, S. Fre revascularizad thin corticoperiostal graft. Plasti. Reconstr. Surg. v.87, n°2, p.290-298, 1991.

SANT'ANNA, M.F. Capacidade osteogênica de enxertos periostais livres. Estudo experimental em ratos. Botucatu: UNESP, 1997. 93p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências.

SATOH, K. NAKATSUKA, K. Simplified procedure for aesthetic improvement of facial contour by maxillary augmentation using a porous hydroxyapatite graft for maxillofacial deformity. Plast. Reconstr. Surg. v. 97, nº2, p. 338 - 344, 1996.

SCHLIEPHAKE, H., BERGHE, P. van den., NEUKAN, F.W. Osseointegration of titanium fixtures in onlay grafting procedures with autogenous bone and hydroxyapatite. Na experimental histometric study. Clin. Oral. Implant. Res. v.2, p.1233-1234, 1991.

SCHMID, E. Die Annäherung der Kieferstümpfe bei Lippen-Kiefer-Gaumensplatten; ihre schädlichen Folgen und Vermeidung. Fortsch Kiefer Gesichtschir. v.1, p.37-39, 1955

SCHULTZ, R.C. Free periosteal graft repair of maxillary clefts in adolescents. Plastic and Reconstructive Surgery. v. 73, nº4, p. 556 - 564, 1984.

SHEDDEN, R., DUNHAM, J., BITENSKY, L., CATTERALL, A., CHAYEN, J. Changes in alkaline phosphatase activity in periosteal cells in healing fractures. Calcif. Tissue Res. V.22, nº 1, p. 19-25, 1976.

SHENG, Z., YI, S., SHI, L., BO, Z., JI, W. Transposition of iliac periosteum with vascular pedicle and compression screw fixation for transcervical fracture of femur. Experimental research and clinical application. Chin. Med. J. v. 102, n°1, p.34-40, 1989.

SKOOG, T. The use of periosteal flaps in the repair of clefts of the primary palate. Cleft Palate J. v. 6, p. 332-339, 1965.

SKOOG, T. A double-layered periosteal flap repair of clefts of the primary palate. J. Am. Med. Womens Assoc. v.21 (12), p.1001-5, 1966.

SKOOG, T. The use of periosteum and Surgicel for bone restoration in congenital clefts of the maxilla. A clinical report and experimental investigation. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v.1(2), p.113-130, 1967.

SNELLMAN, O & RITSILÄ, V. Spinal fusion of idiopathic scoliosis with free periosteal grafts. A preliminary report. Acta Orthop. Scand. v.48, p.339-342, 1977.

STELLMACH, R. Primäre Knochenplastik bei Lippen-Kiefer-Gaumensplaten am Säugling unter besonderer Berücksichtigung der Transplantdeckung. Arch Klin Chir. v.292, p.865-869, 1959a.

STELLMACH, R. Modern procedures in uni- and bilateral clefts of lip, alveolus and hard palate with respect to primary osteoplasty. Topic 4, Treatment of respect patients with cleft of lip. Alveolar and palate (ed. K. Schuchardt), p.49-53, G. Thieme Verlag, Stuttgart. 195 9b.

SULIK, K.K., JOHNTSON, M.C., AMBROSE, L.J.H., DORGAN, D. Phenyton (Dilantin) – induced cleft lip and palate in A/J mice: a scanning and transmission electron microscopic study. *Anat. Rec.* V.195, p. 243-256, 1979.

TAKANO-YAMA MOTO, T., KAWAKAMI, M., SAKUDA, M. Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix induced bone formation in a bony defect in the premaxilla of rats. *J. Dent. Research.* v.71, p.1920-1925, 1992.

TAKANO-YAMA MOTO, T., KAWAKAMI, M., SAKUDA, M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* v. 51, p. 887 - 891, 1993.

TAKESHITA, N., AKAGI, T., YAMASAKI, M., OZAKI, T., NOJIMA, T., HIRAMATSU, Y., NAGAI, N. Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *Electron Microsc.* v. 41, p.141 - 146, 1992.

TAKESHITA, F., IYAMA, S., AYUKAWA, Y., AKEDO, H., SUETSUGU, T. Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy,

imaging processing and confocal laser scanning microscopy. Biomaterials. v. 18, p. 317 - 322, 1997.

UCHIDA, A., KIKUCHI, T., SHIMOMURA, Y. Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. Acta Orthop. Scand. v. 59, p. 29 - 33, 1988.

UDDSTRÖMER, L., RITSILÄ, V. Osteogenic capacity of periosteal grafts. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v.12, p. 207-214, 1978.

UDDSTRÖMER, L. The osteogenic capacity of tubular and membranous bone periosteum. A qualitative and quantitative experimental study in growing rabbits. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. v.12, p.195-205, 1978.

VAN DEN WILDENBERG, F.A.J.M., GORIS, R.J.A., BOETES, C. Revascularized periosteum transplantation. Eur. Surg. Res. v.15, p.110-113, 1983.

VON HALLER, A. Experimenta de ossium formatione. Lausanne, Opera Minora, 1763.
Apud CHASE, S.W. & HERNDON, C.H., 1955.

WEISS, L. Cell and Tissue Biology - A textbook of Histology. 60 ed - Urban & Schwarzenberg - 1983.

WIESE, K.G., MERTEN, H.A. The role the periosteum in osteointegration of hydroxyapatite granules. J. Oral Maxillofac. Surg. v.22, p.306-308, 1993.

WLODARSKI, K.-H. Normal and heterotropic periosteum. Clin. Orthop.Related Res., sec.3, n.241, 1 988.

WOLFORD,L.M., WARDROP, R.W., HAETOG, J.M. Coraline porous hydroxylapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery. Oral Maxillofac. Surg. v.45, p.1034-1042, 1987.

YAMAMOTO, M.- K., LUZ, J.G.C., ARAUJO, V.C. Resposta tecidual óssea frente à hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos. Rev. Odont. Univ. São Paulo. v. 8, nº4, p. 281 - 286, 1994.

YAMASHITA, Y., UCHIDA, A., YAMAKAWA, T., SHINTO, Y., ARAKI, N., KATO, K. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. International Orthopaedics. v. 22, p. 247 - 251, 1998.

YLINEN, P. et al. Preliminary study of porous hydroxylapatite particle containment with a curved biodegradable implant in the sheep mandible. J. Oral Maxillofac. Surg. v.49, nº11, p.1191-1197, 1991.