

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARCO ANTONIO ARGENTO

**ESTUDO DE POLI ÁCIDOS LÁTICOS, *ET*, COMPLEXADOS À
HIDROXIAPATITA OU MATRIZ DE PROTEÍNA ÓSSEA: *IN VITRO*, EM
RATOS E HUMANOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

Campinas

2004

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

Ar37e

Argento, Marco Antonio

Estudo de poli ácidos lácticos, *et*, complexados à hidroxiapatita ou matriz de proteína óssea: *in vitro*, em ratos e humanos/ Marco Antonio Argento.-- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Cultura celular. 2. Hidroxiapatita. I. Cortelazzo, Angelo Luiz.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 08 de julho de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Angelo Luiz Cortelazzo (Orientador)

Assinatura

Prof.Dr. Eduardo Saba Chuffi

Assinatura

Profa.Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon

Assinatura

Prof.Dr. Mauro Antonio de Arruda Nóbilo

Assinatura

Profa.Dra. Selma Candelária Genari

Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Assinatura

Prof.Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Assinatura

Aos meus pais

Hélio e Therezinha

pelo amor que me deram

e por terem sido meus primeiros mestres e modelos, e

à minha esposa

Sonia

por todo incentivo

e pelo amor que me destes, e

ao meu filho **Marquinho** que, agora,

é a razão de minha vida.

A vocês, DEDICO MINHA TESE.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AO PROF. DR. ANGELO LUIZ CORTELAZZO

pela orientação, compreensão e amizade. Um leal amigo acima de tudo.

Aos grandes professores:

Professores Doutores Edson Rosa Pimentel, Hernandes Faustino de Carvalho, Laurecir Gomes, Maria L. Furlan Wada, Mary A. Heidi Dolder, Shirlei M Recco-Pimentel, Angelo Luiz Cotelazzo pelas valiosas aulas ministradas e por terem “calor no coração”.

À grande Secretária e amiga nas horas difíceis Lílíam A. S. Panagio e ao secretário Sidnei H. Simões.

Aos Técnicos de laboratório Mario Bianchi, Chico e Neto.

Aos leais amigos Alberto, André, Antonela, Flávia, Juliano, Lucia, Marcela, Maristela, Pedro Angelo.

Ao Prof.Dr. Benedicto de C. Vidal por orientar-me em parte desta tese e ter me deixado mais resistente e forte.

Aos Professores Gilbert Avellar, Linda Gentry El-Dash e Sthefen Hyslop, e à amiga Patrícia da Silva Mello pelas valiosas correções gramaticais.

Ao contribuinte brasileiro, em especial o paulista, pois este trabalho foi realizado em uma instituição pública.

Ao CNPq que financiou parte deste trabalho.

... a todos leais amigos que fiz ao cursar a disciplina de Biologia Celular e todos outros do Departamento de Biologia Celular que não estão nesta.

Os meus sinceros agradecimentos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP - Academia Americana de Periodontologia.
AATB - Associação Americana de Bancos Teciduais.
ASM – Sociedade Americana de Metais.
AT - Azul de Toluidina.
BMP - Proteína morfogenética óssea.
BPM - Matriz de proteína óssea.
BSE - Encefalopatia Espongiforme Bovina.
C - Controle.
DFDBA - Osso desmineralizado seco congelado alógeno.
EGF - Fator de crescimento epidérmico.
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos.
FDBA - Osso mineralizado seco congelado alógeno.
FDA - “Food and Drug Administration”.
FGF - Fator de crescimento de fibroblastos.
HA - Hidroxiapatita.
HE - Hematoxilina e Eosina.
IB - Instituto Biologia.
IGF - Fator de crescimento insulínico, ou como insulina.
MOD - Matriz óssea desmineralizada.
OET - Óxido de Etileno.
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta.
PDLLA – Poli(DL-ácido láctico).
PDLLA-BPM - Poly(DL-ácido láctico associado à matriz de proteína óssea.
PDLLA-co-GL - Poli (DL-ácido láctico)-co-Glicólico.
PDLLA-HA- Poli(DL-ácido láctico) associado à hidroxiapatita.
PGA - Poli ácido láctico Glicólico.
PLA - “Poly lactic acid” (língua inglesa) ou Poli ácido láctico (português).
PLLA - Poli(L-ácido láctico).
TGF - Fator crescimento transformador.
TNF – Fator de necrose tumoral.
RTG - Regeneração tecidual guiada.

ARTIGOS E PUBLICAÇÕES

ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE

ARGENTO, M.A.; MELO, P; VIDAL, B.C.; CORTELAZZO, A.L. Fibroblast Proliferation on Porous Membranes of Different Polylactic Acids: Quantitative and Qualitative Analyses, Sterilization Methods and Measurement of Pore Size.

ARGENTO, M.A.; VIDAL, B.C.; CORTELAZZO, A.L. Analysis of Biological Response to Complex Polymer Grafts of Poly(DL-lactic acid) Associated or Not with Hydroxyapatite and Bone Protein Matrix in Rat Mandibles.

ARGENTO, M.A. & CORTELAZZO, A.L. Clinical Analysis of the Healing Properties of Poly(DL-lactic acid) Associated with Hydroxyapatite or Bone Protein Matrix Used in Maxilla Bone Grafts.

TRABALHOS PARALELOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO

ARGENTO, M.A. & CORTELAZZO, A.L. Bioengenharia na reconstrução mandibular. **Painel – Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo, 2004.** Painel n.050.

ARGENTO, M.A. & CORTELAZZO, A.L. Proposta de um modelo de cirurgia periodontal conservadora. **Painel – Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo, 2004.** Painel n.550.

APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO

ARGENTO, M.A. & CORTELAZZO, A.L. Complex Polymer: Polylactic acid with Hydroxyapatite and Bone Protein Matrix, **American Academy of Periodontology Meeting - Poster Sessions**, aceito para apresentação em 10 e 11/ 11/ 2004.

RESUMO

O Poli(DL-ácido láctico)(PDLLA) associado a hidroxiapatita (HA) ou a matriz de proteína óssea (BPM) bovina formam biopolímeros que parecem ser promissores materiais para enxertos ósseos ou para a utilização como membranas em odontologia. O objetivo do presente trabalho foi analisar a biocompatibilidade e propriedades reparacionais do PDLLA associado ou não à HA bovina ou à BPM bovina, dando suporte científico para o uso destes biomateriais em seres humanos. Inicialmente, analisou-se qualitativamente e quantitativamente a proliferação de fibroblastos V79 “in vitro” em três tipos de poli ácido láctico, além de comparar a influência do tipo de esterilização prévia com óxido de etileno ou hipoclorito de sódio a que elas foram submetidas. As membranas porosas de Poli(L-ácido láctico)(PLLA), Poli(DL-ácido láctico) PDLLA e Poli(DL-ácido láctico)-co-Glicólico (PDLLAcoGL) foram preparados pela técnica da evaporação programada do solvente e os diâmetros dos poros foram medidos. O tamanho médio dos poros das membranas de PDLLA, PLLA, PDLLAcoGL foi respectivamente de 454, 462 e 448 μm . Na esterilização com óxido do etileno, os fibroblastos que cresceram estavam em pequeno número e tamanho, e possuíam núcleo condensado pequeno; na esterilização com o hipoclorito do sódio, os fibroblastos foram encontrados em divisão sobre a membrana e possuíam grandes núcleos com vários nucléolos em todos os intervalos de tempo. A análise estatística demonstrou que a interação material tempo foi significativa ($p=0,0465$) e, pelo teste de Tukey, o número dos fibroblastos encontrados nas membranas foi estatisticamente maior em PDLLA (292,1) seguido de PDLLAcoGL (192,0) e PLLA (23,5). Na associação do PDLLA mais hidroxiapatita (PDLLA-HA), ou matriz de proteína óssea (PDLLA-BPM), o diâmetro médio dos poros dos grânulos de PLLA, PDLLA-HA e PDLLA-BPM foi respectivamente de 314, 433 e 665 μm . Após a análise desses PLAs, foi determinada em ratos, a resposta biológica da reparação após enxertos ósseos de PDLLA associado com HA (PDLLA-HA) e de PDLLA associado com BPM (PDLLA-BPM), incluindo a observação da ocorrência do processo do osteoindução. Numa segunda etapa, blocos de PDLLA-BPM foram implantados no dorso de ratos e analisados histologicamente. Os enxertos de PDLLA causaram reação inflamatória de corpo estranho, e nos PDLLA-HA e PDLLA-BPM, quase nenhuma. Nas mandíbulas dos ratos, o enxerto de PDLLA não induziu a formação de osso novo, enquanto que nos enxertos de PDLLA-

HA e de PDLLA-BPM foi encontrado osso recém formado ao redor e entre os grânulos. No dorso, o PDLLA-BPM induziu a formação do osso (osteoidução). A ossificação intramembranosa foi encontrada em ambos locais. Houve uma rápida invasão de células fibroblásticas dentro e entre os grânulos de PDLLA-HA e de PDLLA-BPM. Finalmente, foram analisados os sinais de biocompatibilidade clínica na reparação de enxertos ósseos de PDLLA-HA e de PDLLA-BPM em maxila e mandíbula humanas. Os enxertos foram utilizados em cirurgias periodontais, na comunicação do buco-sinusal e no alvéolo dental após extração. Intervenções pós-operatórias foram realizadas após 1, 2, 4, 6 semanas e 6 meses. Em todas as cirurgias executadas em seres humanos, a reparação clínica dos tecidos moles mostrou sinais clínicos de normalidade em relação ao tempo, ocorreu uma esfoliação normal do material e não foi observada a presença de exsudato purulento ou de abscesso. Em cirurgias periodontais, houve a diminuição da profundidade de sondagem clínica e ganho clínico do nível de inserção, pouco aumento na recessão gengival, e ocorreu uma resolução radiográfica do defeito ósseo periodontal. Nas comunicações do buco-sinusais foram observados o fechamento clínico sem a recorrência das mesmas. Assim, pode-se concluir que os complexos polímeros de PDLLA-HA e de PDLLA-BPM são biocompatíveis e o material PDLLA-BPM é osteocondutor e osteoindutor em ratos. A superfície dos materiais de PDLLA-HA e de PDLLA-BPM parece ser reconhecida pelas células na reparação e a técnica da evaporação programada do solvente dá a membrana, grânulos e os blocos de PDLLA uma porosidade apropriada para serem utilizadas "in vivo". Os complexos polímeros de PDLLA-HA e de PDLLA-BPM bovinos provaram ser biocompatíveis e podem ser usados com segurança em seres humanos em cirurgias periodontais, como em outros tipos de cirurgias de enxertos ósseos do processo alveolar.

ABSTRACT

The Poly(DL-lactic acid)(PDLLA) associated with bovine hydroxyapatite(HA) or bovine bone protein matrix (BPM) form biopolymers that appear to be promising materials for bone grafts or utilized as membranes in dentistry. The goal of this work was to analyze the PDLLA, and PDLLA associated with bovine HA healing biocompatibility, to giving scientific support to use in humans. At first, the qualitative and quantitative differences of proliferation of fibroblasts “*in vitro*” in three types of Polylactic acid was analyzed, the types of sterilization in cell growth was compared, the pores were obtained and measured them. Second, the “*in vivo*” biological response during tissue repair using grafts of PDLLA associated with HA (PDLLA-HA) and PDLLA associated with BPM (PDLLA-BPM) was analyzed, the pores and confirming the osteoinduction process of PDLLA-BPM was measured. Third, the Clinical analysis of the healing properties of PDLLA-HA and PDLLA-BPM matrix grafts in human maxilla was analyzed. In the first phase, porous membranes of Poly(L-lactic acid)(PLLA), PDLLA and Poly(DL-lactic acid) co Glycolic (PDLLAcoGL) were prepared by the technique of programmed evaporation of solvent. Cultures of fibroblasts, analysis of cellular morphology and the number of cells by the ANOVA statistics test and the Tukey’s test were achieved. Porous membranes of PDLLA were sterilized with ethylene oxide or sodium hypochlorite, diameters of the pores were measured, and also cultures of fibroblasts were made and their morphology and number analyzed. In the second phase, porous granules of PDLLA, bovine PDLLA-HA and bovine PDLLA-BPM were made, the pores were measured, grafts surgery was performed in the mandible corpus of rats and then analyzed; blocks of PDLLA-BPM were implanted on the back of rats, and histological analyses was executed. In the third phase, bone grafts of PDLLA-HA and PDLLA-BPM were utilized in periodontal surgeries, in the bucco-sinus communication and in post-extraction dental alveolus. Post-operational interventions were carried out after 1 up to 6 months to analyze the clinical normality of periodontal tissue repair, clinical probing depth, clinical attachment level, gingival recession, successful closing of the bucco-sinus communication and radiographies. In the first phase, the results obtained demonstrated that the average estimated size of the PDLLA, PLLA and PDLLAcoGL membranes pores was 454, 462 and 448 μm , respectively. In sterilization with Ethylene Oxide, the fibroblasts that grew were small in number and size and had small condensed nucleus; in sterilization with sodium hypochlorite, fibroblasts were found in division at all the time intervals of the experiment all over the film with large nucleus and various nucleolus. In the ANOVA statistical analysis, it was observed that the

material interaction by time was significant ($p=0.0465$), and in Tukey's test, the number of fibroblasts found in the porous membranes was statistically greater in PDLLA (mean 292.11) than in PDLLAcoGL (mean 192.00), and greater than in PLLA (mean 23.49), on 95.022 Minimum Significant Difference. In the second phase, the average estimated diameter of PDLLA, PDLLA-HA, PDLLA-BPM granule pores was 314, 433 and 665 μm , respectively. Grafts of PDLLA caused little foreign body inflammatory reaction, the PDLLA-HA and PDLLA-BPM almost none in rats. Grafts of PDLLA did not induce new bone formation, and grafts of PDLLA-HA and PDLLA-BPM induced new bone formation in the rats mandibles, and PDLLA-BPM induced bone formation in soft tissue (osteoinduction); intra-membranous ossification was found in both locations. There was rapid invasion of fibroblastic cells inside and between the granules of PDLLA-HA and PDLLA-BPM. In the third phase, human repair of soft tissues in all surgeries showed clinical signs of normality in relation to time, normal exfoliation of the material and no presence of purulent exudate or abscess. In the periodontal surgeries, there was clinical probing depth decrease and clinical attachment level gain, little gingival recession increased, and radiographic resolution of the periodontal defect occurred. In the buco-sinus communications, clinical closing of the same without any recurrence was observed. 1.0% sodium hypochlorite is the material of choice for chemical sterilization of PDLLA membranes. Fibroblasts proliferate "*in vitro*" in membranes of PDLLA is greater than in PDLLAcoGL, and than in PLLA. Complex polymers of PDLLA-HA and PDLLA-BPM are biocompatible, and PDLLA-BPM material is osteoconductive and osteoinductive in rats. The surface of PDLLA-HA and PDLLA-BPM materials appear to be recognized by the repairing cells. The technique of programmed evaporation of the solvent gives the membrane, granules and blocks of PDLLA a porosity suitable for using "*in vivo*". Complex polymers of PDLLA with bovine HA and PDLLA with bovine BPM is biocompatible and can be used safely in humans in periodontal surgery as well as other surgeries on human maxilla.

ÍNDICE

1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	03
3. Objetivos	31
4. Artigos Científicos	32
4.1 " Fibroblast Proliferation on Porous Membranes of Different Polylactic Acids: quantitative and qualitative analyses, Sterilization methods and measurement of pore size."	33
4.2 "Analysis of Biological Response to Complex Polymer Grafts of Poly (DL-lactic acid) Associated or not With Hydroxyapatite and Bone Matrix Protein in Rat Mandibles"	52
4.3. "Clinical Analysis of the Healing Properties of Poly (DL-Lactic acid) Associated with Hydroxyapatite or Bone Protein Matrix Used in Maxilla Bone Grafts"	85
7. Considerações finais	110
8. Conclusões	113
9. Referências Bibliográficas	114

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um estudo analisando ossos e dentes de hominídeos encontrados na África Central, na república do Chade, comparando as medidas do crânio, fragmentos da mandíbula e dentes, comprovou que se tratava do “homem” mais antigo encontrado até hoje, o *Sahelanthropus tchadensis*, por que este fóssil possuía entre 6 e 7 milhões de anos (BRUNET et al., 2002). A longevidade do ser humano desta época, então muito baixa, vem aumentando cada vez mais, como é comprovado entre o homem australopithecus (5 milhões de anos) e o homo sapiens atual pois, dessa forma, aumentou significativamente a probabilidade de adquirirmos cada vez mais doenças ao longo de nossas vidas (LARSEN et al., 1991).

Quando primatas humanóides começaram a ficar mais eretos, aumentaram os traumas na coluna e nas articulações do joelho. Suas vidas não passavam dos 30 anos e possuíam muitas dores de patologias óssea, que são confirmadas pela paleopatologia através de informações colhidas do esqueleto, crânio e dentes, diagnosticadas como os atuais problemas ortopédicos (LARSEN et al., 1991). Não só a osteodistrofia, mas também a sífilis, câncer metastático, doenças degenerativas nas articulações, tuberculose e infecção pós-trauma acometiam em grande porcentagem os homens pré-históricos, sendo que muitas destas possuíam origem nutricional, como no exemplo da falta de ferro causando a anemia, falta de vitamina “D” causando encurvamento dos fêmures (COCKBURN & COCKBURN, 1995). Nos dentes e nos ossos maxilares dos hominídeos australopithecus foram encontradas doença periodontal, cáries na coroa e raiz dental, cáries rampantes, hipoplasia, e grandes desgastes no esmalte derivados do tipo de alimentação e hábitos parafuncionais (KEENE, 1980).

A doença periodontal foi diagnosticada no homem pré-Neandertal e também encontrada em múmias egípcias (4.000 a 700 AC), nos sumérios e babilônios na Mesopotâmia (3.200 a 1500 AC), como decorrente de reabsorções ósseas originadas pela inflamação crônica e abscessos (SHKLAR, 2003). Esta inflamação crônica acomete o tecido ósseo que sustenta os dentes e ocorre geralmente na idade adulta, destrói o osso alveolar e quando não é tratada leva à perda dental (OFFENBACHER, 1999). A Academia

Americana de Periodontologia relata que, atualmente, 25 % dos adultos a partir de 35 anos tem ou terá doença periodontal. Isto demonstra que o número de pessoas com este tipo de destruição no osso que suporta os dentes é muito grande. Como nós, seres humanos, pretendemos cada vez mais possuir uma melhor qualidade de vida ao longo de nossa existência, fica clara a razão de tentar manter os dentes pelo maior tempo possível (PAPAPANOU, 1996).

A cirurgia periodontal com enxerto de biomaterias é uma intervenção que tenta recuperar o tecido ósseo perdido pela doença periodontal inflamatória (AAP, 2001). A qualidade dos materiais de enxerto ósseo está relacionada com suas propriedades, ou características que auxiliam o organismo a reparar-se com particularidades específicas. Os biomateriais utilizados em processos alveolares mandibulares e maxilares não deveriam alterar o processo de reparação normal, e sim devolver as características biomecânicas ao tecido lesado o mais rápido possível, e por fim, induzir a formação de novo osso e cimento radicular.

Deste modo, tentamos obter dois novos biomateriais para enxerto ósseo, a partir de estudos de sua utilização e influência em culturas de células, em animais de pequeno porte e, finalmente, em seres humanos. Utilizamos um Poli ácido lático associado, ou não, a uma hidroxiapatita e matriz de proteína óssea, que se comportam como materiais que auxiliam e induzem o processo de reparação tecidual com certas características, contribuindo para o acúmulo de conhecimento que poderão melhorar a qualidade de vida do ser humano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Algumas definições foram listadas aqui, pois, auxiliam o leitor ao serem levadas em conta quando do aparecimento dos respectivos termos no texto do presente trabalho. São destacadas, segundo a AAP (1992):

- Reabsorção: eliminação de estruturas e substâncias anteriormente formadas pelo próprio organismo;
- Absorção: relaciona-se ao mesmo processo de eliminação, porém direciona-se a substâncias novas, cuja origem é externa ao organismo;
- Bioativa: substância que tem efeito ou induz respostas nos tecidos vivos;
- Biocompatível: aquilo que está em harmonia com a vida;
- Biointegração: união de osso vivo com a superfície de um implante, a qual independe de qualquer mecanismo de união mecânica;
- Osteointegração: contato direto, em microscopia de luz, entre o tecido ósseo e um implante;
- Regeneração: reprodução ou reconstituição da parte injuriada ou perdida;
- Reparação: processo de cicatrização de uma ferida por tecidos que não restauram totalmente a arquitetura, ou a função da parte injuriada;
- Cicatrização: processo de reparação ou regeneração do tecido injuriado, perdido, ou cirurgicamente tratado.

2.1. POLI ÁCIDO LÁTICO

O poli ácido láctico (PLA) ou ácido polilático é um poliéster derivado do α -hidroxi ácido, com fórmula química $(-O-C(O)H_2-C-)_n$.

Como o ácido láctico apresenta duas formas isoméricas devido ao fato de seu Carbono α ser quiral, os PLAs utilizados em pesquisas laboratoriais e clínicas são os isômeros poli(D-ácido láctico) (PDLA), poli(L-ácido láctico) (PLLA) e também a mistura (racêmica) de ambos, poli(DL-ácido láctico) (PDLLA). A diferença entre eles reside na posição do grupo carboxila, que no PDLA está girado para a direita, enquanto no PLLA está para a esquerda (figura 1) fazendo, segundo GILDING & REED (1979), que o PDLA degrade mais rapidamente que o PLLA.

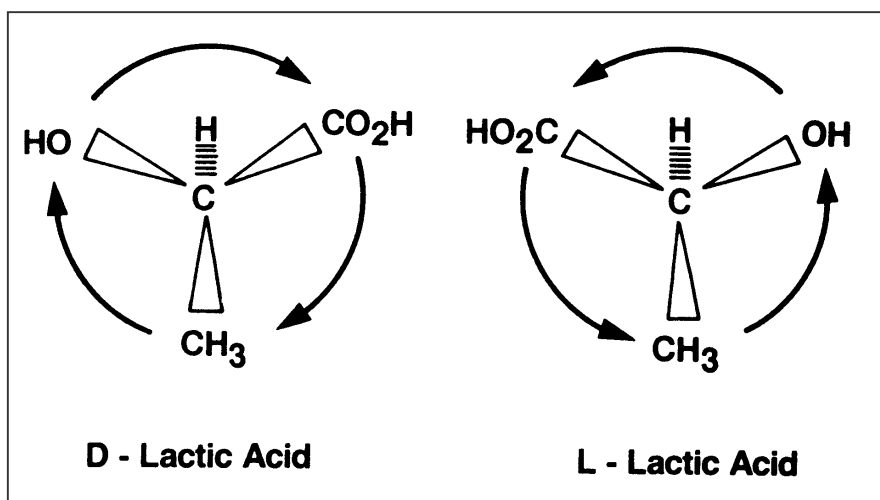


Figura 1. Esquema mostrando a diferença entre o PDLA e o PLLA.

A análise dos dados descritos na literatura leva muitas vezes a dúvidas, visto que muitos autores classificam os isômeros PDLLA, PDLA e PLLA, e até o poli ácido glicólico (PGA) sob a nomenclatura única de PLA, dificultando a comparação dos resultados obtidos.

O PLA assemelha-se quimicamente ao ácido poliglicólico, cuja fórmula química pode ser representada por $(-O-C(CH_3)H_2-C-)_n$, com um grupo metil substituindo o oxigênio. Essa diferença faz com que seus polímeros e copolímeros apresentem diferenças químicas, mecânicas e biológicas (tabela 1) (MIDDLETON & TRIPTON, 1998).

Tabela 1. Características dos PLAs e PGA segundo MIDDLETON & TRIPTON, 1998.

Características Polímero	Ponto de fusão (°C)	Ponto de liquificação (°C)	Tempo de degradação (meses*)
PLLA	173-178	60-65	>24
PDLLA		55-60	12 a 16
PGA	225-230	35-40	6 a 12

* tempo de perda completa da massa.

Os PLAs são polímeros que possuem características de serem biodegradáveis, bioabsorvíveis e biocompatíveis. Eles são comercializados na forma de micropartícula, grânulo, fio, gel, membrana ou em blocos e são utilizados como implantes reconstrutivos de cartilagem, fígado, intestino, osso e nervo (AMBROSIO et al., 1996). Estes polímeros têm sido intensamente pesquisados como sistemas controladores de liberação de drogas hormonais (calcitonina e insulina), antibióticos, vacinas, psicotrópicos, proteínas indutoras de crescimento, agentes bacteriostáticos, separadores de tecidos, guias para a regeneração óssea (Regeneração Tecidual Guiada) e em suturas (TARCHA, 1991; A.A.P., 1993; WAKE et al., 1998; Di TIZIO et al., 1998; KIRKER-HEAD et al., 1998; WALTER et al., 1999).

Na preparação, modelação e caracterização de um biopolímero, a partir do PDLLA ou PDLA, utilizando a técnica de evaporação do solvente ou moldagem por injeção, ocorre a sua dissolução e uma rápida recristalização. Este processo faz com que o tamanho inicial dos cristais diminua. Quando o tempo for longo para a recristalização, leva à formação de uma cristalinidade com grandes esferulitos e o polímero em questão torna-se friável, ou seja, aumenta sua dureza (TUNC & JADHAY, 1988). A associação de PLLA com fios de hidroxiapatita de tamanhos variando entre 40-150µm de comprimento por 2-10µm de largura, resulta em um polímero complexo com um maior módulo de elasticidade, o que também acontece ao se acrescentar cada vez mais carbonato de cálcio. Na união de dois ou mais polímeros, consegue-se modular as características físicas do produto final, como o módulo de elasticidade, tempo de degradação e massa molecular, o que permite a utilização

do copolímero formado para funções específicas como enxertos odontológicos (CHEN et al., 2003).

A biodegradação dos PLAs é uma propriedade importante para materiais de enxerto e pode ser explicada por 4 mecanismos: solubilização, solubilização com prévia ionização, hidrólise (simples) e hidrólise enzimática. Os polímeros solúveis degradam em água pela difusão no corpo de sua matriz, seguida pela contínua solvatação, inchando-se até ocorrer fragmentação ou dissolução. No mecanismo de solubilização com ionização prévia, o polímero é relativamente hidrofóbico, sua superfície ioniza-se, absorve água e solubiliza. A “simples” hidrólise é semelhante à solubilização, pois é a reação da água sobre a superfície do polímero e a remoção de moléculas do mesmo. A biodegradação catalisada por enzima é o mecanismo clássico pelo qual os implantes e fios de suturas são removidos dos locais implantados, havendo a participação das enzimas leucina aminopeptidase, fosfatase ácida e alcalina (GILDING, 1981).

A degradação do PLA “in vivo” se deve às cisões hidrolíticas das ligações ésteres de sua cadeia, mas a influência enzimática neste processo não aparenta ser de grande importância. A oxidação do ácido láctico tem como produto o ácido pirúvico, que pode ser convertido em acetilCoA, gerando ácido cítrico no ciclo de Krebs, transformando-se, então, em CO₂ e H₂O (MARZZOCO & TORRES, 1990). A degradação do PDLA em tampão fosfato “in vitro” é semelhante a implantações em carneiros e ratos, em que é diminuída a força à tração e peso molecular, sendo mais influenciada pelo envolvimento da hidrólise do que pela reabsorção celular (GILDING, 1981; ZILIS et al., 1989; MAINIL-VALET et al., 1997).

A porosidade é um tipo de característica estrutural dos polímeros que influencia tanto a degradação, quanto o reparo tecidual, quando estes são utilizados como implantes. Há uma controvérsia na velocidade de degradação dos PLAs porosos versus não porosos “in vivo” e “in vitro” (ZILIS et al., 1989). Porém, a porosidade deixa o substrato adequado para o crescimento de células e produção da matriz extracelular, “in vitro” e “in vivo” como implantes (AGRAWAL et al., 1997; ISHAUG-RILEY et al., 1998). A uniformidade e interconexão da estrutura porosa facilitam a formação de uma rede tecidual, cuja

aplicação direciona-se para a reconstrução de tecidos de sustentação, como o ósseo e de cartilagem (VAN SLIEDRGT et al., 1992).

A adesão celular é influenciada pela hidrofília de superfície do polímero, sendo que muitos tratamentos são realizados para alterar a superfície dos PLAs, que conseqüentemente podem melhorar a sua biocompatibilidade (CAI et al., 2002; YANG et al., 2002). DEWEZ et al. (1998) demonstraram que um substrato hidrofílico promove maior adesão de células que um substrato hidrofóbico. A superfície do biomaterial influencia a adsorção de proteínas de fluidos biológicos, sendo que ao colocá-los “in vivo”, em menos de um segundo já são observadas proteínas na superfície de implantes dos biomateriais, resultando em superfícies totalmente cobertas por proteínas após poucos minutos, pois o contato e adesão das células à superfície do polímero ocorrem devido à especificidade da interação com a camada protéica que a recobre. As células que aderem ao implante de PLA são inicialmente sanguíneas vermelhas, células inflamatórias e posteriormente fibroblastos com a deposição de matriz colágena (ZILIS et al., 1989; PÉREZ-LUNA et al., 1994). Ao se analisar ultraestruturalmente o tipo de união que ocorre entre proteínas e peptídeos ao PDLA observou-se que entre 5 a 80 % acontece uma união que é considerada como adsorção e não união covalente, o que está na dependência das concentrações, massas moleculares e propriedades destas proteínas e peptídeos (STEFFENS et al., 2002).

A cristalinidade dos polímeros influencia a sua força à tração, degradação e bioabsorção e, com isso, sua biocompatibilidade (VAN KREVELEN, 1978). A adição de PLLA ao PDLA faz com que aumente a velocidade de degradação, com maior facilidade de penetração da água na região amorfa, com rápida perda de força à tensão “in vivo” e demonstra que a cristalinidade do polímero também altera seu processo de degradação. O PDLA é totalmente amorfo, mas torna-se cristalino após dissolução e recristalização em dicloro metileno (VERT & CHABOT, 1981).

O poli ácido lático não tem a capacidade de induzir a formação de novo osso quando implantado em tecido mole. Seus poros são preenchidos por tecido conjuntivo e geralmente ocorre uma resposta inflamatória do tipo granulomatosa de corpo estranho. Assim, sua utilização vem sendo feita em conjunto com outros materiais e substâncias

como a “BMP-2” (MURAKAMI et al., 2003). Também estão sendo associados diferentes tipos de PLAs para aumentar o reconhecimento e proliferação celulares em sua superfícies (EL-AMIM et al., 2003), assim como sais que auxiliam na estabilização do pH em valores próximos ao fisiológico, como o fosfato de sódio (HEIDERMAMM et al., 2002).

As diferentes características dos polímeros de ácido lático Induzem as células a diferentes comportamentos como reparadoras de tecidos (MIDDLETON & TRIPTON, 1998). KULKARNI et al., em 1966, foram os primeiros a utilizar o PLA em cirurgias ortopédicas, de diferentes formas. O uso de membranas absorvíveis de PLA foi introduzido em odontologia na década de 1980, sendo utilizadas nas áreas de periodontia, cirurgia buco-maxilo-facial e implantodontia (GALGUT et al., 1991). Com a aplicação deste separador tecidual em cirurgias periodontais foi obtido sucesso na formação de novo cemento com inserção de fibras colágenas e significante quantidade de regeneração dos defeitos ósseos (MAGNUSSON et al., 1988).

Películas ou membranas absorvíveis que servem como guia para reparação óssea na Regeneração Óssea Guiada (ROG) foram lançadas no mercado dos Estados Unidos da América na década de 1980 como a membrana Vicryl®¹ para o tratamento de defeitos ósseos periodontais, mas até o momento, foram encontrados poucos estudos que utilizaram blocos porosos associando o PDLA a materiais que auxiliem, apressem ou induzam a formação de novo osso.

2.1.1. POLI ÁCIDO LÁTICO em HUMANOS

Existem várias dezenas de materiais à base de Poli ácido lático comercializados nos Estados Unidos da América para uso em seres humanos. Os nomes comerciais de alguns PLAs aceitos pelo FDA, ou com a classificação 510K para a venda, são: LactoSorb®², Phantom Screw®³, Sysorb®⁴, Full Thread Bio/Shethead Bio®⁵, Bio Screw®⁶, Phatom®⁶,

¹ Vicryl membrane, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Germany.

² Davis and Geck LTO, Manati, PR, E.U.A.

³ DePuy Acromed, Raynham, MA, E.U.A.

⁴ Sulzer Carbomedies Canada LTO, Alberta, Canadá.

⁵ Arthex, Naples, FL, E.U.A.

Bio-Statak®⁷, BioROC EZ®⁸, Sdsorb®⁹, LactoSorb Screws/Plates®¹⁰, Clearfix Meniscal Dart/Screw®¹¹, Atrisorb®¹¹, Resolut®¹² e Guidor®¹³. O PDLLA faz parte da composição de quatro destes materiais.

No Brasil existem empresas que confeccionam, modelam e comercializam PLAs para uso em seres humanos, com forma de placas, parafusos e malhas absorvíveis. No momento, LACTOSORB®¹⁴ e BIORCI-HA®¹⁵ são biomateriais aprovados pelo Ministério da Saúde do Brasil para serem utilizados em seres humanos e possuem registro na Vigilância Sanitária. O produto BIORCI-HA® é composto por uma união de 75% de PLA e 25% de hidroxiapatita bovina.

A biocompatibilidade clínica e histológica, e a degradação de parafusos bioabsorvíveis de diferentes PLAs foram estudadas na reconstrução e fixação de tendão patelar utilizando o PLLA, PLLAcoGL, PDLLA, PDLLAcoGL (STÄHELIN et al., 1997). Todos estes materiais foram eficazes para a fixação do tendão patelar, porém outros fatores influenciaram para que ocorresse o insucesso, como uma precoce força excessiva de tração, diferenças na quantidade de degradação e compatibilidade clínica no mesmo material de paciente para paciente, e a ausência de sinais clínicos de reação de corpo estranho, o que diverge das propriedades encontradas em cultura de células e em animais de pequeno porte.

Em cirurgias ortognáticas para redução de fraturas de face com a utilização de parafusos e placas de PDLLA, não foi presenciada reação alérgica, comprovou-se sua eficácia na redução de fraturas e na manutenção da imobilidade local no período de reparação. Houve uma vantagem de não necessitar de uma segunda cirurgia para a

⁶ Linatec Biomaterials INC, Tampere, Finlândia.

⁷ Zimmer Orthopaedic Surgical Products, Stateville, NC., E.U.A.

⁸ Innovative Devices INC, Malborough, MA, E.U.A.

⁹ Surgical Dynamics INC, Concord, CA.,E.U.A.

¹⁰ Biomet INC, Warsaw, IN., E.U.A.

¹¹ Aatrix Laboratories INC., Fort Collins, CO., E.U.A.

¹² W.L. & Associates INC., Flagstaff, AZ., E.U.A.

¹³ Procordia Drateh, Hudinge, Suécia.

¹⁴ Implant Innovations do Brasil, São Paulo, S.P., Brasil.

¹⁵ PCE – PRÓ – Cirúrgica Especializada Ltda., Belo Horizonte, M.G., Brasil.

remoção destes biomateriais (HOFFAMANN et al., 2002).

A reparação clínica e histológica dos tecidos após o uso de membranas de PDLLA em cirurgias periimplantais, mostrou-se eficaz no preenchimento quase completo de tecido ósseo destes defeitos (ROSEN & REYNOLDS et al., 2001).

A reparação clínica e radiográfica de defeitos ósseos periodontais frente a uma barreira absorvível de PLA associado ou não ao osso “DFDBA”, foi estudada por TREJO et al. (2000), que encontraram preenchimento ósseo destes, porém sem diferença estatística entre os grupos teste e controle.

2.2. HIDROXIAPATITA

Na classificação dos materiais para implantes e/ou enxertos, os aloplásticos são divididos em três grupos: os metais, os polímeros e as cerâmicas. O grupo das cerâmicas é composto pelo vidro, gesso Paris, aluminato de cálcio, óxido de alumínio e o fosfato de cálcio. Dentre os fosfatos de cálcio estão o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita, sendo que existe uma semelhança química entre ambos (De GROOT, 1983; JARCHO, 1986).

A hidroxiapatita (HA) é responsável por uma grande parcela no extenso estudo dos biomateriais para enxerto de tecido duro, podendo ser sintética ou ser extraída de animais (WILSON & HENCH, 1990). Trata-se de um composto inorgânico, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que é depositado na matriz extracelular de tecidos calcificados do osso, dentina, cimento e esmalte e vem sendo usado em cirurgias maxilofaciais, para o preenchimento de defeitos ósseos, cirúrgicos, patológicos ou naturais. Em odontologia, tem sido utilizado no preenchimento de defeitos ósseos periodontais e periimplantais (HOLMES & HAGLER, 1988; AAP, 1992).

A qualidade dos enxertos ósseos aloplásticos teve um avanço em 1963, quando Lyman Smith, fabricou uma hidroxiapatita que apresentava propriedades físicas (porosidade e dureza) similares às do osso natural. Ele foi implantado na tíbia de coelhos e após cicatrização o material implantado estava tão firmemente unido ao osso, que foi utilizado um cinzel para ser removido. Este foi um dos primeiros trabalhos associando as

características físicas dos biomateriais com o osso humano (Le GEROS, 1991).

No final da década de 60 e no começo dos anos 70, as pesquisas buscavam um biomaterial que, além de possuir porosidade e dureza similares ao tecido ósseo, deveria possuir canais interconectantes que poderiam servir como suporte para a regeneração de vasos sanguíneos e formação de tecido duro. Portanto, a idéia de se fazer um corpo poroso baseia-se neste modelo. Em meados da década de 70 foi obtida uma hidroxiapatita¹⁶, não absorvível, com poros de 200 µm diâmetro em média e com canais que se interconectavam (KLAWITTER & HULBERT, 1972).

Na década de 80 e meados de 90, a hidroxiapatita foi exaustivamente pesquisada em odontologia para a cicatrização de defeitos ósseos periodontais e em rebordos alveolares (DROBECK et al., 1984; BYE et al., 1987; PAGE & LASKIN, 1987; HOLMES & HAGLER, 1988; RICCI et al., 1992; PINHOLT & KWON, 1992). Atualmente, muitos estudos clínicos envolvem enxertos de hidroxiapatita de origem bovina em defeitos ósseos periodontais, em seio maxilar e em associação a implantes dentários osteointegrados (ARTIZI et al., 2001; BRUNEL et al., 2001; KARABUDA et al., 2001).

A Academia Americana de Periodontologia (1993), através de seu comitê de pesquisa, ciência e terapia, relatou que as hidroxiapatitas porosas e não porosas não são absorvíveis em oposição ao fosfato de tricálcio. Relatou ainda que os materiais aloplásticos, quando usados como enxertos, parecem produzir uma melhora significativa nas condições clínicas, mas atuando apenas como preenchedores biológicos que induzem pouco ou nenhum crescimento ósseo. Sabe-se, porém, que existem hidroxiapatitas absorvíveis (BOWERS et al., 1986; FROUM & STHAL, 1987) e que essa absorção faz com que este biomaterial possa ter a propriedade de servir como foco de formação de novo tecido ósseo (BYE et al., 1987). A degradação in vivo da HA pode aumentar o pH local, enquanto que ocorre o inverso com os PLAs, ao associar estes dois materiais poderá ocorrer uma menor alteração do pH local e um processo de reparação inalterado (HEIDEMANN et al., 2002).

Diferentes formas de grânulos de hidroxiapatita, como: bordas agudas, bordas arredondadas, bordas levemente agudas, e de bordos irregulares, quando implantadas em

¹⁶ Interpore 200 ®, Irvine, CA., U.S.A

cavidades ósseas em tibia de coelho, não alteram o processo de cicatrização que se reparam ao mesmo tempo (LEHTINEN et al., 1990). As formas de grânulos arredondados e discos multifacetados da hidroxiapatita, quando implantadas subcutaneamente em ratos e cães, induzem a semelhantes respostas, pois não é observada inflamação, há encapsulação das partículas e dos discos em todos tempos, observando-se um tecido conjuntivo denso adjacente e ao redor das partículas, com visualização de poucos macrófagos (DROBECK et al., 1984). No enxerto para aumento de rebordo alveolar, os resultados clínicos são semelhantes quando é utilizada uma hidroxiapatita na forma de grânulos e outra na forma de blocos, porém um material contendo partículas arredondadas parece ser mais indicado devido à força de compressão mastigatória (El DEEB et al., 1988).

A hidroxiapatita quando implantada em tecido mole não tem a capacidade de formar osso, isto é, não possui a propriedade ósteo-indutora, seus poros são preenchidos por tecido conjuntivo e geralmente não ocorre nenhuma resposta inflamatória (PIECUCH, 1982). A formação de osso que ocorre na superfície da hidroxiapatita, ocorre por ósteo-condução, ou seja, ela serve como andaime e não induz uma neoformação óssea. Assim, a hidroxiapatita vem sendo considerada apenas uma preenchedora de espaço quando colocada em defeitos ósseos periodontais (JEFFCOAT et al., 1997).

O tamanho do poro da hidroxiapatita em grânulos está relacionado com a quantidade de formação óssea dentro do mesmo. Existe pouca formação óssea em poros inferiores e igual a $40\mu\text{m}$, e em poros maiores e iguais a $100\mu\text{m}$ ocorre uma formação completa (WHITE & SHORS, 1986). Foi encontrado osso e tecido conjuntivo frouxo ao utilizá-la com poros de 400 a $500\mu\text{m}$, em aumento de rebordo alveolar de cães (CARRANZA et al., 1987; AAP, 1993).

A reparação do enxerto de hidroxiapatita em defeitos ósseos periodontais é relatada na literatura com características diversas, como: (a) a hidroxiapatita é encapsulada por tecido conjuntivo frouxo e raramente em contato com osso (BARNEY et al., 1986); (b) a hidroxiapatita é encontrada entre os trabeculados ósseos, alguns dos quais consistem de osso lamelar maduro com sistemas Haversianos; também possui um estroma fibrocelular, osso imaturo espalhado entre o material enxertado e osteoclastos em lacunas de "Howship"

(SAPKOS, 1986; ETEL et al., 1989); (c) é observado crescimento ósseo, na forma de osteóide, para dentro dos poros dos grânulos próximos ao trabeculado ósseo de defeitos ósseos periodontais (CARRANZA et al., 1987). (d) osso trabecular é visto em apenas algumas amostras, é mais evidente a presença de tecido conjuntivo fibroso por entre o material implantado com células gigantes de corpo estranho. Na hidroxiapatita adjacente ao osso alveolar, raramente encontra-se osteóide e formação de novo osso trabecular (GANELES et al., 1986; MINABE et al., 1988; PINHOLT & KWON, 1992); (e) osso maduro e formação osteóide são observados em todas as amostras, ao longo e dentro dos grânulos, e ocorre a formação de osso supracrestalmente no tecido mole coronal ao defeito após 1 ano, em humanos (BOWERS et al., 1986; BYE et al., 1987); (f) há nos locais uma mínima quantidade de partículas de hidroxiapatita nos locais operados, não há evidências de osteogênese e a crista alveolar está remodelada. A pequena quantidade de partículas encontradas pode ser devida à absorção ou esfoliação (FROUM & STHAL, 1987).

Quando executado enxerto de hidroxiapatita, é visto com freqüência uma formação de novo tecido ósseo na interface e dentro da camada do enxerto voltada para o osso. Este osso consiste de formações lamelares e sistemas de canais de Havers, idênticos àqueles existentes abaixo da crista óssea. Na interface e na camada externa da hidroxiapatita voltada para os tecidos moles foram encontradas uma camada densa de tecido conjuntivo fibroso e uma quantidade mínima de células inflamatórias crônicas (DENISSEN et al., 1984; PAGE & LASKIN, 1987).

O tamanho da partícula de hidroxiapatita pode induzir a diferentes graus de reparação óssea inicialmente, porém, em tempos posteriores, os resultados histomorfométricos mostram que a quantidade de osso regenerado apresenta-se estatisticamente semelhante entre os grupos (KLINGE et al., 1992). No entanto, em defeitos ósseos periodontais humanos e em cultura celular pode existir uma influência do tamanho da partícula e do cristal na formação óssea (FRANK et al., 1991; TETI et al., 1991). Normalmente o cristal de HA apresenta forma hexagonal, com os átomos dispondo-se em forma bastante complexa para um fosfato de cálcio. Cada cristal é formado por milhares de unidades desse sal que se mantêm unidas através de atrações eletrostáticas. A

associação de PDLLA com a hidroxiapatita na forma de nanopartículas (cristais) origina um polímero complexo com maior módulo à tensão (DENG et al., 2001).

Um critério de grande importância para avaliar a biocompatibilidade de uma HA., é a osteointegração de sua interface, sem a presença de células inflamatórias (AAP, 1992). Encontra-se uma íntima relação entre as fibras colágenas da matriz óssea e os cristais de hidroxiapatita, com as fibras geralmente posicionadas paralelamente à superfície do implante, e também são encontrados cristais minerais do osso, adjacentes aos da hidroxiapatita (DENISSEN et al., 1984; TRACY & DOMERUS, 1984). O íntimo contato do material implantado ao osso faz com que sua separação se torne difícil, precisando de uma força em média de 30 N.cm^{-2} (DENISSEN et al., 1980). No início da reparação a interface entre a hidroxiapatita e o osso pode apresentar uma camada de tecido conjuntivo denso, que se transforma em tecido ósseo jovem (osteóide) à medida que o tempo passa e que posteriormente é remodelado em tecido ósseo fasciculado (GANELES et al., 1986).

Um tipo de hidroxiapatita de origem bovina sintetizada nos laboratórios do Departamento de Biologia Celular (UNICAMP) demonstrou ser biocompatível, lentamente absorvível e com qualidades semelhantes à HA do osso humano. Trata-se de um osso desproteinado na forma de hidroxiapatita, também chamado de cerâmica bovina, obtido após a limpeza com substâncias cáusticas e detergentes, e sintetizado em altas temperaturas. A matriz mineral é composta por fosfocarbonato de cálcio e magnésio e é mantida na forma natural. A matriz orgânica é removida por digestão enzimática e por sublimação. Após a separação da fase mineral, esta HA se apresenta com alto teor de pureza e composição, e seu grau de cristalinidade é extremamente semelhante ao da matriz mineral do osso humano (TEIXEIRA et al., 2000).

2.2.1. Hidroxiapatita ou Matriz Óssea Mineralizada Bovina, em Humanos

No Brasil existem empresas que confeccionam, modelam e comercializam hidroxiapatita bovina ou osso bovino mineralizado. Os nomes comerciais destes produtos são: PRO-HA®¹⁷, GEN-OX¹⁸ (Osso Bovino Inorgânico Liofilizado), BIO-MINER®¹⁹ e

¹⁷ Odontex Ltda, Curitiba, PR.

BIO-HA®²⁰. Todos estes biomateriais são aprovados pelo Ministério da Saúde do Brasil para serem utilizados em seres humanos e possuem registro na Vigilância Sanitária. A empresa VK Driler possui ISO/DIS 10993, sendo que estes materiais passaram por avaliações de citotoxicidade “in vitro”, efeitos colaterais após implantações, toxicidade sistêmica e local, irritação e sensibilização, avaliados no IPEN e USP. Estes materiais são matrizes ósseas bovinas mineralizadas, compostas por fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita em sua maior parte.

Em 1981, NIELSEN e co-autores publicaram um trabalho utilizando osso bovino desproteinado, comparando ao osso autógeno proveniente da cavidade bucal no tratamento de defeitos ósseos periodontais. Os resultados clínicos e radiográficos não demonstraram diferença significativa no ganho de inserção clínico entre os dois grupos, demonstrando, assim, a eficácia da HA de origem bovina no tratamento periodontal cirúrgico.

Em cirurgias para elevação do seio maxilar associado à colocação de implantes osteointegrados, o osso bovino mineralizado foi eficaz a longo prazo, pois foi encontrado 98,2% de sucesso nos parâmetros clínico, histológico, histomorfométrico e radiográfico. Foi observado histologicamente, que há maior formação de osso quando a HA bovina foi associada ao autógeno, ou "DFDBA" (FROUM et al., 1998). Na comparação histológica da absorção entre hidroxiapatita²¹, osso bovino desproteinado (BIO OSS®)²² e osso humano desmineralizado seco e congelado autógeno em seio maxilar, foi constatado que esta HA bovina é o material menos absorvível entre os três (KARABUDA et al., 2001). A maior taxa de sucesso dos implantes (sobrevivência) foi significativamente maior com a HA bovina do que com a mistura de HA bovina mais “DFDBA” após 6,5 anos (VALENTINI & ABENSUR, 2003).

Na associação da HA bovina com materiais ou substâncias indutoras de tecido

¹⁸ Baumer S/A, Mogi Mirim, S.P.

¹⁹ VK Driler LTD, São Pulo, S.P.

²⁰ VK Driler LTD, São Pulo, S.P.

²¹ Frios Algipore, Friadent GmbH, Mannheim, Alemanha.

²² Bio-Oss, Geistlich AG, Wolhusen, Suíça.

ósseo, houve um aumento na quantidade de preenchimento de defeitos ósseos periodontias, com peptídeo sintético (P-15) preencheu-se 72,9 % do defeito, contra 50,6% sem a utilização deste (YUKNA et al., 2000, 2002). Na comparação com “DFDBA”, YUKNA et al. (1998) encontraram um preenchimento do defeito de 87% versus 58% para HA mais P-15 e “DFDBA”, respectivamente.

Na preservação do osso alveolar e aumento do mesmo para a colocação de implantes, a associação “DFDBA” mais osso bovino (BIO-OSS[®]) mostrou ser eficaz (VACHIRAMON et al., 2002). Por outro lado, o osso Bovino anorgânico usado sozinho parece ser um material apropriado para o aumento do assoalho do seio maxilar em humanos quando é colocado implante dentário em seu interior (VALENTINI & ABENSUR, 2003).

No tratamento da doença periodontal, a matriz óssea mineralizada bovina (BIO-OSS^{®23}) reduziu 59,4% e o “DFDBA”, 77,6% a altura dos defeitos ósseos. Mesmo assim, não houve diferença estatística significativa entre os grupos após 6 meses de reparação (RICHARDSON et al., 1999).

2.3. MATRIZ DE PROTEÍNA ÓSSEA

Existem vários tipos de ossos para serem utilizados em cirurgia de enxerto em odontologia, medicina, ou em veterinária: (a) o enxerto autógeno, que é o osso doado e colocado no próprio paciente, a área doadora pode ser a maxila, mandíbula, íliaco, costela e calota craniana; (b) o enxerto alogênico ou alógeno, que é aquele retirado de outro paciente, podendo ser: (b1) congelado apenas, (b2) mineralizado seco e congelado (FDBA) e (b3) desmineralizado seco e congelado (DFDBA); e (c) o enxerto xenogênico, antigamente chamado de heteroenxerto, que é aquele transplantado entre espécies diferentes, como por exemplo, do boi para humanos (SZYCHER, 1992; AAP, 2001). A matriz óssea desmineralizada ou osso desmineralizado é chamado também de matriz de proteína óssea (BPM). No Brasil, nossa legislação proíbe a comercialização e a utilização de ossos para implantes de procedência humana.

²³ Bio-Oss, Geistlich AG, Wolhusen, Suíça.

Os diferentes tipos de enxerto possuem vantagens e desvantagens para os pacientes que irão recebê-los. O enxerto autógeno fresco possui a vantagem de ser do próprio paciente, está estéril e possui células ósseas osteoprogenitoras vivas, porém envolve outra cirurgia na área doadora, a quantidade de material geralmente é pequena e o osso mineralizado pode causar reabsorção radicular externa quando utilizado em defeito ósseo periodontal (SEIBERT, 1983). O osso mineralizado liofilizado (FDBA) é apenas osteocondutivo e não osteoindutivo. O osso desmineralizado seco congelado (DFDBA) é recomendado pela Academia Americana de Periodontologia, é osteocondutivo e osteoindutivo, mas tem custo elevado (HIAT & GENCO, 1997; NASR et al., 1999); O FDBA e o DFDBA continuam sendo importantes substitutos ósseos para uso em uma variedade de procedimentos periodontais regenerativos, bem como em regeneração óssea para implantodontia. O osso bovino desmineralizado seco é osteocondutivo, osteoindutivo, mais barato que o DFDBA e não oferece risco de transmissão de doenças (BESSHO et al., 1998; AAP, 2001).

Existe uma semelhança anatômica e bioquímica entre o osso bovino e o osso humano. A proteína morfogenética óssea contida no osso bovino possui 163 aminoácidos e peso molecular 18 KDa enquanto que a humana possui 165 aminoácidos, com peso molecular 17KDa. Ambas possuem semelhantes quantidades de osteoindução quando colocadas em tecido muscular de ratos (BESSHO et al., 1998). O osso alógeno desmineralizado seco congelado e o osso bovino foram introduzidos em periodontia na década de 1970; no final da década de 1980 foram vendidos comercialmente; na década de 1990 foram cada vez mais usados e, atualmente, o osso bovino é muito bem aceito pelos profissionais e pesquisadores, ao constatar-se o número crescente de trabalhos científicos envolvendo este biomaterial (AAP, 2001).

O DFDBA possui uma fonte de fatores osteocondutivos em seu conteúdo protéico e em sua superfície e quando mineralizado (FDBA) é apenas osteocondutivo. Comparando diferentes substratos para o crescimento de células osteogênicas em cultura, verificou-se que na matriz óssea desmineralizada ocorre maior proliferação e osteoindução quando comparados à matriz óssea mineralizada (hidroxiapatita) e Beta-fosfato tricálcico

(KASTEN et al., 2003). A osteoindução é a principal propriedade clínica dos enxertos ósseos: envolve a migração de células mesenquimais, fixação e osteogênese quando o enxerto é implantado em osso bem vascularizado e também a indução formação óssea endocondral quando implantado em tecidos que de outra maneira não formariam osso. O DFDBA parece não ser antigênico (QUATTLEBAUM et al., 1988) e os relatos clínicos de tratamentos com a sua utilização têm sido pouco conclusivos (BECKER et al., 1992; 1994; 1998).

A origem embriológica do leito receptor ósseo influencia no tipo de ossificação de ocorrerá na reparação do enxerto ósseo utilizado. Quando uma matriz óssea descalcificada é implantada subcutaneamente ou intramuscularmente ocorre inicialmente uma resposta tecidual, indução de células formadoras de osso, seguido de formação de cartilagem que se calcifica e sofre remodelação óssea ao longo do tempo, ou seja, ocorre uma ossificação endocondral. A reparação dos mesmos implantes em defeitos cranianos difere, porque células indiferenciadas mesenquimais são induzidas e se transformam em osteoblastos, que depositam osteóide com posterior calcificação, ou seja, ocorre uma ossificação intermembranosa (WANG et al., 1998).

A origem embriológica do osso usado como enxerto pode também ser decisiva no tipo de ossificação que ocorrerá na reparação do mesmo. Implantes ósseos de fêmur induziram ossificação endocondral e implantes de osso frontal induziram ossificação intramembranosa, quando ambos foram implantados em tecido subcutâneo (SCOTT & HIGHTOWER, 1991). No entanto, REDDI & HUGGINS (1972) relataram que estes dois tipos de ossos induzem apenas a ossificação endocondral.

A preparação do DFDBA pode ser de diferentes maneiras e os métodos usados pelos bancos de tecidos para o processamento ósseo dos doadores são de propriedade exclusiva e, por isso, não são de domínio público. A maioria das empresas que vendem osso para enxerto segue as orientações da “American Association of Tissue Banks” (AATB) no que diz respeito à obtenção, processamento e esterilização dos mesmos. As orientações da AATB se aplicam ao controle de qualidade e conformidade às normas, garantindo a segurança. A “Food and Drug Administration” (FDA) tem normas para a

fabricação de implantes derivados de biomateriais, indicando limites máximos de resíduos e contaminantes introduzidos pelo processamento, bem como a biocompatibilidade aceitável para um material de implante. Hoje, o uso do DFDBA de um banco de ossos aprovado pela AATB é geralmente seguro e pode ser considerado como um substituto ósseo durante procedimentos regenerativos (AAP, 2001).

A esterilização de ossos para enxertos é um procedimento que possui afirmações contraditórias. Bancos de tecidos que esterilizam suas amostras por radiação ou por óxido de etileno (OET), podem não relatar este dado nos rótulos de seus produtos. O OET utilizado para esterilizar ossos para enxerto pode diminuir a osteogênese e a reabsorção do material enxertado. Isto pode ser explicado devido à remoção inadequada dos resíduos de OET durante o processo de esterilização ou à exposição do material a temperaturas que causam desnaturação protéica (AAP, 2001). A esterilização com OET pode ser problemática em alguns lotes, pois seus resíduos são tóxicos para fibroblastos gengivais humanos (KUDRYK et al., 1992). Contudo, foi demonstrado que uma correta esterilização, envolvendo temperaturas e tempos apropriados, não extingue a capacidade osteoindutora da matriz óssea desmineralizada (ASPENBERG & LINDQVIST, 1998; ZHANG et al., 1997). A esterilização óssea por radiação ou raios gama pode reduzir a capacidade osteoindutiva em até 40 % (ZHANG et al., 1997). Entretanto, a “American Academy of Periodontology” relatou que este tipo de esterilização parece não alterar a capacidade indutora do DFDBA no período de reparação (AAP, 2001).

A não esterilização é aceita quando o osso é coletado e processado sob condições estéreis. Foram encontrados 4 casos de AIDS após procedimentos com enxertos alógenos congelados executados antes de 1985, quando a legislação e os protocolos eram diferentes dos atuais, ainda que nenhum relato de DFDBA contaminado foi observado até 1992 (SIMONDES et al., 1992). Um banco de transplantes norte-americano, o “Musculoskeletal Transplant Foundation”, tem como referência um estudo mostrando que o risco de transmissão do vírus HIV em transplante é de 1 em 1,67 milhões. Neste sentido, o osso bovino tem sido cada vez mais utilizado em odontologia (LEKOVIC et al., 2001).

O tamanho da partícula do enxerto de matriz óssea desmineralizada influencia na diferenciação e proliferação de células ósseas. Partículas com tamanho de 74 a 420 μm induziram a formação de osso (endocondral), o que não aconteceu com partículas cujo tamanho foi de 44 a 74 μm , subcutaneamente em ratos (SAMPATH & REDDI, 1984). Partículas entre 125 a 250 μm foram mais indutoras de osso que 44-75 μm ou 500-1000 μm , subcutaneamente em ratos (SYFTESTAD & URIST, 1979), ao passo que, partículas entre 250 a 1000 μm induziram mais formação de osso que as menores que 250 μm , em calvária de porcos (MELLONIG & LEVY, 1984). As partículas muito pequenas de DFDBA parecem induzir a ação dos macrófagos, resultando em pouca ou nenhuma formação óssea. A Academia Americana de Periodontologia sugere que o tamanho das partículas deva ser de 250 a 750 μm , que são os tipos mais disponíveis e comercializados pelos bancos de ossos atualmente (AAP, 2001). Cirurgias mais complexas utilizando enxertos ósseos têm sido cada vez mais realizadas, consistindo no levantamento do seio maxilar para a colocação de implantes e técnicas para aumento de rebordo alveolar. Os DFDBA utilizados nestas cirurgias possuem a forma de grânulos de tamanhos variando de 250 a 2000 μm , ou lâminas de espessuras de 20 a 100 μm por 3 a 5mm, e blocos de ossos porosos ou densos (AAP, 2001; BECKER et al., 1998).

A idade e sexo do doador (humano) foram confrontados com a capacidade osteoindutiva e concluiu-se que a idade, mas não o sexo, pode diminuir a capacidade de osteoindução, ou seja, quando é utilizado osso de doadores idosos há menor formação de osso (SCHWARTZ et al., 1998). Porém, quando é analisada a idade óssea em animais, os resultados são contraditórios. O osso obtido de ratos de 1 mês induziu menos formação óssea que aquele obtido de ratos doadores de 8 meses e ainda, a indução de formação óssea em ratos receptores com 1 mês foi maior que em ratos com 8 meses (JERGESEN et al., 1991).

O FDBA e o DFDBA continuam sendo importantes substitutos ósseos para uso de uma variedade de procedimentos periodontais regenerativos ao redor dos dentes, bem como em regeneração óssea para a implantodontia (BESSHO et al., 1991).

2.3.1. MATRIZ DE PROTEÍNA ÓSSEA em HUMANOS

PERCHY & LAROCHE, em 1800, foram os primeiros autores a relatarem o uso de osso de boi em enxertos ósseos para tratamento de fratura de tíbia em humanos, assim como OLLIER (1861) relatou em detalhes a remoção, preparo e colocação de enxertos bovinos em seres humanos, apesar desta época não ter procedimentos de assepsia e esterilização eficientes (GRAZIANI, 1986). Na década de 60 do século passado, SCOOP et al. (1966) colocaram um tipo de osso bovino em defeitos ósseos periodontais humanos, com osso tratado apenas com uma solução detergente, esterilizado, congelado e desidratado, porém os resultados não foram satisfatórios.

NASR et al. (1999) descreveram, em periódico com bom grau de impacto na área da odontologia (2,49), que o osso bovino após tratamento com soluções de soda cáustica (NaOH), hipoclorito de sódio (NaClO) e água oxigenada (H₂O₂) para limpeza e remoção da gordura, descalcificação com ácido clorídrico (HCl), desidratação e esterilização adequadas, torna-se um produto biocompatível, osteoindutor. Comercialmente, ele é de fácil aquisição e livre de risco de transmissão de doenças. No entanto, os autores estavam relatando produtos já aprovados, ou aceitos para venda pelo FDA.

A Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), ou “mal da vaca louca”, é uma doença bovina que preocupa os órgãos governamentais devido à possibilidade de contágio e morte em seres humanos. O tempo de incubação para a BSE é longo (2 a 8 anos) e o FDA aceita o uso de produtos bovinos, tanto dos países de risco, como dos “contaminados”, se provarem que seus produtos possuem evidências de que o agente da BSE é inativado durante o processo de fabricação do produto. Um processo científico válido que inativa tal agente é o tratamento térmico para a obtenção de hidroxiapatita de osso bovino (FDA, 1998).

No Brasil existem empresas que confeccionam, modelam e comercializam a matriz de proteína óssea bovina, ou osso bovino desmineralizado, ou osso bovino orgânico. Os nomes comerciais destes produtos são: (1)PRO-BONE[®]²⁴,

²⁴ Odontex Ltda, Curitiba, PR.

(2)ALOMATRIX®²⁵, (3)OSTEOPUR®²⁶, (4)GEN-OX®²⁷ (Matriz Orgânica de Osso Bovino Liofilizada), (5)GEN-COL®²⁸ (Colágeno bovino), (6)GEN-TECH®²⁸ (osso mais colágeno), (7)GEN-DERM®²⁸ (Membrana de Matriz Óssea Bovina Liofilizada), (8)LiSPONGY-FLEX®²⁸ e (9)CORT-FILME®²⁹ (Membrana de osso cortical descalcificado). Todos estes biomateriais são aprovados pelo Ministério da Saúde para serem utilizados em seres humanos e possuem registro na Vigilância Sanitária. A empresa VK Driler possui ISO/DIS 10993, sendo que estes materiais passaram por avaliações de citotoxicidade “in vitro”, efeitos colaterais após implantações, toxicidade sistêmica e local, irritação e sensibilização, avaliados no IPEN e USP.

O colágeno de origem bovina tem sido considerado um biomaterial seguro e eficaz para numerosas aplicações médicas mesmo induzindo pequena reação imunológica. A maior exceção é o uso de injeção de colágeno bovino na derme para tratamento de rugas e correção de contornos de tecido mole que causam uma reação inflamatória na derme e cessam quando são absorvidos. Esta reação imunológica pode ser grande em pacientes com história de hipersensibilidade exagerada. Estudos recentes relatam que materiais que possuem colágeno utilizado na reparação ou regeneração óssea demonstram que a presença de imunidade para os componentes colagenosos ou não colagenosos não é causa de uma seqüela adversa. Para se obter uma verdadeira biocompatibilidade deve-se observar atentamente a reação imunológica e relacioná-la com os aspectos histológicos e clínicos e não analisá-la isoladamente (DELUSTRO et al., 1990).

Na reconstrução de ossos das mãos o osso desmineralizado bovino promoveu uma reparação óssea com a presença de ossificação endocondral e após 9 semanas ocorreu contínua calcificação radiográfica (UPTON et al., 1984).

Na reconstituição de ossos da face, o osso bovino descalcificado foi bem aceito e induziu um contínuo aumento da radiopacidade nos locais enxertados e, clinicamente não

²⁵ Vipro Indústria e Comércio Importação e Exportação de Produtos Médicos Hospitalares Ltda., Esteio, R.S.

²⁶ Impol Instrumental e Implantes Ltda., São Paulo, S.P.

²⁷ Baumer S/A, Mogi Mirim, S.P.

²⁸ Baumer S/A, Mogi Mirim, S.P.

²⁹ VK Driler LTD, São Pulo, S.P.

foi notada a presença de fluido cerebrospinal, meningite, abscesso extradural, reação imunológica, e ou outras infecções (ABDULLAH et al., 1999). Em fraturas mandibulares, a cicatrização óssea ocorreu sem sinais clínicos de reação alérgica ou rejeição, sendo que o osso bovino desmineralizado ofereceu segurança a longo prazo (até 15 anos) no tratamento de fraturas cominutivas e de lesões ósseas de aspecto de granulomatoso e cístico na cavidade bucal de seres humanos (ROSENTHAL et al., 1999).

A literatura citada acima ou o Ministério da Saúde do Brasil, ou ambos, relatam que o osso bovino desmineralizado é seguro, eficaz, promove rápida cicatrização óssea e oferece um ilimitado suprimento de materiais quando comparados a bancos teciduais.

2.4. REPARAÇÃO ÓSSEA

A reparação óssea de uma fratura é semelhante à reparação de enxertos biocompatíveis, porém daqueles que não causam uma exacerbada reação de corpo estranho. Esta reparação é uma imitação dos eventos embrionários de formação óssea que incluem interações complexas de fatores de crescimento e respostas das populações celulares presentes no local. Ela resulta geralmente na regeneração da estrutura óssea que será fisiologicamente e biomecanicamente indistinguível do original, e todos estes eventos são dependentes dos fatores de crescimentos e em particular das Proteínas Morfogenéticas Ósseas ou “BMPs” (SCHMITT et al., 1999).

No início do processo de reparo ocorre uma resposta inflamatória, e com esta há uma série de ativadores moleculares como as Interleucinas e a cascata de reações de complemento. As injúrias vasculares causam o extravasamento de células e de moléculas sinalizadoras e a degradação proteolítica da matriz extracelular produz uma quimiotaxia positiva para monócitos e macrófagos para o leito. Os macrófagos ativados liberam Fator de Crescimento de Fibroblasto β (FGF β), estimulando as células endoteliais a expressar ativador de plaminogênio e prócolagenase. Há também a liberação pelas plaquetas de sinais de ativação para os leucócitos, linfócitos, monócitos e macrófagos (EINHORN, 1998; HYADA et al., 1998).

O extravasamento de sangue local forma um hematoma que previne a perda de

sangue por hemorragia que permanece entre as superfícies ósseas danificadas. As plaquetas ali presentes liberam Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), Fator de Crescimento Transformador β (TGF β) e Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) (BOLANDER, 1992). A tensão de Oxigênio e o pH diminuem, dando melhores condições para a ação dos leucócitos e macrófagos. Os leucócitos polimorfonucleares removem microorganismos e outras micropartículas, enquanto que materiais maiores são fagocitados pelos macrófagos e células gigantes multinucleadas. Os macrófagos possuem uma grande capacidade de síntese de fatores de crescimento que recrutam e ativam células e provocam mitogênese e quimiotaxia ao longo do processo de reparo (SCHMITT et al., 1999).

Após estes eventos de reparo, há formação de novos vasos e a presença de fibroblastos, macrófagos e uma deposição inicial de colágeno de vários tipos. Fatores de crescimento se unem seletivamente ao colágeno e podem localizar, proteger e interagir com as células. O colágeno da ferida em reparação é substrato para o TGF β , FGF, PDGF e BMPs na interação celular. Células indiferenciadas e células osteoprogenitoras localizadas no periósteo e endósteo interagem com o tecido de granulação colagenoso e se diferenciam em condrócitos e osteoblastos sob a ação das moléculas sinalizadoras, as “BMPs” (REDDI, 1992), que possuem uma fundamental participação na formação óssea na embriogênese, remodelação e reparo. Elas induzem a ancoragem, transdução, recrutamento (quimiotaxia +), mitose, diferenciação e interação de células; transformam fenótipos celulares específicos em blastos ósseos, pois têm um potencial de iniciar a cascata da reparação óssea e estão contidas na matriz óssea desmineralizada. O peso molecular de BMPs de origem humana e bovina é 17,0 e 18,0 KDa, com 165 e 163 amino ácidos, respectivamente, e são extraídas com 4M de HCl-guanidina. A BMP1 não faz parte da superfamília das BMPs, que estão na tabela que se segue (BESSHO et al., 1991; REDDI, 1992; BRUDER et al, 1994; SCHMITT et al., 1999).

Após 6-8 semanas de reparo em humanos, estão presentes populações de células e fatores de crescimento e diferenciação como o TGF β , FGF, fatores de crescimento endoteliais, BMP e PDGF. A reconstrução da estrutura óssea perdida é executada pelos osteoblastos e osteoclastos. No entanto não há no local uma quantidade suficiente de

células, que devem ser recrutadas, aumentadas em número e serem induzidas pelos fatores de crescimento. No local há fragmentos de fibronectina, que é um fator de adesão, além de produtos de degradação da matriz extracelular que estimulam os monócitos diferenciando em osteoclastos. Os macrófagos presentes liberam FGF e Fator de Crescimento Endotelial, promovendo a angiogênese com proliferação vascular para servir de caminho para a maior demanda celular exigida. As BMPs que mais são encontradas nos processo de reparo ósseo são as chamadas BMP2, 4 e 7, no entanto, há 16 tipos de BMPs (Tabela 2 na página 26) (REDDI, 1992; BOLANDER, 1992; HAYDA et al., 1998; REDDI, 1998).

As diferenças na capacidade de regeneração permitem o reconhecimento de 3 grupos de células nos organismos dos mamíferos: as lábeis, estáveis e permanentes. As células lábeis continuam a proliferar por toda a vida; as células estáveis se proliferam, embora normalmente não se reproduzam; e as células permanentes não se reproduzem. As células lábeis são aquelas encontradas na medula óssea, os monócitos, neutrófilos, macrófagos, osteoclastos, odontoclastos, células esplênicas e linfóides, as células envolvidas na inflamação granulomatosa como células gigantes de Langerhans ou célula gigante do tipo corpo estranho e células epitelóides. As células estáveis são as parenquimatosas, mesenquimatosas como fibroblastos, condroblastos, células endoteliais, osteoblastos e osteócitos. As células lábeis e estáveis estão envolvidas no processo de reparo ósseo (COTRAN et al., 1997; FARIA, 1999; GUYTON, 2002).

Tabela 2. Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas relatadas na literatura.

PMO	Sinônimos encontrados na literatura
BMP2	BMP2a
BMP4	BMP2b
BMP3	Osteogenin
BMP3B	Fator de crescimento e diferenciação 10 (GDF10)
BMP5	-
BMP6	“Vegetal related” (Vgr1)
BMP7	Proteína osteogênica 1 (OP1)
BMP8	Proteína osteogênica 2 (OP2)
BMP8B	Proteína osteogênica 3 (OP3)
BMP9	Fator de crescimento e diferenciação 2 (GDF2)
BMP10	Fator de crescimento e diferenciação 11
BMP11	Fator de crescimento e diferenciação 11
BMP12	Proteína morfogenética derivada de cartilagem 3 (CDMP3), e fator de diferenciação e crescimento 7 (GDF7).
BMP13	Proteína morfogenética derivada de cartilagem 2 (CDMP2), e fator de diferenciação e crescimento 6 (GDF6).
BMP14	Proteína morfogenética derivada de cartilagem 1 (CDMP1), e fator de diferenciação e crescimento 5 (GDF5).
BMP15	-
BMP16	-

Tabela adaptada de REDDI, 1998.

Os processos mais evidentes na cicatrização óssea são: regeneração das células parenquimatosas, migração e proliferação de células parenquimatosas e do tecido conjuntivo, síntese de proteínas da matriz extracelular, remodelação do tecido conjuntivo frouxo, colagenização e mineralização. Há 3 importantes aspectos biológicos que formam a maquinaria dos processos acima citados: (1) o papel dos fatores de crescimento; (2) as interações célula-matriz e célula-célula; (3) a síntese da matriz extracelular (COTRAN et al., 1997).

Os fatores de crescimento são moléculas que estão diretamente relacionadas com o

crescimento dos fibroblastos e vasos sanguíneos. É sabido que o crescimento normal de populações de células é controlado por efeitos opostos dos estimuladores do crescimento e dos inibidores do crescimento. Os fatores de crescimento mais importantes são aqueles que recrutam as células G_0 para dentro do ciclo celular. Os fatores de crescimento polipeptídicos estão presentes no soro. Os fatores de crescimento podem induzir a célula a tomar duas “atitudes”: (1) de tornar-se capaz de sintetizar DNA (fatores de competência) e/ou (2) de estimular a síntese de DNA (fatores de progressão). Com isso, certos fatores estimulam a migração celular, diferenciação, remodelação tissular que estão envolvidos em uma reparação.

Os 5 fatores de crescimento mais importantes presentes no reparo ósseo são: (1) o fator de crescimento epidérmico (EGF), que é um fator de progressão para células epidérmicas e fibroblastos; (2) o fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), que é um fator de competência que quando liberado na ativação das plaquetas, pelos macrófagos ativados e células do endotélio, causa a migração e a proliferação de fibroblastos, células musculares, monócitos; induz progressão de inflamação, e quando aplicado diretamente sobre uma incisão cirúrgica há um aumento na quimiotaxia dos monócitos e síntese de colágeno; (3) o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que induz a diferenciação, crescimento e proliferação dos fibroblastos, induz a todos os estágios da angiogênese, é liberado por macrófagos ativados e também está presente em extratos de muitos órgãos; (4) fatores de crescimento transformadores ($TGF\alpha$ e $TGF\beta$). O $TGF\alpha$ exerce a maior parte das atividades do EGF, por outro lado o $TGF\beta$ possui efeitos variados, como a inibição do crescimento para a maioria das células em cultura, estimula a quimiotaxia fibroblástica e a produção de colágeno e de fibronectina pelas células, ao mesmo tempo em que inibe a degradação do colágeno. O $TGF\beta$ é produzido pelas plaquetas, células do endotélio, linfócitos T e macrófagos. As BMPs da superfamília $TGF\beta$; (5) as citosinas Interleucina-1 (L-1) juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF) são angiogênicos, mediadores mitogênicos para fibroblastos e também aumentam a síntese de colágeno e colagenase pelos mesmos que são secretados por macrófagos (BRUDER et al., 1994; COTRAN et al., 1997; HAYDA et al., 1998; REDDI, 1998; SCHMITT et al., 1999).

Os genes que codificam alguns dos fatores de crescimento mostram uma homologia seqüencial extensa com os oncogenes, como no caso do PDGF com o *c-sis* e o receptor do EGF com o *c-erb*, sugerindo envolvimento desses fatores de crescimento na formação do câncer (COTRAN et al., 1997).

A interação célula-matriz compreende um aspecto importante na reparação óssea, pois pode influenciar nas ações celulares, como a migração, diferenciação, proliferação, síntese de proteínas e apoptose, sendo que o tipo de colágeno da matriz, a presença de fibronectina ou da laminina e a natureza dos proteoglicanos fazem parte da lista das substâncias que agem sobre a célula. Na superfície da membrana celular há receptores que reconhecem as proteínas da matriz. Tais receptores são, geralmente, glicoproteínas transmembrana com domínios intracelulares, as integrinas, que interagem com elementos do citoesqueleto que propagam as informações ao núcleo. No processo de cicatrização de feridas, a fibrina, a fibronectina ou fragmentos de fibronectina promovem a migração das células endoteliais e dos fibroblastos para a área da lesão. Acredita-se que muitas integrinas ligam-se às proteínas da matriz através do reconhecimento da seqüência de aminoácidos específicos, o tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Os fatores de crescimento também interagem com a matriz extracelular e induzem a uma resposta celular definida (COTRAN et al., 1997; COLARES-BUZATO, 2001).

A interação célula matriz pode também estar baseada no “feedback” dos eventos de reconhecimento e adesão celular à certos arranjos moleculares da superfície da matriz extracelular ou implantes. A geometria e o arranjo das macromoléculas da matriz, ou implantes parecem ser necessários para a interação célula-matriz, tal qual os eventos de reconhecimento e adesão requeridos para diferenciação e o surgimento da morfogênese (GIRAUD-GUILLE & BESSAU, 1998; BAGAMBISA et al., 1994; MIDWOOD et al., 2004). Os fenômenos da reparação e remodelação teciduais também são baseados nos eventos do modelo de “feedback”, considerando que um empilhamento regular das moléculas na superfície da matriz extracelular pode conter informações e liberação de sinais de reconhecimento e indução (BESSEA, et al., 2002; MIDWOOD et al., 2004).

A interação célula-célula é importante na cicatrização porque influencia na

proliferação celular. A inibição por contato é aqui o evento mais marcante desta interação, acontecendo por ocasião da confluência celular. A regulação da densidade dependente do crescimento celular pode ter várias causas: (1) limitação de qualquer uma das substâncias que faz parte do microambiente que circunda o volume celular, como nutrientes e O₂; (2) limitação do número de receptores para os fatores de crescimento; (3) acúmulo de inibidores de crescimento no meio (COTRAN et al., 1997; COLARES-BUZATO, 2001).

A síntese e deposição de colágeno (tipo I) são de fundamental importância para a cicatrização das feridas, devido sua quantidade e organização nos tecidos fibrosos, na membrana basal, no osso e cartilagem, sendo que nas feridas em reparação, ele dá resistência tensional e à compressão. O tecido de granulação é rico em colágeno tipo III. A vitamina C está presente no processo de reparo, pois uma das etapas da síntese do colágeno depende do ácido ascórbico para a hidroxilação da prolina e da lisina. Assim, a falta deste nutriente (escorbuto) resulta em distúrbio da síntese do colágeno (SAUBERLICH, 1994). A falta prolongada de ingestão de proteínas e a ingestão de corticosteróides também inibem a síntese de colágeno e bloqueiam ou retardam a resposta inflamatória-reparadora. (COTRAN et al., 1997; HAYDA et al., 1998; FARIA, 2001).

Algumas influências sistêmicas modificam a qualidade da resposta reparadora de feridas: (1) a idade; (2) a falta de ingestão de Zn, no caso da dependência das metaloenzimas e polimerases do DNA e do RNA; (3) os distúrbios hematológicos de neutrófilos que diminuem a imunidade e aumentam a probabilidade à infecção; e (4) a diabetes que diminui a quimiotaxia neutrofílica e capacidade fagocitária (COTRAN et al., 1997; HAYDA et al., 1998; FARIA, 2001). A Calcitonina é um hormônio produzido pelas células C da tireóide. Sua principal função é inibir a atividade osteoclástica, o que leva a um “turnover” ósseo reduzido. No entanto, só tem efeito em pacientes com remodelação óssea de alto “turnover”. O efeito de preservação óssea alcança um platô após dois anos (GUYTON & HALL, 2002).

Os hormônios sexuais estimulam os osteoblastos e a osteoporose pode ser prevenida por suplementação estrogênica. Contudo, uma vez diagnosticada osteoporose, os esteróides não conseguem mais reverter à perda óssea. O paratormônio em níveis ou em

função aumentadas não causam osteoporose. A ingestão de vitamina D parece não ter uma relação com a doença, pois mulheres pós-menopáusicas com osteoporose não obtiveram qualquer benefício significativo. Entretanto, foi observado um adiantamento no processo de reparo após extração dentária em ratos alimentados com essa vitamina (BARRETO et al., 1982; KRANE & NEER, 1998).

As influências locais que aparecem como as mais importantes no retardamento ou modificações do processo de cicatrização, entre elas estão: (a) a infecção, que é a causa isolada mais importante; (b) a falta de suprimento sangüíneo; (c) os corpos estranhos, que atrasam a reparação, pois o organismo deve primeiro eliminá-los para depois continuar com o processo de cura; (d) o tipo de tecido que ocorreu a ferida, pois o reparo em tecidos compostos por células estáveis ou lábeis geralmente é perfeito, enquanto que na ocorrência em tecidos compostos por células permanentes geralmente culmina em fibrose, com perda da função (COTRAN et al., 1997, HAYDA, 1998).

2.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha de um material sintético para enxerto deveria preencher alguns dos seguintes critérios: (1) sendo o material absorvível ou não, deve ser fisiologicamente compatível, não manifestando toxicidade ou antigenicidade; (2) se o material for absorvível, seu material básico e aqueles resultantes de sua degradação não devem produzir grande reação de corpo estranho, que atrase a reparação; (3) o material deve ser totalmente incorporado pelo osso circundante, implicando em uma adesão mecânica e química (WILLIAMS, 1985).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a biocompatibilidade e propriedades reparacionais de poli ácidos lácticos associados ou não à hidroxiapatita e à matriz protéica óssea, dando suporte científico para o uso destes biomateriais em seres humanos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar qualitativa e quantitativamente a proliferação de fibroblastos *in vitro*, em membranas de Poli(L-ácido láctico)(PLLA), de Poli(DL-ácido láctico)(PDLLA) e Poli (DL-ácido láctico)-co-Glicólico (PDLLAcoGL);
- Testar a eficácia de uma técnica para a obtenção de poros e medição destes;
- Comparar a esterilização por óxido de etileno versus hipoclorito de sódio na proliferação fibroblástica em membranas de PDLLA.
- Analisar *in vivo* a resposta biológica durante o reparo tecidual frente aos enxertos de melhor resultado na análise *in vitro*, associados à hidroxiapatita bovina ou à matriz de proteína óssea bovina;
- Dar forma aos materiais de enxertos para a obtenção de corpos tridimensionais com porosidades específicas;
- Avaliar o processo de osteoindução do PDLLA-BPM em tecidos moles;
- Analisar os sinais de biocompatibilidade clínica e radiográfica em seres humanos na reparação de enxertos ósseos de PDLLA complexado à HA e PDLLA complexado à BPM na forma de grânulos porosos, em uma variedade de técnicas cirúrgicas odontológicas, após o sucesso de sua utilização em ratos.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1. “Fibroblast Proliferation on Porous Membranes of Different Polylactic Acids: Quantitative and Qualitative analyses, Sterilization Methods and Measurement of Pore Size.”

Fibroblast Proliferation on Porous Membranes of Different Polylactic Acids: quantitative and qualitative analyses, sterilization methods and measurement of pore size.

Marco A. Argento^{a*}, Patricia S. Melo^b, Benedicto de C. Vidal^a, Angelo L. Cortelazzo^a

^a Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

^b Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Short title: Fibroblast Culture on Polylactic Acids

Abstract

The purpose of this work was to determine the qualitative and quantitative differences in fibroblast proliferation on three types of Poly lactic acid, to compare the effects of sterilization methods, to measure the pore sizes. Porous membranes of Poly(L-lactic acid)(PLLA), Poly(DL-lactic acid) (PDLLA) and Poly(DL-lactic acid)-co-Glycolic (PDLLAcoGL) were prepared and PDLLA membranes were sterilized with ethylene oxide or sodium hypochlorite. The number and morphology of fibroblasts growing on these membranes was subsequently determined. The diameter of pores in the PDLLA, PLLA, PDLLAcoGL membranes pores was 454, 462, 448 μm , respectively. Sterilization with 1 % sodium hypochlorite solution enhanced proliferation whereas ethylene oxide inhibited this growth. The cells grown on PLLA membranes were small in number and size, with condensed nuclei of varying sizes, and very few fibroblasts presented evident nucleoli. Fibroblasts grown on PDLLAcoGL were generally small spherical and isolated, with small nuclei, but eventually assumed a cell appearance grown on PDLLA; i.e., they had large nuclei, various nucleoli and a basophilic cytoplasm. The number of fibroblasts growing on PDLLA membranes was significantly greater than on PDLLAcoGL, which was greater than on

* Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), zip 13081-970, Campinas, SP, Brazil. Telephone: + 55 19 3788-6126, Fax: + 55 19 32414852. E-mail: argentoma@yahoo.com .

PLLA. These results show that programmed solvent evaporation can be useful for producing porous PDLLA membranes for grafting materials.

Keywords: polylactic acid; porosity; membrane; surface topography; cell proliferation; sterilization.

1. Introduction

Polylactic acids (PLAs) are polymers with a potential clinical use because they are biodegradable, bioabsorbable and biocompatible. PLAs are used as reconstructive implants and are sold as of microparticles, granules, threads, gels, membranes and blocks. These polymers have been widely studied as controlled release systems for drugs, and are also used as tissue separators in guided tissue regeneration and in sutures.¹⁻⁷

The physico-chemical properties of PLAs greatly influence the cellular response *in vitro* and *in vivo*.⁸ The techniques for preparing these polymers influence the properties of degradation, molecular mass, crystallinity, resistance to tension and plasticity. This means that is possible to vary the preparative methods to obtain more adequate forms for each type of application. Some methods for sterilizing PLAs, such as dry heat, humid heat, radiation and gaseous ethylene oxide, may also alter the molecular mass, resistance to tension and degradation.⁹⁻¹⁰

Porosity is an important structural characteristic of polymers that influences not only polymer degradation, but also tissue repair when these are used as implants. PLAs with a greater porosity can degrade more rapidly *in vivo* and *in vitro* than PLAs in blocks. Porosity can be obtained by adding specific salts, thereby making the substratum suitable for cell growth and the

production of extracellular matrix. The resulting polymers can be used in the reconstruction of support tissues such as bone and cartilage.¹²⁻¹⁴

When the technique of solvent evaporation or molding by injection is used to obtain PDLA or PLLA biopolymers, there is dissolution and rapid recrystallization that diminishes the initial size of the crystals.¹⁵ If there is no compression during recrystallization, large spheres are formed and the polymer becomes brittle. The technique of molding by injection, orients the crystals, increases the resistance to tension by 4 - 5 times, and produces a polymer that is more resistant to degradation *in vitro* and *in vivo*.¹⁶

The useful PLAs included poly(D-lactic acid) isomers and PLLAcoGL acids. The tendency to classify PLLA, PDLA and PLLA simply as PLA often makes it difficult to compare the results reported in the literature. Differences in the ability of PLAs to influence cellular morphology and proliferation *in vitro*, are probably reflected *in vivo*. Hence, the aim of this work was to compare the morphology and number of fibroblasts growing on PLLA, PLLA and PLLAcoGL crystalline membranes of standard porosity. The influence of two methods of sterilization (ethylene oxide and sodium hypochlorite) on the proliferation and morphology of fibroblasts grown on PLLA membranes was also assessed.

2. Experimentation

2.1. Material

Solutions at 12.5% PLLA[†], PLLA[†] or PLLAcoGL[†] (75:25 w/v) in dichloride methylene[‡] were stirred for 20 minutes in petri dishes (5 cm) until the polymers had dissolved.

[†] Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

[‡] Synth, Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brazil.

Two grams of sodium citrate[‡] granules (diameters of 350 - 420 μm) were added to some PDLLA samples. One hundred microliters of the solution was then removed and placed on glass slides measuring 10 x 10 mm followed by evaporation of the solvent for 48 h at room temperature. The membranes were fixed to the glass slides with 2 μL of cyanoacrylate ester[§] to keep them from floating in the culture. Finally, the material adhering to the slides was placed in 500 mL of distilled water for 24 hs and changed every 8 hs to completely remove the sodium citrate.

Some membranes were sterilized in a 1.0 % sodium hypochlorite[†] solution at (10 min.). Then washed for 4 hs in distilled water and air-dried for 48 hs. Other PDLLA membranes were sterilized with ethylene oxide gas.

2.2. Analysis of PDLLA membranes

The three types of membranes were initially analyzed for their transparency and, after hydration, for their malleability (using two small pincers), and the thickness of the pore walls, color tonality and presence of crystals.

2.3. Estimated diameter size and area of the membrane pores

Two perpendicular axes, in 100 pores of the PDLLA membranes were measured, by light microscopy^{**} as described by Mello & Vidal 1980.¹⁷⁻¹⁸ The measurements axes were made using an eyepiece with a reticule[§] in the form of a ruler^{††} and a micrometric 1/100 mm slide^{‡‡}. The diameter of the pores was calculated by the arithmetic average of the extension of the two principal axes.

[§] Super Bonder, Loctite Brasil Ltda, Itapevi, SP, Brazil.

^{**} Carl Zeiss, Oberkochen/Württ, Germany.

^{††} Olympus, Tokyo, Japan.

^{‡‡} Olympus, micrometer lens, ob-m / 1/100, Tokyo, Japan.

2.4. Cell culture

Chinese hamster lung fibroblasts V79^{§§} were used at passages varying from 30 to 50. The cells were grown in culture bottles with DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) containing 10% of fetal bovine serum IU penicillin / mL and 100 µg of streptomycin sulfate / mL. All the materials used in the cell cultures were acquired from the same manufacturer^{***}.

The cells were seeded at an initial density of 30,000 cells/ml and were maintained in an atmosphere of 5% CO₂ at 37° C. A V79 cells cultured on glass slides were used as control. Samples were removed after of 2, 4, 8 and 16 days of the culture with six groups were set up as follows: 1) Five PDLLA membranes sterilized with ethylene oxide, 2) Five control glass slides sterilized with ethylene oxide, 3) Five PDLLA membranes sterilized with sodium hypochlorite (NaClO), 4) Five PLLA membranes sterilized with NaClO, 5) Five PDLLAcoGL sterilized with NaClO, and 6) Five control glass slides sterilized with NaClO. All of the experiments were done duplicate. After the culture times, the membranes were fixed without washing in order to avoid the removal of dead cells that had not adhered to the material. The cells were fixed in ethanol – acetic acid (3:1 v/v) for 90 s, washed in 70% alcohol and air-dried for 24 h. After staining with toluidine blue (AT) for 15 min, the cells were washed quickly in distilled water and washed quickly and air-dried for 24 h.

The control slides and PLLA membranes with V79 cells were diaphanized in xylol (9) for 1 min while the PDLLA and PDLLAcoGL membranes were treated with butyl alcohol for 30 min. All of the slides were mounted in synthetic balsam ($\eta = 1.51$), and examined by light microscopy.

^{§§} Provided by Prof. Rogério Meneghini, Institute of Chemistry, USP, Brazil.

^{***} Merck, Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2.5. Statistical analysis

V79 fibroblasts that proliferated on PLLA, PDLLA and PDLLAcoGL membranes sterilized with sodium hypochlorite were used for statistical analysis. Fifty membranes areas in each group were sampled, giving a total totaling of 500 different regions for each type of PLA and time interval. Two hundred and fifty samples were counted on the smooth surface and 250 on the porous surface after 2, 4, 8 and 16 day (a total of 2,000 samples per material).

Each sample was analyzed by counting the fibroblasts with a light microscope using a magnification x 100. An ocular lens (integrationsplatte II – 110/25) with a reticule marked in the form of a square was used. The cells that were located on the sides of this square were counted and the sums were analyzed statistically. The total area of the 50 areas sampled for each material was 8.0 mm². The data were analyzed by ANOVA followed by the Tukey test. A value of $p < 0,05$ indicated significance.

3. Results

3.1. Analysis of PDLLA membranes and measurement of PDLLA membrane pores

Table 1 summaries the characteristics of the three PLA derivatives (Fig. 1). The average diameter of the PDLLA, PLLA, PDLLAcoGL pores was 454, 462, 448 μm , respectively.

3.2. Effect of sterilization on cultured V79 cells.

There was no bacterial or fungal contamination in PDLLA membranes sterilized by ethylene oxide or NaClO. The few cells that grew on membranes exposed to ethylene oxide were reduced in number and size, and their nuclei appeared condensed all through out the experiment (Fig. 2a,b). Proliferating star-shaped fibroblasts with large nuclei, various nucleoli and a

basophilic cytoplasm were seen on the smooth surface and in the pores at all time intervals (Fig. 3b, f, 4b, f). There was no difference between the number and morphology of control cells grown on glass slides sterilized with ethylene oxide (data not shown) or NaClO (Fig. 3a, e, and 4a, e).

3.3. V79 cells cultured of PDLLA, PLLA, PDLLAcoGL versus compared to control cells.

V79 cells grown on slides (control) were confluent after 2 days in culture (Fig. 3a). After 4 days, overlapping were star shaped fibroblasts becoming more polygonal, a loss of nucleoli, chromatin condensation to form granules and a reduction basophilic cytoplasm (Fig. 3e). After 8 days, the cells disattached from the slides, and there was a decrease in nuclear size together with chromatin condensation and the presence of nuclear bodies (Fig. 4a,e). Star-shaped fibroblasts were seen on PDLLA membranes at all intervals (Fig. 3b,f, 4b,f). These cells had large nuclei, various nucleoli and a basophilic cytoplasm after up to 16 days in culture (Fig. 4f). The cells that grown on PLLA membranes were small in number and size, with condensed nuclei of varying, and very few fibroblasts presented evident nucleoli (Fig. 3c,g, 4c,g). Fibroblasts grown on PDLLAcoGL were generally small spherical and isolated, with small nuclei, but eventually assumed an appearance grow on PDLLA; i.e., they had large nuclei, various nucleoli and a basophilic cytoplasm (Fig. 3d,h, 4d,h).

3.4. Statistical analysis

More cells grew on PDLLA membranes and fewer on PLLA. ANOVA revealed significant differences among the materials as a function of culture time ($p=0.0465$), and also significant differences between smooth and porous surfaces ($p=0.0309$). The interaction between material and surfaces and the relationships between surface type and time were not significant (Fig. 6). The Tukey test revealed a significantly greater total number of cells of in PDLLA (292.11) membranes than in the others, and also in PDLLAcoGL (192.00) compared to PLLA

(23.49). The cellular proliferation and the number of cells were greater on porous surfaces (204.68) than on smooth surfaces (133.72), with minimum significant difference of 95.022. (Fig.5 – table 1).

4. Discussion

The adding salt technique was effective in producing pores in the PDLLA films, and allowed the fibroblast to cover the internal surface of the pores or cells. The diameter of the sodium citrate granules varied from 350 to 420 μm and produced cells with an average diameter of 454 μm . This finding agree with the observation that dehydration and hydration during membrane formation produced pores larger than the salt granule that molded it. The biomaterials used in implants have a pore diameter that varies from 350 to 450 μm to allow the invasion of vessels diving tissue repair and formation. In cultured osteoblasts, there is no significant difference in cellular proliferation and mineralized tissue formation when the diameter of the pores is 150 - 710 μm . The method used here enabled us to create a film of biomaterial with morphological characteristics suitable for use in implants *in vivo*.

All biomaterials that enter into contact with blood and living tissue must be sterilized. Commonly used methods include: dry heat, humid heat, radiation and ethylene oxide gas. These methods to sterilization can alter the physical characteristics of polymers. Dry heat, humid heat and radiation interfere with the mechanical properties of PLAs by significantly reducing their molecular mass and altering their degradation; humid heat entirely dissolves PDLLA films even before sterilization is finished. Ethylene oxide reduce the molecular weight and increases the crystallinity of PLLA in the form of blocks, thus decreasing degradation time. Ethylene oxide is used when the material is sensitive to heat and humidity since PDLLA is a thermoplastic that can

onto degrade by hydrolysis. As shown here few V79 cells grew on films sterilized with ethylene oxide, which suggests that residues of gas may possibly have been incorporated into in the membranes. Sterilization with sodium hypochlorite was efficient and better than ethylene oxide since no contamination was found and the fibroblasts grew rapidly.

The number of cells on the smooth and porous surfaces of the three polymers was most similar during the first two days in culture than at later times. Cellular adhesion to the substratum began immediately after the cells were plated, and may have been easier on smooth surfaces than on porous ones because of the greater probability of the fibroblasts adhering to these surfaces instead of to the spaces formed by sodium citrate. At later time intervals, the number of cells was greater on the porous surfaces than on the smooth surfaces because of the larger area provided by the latter.

The number of fibroblasts in the regions of PDLLA was maintained throughout the experiment (16 days) while in the other polymers the number diminished abruptly. Cells adhering to a surface that is degraded can lose their attachment because of polymer dissolution. In addition, a rapid degradation could inhibit direct contact between cells and delay the process of cellular death mediated by lateral contact (confluence). On the other hand, the lack of cell contact with the substratum could prevent multiplication of the cells anchoring dependent (growth) and lead to apoptosis. Cell division was observed in the PLAs during the 16 days of cultivation.

The growth the V79 cells on the glass slides (control) was characterized by cellular confluence after 2 days. By 4 days there was confluency of cells and a shift from a star-shape to a more polygonal form, with no nucleoli, chromatin condensation and reduced basophilic cytoplasm. After 8 days, the cells began to lose their adhesion to the slides. This was

accompanied by a decrease in nuclear size and figures of chromatin condensation and nuclear bodies that suggested cell death. In cultures on PDLLA films, star-shaped fibroblasts with large nuclei, various nucleoli and a basophilic cytoplasm were found up to 16 days in culture. Cells that grew on the PLLA films were fewer in number and smaller size; condensed nuclei of different sizes and nucleoli were uncommon. Fibroblasts were initially seen in PDLLAcoGL mostly as small, spherical, isolated cells with small nuclei, but later because similar in appearance to cells grown on PDLLA. These findings suggest that PLAs delay cell death.

The greater number of cells found on PDLLA membranes indicated that this substratum caused greater cell proliferation than PDLLAcoGL or PLLA, even after 8 weeks of cultivation when an approximately equal number of cells was growing on PDLLA and PDLLAcoGL. PDLLAcoGL was more efficient in stimulating cellular proliferation than PLLA. These findings indicate that membrane or porous block implants of PDLLA or the less suitable PDLLAcoGL may be useful clinically.

PDLLA has been approved for use in humans, and PDLLA membranes should find clinical use as tissue separators or as a guide and scaffold for regenerating tendons, bones and periodontal ligaments.^{3,7,20,21} PDLLA block is already utilized or sponges used as a bone graft with the addition of hydroxyapatite or an appropriate bone protein matrix, this polymer could have ideal characteristics for specific situations such as critical bone defects, extensive fractures or large periodontal bone defects.

Acknowledgements

The authors thank Nora Marcela Haun, Department of Biochemistry, UNICAMP, for providing the laboratory for culturing the fibroblasts and João B. Fabrin Neto for help with cell culturing, and the Brazilian National Research Council (CNPq) for its in part financial support.

5. References

1. di Tizio V, Ferguson GW, Mittelman MW, Khoury AE, Bruce AW, Di Cosmo F. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials* 1998;19:1877-1884.
2. Ravi Kumar, M. N. V.; Bakowsky, U.; Lehr; C. M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers, *Biomaterials* 2004;25:1771-1777.
3. Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol* 1998;69:1044-1049.
4. Wake MC, Gerecht PD, Lu L, Mikos A. Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived. *Biomaterials* 1998;19:1255-1268.
5. Mundy G, Garret R, Harris S, et al. Simulation of bone formation in vitro and rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
6. Walter E, Moelling K, Pavlovic J, Merkle HP. Microencapsulation of DNA using poly(DL-Lactide-co-glycolide):stability issues and release characteristics. *J Controlled Release* 1999;61:361-374.
7. Pereira SLS, Sallum AW, Casati MZ, Caffesse RG, Weng D, Nociti FHJr., Sallum EA. Comparison of Bioabsorbable and Non-Resorbable Membranes in the Treatment of Dehiscence-Type Defects. A Histomorphometric Study in Dogs. *J Periodontol* 2000; 1:1306-1314.
8. Dewez JL, Lhoest JB, Detrait E, et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. *Biomaterials* 1998;19:1441-1445.

9. Weir, NA; Buchanan, FJ; Orr, JF; Farrar, DF; Boyd, A. Processing, annealing and sterilization of polylactide, *Biomaterials* 2003, In Press, Corrected Proof, Available online 10 December.
10. Ying Yip, EY; Wang. J ; Wang, C-H. Sustained release system for highly water-soluble radiosensitizer drug etanidazole: irradiation and degradation studies, *Biomaterials* 2003;24:1977-1987.
11. Zilis T, Mark DE, Cerbas EL, Hollinger JO. Scanning electron microscopic study of cell attachment to biodegradable polymer implants. *J Oral Implantol* 1989;15:160-167.
12. van Scheldregt A, Raderr AM, de Groot K, van Blitlerswijk CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides Part I: proliferation of different cell types. *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:365-370.
13. Agrawal CM, Athanasiou KA, Heckman JD. Poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) for tissue-cell-seeded construction. *Mat Sci Forum* 1997;250:115-128.
14. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 1998;19:1405-1412.
15. Tunc DC, Jadhav B. Development of absorbable. Ultra-high-strength polylactides. *Polym Mater Sci Eng* 1988;59:383-387.
16. Leensalag, JW, Pennings, AJ, BOS, RRM, ROZEMA, FR, BOERING, J Resorbable materials of poly(L-lactide). VI. Plates and screws for internal fracture fixation, *Biomaterials* 1987,8:70-73.
17. Mello MLS. Noções fundamentais de cariometria. In: Mello MLS, Vidal BC, editors. *Práticas de Biologia celular*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1980. p. 34-40.
18. American Society of Metals - American Society of Metals International Handbook Committee. Properties and selection iron, steels, and high-performance alloys. Vol. 1, Ohio: ASM International Press; 1990, p.1063.
19. Maria SS, Vidal BC, Mello ML. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. *Genet Mol Biol* 2000;23:109-112.

20. Ambrosio L, Peluso G, Davis PA. Biomaterials and their biocompatibilities. In: Wise DL, Altobelli DE, Yaszemski MJ, Gresser JD. eds. Human biomaterials applications, New Jersey: Hummana Press Inc.; 1996:423p.
21. Tatakis DN, Trombelli L. Gingival Recession Treatment: Guided Tissue Regeneration With Bioabsorbable Membrane Versus Connective Tissue Graft. J Periodontol 2000;71:299-307.

Notes

(*) Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas

(UNICAMP), P.O. box 6109, zip code 13081-970, Campinas, SP, Brazil. Telephone: + 55 19 3788-6126, Fax: + 55 19 32414852. E-mail: argentoma@yahoo.com .

(†) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

(‡) Synth, Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brazil.

(§) Super Bonder, Loctite Brasil Ltda, Itapevi, SP, Brazil. Sigma,

(**) Carl Zeiss, Oberkochen/Württ, Germany.

(††) Olympus, Tokyo, Japan.

(‡‡) Olympus, micrometer lens, ob-m / 1/100, Tokyo, Japan.

(§§) Provided by Prof. Rogério Meneghini, Institute of Chemistry, USP, Brazil

(***) Merck, Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

FIGURE CAPTION

Figure 1. Table 1: Transparency, malleability, thickness of pore walls, tonality and presence of spherules, in polylactic acids.

Figure 2. Photomicrography of fibroblasts in PDLLA membranes sterilized by ethylene oxide showing the small number of condensed cells after 2 days (2A), and after 16 days (2B). Bars = 20 μm .

Figure 3. Photomicrography showing V79 fibroblasts in culture after 2 days (A,B,C,D), and after 4 days (E,F,G,H). 3A) control; 3B) PDLLA; 3C) PLLA; 3D) PDLLAcoGL; 3E) control; 3F) PDLLA; 3G) PLLA; 3H) PDLLAcoGL. Bars = 20 μm .

Figure 4. Photomicrographs showing V79 fibroblasts in culture after 8 days (A,B,C,D), and after 16 days (E,F,G,H).. 4A) control; 4B) PDLLA; 4C) PLLA; 4D) PDLLAcoGL; 4E) control; 4F) PDLLA; 4H) PDLLAcoGL. 323 X amplification. Bars = 20 μm .

Figure 5. Graphics showing the average number of cells (X axis) versus the days in culture (Y axis) on smooth surfaces (5-A) and porous surfaces (5-B).

Figure 1.

Table 1: Transparency, malleability, thickness of pore walls, tonality and presence of spherules, in polylactic acids.

Analyses	Polymers	PLLA	PDLLAcoGL	PDLLA
Transparency before hydration		+	-	+
Transparency after hydration		+	-	intermediate
Malleability		+ malleable	- malleable, breakable	+ malleable
Thickness of pore walls		+ thin	+ thick	+ thin
Grey tonality		lighter	darker	lighter
Spherules		fewer number	greater number	intermediate

(+) present, (-) absent

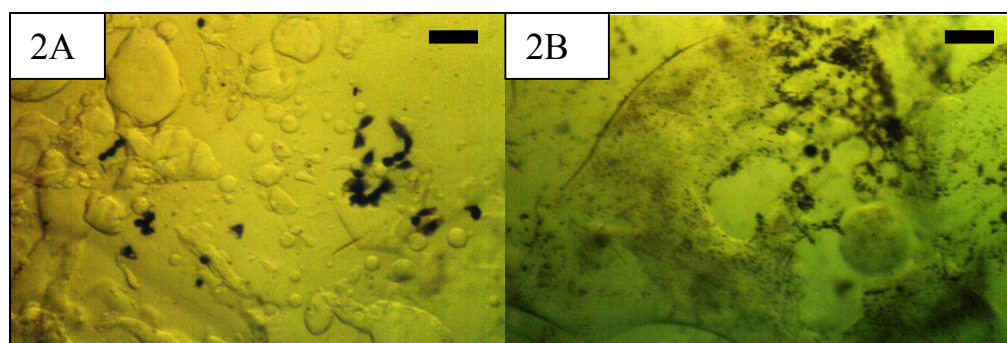
Figure 2.

Figure 3.

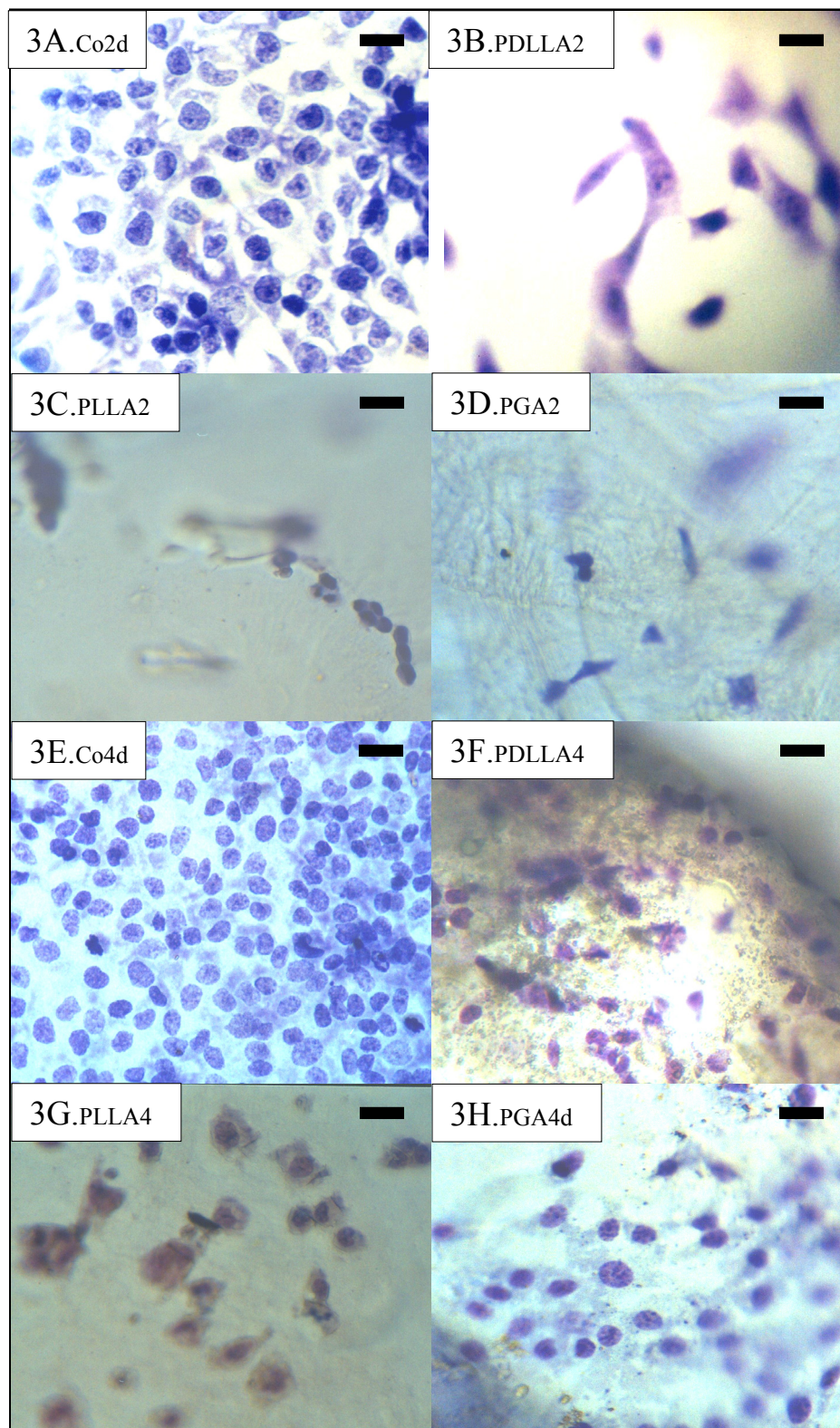


Figure 4.

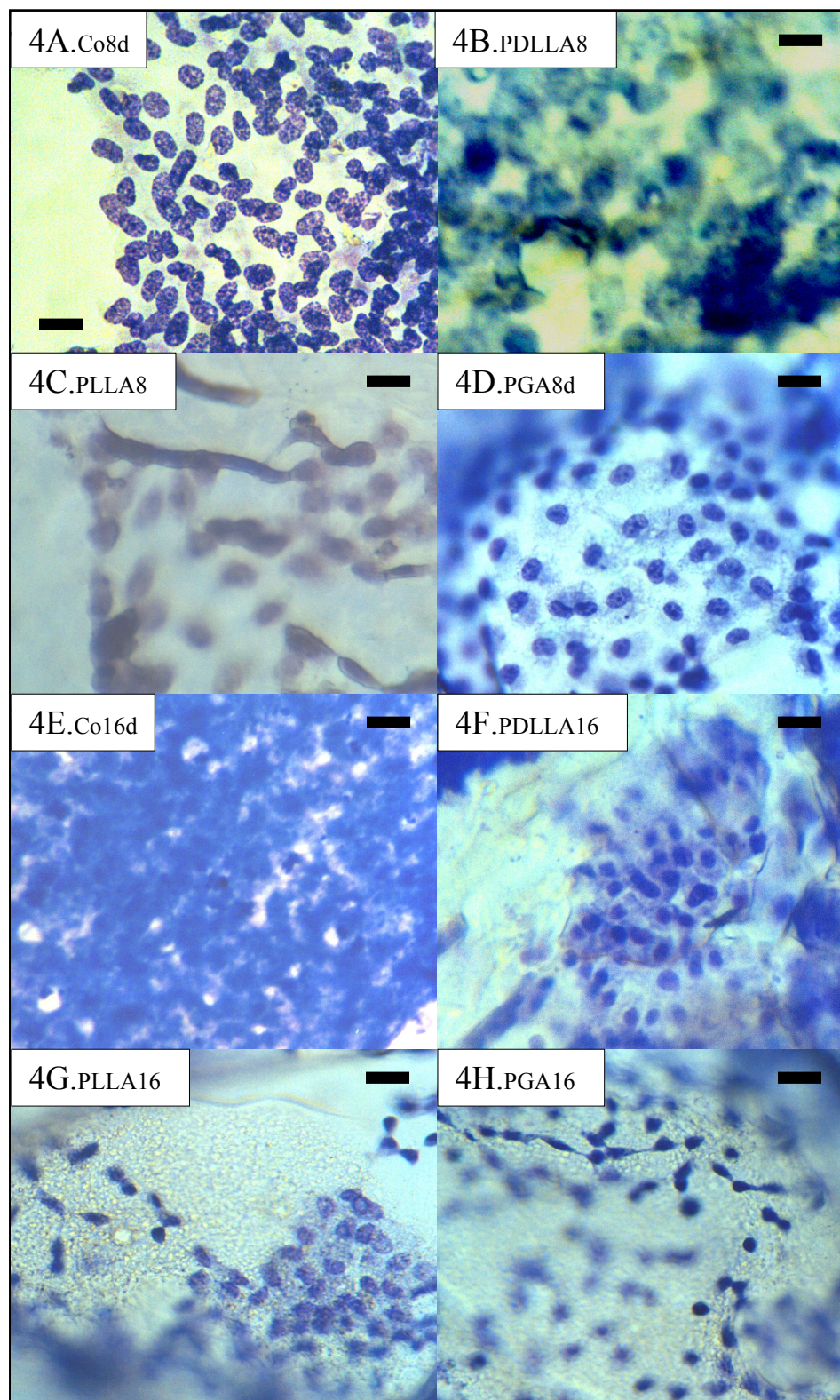
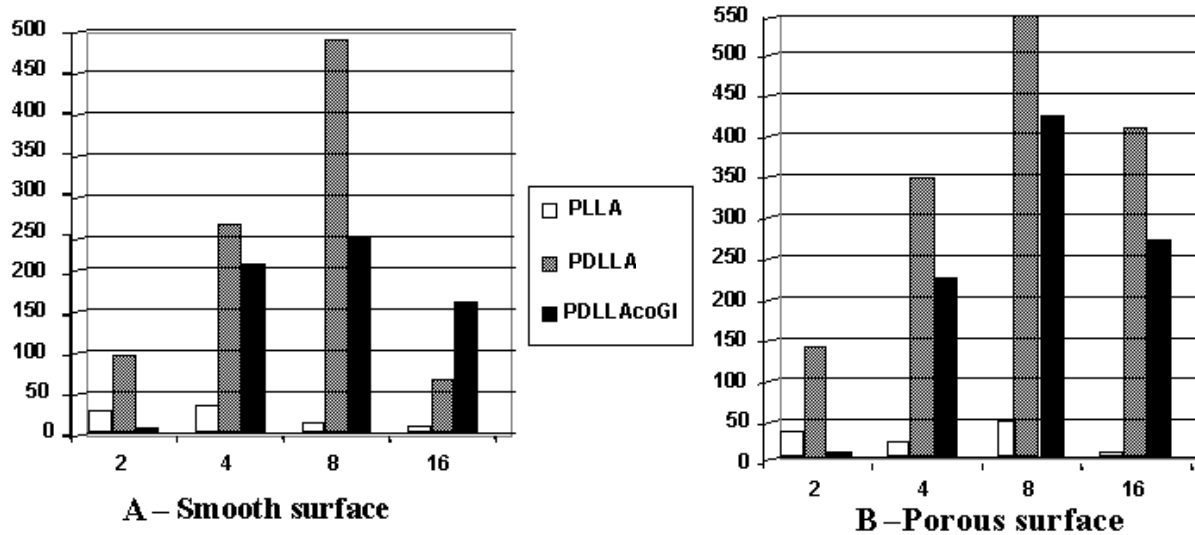


Figure 5. Graphic.



**4.2. “Analysis of Biological Response to Complex Polymer Grafts
of Poly(DL-lactic acid) Associated or Not with
Hydroxyapatite and Bone Protein Matrix in Rat
Mandibles.”**

Analysis of Biological Response to Complex Polymer Grafts of

Poly(DL-lactic acid) Associated or Not with Hydroxyapatite and Bone Protein Matrix in Rat Mandibles.

Marco A. Argento¹; Benedito de C. Vidal¹; Angelo L., Cortelazzo¹

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Short title: Fibroblast Culture in Polylactic Acid

Correspondence: Marco Antonio Argento, Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), POBOX 6109, ZIP CODE 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

Telephone: + 55 19 37886126, Fax: + 55 19 32414852.

E-mail: argentoma@yahoo.com

Key Words: grafts, polylactic acid, hydroxyapatite, bone matrix protein, bone repair.

Abstract

Background: The search for better bone graft materials will never cease because it is possible to create new materials with various physical, chemical and biological characteristics, thus inducing different kinds of tissue repair. The main objective of this work was to analyze the “in vivo” biological response during tissue repair using grafts of poly(DL-lactic acid) (PDLA) and PDLA combined with bovine hydroxyapatite (PDLA-HA) and PDLA associated with bone protein matrix (PDLA-BPM). Other objectives included the formation of graft materials using PDLA, PDLA-HA and

PDLLA-BPM to obtain materials with have specific porosities, and to verify the existence of the osteoinduction process of PDLLA-BPM in soft tissues.

Methods: PDLLA, PDLLA-HA, PDLLA-BPM polymers complexes were prepared and pore measurements were made using an optical microscope, the grafting materials were then implanted in mandibles of 56 rats. Surgery was also used to insert grafts of PDLLA-BPM in the soft tissue of the backs of another group of 16 rats. The animals were sacrificed after 10, 20, 30 and 60 days. The mandibles and soft tissue were then subjected to laboratory processing, and analyses were made using both optical and polarized microscopes.

Results: The average pore diameters of the PDLLA, PDLLA-HA and PDLLA-BPM were 314, 433, and 665 μm , respectively. None grafts reveled much of a reaction to foreign body, although a slight inflammatory reaction to PDLLA was observed, and an even smaller one to PDLLA-HA and PDLLA-BPM. Intra membranous ossification was focused in PDLLA-BPM grafts in mandible and also in the soft tissue of the back. Rapid fibroblastic cell invasion of the PDLLA-HA and PDLLA-BPM are observed.

Conclusion: The use of programmed solvent evaporation technique for the preparation of PDLLA-containing polymer complexes produces biocompatible porous polymer which seem to be appropriate bone grafts in rats mandibles. PDLLA-BPM material is both osteoconductive and osteoinductive, whereas the surface of the PDLLA-HA and the PDLLA-BPM seem to be recognized by repairing cells.

INTRODUCTION

Synthetic and natural polymers for use in bone grafts have been the topic of extensive research designed to promote and improve the process of bone repair/ these

include polylactic acid (PLA), hydroxyapatite (HA) and demineralized bone. In dentistry, absorbable PLA are utilized in periodontology, buccal- maxillo-facial surgery and implant dentistry (Cury, et al., 2003). Various isomers of PLA have been used, including Poly(D-lactic acid), poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic acid) (PDLLA); each of these has its own morphological characteristics, degradation time and molecular weight, and induces specific cellular responses (Middleton & Tripton, 1998). However, many authors classify them together, which makes it difficult to interpret the results reported in the literature.

Variability in the physical-chemical characteristics of PLAs makes these materials useful for many different of applications because their degradation properties, molecular mass, crystallinity, resistance to tension, and plasticity will influence “in vitro” and “in vivo” cellular responses. Some of the different characteristics of PLAs arise from preparation of the polymer (Dewez et al., 1998); and the physical and chemical methods of sterilization used (Gilding & Reddi, 1979; Rozema et al., 1991), and which is developed the porosity (Zilis et al., 1989; Van Scheldregt et al., 1992).

HA has been extensively studied as implants to stimulate bone repair in dentistry; such material can be used to fill periodontal and perio-implantal bone defects, and to fill bone cavities, whether arising from surgical, pathological or natural causes (Holmes & Hagler, 1988; AAP, 1993). Different shapes and sizes of HA granules do not affect bone formation, as such repairing process (Drobeck et al, 1984; Lehtinen et al., 1990 Klinge et al., 1992). However, crystal size seems to have an influence on bone formation in repairing human periodontal bone defects, as well as in cell cultures (Frank et al., 1991; Teti et al., 1991). The pore size of the HA is related to the amount of new bone which can be formed in the interior of that pore (Carranza et al., 1987). Bovine HA produced in the Cell Biology

Laboratory at UNICAMP has proved to be biocompatible and absorbs slowly, it presents a high degree of purity with a degree of crystallinity very similar to that of the mineral matrix of human bone (Teixeira et al., 2000).

Types of bone are utilized in grafts and implants, including: autotransplants; allotransplants, which can be frozen, dry, mineralized (DFBA) or demineralized (DFDBA); and xenotransplants, which involve transplants from a different species, such cows (AAP, 2001). There is a certain biochemical similarity between human and bovine osteoinductive proteins, as they present a similar number of amino-acids and similar molecular weights; moreover, induce a similar degree of osteoinduction when insert in the muscular tissue of rats. Furthermore, dry demineralized bovine bone is osteoconductive and osteoinductive, and presents no risk for the transmission of diseases (Bessho et al., 1991). The objective of this paper was to analyze the “in vivo” biological response to grafts of PDLA, PDLA combined with bovine HA (PDLA-HA) and PDLA with bone protein matrix (PDLA-BPM) during tissue repair. Other objectives included the obtention of porous granules of PDLA, PDLA-HA, PDLA-BPM, and the investigation of PDLA-BPM-induced the osteoinductive process.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Graft Materials

PDLA graft material (1) was obtained from a solution of 12.5% PDLA in dichloromethane. Before the evaporation of the solvent, the solution was stirred with a thin spatula at a rate gradually decreasing from 240 – 6 r.p.m.; the solution was cooked in a

freezer then heated using a Bunsen burner. After evaporation, the resulting material was cut and the granules passed through two sieves to obtain those ranging from 350 - 420 μm ; it was then sterilized in 1.0% sodium hypochlorite for 10 minutes and washed in sterile distilled water for 1 hour.

Bovine HA was obtained as previously described by Teixeira et al. (2000). This material was ground and passed through two sieves to obtain granules from 350 to 420 μm . These were then sterilized in a drying oven for 2 hours at 170°C.

Bovine BMP acquired and received the same chemical treatment as the HA. The BMP was broken into 1 to 2.0 cm pieces and processed as described by Urist (1965). It was dried, ground and separated 350- to 420- μm granules, which were then sterilized by Gamma radiation.

Graft materials of PDLLA-HA and PDLLA-BPM were prepared mixing a 12.5% (weight/volume) solution of PDLLA* in dichloromethane with HA (or BPM) $\frac{1}{2}$ (weight/volume) in a Petri dish. The mixture was initially stirred at 240 r.p.m. that decreased progressively to 6 r.p.m. This was followed by cooling in a freezer and heating on a Bunsen burner until the mixture reached the consistency of a candy ball. The material then ground in granules up to 500 μm in diameter were selected, sterilized in 1.0% sodium hypochlorite (NaClO) for 10 min., washed in sterile distilled water for 4 h., oven-dried at room temperature for 48 h. and packaged in sterile flasks.

Macroscopic Analysis

The PDLLA, PDLLA-HA, and PDLLA-BPM complexes were analyzed manually

* Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

using two small pincers for relative hardness.

Measurement of pore Diameter

One hundred pores of the PDLLA, PDLLA-HA and PDLLA-BPM were measured using a light microscope (2) with a objective equipped with a micrometer reticule (3) and a micrometric slide (4). The estimated average diameter of the pores was calculated by the arithmetic average of the main axes of pore extension (Mello & Vidal, 1980; ASM., 1990).

Surgery

The present work was conducted according to the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), of the Biology Institute of State University of Campinas, no. 337-3.

Fifty-six 6-month-old Wistar rats were acquired from the UNICAMP Bioterium (CEMIB) for the experiment. The rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (40-87 mg/kg) and xylazine (5-13mg/kg). After tricotomy, a 1.5-cm rectilinear incision was made along on the lower edge of the left mandible. The muscles were separated, exposing the buccal alveolar region and a 1 x 4x 2 mm cavity was prepared in the molar region, 1 mm from the alveolar bone crest using a slow rotating cylindrical steel drill. The rats were separated in 4 groups, each submitted to the insertion of one of the following compounds: PDLLA, PDLLA-HA, PDLLA-BPM, and blood (control). Muscles and skin were sutured and a solution of 0.12% Chlorexidine was applied to the cut. Four rats from each experimental group plus two control were sacrificed after 10, 20, 30 and 60 days.

Once animals were sacrificed, the mandibles were removed and fixed in a solution of 2.0% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) for 48 hours at 8° C in a vacuum. The bone was decalcified in a solution of 10% formic acid and 2.0% paraformaldehyde in phosphate buffer for 9 to 11 days at 37° C. The material was then embedded in paraffin, cut into 6 µm sections, stained with Toluidine Blue (TB) and Hematoxylin Eosin (HE). The reaction tissue and cells was analyzed using both light and polarized microscopes.

Sixteen additional rats were obtained and submitted to the insertion of PDLLA-BPM in the soft tissue of their backs to investigate possible osteoinduction process. The surgery consisted of trichotomy, incision along of the back, separation of the muscles and subcutaneous insertion of the material. Groups with four rats were sacrificed after 10, 20, 30 and 60 days. Inserted material was removed, processed and stained with HE and Toluidine Blue.

RESULTS

Results – Macroscopic Analysis

The macroscopic analysis of the dehydrated material confirmed that PDLLA-HA has greater resistance to compression, followed by PDLLA and PDLLA-BPM. Although when hydrated, all of them were malleable, due to the hydratation of the PDLLA. The PDLLA-HA was more resistant to compression than the others.

Results – Measurement of the Diameter of Pores

The average pore diameter was 314, 433, and 665 μm for the PDLLA, PDLLA-HA, PDLLA-BPM, respectively (Fig. 1).

Results – Microscopic Analysis

PDLLA Group

After 10 days, it could be seen only loose connective tissue growth around the PDLLA granules negative images. This tissue consisted of fibroblast cells, mononuclear cells and a few gigantic multinuclear cells, especially on the surface close to the cavity edge of the cavity. A slight foreign body reaction delaying bone repair was observed; and no bone formation was visible, even by the end the experiment (Fig. 2).

PDLLA-HA Group

After 10 and 20 days, the soft tissue surrounding the PDLLA-HA granules consisted of cells resembling fibroblasts and few gigantic multinuclear cells. These latter cells were invading the implant and surrounding the HA granules (Fig. 3). With polarized light, the birefringence of the crystals was seen to be similar to that of natural bone (Fig. 4, 6). The PDLLA itself was visible as a brown granular layer surrounded by fibroblasts-like cells and few multinuclear cells (Fig.6). The material at the bottom of cavity was seen to be in direct contact with bony tissue with the active cells located further from the implant being darker (less birefringent) than those to it (Fig. 6). After 20, 30 and 60 days, there was a gradual replacement of soft tissue by immature bony tissue, although the HA had not been absorbed (Fig. 5, 6).

PDLLA-BMP Group

After 10 and 20 days, the cavity continued to have multiple empty spaces surrounded by a brownish-gray layer, which was also surrounded by a basophilic material. The empty spaces were probably BPM particles (Fig. 7). At the bottom of the cavity, PDLLA-BMP particles were surrounded by neutrophils, fibroblasts and multinuclear cells. After 20, 30 and 60 days, BMP particles were observed in the center of the cavity surrounded by immature bony tissue; these results were confirmed by the birefringence quantity, which suggested the presence an intra-membranous ossification caused by osteoinduction (Figs. 8, 9). After 60 days, the cavity had not been totally repaired, nor had the grafting been totally absorbed.

CONTROL Group

The bone cavities were not totally repaired during the 60-day period. The bone cortical was formed at 2/3 amount of cavity (Fig.10).

Results – Subcutaneous Implant

In the rats having received subcutaneous PDLLA-BMP implants, the presence of spikes immature bony tissue surrounded by large osteoblasts was observed after 60 days, confirming the osteoinduction process (Fig. 11).

DISCUSSION

This paper has investigated the cellular and extra-cellular repair response of the bone matrix upon the insertion of three different biomaterials.

Rats and mice are ideal animals for bone repair studies. Although the number of animals used in this study was limited, the results varied little animal to animal and from group to group in terms of bone formation in the cavity in general. Ingestion of food by the

rats diminished for the first 15 days after surgery, since surgical made eating difficult, and the animals began to be lose weight. The diminished ingestion of proteins, carbohydrates, ascorbic acid and zinc, may thus had a detriment effect on the initial repair process, as their absence would cause a decrease in collagen synthesis and others bone growth factors (Cotran et al, 1997; Hyada et al., 1998; Faria et al., 2001).

Ethylene oxide, used for sterilization, may have influence of the osteogenesis and the absorbtion of the inserted material (Kudryk et al, 1992). Nevertheless, it has been already demonstrated that correct sterilization, involving appropriate time temperature, does not eliminate the osteoinduction capacity of the demineralized bone matrix (Aspenberg & Lindquist, 1998; Zhang et al., 1997; A.A.P., 2001). The age of the donor and the recipient may also affect osteoinductive capacity of grafts (Schwartz et al., 1998).

The pore size of bone graft materials influence in the differentiation and proliferation of bone cells. Bone have blood vessels within diameters ranging from 150 to 600 μm (Sicher & Du Brul, 1992). The results obtained here have demonstrated our biomaterials have pore diameters varying between 314 to 665 μm , provide excellent bone grafts, since it allows the invasion of blood vessels for repair and bone tissue formation. In laboratory cultures of osteoblasts, there is no significant difference in cellular proliferation and the formation of mineralized tissue as long as the pore diameter is maintained between 150 to 710 μm (Ishaug-Riley et al., 1998).

The size of demineralized bone DFDBA particles also influences the repair process, since particles smaller than 1 μm can induce the action of macrophages, thus resulting little or no bone formation, and particles larger than 500 μm also induce a reduction in bone formation (A.A.P., 2001). The optimal pore size according to the literature, varies from 350

to 710 μm (Syftestad & Urist, 1979; Mellonig & Levy, 1984; Sampath & Reddi, 1984; A.A.P., 2001). Hence the particles 350 to 420 μm , adopted here well within the ideal size for tissue grafts.

The region of the mandibular corpus, seemed to receive too little blood irrigation for the size of cavities, which may have contributed to the delay in bone formation in relation to that in other areas of the body (Urist, 1965; Mellonig & Levy, 1984; Argento, 1998; Ishaug-Riley et al, 1998). There are fewer blood vessels feeding the mandibular corpus of rats than feeding the tibia, fibula or ulna (Sicher & Du Brul, 1992; Nunamaker, 1998). The cortex is thicker and less well irrigated than that of the calvaria or the mandibular branch (Argento, 1998; Einhorn, 1998). The blood irrigating this area normally comes from the facial artery; the medullar canals in the mandible; the mandibular artery via mandibular canal; cervical arteries in the neck; arteries from periosteum; and buccal artery. The facial, cervical, buccal and periosteal arteries were severed by the surgical incision, and the tissue mucoperiosteal was dislocated. Moreover, the mandibular artery and other arterioles of the periosteum were cut during the hollowry onto of the cavity. As the repair process began, blood irrigation may initiate with the angiogenesis of the periosteum arterioles, after healing of soft parts is followed anastomoses of the facial, buccal and cervical arteries; the last heal is the mandibular artery, which only stants regeneration when the yong bony tissue has been remodeled, which can take years took longer in this study than in most of those reported in the literature(Sicher & Du Brul, 1992). The time requered for these events in cellular and tissue repair (Hayda et al., 1998; Argento, 1998). Periodontal practitioners ought to pay close attention to local blood irrigation when cutting to the placement of bone grafts.

Bone cells invading the area of the graft come from four locations: the periosteum, the bone cortex, the bone marrow and soft tissue. Osteogenetic cells involved in bone repair are endothelial cells, periosteum, endosteum, bone line cells, and from micro-vessels of the medullar (Hayda et al., 1998).

Results of microscopic analysis showed that after 10 days, cells had penetrated all of the graft materials and also adhered to their outside surface, which suggests that fibroblastic cells recognized, interacted with and adhered to the surface of PDLLA-HA and PDLLA-BPM. After 20 days, no formation of new bone was observed inside the PDLLA. Although some newly formed bony tissue was already found on the internal surfaces of the cavities and penetrating inside the PDLLA-HA. The formation of thin bone trabecula was observed in the connective tissue in direct contact with the PDLLA-BPM particles. PDLLA is biocompatible, although, it induces a slight foreign body reaction that delays bone growth; moreover to does not bring aby special benefits for use in bone grafts.

The choice of hydroxyapatite was based on the simulating of its composition with that of bone and the fact that purity favors cell recognition as confirmed here (Teixeira et al., 2000). According to Urist (1965) and Bessho et al. (1991) this methodology preserves bone morphogenetic proteins. Moreover, our results suggest that BPM contain enough of these proteins to induce new bone formation , even in soft tissue.

The hematoma resulting from the surgery contains a molecules capable of initiating a chain of critical cellular events for intercartilagenous ossification (Einhorn, 1998). Post surgical swelling of soft tissues was found in the mandible of the rats up to 15 days, but no endochondral ossification was seen in the cavities, although, intra-membranous ossification was clearly visible with the PDLLA-BPM materials.

The type of ossification which takes place after bone grafts is influenced by the embryological origin of the receptor bed (Wang et al., 1998). The results obtained here was intra-membranous ossification with the initial presence of fibroblast cells followed by the presence of osteoblasts and finally that of osteocytes; only later did calcification occur. Since growth of the mandibular corpus involves endochondral ossification, while that of the alveolus is intra-membranous, the question arises as to where one type stops and the other starts. Moreover, the embryological origin of bone used as a graft was not decisive in relation to the type of ossification that occurred since all of the bone used in the graft was of endochondral origin. The results reported in the literature are not always clear, since do not always identify the specific graft material nor the exact (Reddi & Huggins, 1972). Scott & Hightower (1991) reported that age, mobility of the graft and the blood supply may define the type of ossification that will occur. Histological studies have demonstrated that bone grafts inserted to correct periodontal defects heal by means of intra-membranous ossification, whatever the of embryological origin (Drobeck, 1984; Carranza et al., 1987; Kanabuda et al, 2001; Yukna et al., 2002). This data should be further investigated.

Spikes of recently formed bony tissue were found inside PDLLA-BMP material, although no bone formation was observed that would have served as scaffold or vehicle for the osteoblasts. The undifferentiated mesenchymal cells that invaded the granule were transformed differentiated cells (osteoblasts). Therefore; the PDLLA-BPM material was capable of inducing the transformed of non-osteogenic cells into osteogenic ones, which means it is capable of osteoinduction, a property, which is widely sought by dental clinics.

The PDLLA-HA material is slightly more resistant to compression compared than the other two materials tested. In the treatment of advanced periodontitis, when there is

great loss of insertion, i.e. the loss of the bone of alveolum, the dentist can opt for graft some sort of biomaterial. One option is PDLLA-HA, if its is carefully inserted in the right location and if all the required operative and post operative steps are followed, so that mobility is reduced, it should leave the patient more comfortable, as well as laying the basis for bone repair.

The mechanical force resulting from compression, twisting and elongation can induce biophysical signals that influence molecular-level, and also mechanical deformation and the presence of electrical fields can increase the concentration of the β transformer growth factor, which accelerate the bone repair process (Usui et al., 1989). This study suggest that mechanical micro-stimulation in locations where grafts are implanted or after fractures can have a favorable influence in bone regeneration.

The American Academy of Periodontology (1993) reported neither porous or non-porous HA is not absorbable. The kind of HA used in this experiment, however, does seem to be absorbable in long term (Teixeira et al., 2000), although in present study absorption could not been evaluated. However, a small number of giant multinuclear cells were observed surrounding the HA granules. Pinholt et al., 1992, observed that there was little absorption of HA from marine coral (non-absorbable), and Holmes & Hagler (1988) also reported that the absorption of marine HA was very slow, limited to 0.7% per year during 4 years.

PLAs are considered to be biocompatible according to Dewez et al. (1998), although, this has been questioned because some implants in live tissue have induced a massive foreign body inflammatory reaction, including the presence of macrophages and giant cells. Pistner et al. (1993) reported a long-term inflammatory reaction to a foreign

body in “Cara” rats with a malignant tumor. The reason for conflicting results may be the use of a single term for all the PLA isomers (PDLA, PLLA, PDLA and PDLLA) and the consequent failure to consider differences in molecular mass, crystallinity and degradation time for the specific isomer involved (Gilding & Reed, 1979). In a previous study, we significantly, we proved that PDLLA membranes induce greater “in vitro” fibroblastic proliferation than those PDLLA-co-Glycolic and PLLA membranes (unpublished data).

With the methodology utilized in this paper we have been able to produce graft materials with specific morphological characteristic suitable for testing in human beings. PDLLA can be used as a tissue separator, as well as a guide or scaffold for the regeneration of the periodontium, tendons, bones, and even organs. In the form of blocks PDLLA-BMP is able to induce bone formation in critical locations and can be used in extensive areas of fracture or large periodontal bone defects. The complex polymer PDLLA-HA may be indicated when an clinical dentist needs to repair large maxillofacial bone defects that require immediate, post-operative resistance to compression, as wells as for periodontal defects involving teeth mobility.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Mario Bianchi for help in the laboratory, and the Brazilian National Research Council (CNPq) for its in part financial support.

REFERENCES

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Department of Scientific, Clinical and Educational affairs. **Periodontal regeneration**: Research, Science and Therapy Committee. Chicago: AAP, 1993. 11p.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Department of Scientific, Clinical and

- Educational affairs. Tissue banking of allografts used in periodontal regeneration (Position paper): Research, Science and Therapy Committee, **J. Periodontol.**, v.72, p.834-838, 2001.
- AMERICAN SOCIETY OF METALS – AMERICAN SOCIETY OF METALS INTERNATIONAL HANDBOOK COMMITTEE. **Properties and selection iron, steels, polymer, and high-performance alloys.** V.1, 10a ed. ASM International Press. Ohio, 1990, 1063p.
- ARGENTO, M.A. **Análise histológica da reparação de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos preenchidos com hidroxiapatita**, tese mestrado, USP, 1998, 52p.
- ASPENBERG, P.; LINDQVIST, S.B. Ethane oxide and bone induction. Controversy remains. **Acta Orthop. Scand.**, v.69, p.173-176, 1998.
- BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Analysis of bone morphogenetic protein (BMP) derived from human and bovine bone matrix, **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.268, p. 226-234, 1991.
- CARRANZA, F.; KENNEY, E.; LEKOVIC, V.; TALAMANTE, E. ; VALENCIA, J.; DIMITRIJEVIC, B. Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxyapatite implant. **J. Periodontol.**, v.58, p.682-688, 1987.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.Y.; ROBBINS. **Robbins patologia estrutural e funcional**, 5.ed., Editora Guanabara Koogan. , Rio de Janeiro, R.J., 1997, 980 p.
- CURY, P.R., SALLUM, E.A.; NOCITI Jr.,F.H.; SALLUM, A.W.; JEFFCOAT, M.K. Long-term results of guided tissue regeneration therapy in the treatment of class II furcation defects: A randomized clinical trial. **J. Periodontol.**, v74, p.3-9, 2003.
- DEWEZ, J.L.; LHOEST, J.B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C.C.; VINCENT, L.M.; SCHNEIDER, Y.J.; BERTRANT, P.; ROUXHET, P.G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomat.**, v.19, p.1441-1445,1998.
- DROBECK, H.P.; SANFORD, S.R.; GUMAER, K.I.; SHERER, A.D.; SLIGTER, R.G. Histologic observation of soft tissue responses to implanted multifaceted particles and denses of hydroxyapatite. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.42, p.143-149, 1984.
- EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing, **Clin. Orthop. Rel. Res.**, n. 255Sup., p. S7-S21, 1998
- FARIA, J.L. Aparelho locomotor. Ossos articulações bolsas. In: FARIA, J.L. **Patologia Especial com aplicações clínicas.** 2.Ed. Editora Guanabara Koogan. , Rio de Janeiro, R.J., 2001, 893p.
- FRANK, R.M.; KLEWANSKY, P.; HEMMERLE, J.; TENNENBAUM, H. Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human

- periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p.669-680, 1991.
- GILDING, D; REED, A.M.; biodegradable polymer for use in surgery – polyglycolic / poly (lactic acid) homo and copolymers: **Polymer.**, v.20, p.1459-1464, 1979.
- HOLMES, R.E.; HAGLER, H.K. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstitution: A histometric study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.81, p.662-671, 1988.
- HYADA, R.A.; BRIGHTON, C.T.; ESTERHAI Jr, J.L. Phatophysiology of delayed healing, **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.355s, p.31S-40S, 1998.
- ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE-KRUGER, G.M.; YASZEMSKI, M.J. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomater.**, v.19, p. 1405-1412, 1998.
- KANABUDA, C.; OZDEMIR, O.; TOSUN, T.; ANIL, A.; OLGAC, V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **J. Periodontol.**, v.72, p.1436-1442, 2001.
- KLINGE, B.; ALBERIUS, P.; ASAKSSON, S.; JONSSON, J. Osseous reponses to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.241-249, 1992.
- KUDRYK, V.L.; SCHEIDT, M.J.; McQUADE, M.J. SUTHERLAND, D.E. Van DYKE, T.E.; HOLLINGER, J.O. Toxic effect of ethylene-oxide-sterilized freeze-dried bone allograft on human gingival fibroblasts. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, p.1477-1488, 1992.
- LEHTINEN, R; KUUSILEKTO, A.; NIKKANEN, U.M. Bone response to hydroxyapatite particles of different shapes in Rabbit Tibia. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.48, p.107-108, 1990.
- MELLO, M.L.S, VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia celular**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1980, 71p.
- MELLONIG, J.T.; & LEVY, R.A. The effects of different particle sizes of freeze-dried bone allograft on bone growth. **J. Dent., Res.**, v.63, p.222-228, 1984.
- MIDDLETON, J.C.; TRIPTON, J.A. Synthetic biodegradable polymers as medical devices, **Med. Plast. Bio. Mag.**, v.3, p.275-282,1998.
- NUNAMAKER, D.M. Experimental models of features repair, **Clin. Orthop. Rel. Res.**, n. 355Sup., p. S56-S65, 1998.
- PINHOLT, E.M.; RUYTER, I.E.; HAANAES, H.R.; BANG, G. Chemical, physical and histologic studies on four commercial apatites used for alveolar ridge augmentation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.859-867, 1992.
- PISTNER, H; BENDIX, D.R.; MÜHLING, J.; REUTHER, J.F. Poly(L-Lactide): A long-term

- degradation study in vivo. Part I biological results, **Biomat.**, v.14, p.671-677, 1993.
- REDDI, A.H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.69, p.1601-1605, 1972.
- ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, D; Van ASTEN, J.A.A.M.; NIJENHULS, A.J.; PENNING; A.J. The effects of different steamsterilization programs on material properties of poly(L-lactide). **J. Appl. Biomater.**, v.2, p.23-28., 1991.
- SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Importance of geometry of extracellular matrix in endochondral bone differentiation, **J. Cell Biol.**, v.98, p.2192-2197, 1984.
- SCHWARTZ, Z.; SOMMERS, A.; MELLONIG, J.T. CARNES Jr., D.L.; DEAN, D.D.; COCHRAN, D.L.; BOYAN, B.D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. **J. Periodontol.**, v.69, p.470-478, 1998.
- SCOTT, C.K.; HIGHTOWER, J.A. The matrix of endochondral bone differs from matrix of intramembranous bone. **Calcif. Tissue Int.**, v.49, p.349-354, 1991.
- SICHER, H; Du BRUL, E.L. **Oral Anatomy**, 8Ed. C.V. Mosby Company, Saint Louis, USA, 1992, 551p.
- SYFTESTAD, G.; URIST, M.R. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization, **Clin. Orthop.**, v.141, pg.281-288, 1979.
- TETI, A; TARQUILLO, Q.; GRANO, M; COLUCCI, S.; LAFORGIA, A.; MANGINI, F.; ZALLONE, A.Z. Effects of Calcium-phosphate based materials on proliferation and alkaline phosphate activity of newborn rat periosteal cells in vitro **J. Dent. Res.**, v.70, p. 997-1001, 1991.
- TEIXEIRA, R.G.; VIDAL, B.C; LIMA, L.Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado. **J. Bras. de Ortod. Ortopedia Facial.**, v.5, p.76-82, 2000.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction, **Science**, v. 150, n. 3698, p. 898-899, 1965.
- USUI, Y.; ZERWEKH, J.E.; VANHARANTA, H.; ASHMAN, R.B.; MOONEY, V. Different effects of mechanical vibration on bone ingrowth into porous hydroxyapatite and fracture healing in a rabbit model, **J. Orthop. Res.** v.7, p. 559-567, 1989.
- van SCHELDREGT, A; RADERR, A.M.; de GROOT, K.; van BLITLERSWIJK, C.A. In vitro biocompatibility testing of polylactides Part I: proliferation of different cell types. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** V. 3, p. 365-370, 1992.
- WANG, J.; GLIMCHER, M.J.; MAH, J.; ZHOU, H.Y.; SALIH, E. Expression of Bone Microsomal Casein Kinase II, Bone Sialoprotein, and Osteopontin During the Repair of Calvarial Defects, **J.**

Clin. Orthop. Sur. Res., v. 22, p. 621-628, 1998.

YUKNA, R.A.; KRAUSER, J.T.; CALLAN, D.P.; EVANS, G.H.; CRUZ, R.; MARTIN, M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. **J. Periodontol.**, v.73, p.123-128, 2002.

ZHANG, Q; OLIVER, C.; DELLOYE, C. Ethylene oxide does not exiting the osteoinductive capacity of demineralized bone, **Acta Orthop. Scand.**, v.68, p.104-108, 1997.

ZILIS, T; MARK, D.E.; CERBAS, E.L. HOLLINGER, J.O. Scanning electron microscopic study of cell attachment to biodegradable polymer implants. **J. Oral Implantol.**, v. 15, p. 160-167, 1989.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. 1A) Photomicrograph showing PDLLA block and future pores in white arrows. (magnification x 28). 1B) photomicrograph of PDLLA-HA block, showing pores (yellow arrows) and granules of HA (red arrows) (magnification x28). 1C) photomicrograph of PDLLA+MOD block showing pores (white arrows) (magnification x 56).

Figure 2. 2A) PDLLA graft in rat showing (a) connective tissue, (b) mononuclear inflammatory infiltrated. (HE stain, original magnification $\times 32$). 2B) detail of 2A, showing (a) connective tissue, (b) mononuclear inflammatory infiltrated, (c) mandibular bone and sidewall of the cavity being absorbed (osteoplastes indicated by white arrows) (H.E stain, magnification x116).

Figure 3. 3A) Photomicrograph of mandible after 10 days post-graft with PDLLA-HA showing (a) molar, (b) HA granule, (c) gingival sulcus, (d) caries aspect, (e) negative image of PDLLA-HA graft, (f) dislocated HA (g) PDLLA, (h) connective tissue. (AT stain, original magnification x28). 3B) detail of 3A showing (a) dentine, (b) HA granules and (c) PDLLA surrounded and invaded by cells of fibroblastic aspect (arrows white), (d) vessels and (e) connective tissue with predominance of fibroblast cells. (AT stain, original magnification x112).

Figure 4. 4A) Photomicrograph showing detail of HA granule b1 at 3A and the

birefringence of the HA granule under polarized light. The Havers system (yellow arrow) (magnification x112). 4B) photomicrograph of bottom of cavity of PDLHA-HA graft after 10 days under light polarized showing (a) birefringence of superficial layer of bone tissue, (c) bone layer with larger number of osteocytes, but little birefringence, and (d) HA (magnification x106)

Figure 5. Photomicrograph of rat mandible 30 days after PDLHA-HA graft, showing (a) HA granules surrounded by (b) newly formed osseous tissue (H.E. stain with magnification x120).

Figure 6. Photomicrograph 20 days after PDLHA-HA graft bottom of cavity, showing birefringence of (a) immature bone tissue surrounded by (b) large osteoblasts, (c) HA granule in contact with bone showing birefringence trabecula separate only for a layer of osteoblasts, remaining portions of material with crystal aspect of (d) PDLHA surrounded by cellular proliferation and osteoblasts, and (e) conjunctive tissue with predominance of fibroblasts along walls of cavity. (AT stain analyzed by polarization microscopy, magnification x248).

Figure 7. Photomicrograph 10 days PDLHA-BPM graft showing, (a) molar, (b) lingual alveolar bone cortex, (c) negative particle image of PDLHA-BPM, (d) buccal bone wall, (e) marrow, (f) connective tissue.. (AT stain, magnification x28).

Fig. 8. 8A) Photomicrograph 20 days PDLHA-BPM graft showing (a) connective tissue with immature bone formation focus, at cavity edges (arrows) and in interior of the (b) particles (HE stain, magnification x248). 8B) same view but using polarization microscopy showing high birefringence of collagen fibers in immature bone tissue: (a) cavity edges, (b) connective tissue, (c) immature bone surrounding the (d) particles of PDLHA-BPM and (e) inside of them. (magnification x248).

Figure 9. 9A) Photomicrograph 30 days PDLHA-BPM graft, showing (a) cavity and granules of PDLHA-BPM and (b) connective tissue. The cavity is filled with immature bone tissue, connective tissue and bone trabecula (H.E. stain, magnification x30). 9B) magnified view of the square in 5-A showing the surgical cavity filled by a) material granules, b) connective tissue, c) immature bone tissue (H.E. stain, magnification x20).

Figure 10. Photomicrograph 36 days Control group, showing the bone fill at cavity (HE stain, magnification x28).

Figure 11. Photomicrograph showing subcutaneous implantations of a) PDLLA-BPM after 60 days, showing immature bone tissue inside material granules (arrows) (HE stain, magnification x120)

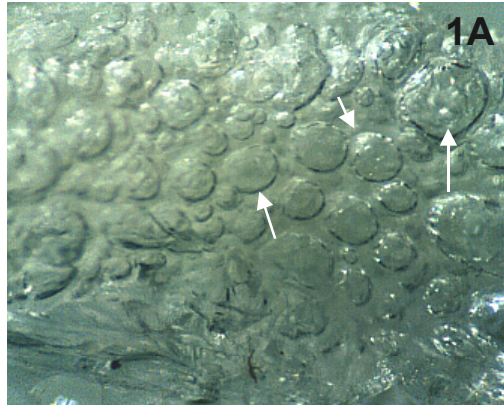


Figure 1

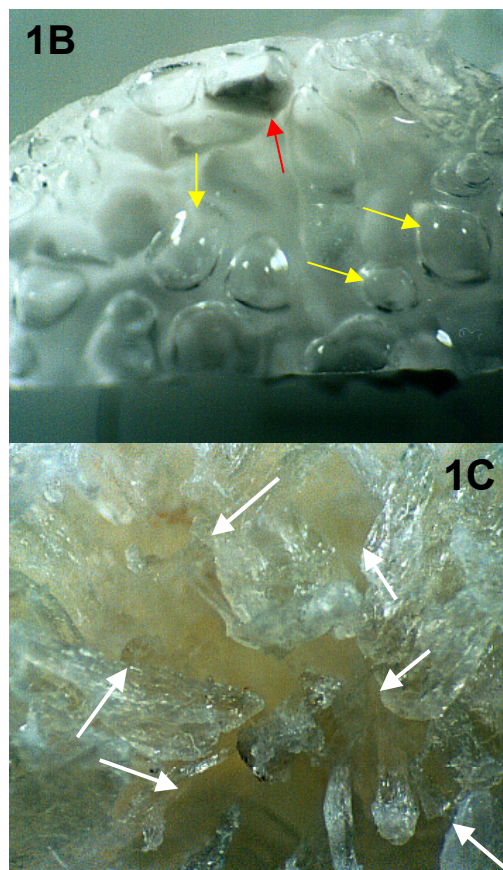


Figure 2

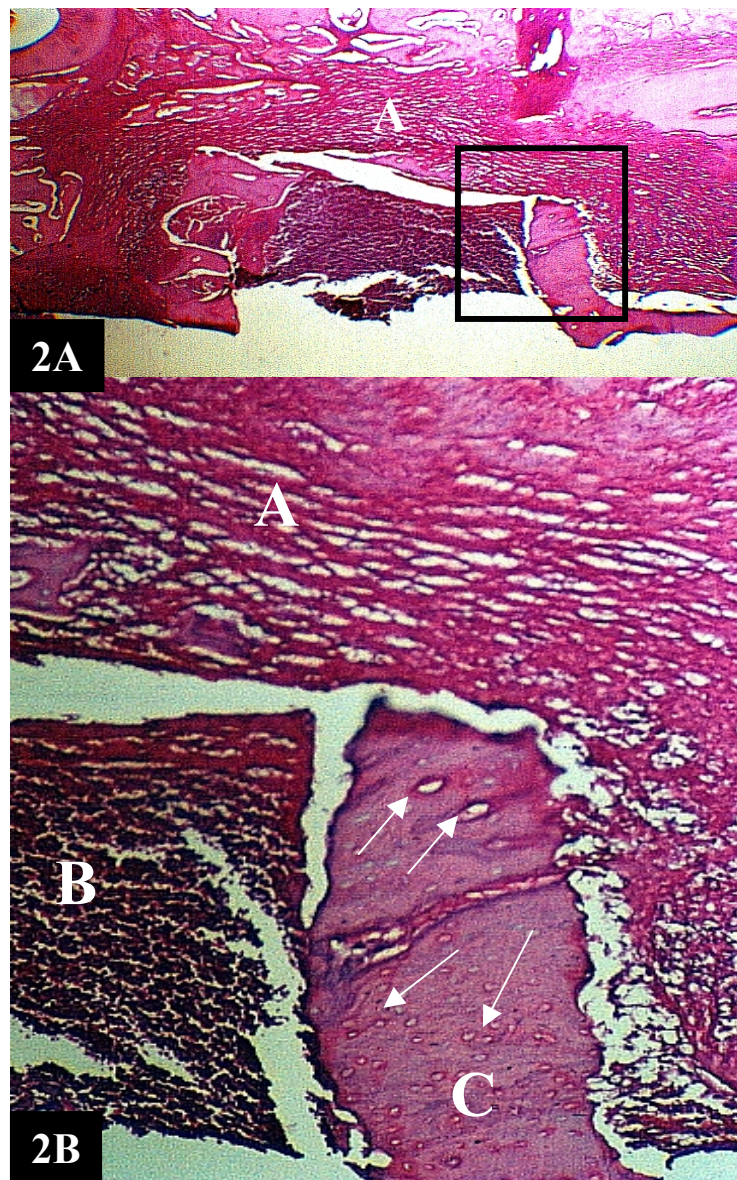


Figure 3

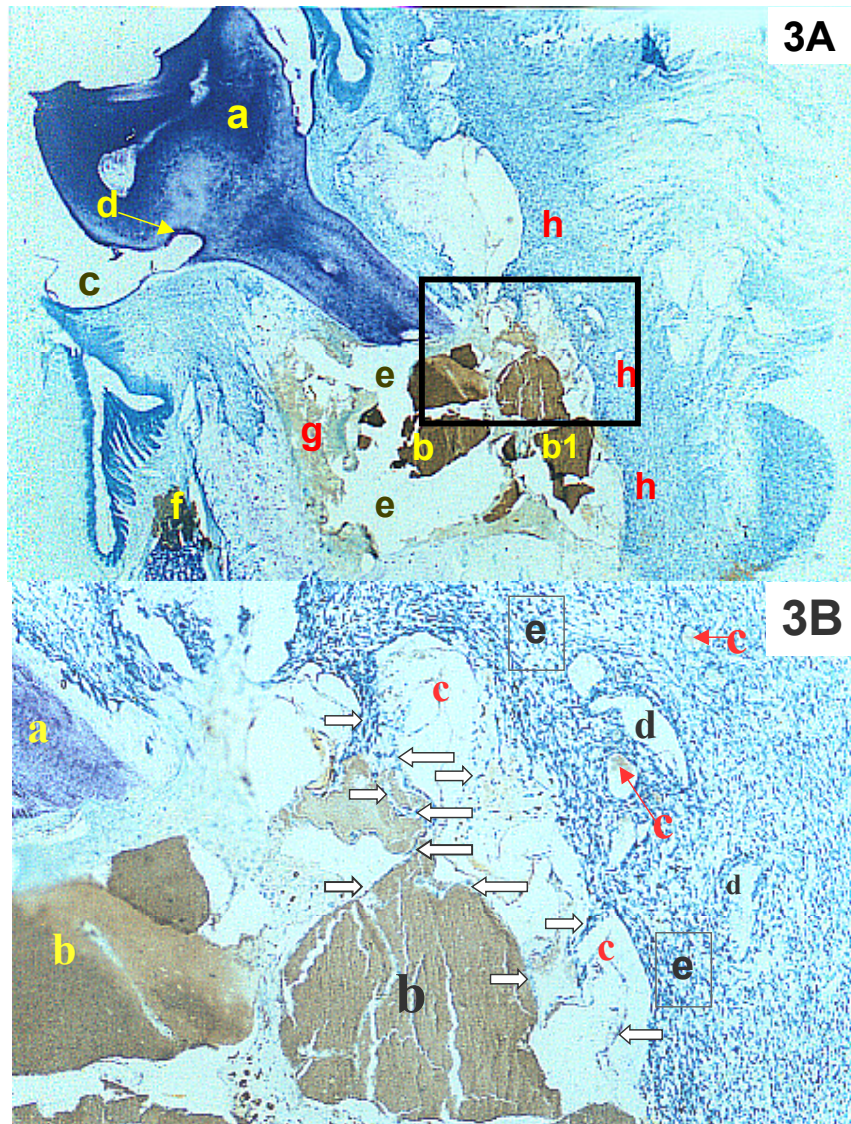


Figure 4

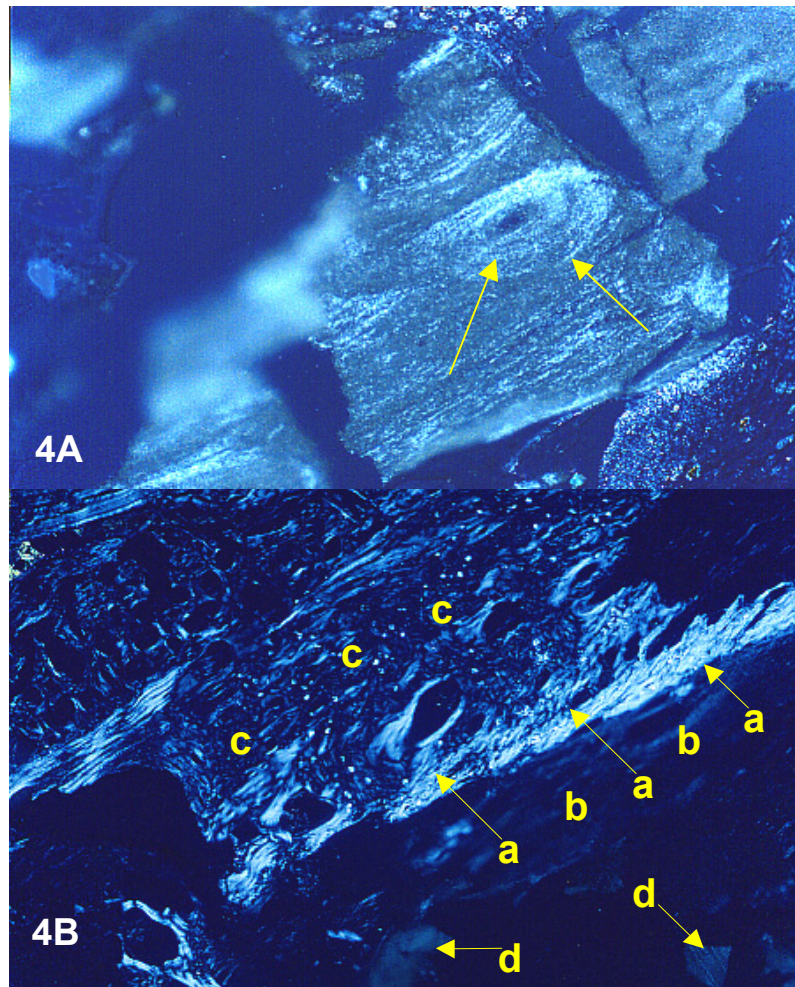


Figure 5



Figure 6

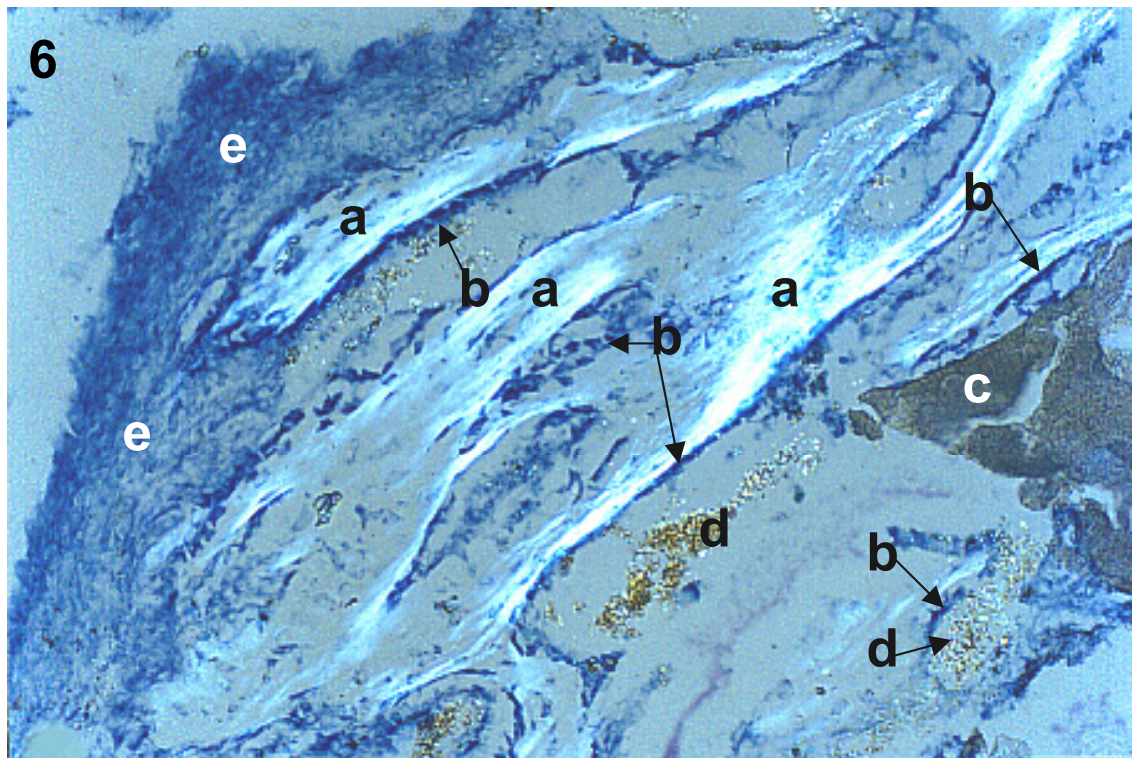
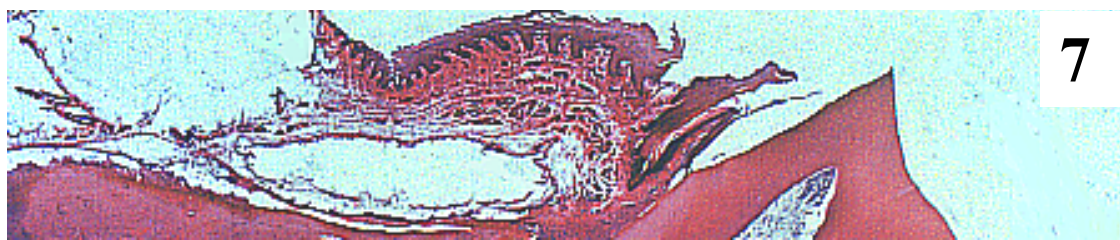


Figure 7



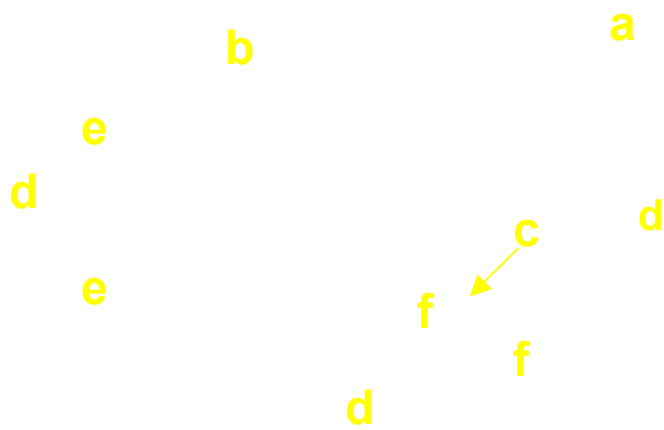


Figure 8

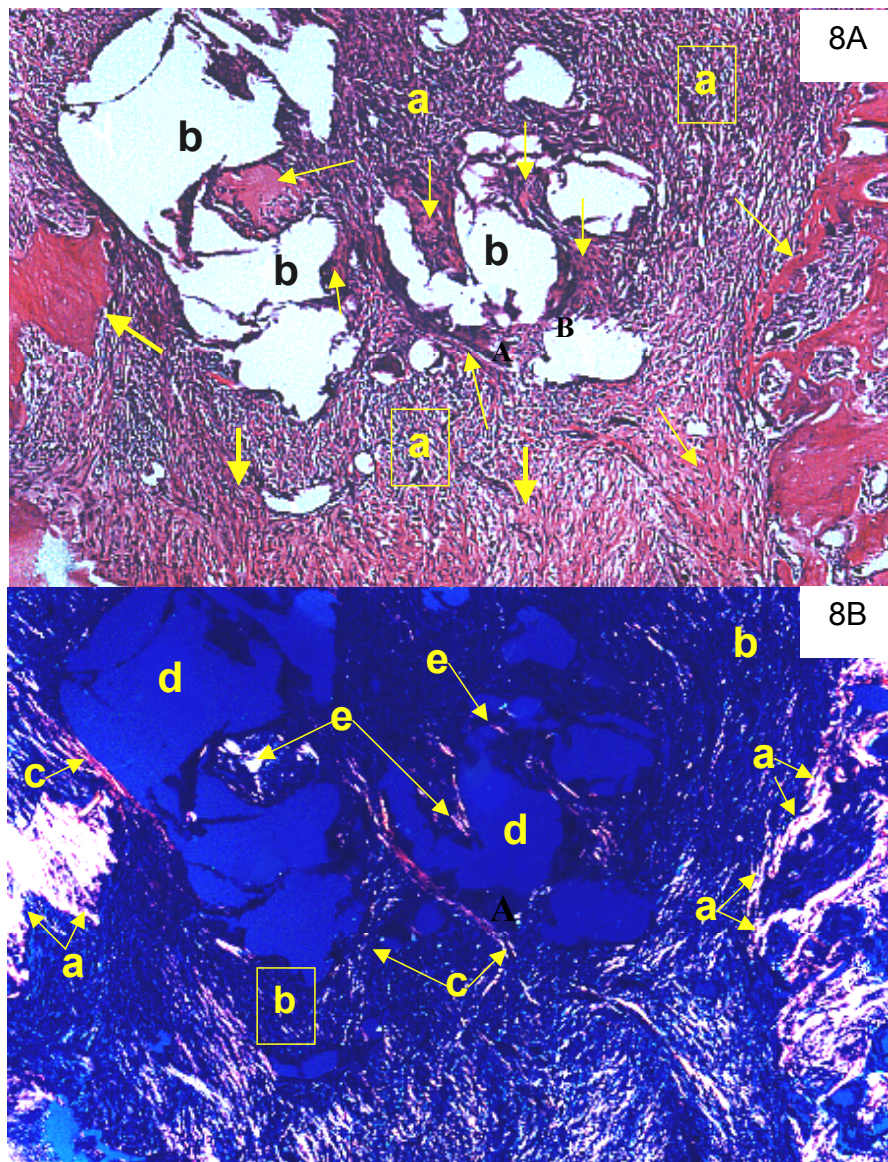
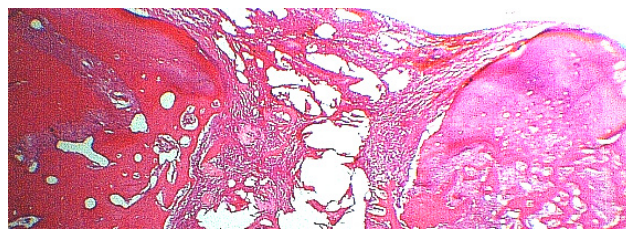


Figure 9



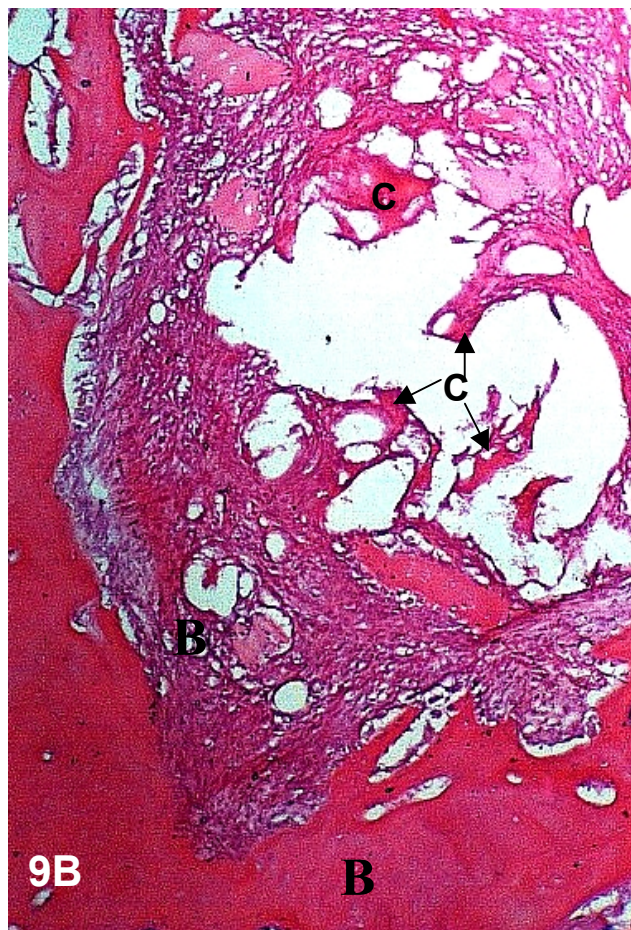


Figure 10

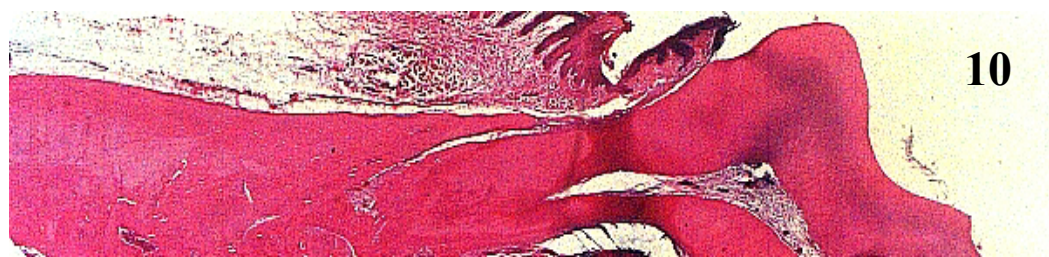


Figure 11



4.3. “Clinical Analysis of the Healing Properties of Poly(DL-Lactic acid) Associated with Hydroxyapatite or Bone Protein Matrix Used in Maxilla Bone Grafts”.

**Clinical Analysis of the Healing Properties of Poly(DL-Lactic acid)
Associated with Hydroxyapatite or Bone Protein Matrix Used in
Maxilla Bone Grafts.**

Marco Antonio Argento¹; Angelo Luiz Cortelazzo¹.

Correspondence: Marco Antonio Argento, Department of Cellular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), POBOX 6109, ZIP CODE 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

Telephone: + 55 19 37886126, Fax: + 55 19 32414852.

E-mail: argentoma@yahoo.com

Short title: PDLLA Graft Material plus Hydroxyapatite or Bone Protein Matrix in Humans.

ABSTRACT

Introduction. Bone graft materials used in dentistry must be clinically compatible and have appropriate characteristics for each type of application. The biomaterials used should induce cellular proliferation and have a uniform particle size. Pore diameter, capacity for osteoinduction and osteoconduction, and the type of sterilization applicable are important criteria for assessing the quality of biomaterials. The purpose of this work was to examine the clinical biocompatibility in bone graft repair of associations of poly(DL-lactic acid) with bovine hydroxyapatite (PDLLA-HA) and with bovine bone protein matrix (PDLLA-BPM) in the oral cavity of humans.

Materials and Methods. PDLLA, HA and BPM were processed to yield a granular form with a standard particle and pore size. Bone grafts of PDLLA-HA and PDLLA-BPM were used in periodontal surgery, apical and lateral periodontium and buco-sinus communication, and in post-

extraction dental alveoli. The extent of degree of periodontal tissue repair, including the probing depth, clinical attachment loss, gingival recession, the successful closing of the buco-sinus communication and the apical and lateral periodontium, and a radiographic analysis were assessed 1, 2, 4 and 6 weeks and 6 months after surgery.

Results. 1) The soft tissues showed the clinical signs of normal repair within the expected time scale. There was no infection or formation, or any sign of exacerbated inflammation indicative of an toxicity or an allergic response, 2) In the periodontal surgeries, there was a decrease in the clinical probing depth and clinical attachment level, with little marginal gingival recession; a radiographic analysis confirmed resolution of the periodontal osseous defect, 3) The buco-sinus communication and the apical and lateral periodontium showed normal healing with no clinical recurrences, and 4) The apical and lateral periodontium contained radiographic opaque tissue with no fistula during the six months of follow-up.

Conclusions. Complexes of PDLLA-HA and PDLLA-BPM bovine were clinically biocompatible and these materials may be safely used in dental surgery in humans.

Key words: biocompatibility; bone graft; hydroxyapatite; PDLLA; repair; polylactic acid.

INTRODUCTION

Synthetic and natural polymers for bone grafts have been widely studied because their chemical, physical and biological properties contribute to tissue repair. Materials used in mandibular and maxillar alveolar processes should not alter the normal repair process and should restore the biomechanical characteristics of the offended tissue and induce new bone formation as rapidly as possible. Biomaterials that meet these requirements include polylactic acid (PLA), bone hydroxyapatite and bone protein matrix.

PLAs are degradable, bioabsorbable and biocompatible (Di Tizio et al., 1998; Kirker-Head et al., 1998; Lekovic et al., 1998; Wake et al., 1998; Walter et al., 1999). Hydroxyapatite (HA) is biocompatible, may or may not be absorbable, has a block or porous shape, is osteoconductive, and radiographically opaque, and is not malleable (A.A.P., 1993, Jeffcoat et al., 1997). Bone protein matrix (BPM) or demineralized bone matrix is biocompatible, absorbable, osteoconductive and osteoinductive (Urist, 1965; Upton et al., 1984; Rosenthal et al., 1999, Nasr et al., 1999). The characteristics of the biomaterials should be compatible with the types of grafts in which they are used. The association of two or more biomaterials such as PLA-HA or BPM can improve the characteristics or properties of bone graft materials (Trejo et al, 2000). However, few studies have assessed the usefulness of PDLA + bovine HA and PDLA + bovine BPM for oral surgery in humans. In this work, we examined the clinical biocompatibility of PDLA-HA and PDLA-BPM in human maxillar and mandibular bone graft repairs .

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bovine hydroxyapatite was obtained from bovine tibia that were cut transversally cut into 2 cm pieces, after chemical cleaning and defatting (Urist, 1965). This was followed by thermal treatment at 300°C, 600°C and 800°C for 2 h each. After cooling to room temperature, this material was ground and granules 340-420 µm diameter were separated, sterilized in dry heat and packaged.

Bone protein matrix (BPM) was subjected to the same initial chemical treatment as hydroxyapatite. After drying and grinding, particles 350 - 420 µm in size were separated and sterilized with gamma radiation (10 kgr).

Graft materials of PDLLA-HA and PDLLA-BPM were prepared mixing a 12.5% (weight/volume) solution of PDLLA¹ in dichloromethane with HA (or BPM) ½ (weight/volume) in a Petri dish. The mixture was initially stirred at 240 r.p.m. that decreased progressively to 6 r.p.m. This was followed by cooling in a freezer and heating on a Bunsen burner until the mixture reached the consistency of a candy ball. The material then ground in granules up to 500 µm in diameter were selected, sterilized in 1.0% sodium hypochlorite (NaClO) for 10 min., washed in sterile distilled water for 24 h., oven-dried at room temperature for 48 h. and packaged in sterile flasks.

Methods

Twenty five patients of both sexes between 21 and 50 years old were selected for buccal surgery. An anamnesis and all standard clinical examinations and laboratory tests were done. The surgeries included periodontal surgery with a modified Widman section, surgery in the apical and lateral periodontium with a semi-lunar section, surgery to close the buccal-sinus communication, and tooth extraction with preservation of the alveolus. The postoperative follow-ups occurred 1 and 2, 4, 6 weeks and 6 months after surgery. This study was approved by the institutional ethics committee (process # 228/2003) of the State University of Campinas School of Medicine.

The subjects were divided into three groups: 1) those treated with PDLLA-HA, 2) those with PDLLA-BPM, 3) those not treated with biomaterials. Thirty-nine surgeries were done (Table 1).

¹ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Table 1. Number of surgeries in each group.

Type of Surgery	PDLLA-HA	PDLLA-BPM	Control
Periodontal bone graft	9	6	5
Graft in the apical and lateral periodontium	3	3	1
Graft close a buccal-sinus communication	2	2	1
Graft to fill the alveolus	2	3	2

The success of the treatment assessed based on the normal clinical repair of periodontal tissues and after measurement of probing depth, clinical attachment level and gingival recession with a periodontal probe, and radiographic detection of bone loss. Special attention was given to the clinical signs of a normal post-operative response, including excessive scaling of the material, the presence of a purulent exudate abscess, or delayed epithelial repair of the surgical incision, prolonged local edema and pain and color of the tissues that indicating local inflammation or reaction. The presence of fever, generalized pain and signs and symptoms of a local and generalized allergic process were also recorded. The success of buccal-sinus communication and endodontics lesions were assessed on repair and no recurrence of fistula and bone formation if possible.

RESULTS

The results of the clinical parameters analyzed are shown in Table 2.

Table 2. The results of the clinical parameters analyzed and their respective figures, where appropriate.

Clinical aspects of repair	Results	Figure number
Repair of marginal and keratinized gingival	Within the normal range and equal to control groups	3, 5b,7b, 10
* Reduction in probing depth, gain of clinical attachment, less gingival recession	Better than the control in all items	-----
Resolution radiographically of the periodontal osseous defect after 6 months	Test – Success Control group – Failure	4c, 6b, 8b, 11b
Scaling of material	Very little	2a,10a, 10c
Presence of purulent exudate or abscess	None in both	2, 10
Time required for of epithelial repair	Equal to control	2, 10
Duration of edema	Equal to control	-----
Pain	Equal to control	-----
Tissue color: rose-colored in greater part	Equal to control	2, 3 5, 7, 10
Signs and symptoms of a local inflammatory reaction	Equal to control	
Closing of the buccal-sinus communication	Success. Equal to control	7, 8
Recurrence of a buccal-sinus communication	None. Equal to control	9, 10, 11

*The result of probing periodontal was a comparison between the arithmetic averages (in millimeters) of the reduction in probing depth, gain of clinical attachment and change in recession. The first assessment was during the initial clinical examination and the other was after six months.

The presence of no fever, generalized and local signs of no allergic process were equal in test and control groups.

DISCUSSION

This study analyzed the clinical biocompatibility of complex polymer grafts of PDLLA-HA. or BPM of bovine origin in the human mandible and maxilla. The results showed that these materials were well accepted by buccal tissues, indicating their biocompatibility (Figures 2, 5, 7, 10).

Polylactic acid is a polyester derived from propane hydroxyde acid that is biodegradable, bioabsorbable and biocompatible. Because of these characteristics, these acids are used as reconstructive tissue implants sold in the form of micro particles, granules, threads, gels, and membranes or in blocks. This polymer has been widely studied as a control system for the controlled release of drugs, as tissue separators in guided tissue regeneration and in sutures (Di Tizio et al., 1998; Kirker-Head et al., 1998; Lekovic et al., 1998; Wake et al., 1998; Walter et al., 1999; Murakami et al., 2002).

In dentistry, HA has been used to fill periodontal and periimplantais bone defects, as well as pathological and natural surgical bone cavities in maxillofacial surgery, maxillary orthopedics (Holmes & Hagler, 1988). When implanted in soft tissue, HA has no osteoinductive capacity and its pores fill with fibrous conjunctive tissue with little inflammatory response, and when bone formation occurs adjacent to the surface of hydroxyapatite, there is osteoconduction, i.e., the HA serves as a scaffold for bone neo-formation (A.A.P., 1993; Jeffcoat et al., 1997). Porous and non-porous hydroxyapatites are not absorbable, as is tri-calcium phosphate is absorbable, and when used as grafts, seem to produce a significant improvement in the clinical and, histologicall aspects of wound healing. The results from PDLLA-HA were similiares as Teixeira et al. (2000), which studied the same HA. that related this HA was biocompatible, with a slow absorption and had qualities similar to human bone HA.

Various types of bone can be used as in graft surgery, including demineralized bone matrix or BPM. Autogeneic grafts have the advantage of being from the patient himself, are sterile and have live osteo-progenerative bone cells. However, such grafts involves surgery in another part of the donor, the amount of material available is generally small, and the mineralized bone can cause external radicular re-absorption when used in a periodontal bone defect (Seibert, 1983). Dry frozen demineralized bone (DFDBA), recommended by the

American Academy of Periodontology, is osteoconductive and osteoinductive, but is expensive, and lyophilized mineralized bone (FDBA) is only osteoconductive and not osteoinductive (A.A.P., 2001). FDBA and DFDBA continue to be important bone substitutes for a variety of regenerative periodontal processes, as well as in bone regeneration for implants in dentistry. Dry demineralized bovine bone is osteoconductive, osteoinductive, cheaper than DFDBA and does not present any risk of transmitting diseases (AAP, 2001; Bessho et al., 1991). There is an anatomic and biochemical similarity between bovine and human bone. The morphogenetic bone protein contained in bovine bone has 163 amino acids and a molecular weight of 18 KDa; in humans, this protein has 165 amino acids and a molecular weight of 17 KDa. Both protein cause similar amounts of osteoinduction in muscle tissue of rats (Bessho et al., 1991; Lekovic et al., 2001).

PDLLA was used here because it causes a significantly greater fibroblast proliferation than porous membranes of poly(L- lactic acid) (PLLA) or poly(DL-lactic acid)-co-glycolic. In addition, in rat mandibles, PLLA is absorbable and stimulates a normal repair reaction when associated with HA or BPM (Argento & Cortelazzo, unpublished). HA of bovine origin was used because of its biocompatibility, osteoconductive capacity and efficacy as a vehicle in the composition of biomaterials and in its association with growth factors (Lekovic, 2001; Yukna et al., 2002; Murakami et al., 2002). The use of BPM bovine in humans is currently approved by the Brazilian Ministry of Health and Sanitation Commission for commercial purposes with some products.

The porosity of PLAs influences the extent of tissue repair and implant degradation *in vivo* since the greater the porosity, the greater rate of degradation (Zilis et al., 1989). Adding specific salts to form small pores that can interconnect through tubules can modulate the porosity of polymers. This porosity makes the substratum suitable for cell growth and for the

production of extra cellular matrix *in vitro* and *in vivo* (Sampath & Reddi, 1984). The uniformity and porous structure of PLA facilitates the formation of a tissue net that can be directed to reconstruct support such as bone and cartilage (Ishaug-Riley et al., 1998). In osteoblast cultures, there is no significant difference between cell proliferation and the formation of mineralized tissue for pore diameters ranging from 150 to 710 μm (Ishaug-Riley et al., 1998). We used particles with pore varying from 433 (PDLLA-HA) to 665 μm (PDLLA-BPM), since these are ideal diameters for bone grafts in live tissue.

The particle size of grafts of bone influence the differentiation and proliferation of bone cells. DFDBA particles $< 1 \mu\text{m}$ induce macrophages, resulting in little or no bone formation, and DFDBA particles $> 500 \mu\text{m}$ induce little bone formation (Syftestad & Urist, 1965; Mellonig & Levy, 1984; Sampath & Reddi, 1984; AAP, 2001). The American Academy of Periodontology recommends that bone particles should be 250-750 μm in diameters, which includes most widely available types sold by bone banks (A.A.P., 2001). For more complex surgeries, such as raising maxillary core to insert implants and increasing the alveolar rim, the bone granules range in size from 250 to 2000 μm , although sheets 20 - 100 μm x 3 - 5 mm and blocks of porous or dense bones have also been used (A.A.P., 2001; Becker et al., 1998). We used particles 350 – 500 μm in diameter, which is an ideal size for bone tissue grafts in the of the human oral cavity, and the clinical repair was equal to control group.

The sterilization of bone to be used in grafts is controversial issue. OET can diminish osteogenesis and the re-absorption of the grafted material, probably because of the inadequate removal of residual OET during sterilization or exposure of the material to temperatures that cause protein denaturation (A.A.P., 2001). Sterilization with ETO can be problematic since the residues of the gas are toxic for human gingival fibroblasts (Kudryk et al., 1992). Nevertheless, the use of appropriate sterilization conditions can maintain the osteoinductive capacity of

demineralized bone matrix (A.A.P., 2001). Bone sterilization by radiation or gamma rays can reduce the osteoinductive capacity by up to 40% (Zhang et al., 1997), although this type of sterilization does not alter the inductive capacity of DFDBA during the repair period (AAP, 2001). We used gamma radiation to sterilize for BPM because: 1) the removal chloride acid in the act of it being obtained can contaminate this material; 2) residues of ETO in PDLA inhibit fibroblast proliferation *in vitro* and BPM is enveloped by this polymer (PDLA-BPM); if we sterilize with OET, the PDLA could be contaminated, making it toxic for the tissues (Argento, unpublished data); 3) sterilization with NaClO in PDLA-BPM material is not able to cross the PDLA that envelopes the BPM, which may be contaminated.

The association of PDLA with HA can enhance the cytological and histological properties of these materials and provide a greater area for cellular proliferation. Radiographically, HA granules were seen enveloping the alveolar bone trabeculae after 6 months, thus indicating that the granules were not absorbed during this period and that there was bone union. The PDLA-BPM complex combined the ability of PDLA to induce cellular proliferation with that of BPM to cause cellular differentiation (Argento et al, unpublished data). The porosity of these materials and the size of the particles probably contributed to tissue repair during the 6 months after surgery. Sterilization with sodium hypochlorite was efficacious. Thus PDLA-HA appears to be a safe biomaterial for dentistry use in humans.

The parameters of clinical biocompatibility assessed here are those most commonly used by dental surgeons protocols. Many of these parameters still need to analyzed in depth to obtain complete diagnosis. Nevertheless, as shown here, these materials were safe and useful in promoting tissue repair. This is first clinical study in humans to use this approach to assess the biocompatibility of mixtures of PDLA-HA and PDLA-BPM in dentistry. Future

investigations need address the anatomo-pathological behavior of the complexes in each type of surgery and to compare them with other already accepted and widely used biomaterials.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank the Brazilian National Research Council (CNPq) for its in part financial support, and Regina Lucia Manara with Vania Berni for help in surgeries.

REFERENCES

- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Department of Scientific, Clinical and Educational affairs. **Periodontal regeneration**: Research, Science and Therapy Committee. Chicago: AAP, 1993, 11p.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Department of Scientific, Clinical and Educational affairs. Tissue banking of allografts used in periodontal regeneration (Position paper): Research, Science and Therapy Committee, **J. Periodontol.**, v.72, p.834-838, 2001.
- BECKER, W.; CLOKIE, C.; SENNERBY, L.; URIST, M.R. BECKER, B.E. Histologic finding after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: Case reports. **J. Periodontol.**, v.69, p.414-421, 1998.
- BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Analysis of bone morphogenetic protein (BMP) derived from human and bovine bone matrix. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.268, p.226-234, 1991.
- Di TIZIO, V; FERGUSON, G.W; MITTELMAN, M.W.; KHOURY, A.E.; BRUCE,A.W., Di COSMO, F. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. **Biomat.**, v.19, p.1877-1884, 1998.
- HOLMES, R.E.; HAGLER, H.K. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstitution: A histometric study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 81, p.662-671, 1988.
- ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE-KRUGER, G.M.; YASZEMSKI, M.J. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomat.**, v.9, p.405-412, 1998.
- JEFFCOAT, M.K.; MEGUIRE, M.; NEWMAN, M.G. Evidence highlights from the 1966 World Workshop in Periodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.128, p.713-724, 1997.
- KIRKER-HEAD, C.A; GERHAR, T.N; ARMSTRONG, R. SCHELLING, S.H.; CARMEL, L.A. Healing bone recombinant human bone morfogenetic protein 2 and copolymer. **Clin. Ortho. Relat. Res.**, v.4, p.205-217, 1998.
- KUDRYK, V.L.; SCHEIDT, M.J.; McQUADE, M.J.; SUTHERLAND, D.E.; Van DYKE, T.E.; HOLLINGER, J.O. Toxic effect of ethylene-oxide-sterilized freeze-dried bone allograft on human gingival fibroblasts. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, p.1477-1488, 1992.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; KLOKKEVOLD, P.R.; WEINLAENDER, M.; KENNEY, E.B.; DIMITRIJEVIC, B.; NEDIC, M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes, **J. Periodontol.**, v.69, p.1044-1049, 1998.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; WEINLAENDER, M; NIKOLA, V.; DJORDJEVIC, M.; KENNEY, E.B. The Use of Bovine Porous Bone Mineral in Combination With Enamel Matrix Proteins or With an Autologous Fibrinogen/Fibronectin System in the Treatment of Intrabony Periodontal Defects in Humans, **J. Periodontol.**, V. 72, p.1157-1163, 2001.

- MELLONIG, J.T.; & LEVY, R.A. The effects of different particle sizes of freeze-dried bone allograft on bone growth. **J. Dent., Res.**, v.63, p.222-228, 1984.
- MURAKAMI, N.; SAITO, N.; HORIUCHI, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP) and a synthetic polymer. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.62, pg. 169-174, 2002, Nov.
- NASR, H.F.; AICHELMANN-REIDY, M.E.; YUKNA, R. Bone and bone substitutes, **Periodontol.** **2000**, v.19, p.74-86, 1999.
- ROSENTHAL, R.K.; FOLKMAN, J.; GLOWACKI, J. Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cysts, and fibrous lesions. **Clin. Orthop.**, v.364, p.61-69, 1999.
- SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Importance of geometry of extracellular matrix in endochondral bone differentiation, **J. Cell. Biol.**, v.98, p.2192-2197, 1984.
- SEIBERT, J.S. **Surgery treatment of bone defects and deformity**, in: GOLDMAN, H.M. & COHEN, D.W, 6 ed. Periodontal Therapy, The C.V. Mosby Company, St Louis, MS, 1983, 1114p.
- SYFTTESTAD, G.; URIST, M.R. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization, **Clin. Orthop.**, v. 141, p.281-288, 1979.
- TEIXEIRA, R.G.; VIDAL, B.C.; LIMA, L. Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado. **J. Bras. de Ortod. Ortopedia Facial.**, v.5, p.76-82, 2000.
- TREJO, P.M.; WELTMAN, R.; CAFESSE, R. Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. **J. Periodontol.**, v.71. p.1852-1861, 2000.
- UPTON, J.; BOYAJIAN, M.; MULLIKEN, J.B.; GLOWACKI, J. The use of demineralized xenogeneic bone implants to correct phalangeal defects: a case report. **J. Hand Surg. [Am]**. v.9, p.388-391, 1984.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction, **Science**, v. 150, n. 3698, p. 898-899, 1965.
- YUKNA, R.A.; KRAUSER, J.T.; CALLAN, D.P.; EVANS, G.H.; CRUZ, R.; MARTIN, M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. **J. Periodontol.**, v.73, p.123-128, 2002.
- WAKE, M.C.; GERECHT, P.D.; LU, L.; MIKOS, A. Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived, **Biomat.**, v.19, p.1255-1268, 1998.
- WALTER, E; MOELLING, K; PAVLOVIC, J; MERKLE, H.P. Microencapsulation of DNA using poly(DL-Lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, **J. Controlled Release**, v.61, p.361-374, 1999.
- ZHANG, Q.; OLIVER, C.; DELLOYE, C. Ethylene oxide does not exiting the osteoinductive capacity of demineralized bone. **Acta Orthop. Scand.**, v.68, p.104-108, 1997.
- ZILIS, T; MARK, D.E.; CERBAS, E.L. HOLLINGER, J.O. Scanning electron microscopic study of cell attachment to biodegradable polymer implants. **J. Oral Implantol.**, v. 15, p.160-167, 1989.

FIGURE CAPTION

- Figure 1.** Photograph showing of the region of the incisors superior central. The marginal gingiva is swelling, red and shining, clinical signals of periodontal inflammation.
- Figure 2.** Photograph of the same patient of Fig.1 after one week PDLLA-HA graft, before removal of the material excess (2A) and after its removal and cleanness of bacterial plaque (2B).
- Figure 3.** Photograph of the same patient of the Fig.1 after 1,5 and 6 months. The color, form and texture gingival is clinical health.
- Figure 4.** . Photoradiographs of region of the superior incisors, showing the periodontal bone defect in the mesial of tooth 21 (4A), after 15 days of PDLLA-HA graft., where a space between the material and the wall of the bone defect is visualized (4B), and after 6 months, showing the resolution of bone defect periodontal radiographic presented initially (4C).
- Figure 5.** Photograph of the region of molar right inferior, showing roots residual before the extraction, and after 1,5 months of PDLLA-BPM graft, where it was distal root of molar second one.
- Figure 6.** Initial photoradiographs (6A) of the patient in Fig. 5. and after 6 months of PDLLA-BPM graft (6B).
- Figure 7.** Photograph of the buco-sinusal communication (7A) between molar and bicuspid, and after the 1,5 months of PDLLA-BPM graft (7B), where the gingiva is repairing and it does not possess fistula.
- Figure 8.** The buco-sinusal communication photoradiographs (8A) of Fig. 7 patient and after 6 months of PDLLA-BPM graft. The bone cortical of the maxillary sinus is repairing.
- Figure 9.** Photograph showing fistulas in the mucous oral in teeth 12 and 21 region, being a clinical signal of endodontics inflammation (9A). This injury is communicated with the gingiva sulcus, mean periodontal/endo-dontic lesions in tooth 21 (9B).
- Figure 10.** Photograph of same patient after 15 days PDLLA-HA graft of Fig. 9, where it has necrosis of the marginal gingiva, showing. Granules exfoliation and repairing in surgery region (10A). After 1 month, a normal repairing in relation the previous figure was occurred, is observed the color mean clinical signal without inflammation (10B). 3 –6 months, granules HA was observed and it has not pocket depth (10C). After 6 months, the attachment gingiva was heath (10D)
- Figure 11.** Photoradiographs of the Fig. 9 patient, showing apical periodontal/endo-dontic lesions of tooth 21 is observed (11A). After 6 months PDLLA-HA graft with retrograde obturation, and also, amalgam granules proceeding from the apical surgery is visualized. Any image was not found that demonstrated failure of the treatment, and so little recurrence of fistulae.

Figura 1.



Figura 2.

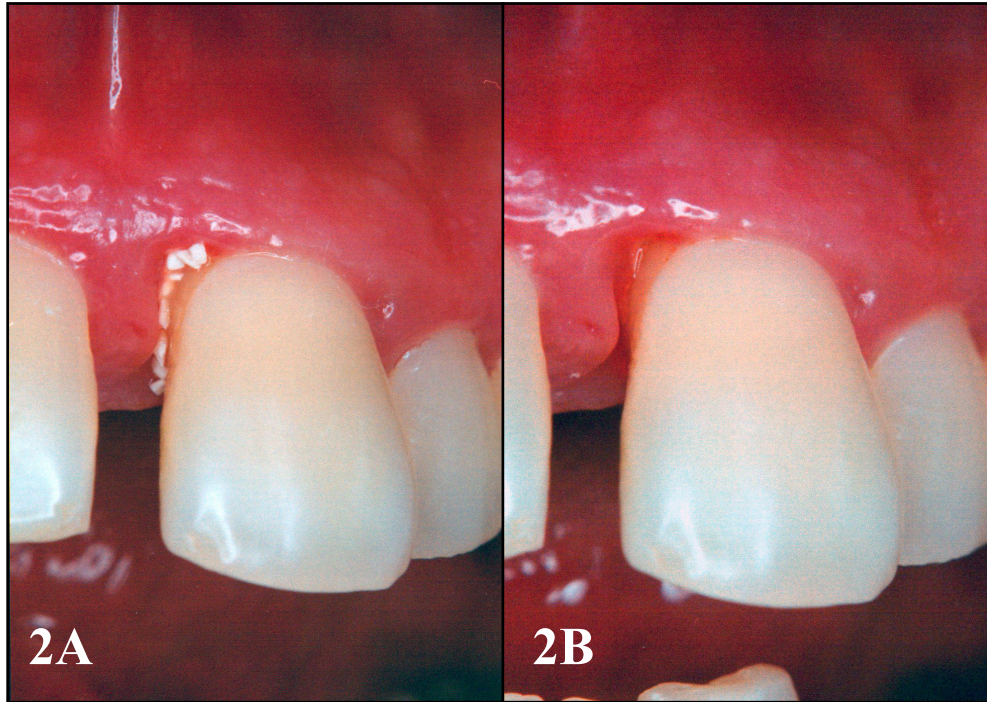


Figura 3.

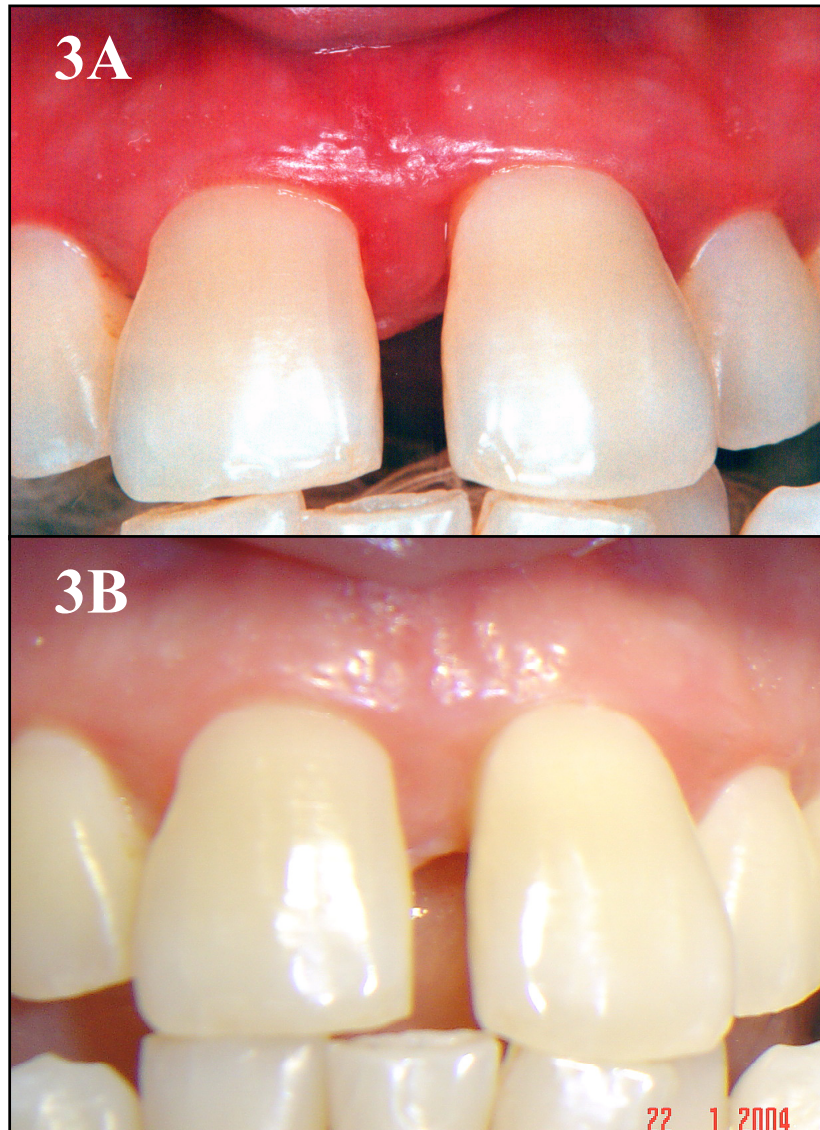


Figura 4.

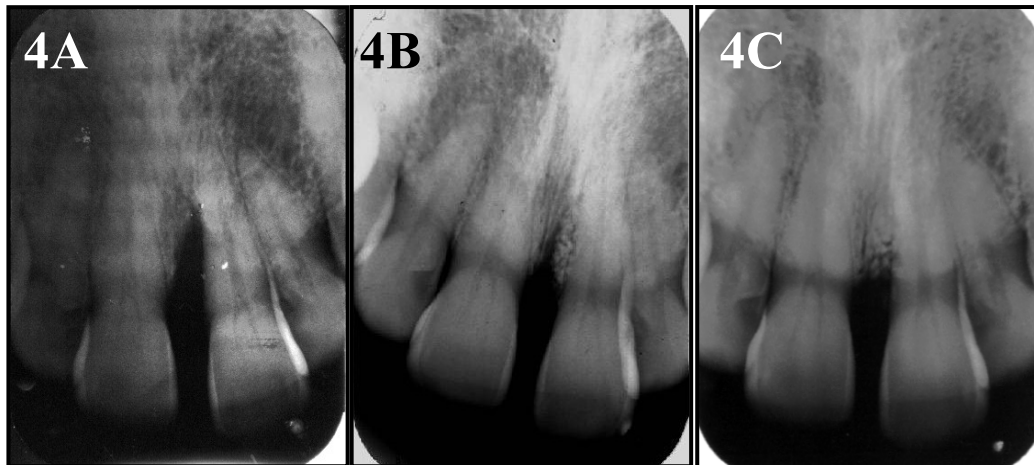


Figura 5.

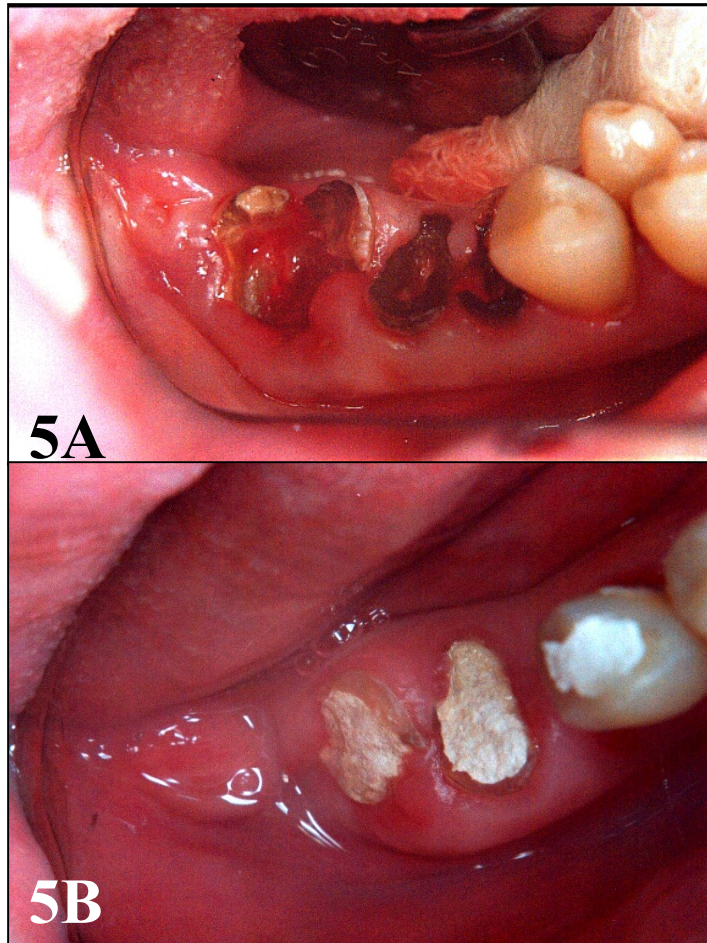


Figura 6

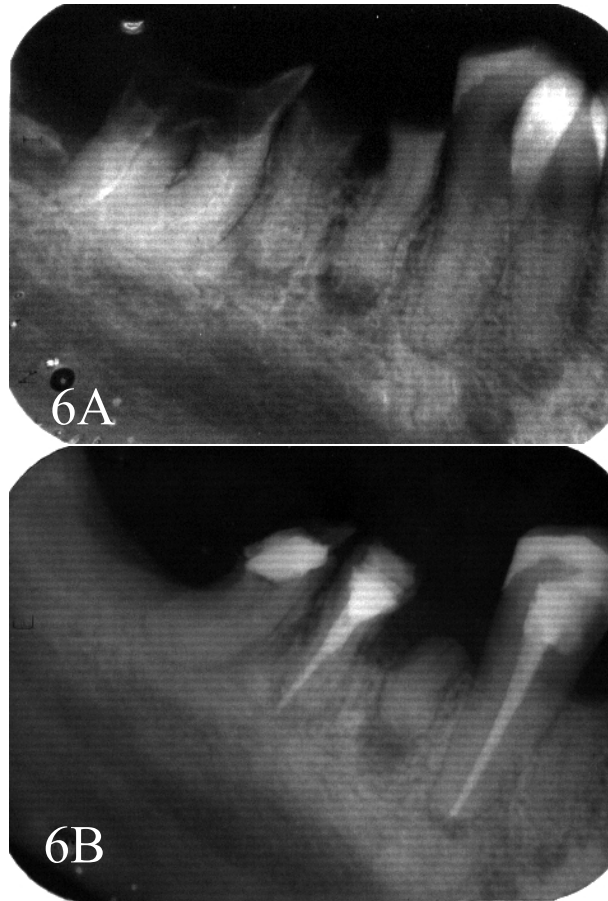


Figura 7

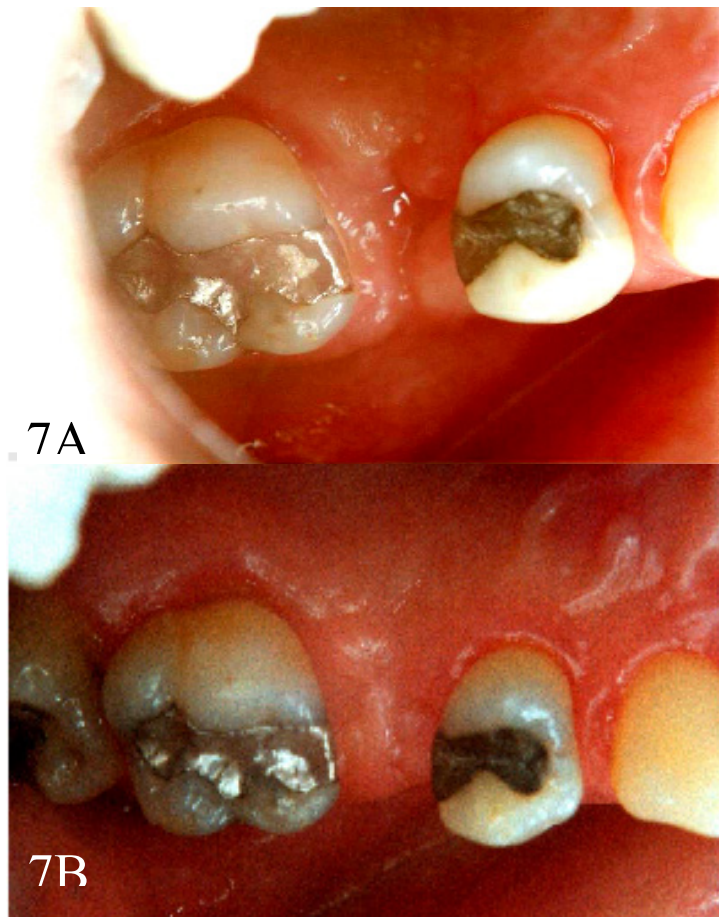


Figura 8

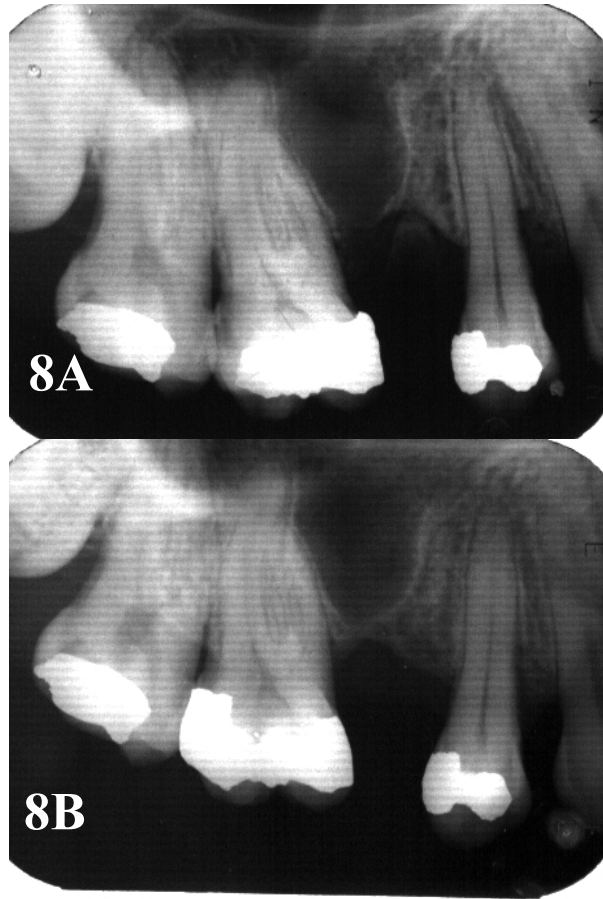


Figura 9

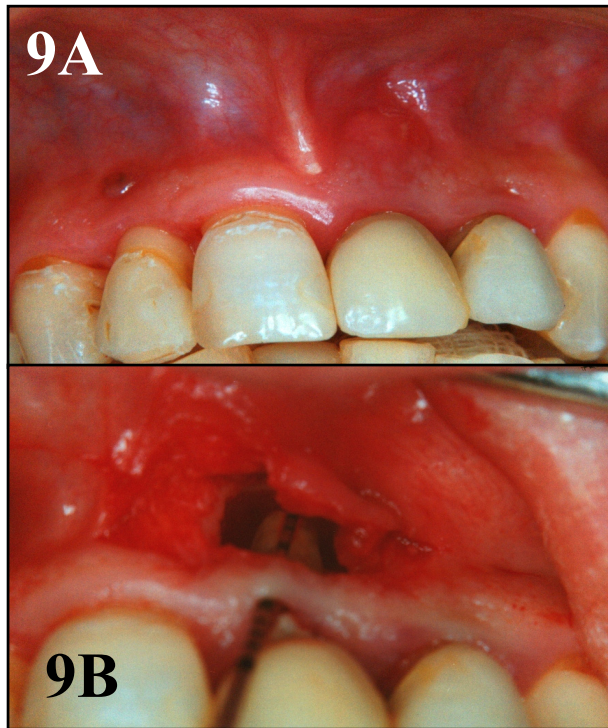
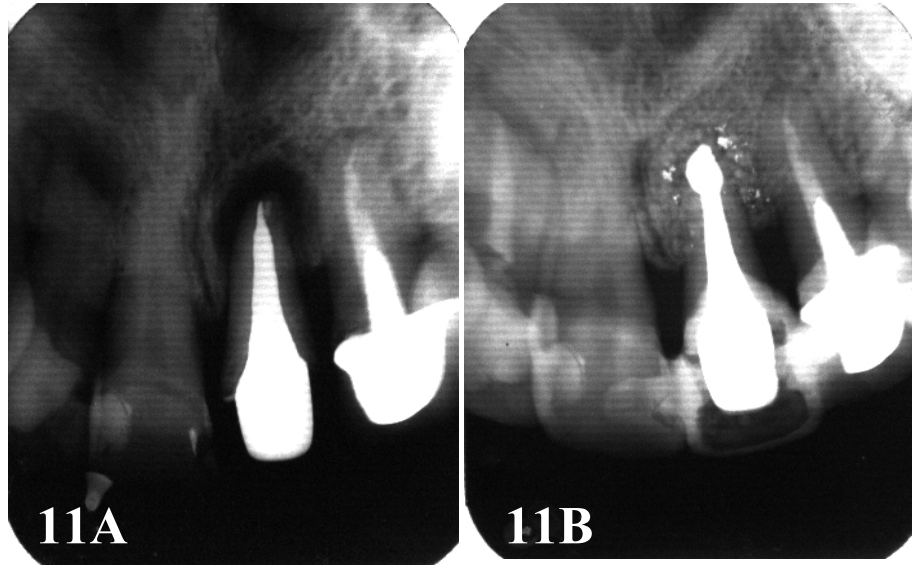


Figura 10.



Figura 11.



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1. Cultura de fibroblastos em PDLLA

- 7.1.1. A técnica da evaporação do solvente com a adição de citrato de sódio em grânulos de tamanhos padronizados é efetiva na obtenção de porosidade em membranas de PDLLA;
- 7.1.2. O tamanho médio dos poros das membranas de PDLLA é de 454 μm , a área é de 0,161 mm^2 e o volume, de 0,036 mm^3 , quando se utiliza a técnica da evaporação do solvente com grânulos de citrato de sódio de diâmetros entre 350 a 420 μm ;
- 7.1.3. O gás óxido de etileno inibe o crescimento de células fibroblásticas V79, quando utilizado na esterilização de membranas porosas de PDLLA utilizadas como substrato. O Hipoclorito de sódio mostra-se efetivo nessa esterilização, sem interferência na proliferação celular;
- 7.1.4. Os poucos fibroblastos V79 que proliferam sobre membranas porosas de PLLA possuem, geralmente, tamanhos reduzidos e pequenos núcleos com cromatina condensada;
- 7.1.5. Os fibroblastos V79 que proliferam sobre membranas porosas de PDLLA são vistos freqüentemente em divisão e possuem grandes núcleos com vários nucléolos;
- 7.1.6. As células V79 crescidas em substrato de PDLLAcoGL apresentam características semelhantes àquelas obtidas em PDLLA e diferentes daquelas do PLLA, ou seja, possuem grandes núcleos com vários nucléolos.;
- 7.1.7. A superfície porosa das membranas de PLLA, PDLLA e PDLLAcoGL apresentou maior número de células que na parte lisa, e essa diferença foi estatisticamente significante;

7.1.8. O número de células V79 encontradas sobre as membranas de PDLLA é superior ao de PDLLAcoGL, que por sua vez é superior ao de PLLA, sendo todas essas diferenças estatisticamente significantes.

7.1.9. O PDLLA e o PDLLAcoGL podem ser utilizados como substratos para a cultura celular de fibroblastos V 79, sendo que o primeiro parece ser melhor.

7.2. Enxertos de polímeros complexados em ratos

7.2.1. Obtenção do material

7.2.1.1. A técnica utilizada para a confecção dos materiais é apropriada para obter materiais de enxerto porosos;

7.2.1.2. O diâmetro médio dos poros do material de enxerto de PDLLA foi de 314 μm , a área estimada foi de 0,07 mm^2 e o volume, 0,002 mm^3 ;

7.2.1.3. O diâmetro médio dos poros do material de enxerto de PDLLA-HA foi de 433 μm , a área estimada foi de 0,14 mm^2 e o volume, de 0,005 mm^3 ;

7.2.1.4. O diâmetro médio dos poros do material de enxerto de PDLLA-BPM foi de 665 μm , a área estimada foi de 0,34 mm^2 e o volume, de 0,01 mm^3 .

7.2.2. Reparação tecidual

7.2.2.1. Os complexos polímeros de PDLLA, PDLLA-HA, PDLLA-BPM são biocompatíveis, pois houve contato direto com fibroblastos vivos;

7.2.2.2. Os enxertos de PDLLA e de PDLLA-HA não causaram grande reação de corpo estranho;

7.2.2.3. O enxerto de PDLLA-HA é osteocondutor;

7.2.2.4. O tipo de ossificação encontrada nos materiais PDLLA-HA e PDLLA-BPM foi a intramembranosa;

7.2.2.5. O enxerto de PDLLA-BPM induziu a formação de novo osso e pode ser considerado um material osteoindutor;

7.2.2.6. Parece haver um reconhecimento das células de reparação às superfícies dos enxertos de PDLLA-HA e PDLLA-BPM.

7.3. Complexos polímeros de PDLA-HA e PDLA-BPM em seres humanos

- 7.3.1.** A reparação dos tecidos moles em todas as cirurgias mostrou sinais clínicos dentro dos padrões de normalidade em relação ao tempo; houve uma esfoliação normal do material. Observou-se nenhuma presença de exsudato purulento ou abscesso, e nenhum sinal de exacerbada inflamação relativa à toxicidade ou processo alérgico;
- 7.3.2.** Nas cirurgias periodontais houve diminuição da profundidade de bolsa clínica e ganho clínico do nível de inserção, pouca retração gengival e ocorreu a resolução radiográfica do defeito periodontal;
- 7.3.3.** Nas comunicações buco-sinusais e nas cirurgias do periodonto apical e lateral, observou-se um fechamento clínico das mesmas e nenhuma recorrência;
- 7.3.4.** Nas cirurgias do periodonto apical e lateral, houve um preenchimento radiográfico de tecido radiopaco e não foi notada a presença de fístula ao longo de 6 meses de experimento.

7.4. Modelo proposto em seres humanos

- 7.3.1.** Deve ficar extremamente claro que não se teve aqui a pretensão de impor um modelo acabado. Sempre haverá a influência de fatores individuais de cada paciente, fatores de ordem sistêmica, fatores relacionados aos seus hábitos, tornando-o co-responsável pelo sucesso do tratamento, assim como o conhecimento técnico / científico e habilidade do cirurgião.

8. CONCLUSÃO GERAL

- 8.1.** A proliferação de fibroblastos V79 é maior em membranas de PDLLA que em PDLLAcoGL e, ambas apresentam melhores resultados do que em PLLA, porém não mostraram-se tóxicas frente aos ensaios realizados.
- 8.2** Os complexos polímeros de PDLLA, PDLLA-HA e PDLLA-BPM de origem bovina são biocompatíveis e este último é osteoindutor, quando utilizados em ratos.
- 8.3** Os complexos polímeros PDLLA-HA e PDLLA-BPM de origem bovina são clínica e radiograficamente biocompatíveis em seres humanos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, J.; RUSHDAN, A.; HAMZAH, M.; ARIFF, A.R.; RANI, A. Use of bovine xenograft in reconstruction of traumatic anterior cranial fossa bone defects involving the frontal sinus. **Ann. Transplant.**, v.4, p.3-4, 1999.
- AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A.; HECKMAN, J.D. Poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) for tissue-cell-seeded construction. **Mat. Sci. Forum**, v.250, p.115-128, 1997.
- AMBROSIO, L.; PELUSO, G.; DAVIS, P.A. Biomaterials and their biocompatibilities. In: WISE D.L.; ALTOBELLI, D.E.; YASZEMSKI, M.J.; GRESSER, J.D. **Human Biomaterials Applications**, New Jersey: Hummana Press Inc., 1996, 423p.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP). **Glossary of periodontal terms**. 3.ed. Chicago: AAP, 1992. 50p.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP) - Department of Scientific, Clinical and Educational affairs. **Periodontal regeneration: Research, Science and Therapy Committee**. Chicago: AAP, 1993, 11p.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY (AAP) - Department of Scientific, Clinical and Educational affairs. Tissue banking of allografts used in periodontal regeneration (Position paper): Research, Science and Therapy Committee. **J. Periodontol.**, v.72, p.834-838, 2001.
- AMERICAN SOCIETY OF METALS (ASM) – AMERICAN SOCIETY OF METALS INTERNATIONAL HANDBOOK COMMITTEE. **Properties and selection iron, steels, polymer, and high-performance alloys**. v.1, 10.ed. ASM International Press. Ohio, 1990, 1063p.
- ARTZI, Z; NEMCOVSKY, C.E.; TAL, H.; DAYAN, D. Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: a comparative study in humans. **J. Periodontol.**, v.72, p.911-920, 2001.
- ARGENTO, M.A. **Análise histológica da reparação de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos preenchidos com hidroxiapatita**, tese mestrado, USP, 1998, 52p.
- ASPENBERG, P.; LINDQVIST, S.B. Ethylene oxide and bone induction. Controversy remains. **Acta Orthop. Scand.**, v.69, p.173-176, 1998.
- BAGAMBISA, F.B.; KAPPERT, H.F.; SCHILLI, W. Cellular and molecular biological events at the implant interface. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v.22, p.12-17, 1994.

- BARNEY, V.C.; LE VIN, M.P.; ADAMS, D.F. Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study. **J. Periodontol.**, v.57, p.764-770, 1986.
- BARRETO, E.M.G.; SANTOS PINTO, R.; OKAMOTO, T. Influência da vitamina D3 no processo de reparo em ferida de extração dental. Estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Odont. UNESP**, v.11, p.91-100, 1982.
- BECKER W., LYNCH, S.E.; LEKHOLM. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-1 or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. **J. Periodontol.**, v.63, p.929-940, 1992.
- BECKER, W; BECKER, B.E. CAFFESE, R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. **J. Periodontol.**, v.65, p.1128-1133, 1994.
- BECKER, W.; CLOKIE, C.; SENNERBY, L.; URIST, M.R. BECKER, B.E. Histologic finding after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: Case reports. **J. Periodontol.**, v.69, p.414-421, 1998.
- BESSEA, L.; COULOMB, B.; LEBRTON-DECOSTER, C.; GIRAUD-GUILLE, M.M. Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture. **Biomat.**, v.23, p.27-36, 2002.
- BESHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Analysis of bone morphogenetic protein (BMP) derived from human and bovine bone matrix. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.268, p.226-234, 1991.
- BOLANDER, M.E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.89, p.165-170, 1992.
- BOWERS, G.M.; VARGO, J.W.; LEVY, B.; EMERSON, J.R.; BERGQUIST, J.J. Histologic observation following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. **J. Periodontol.**, v.57, p.286-293, 1986.
- BRUDER, S.P.; FINKER, D.J.;CAPLAN, A.L.; Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J. Cel. Biochem.**, v.56, p.283-294, 1994.
- BRUNEL, G.; BROCARD, D.; DUFFORT, J.F.; JACQUET, E.; JUSTUMUS, P.; SIMONET, T.; BENQUÉ, E. Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases. **J. Periodontol.**, v.72, p.257-264, 2001.
- BRUNET, M.; GUY, F.; PILBEAM, D.; MACKAYE, H.T.; LIKIUS, A.; AHOUNTA, D.; BEAUVILAIN, A.; BLODEL, C.; BOCHERENS, H.; BOISSERIE, J.R.; BONIS, L.; COPPENS, Y.; DEJAX, J.; DENYS, C.; DURINGER, P.; EISENMANN, V.; FANONE,

- G.; FRONTY, P.; GERAADS, J.; LEHMANN, T.; LIHOREAU, F.; LOUCHART, A.; MAHAMAI, A.; MERCERON, G.; MOUCHELIN, G.; OTERO, O.; CAPOMANES, P.P.; LEON, M.P.; RAGE, J.C.; SAPANET, M.; SCHUSTER, M.; SUDRE, J.; TASSY, P.; VALENTIN, X.; VIGNAUD, P.; VIRIOT, L.; ZAZZO, A.; ZOLLIFER, C. New hominid from the upper miocene of chad, central africa. **Nature**, v.418, p.145-151, 2002.
- BYE, F; KRAUSE, M.E.; REGEZI, J.A.; CAFFESSE, R.G. Histological evaluation of periodontal implants in a biologically "closed" model. **J. Periodontol.**, v.58, p.110-114, 1987.
- CAI, K.; YAO, K.; CUI, Y.; YANG, Z.; LI, X.; XIE, H.; QING, T.; GAO, L. Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. **Biomat.**, v.23, p.1603-1611, 2002.
- CARRANZA, F.; KENNEY, E.; LEKOVIC, V.; TALAMANTE, E.; VALENCIA, J.; DIMITRIJEVIC, B. Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxyapatite implant. **J. Periodontol.**, v.58, p.682-688, 1987.
- CHEN, C.C.; CHUEH, J.Y.; TSENG, H.; HUANG, H.M.; LEE, S.Y. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomat.**, v.24, p.1167-1173, 2003.
- COCKBURN, A.; COCKBURN, E. **Mummies, Diseases and Ancient Cultures**. New York, Cambridge University Press, 1995, 342p.
- COLARES-BUZATO, C.B. Junções celulares. In: CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**. Ed. Manole Ltda., Barueri, S.P., 2001, p.57-76.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.Y.; ROBBINS. **Robbins patologia estrutural e funcional**, 5.ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., 1997, 980 p.
- CURY, P.R., SALLUM, E.A.; NOCITI Jr., F.H.; SALLUM, A.W.; JEFFCOAT, M.K. Long-term results of guided tissue regeneration therapy in the treatment of class II furcation defects: A randomized clinical trial. **J. Periodontol.**, v.74, p.3-9, 2003.
- DE GROOT, K. Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties. In: DE GROOT, K. **Bioceramics of calcium phosphate**. Florida: C.R.C. Press., 1983, p.99-111.
- DELUSTRO, D.; DASCH, J.; KEEFE, J.; ELLINGSWORTH, L. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. **Clin. Orthop.**, v.260, p.263-279, 1990.
- DENG, X.; HAO, J.; WANG, C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide acid) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals. **Biomat.**, v.22, p.2867-2873, 2001.

- DENISSEN, H.W.; DE GROOT, K.; MAKKES, P.C.; VAN DER HOFF, A.; KLOPPER, P.J. Tissue response to dense apatite implants in rats. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.14, p.713-721, 1980.
- DENISSEN, H.W.; VELDUIS, A.A.H.; JANSEN, H.W.B.; HOOF, A. The interface of perimucosae dense apatite ceramic implants in humans. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.18, p.157-154, 1984.
- DEWEZ, J.L.; LHOEST, J.B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C.C.; VINCENT, L.M.; SCHNEIDER, Y.J.; BERTRANT, P.; ROUXHET, P.G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomat.**, v.19, p.1441-1445, 1998.
- DI TIZIO, V; FERGUSON, G.W; MITTELMAN, M.W.; KHOURY, A.E.; BRUCE, A.W., Di COSMO, F. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. **Biomat.**, v.19, p.1877-1884, 1998.
- DROBECK, H.P.; SANFORD, S.R.; GUMAER, K.I.; SHERER, A.D.; SLIGTER, R.G. Histologic observation of soft tissue responses to implanted multifaceted particles and dense of hydroxyapatite. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.42, p.143-149, 1984.
- EL-AMIM, S.F.; LU, H.H.; KHAN, J.; BUREMS, J.M.; TUAN, R.S. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. **Biomat.**, v.24, p.1213-1221, 2003.
- EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 255Sup., p.S7-S21, 1998.
- EL DEEB, M.E.; TOMPACH, P.C.; MORSTAD, A.T. Porous hydroxyapatite granules and blocks as alveolar ridge augmentation material: A preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.46, p.955-970, 1988.
- ETTEL, R.G.; SHAFER, E.M.; HOLPUCH, R.C.; BANDT, C.L. Porous Hydroxyapatite Grafts in Chronic Subcrestal Defects in Rhesus Monkeys: A histological Investigation. **J. Periodontol.**, v.60, p.342-351, 1989.
- FARIA, J.L. Aparelho locomotor. Ossos articulações bolsas. In: FARIA, J.L. **Patologia Especial com aplicações clínicas**. 2.ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., 2001, 893p.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for F.D.A. and industry. Medical devices containing materials derived from animal sources (Except for in vitro diagnostic devices)** Center for Devices and Radiological Health / C.D.R.H. Rockville, 1998, 6p.

- FRANK, R.M.; KLEWANSKY, P.; HEMMERLE, J.; TENNENBAUM, H. Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p.669-680, 1991.
- FROUM, S.J.; STHAL, S.S. Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. II. 13 to 18 months. **J. Periodontol.**, v.58, p.102-109, 1987.
- FROUM, S.J.; TARNOW, D.P.; WALLACE, S.S.; ROHRER, M.D.; CHO, S.C. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis-Part 2 of an ongoing prospective study. **Int. J. Perio. Rest. Dent.**, v.18, p.528-43, 1998.
- GANELES, J.; LISTGARTEN, M.A.; EVIAN, C.I. Ultrastructural of durapatite tissue interface in human intrabony defects. **J. Periodontol.**, v.57, p.133-140, 1986.
- GALGUT, P.; PITROLA, R.; WAITE, I. Histologic evaluation of biodegradable and non-degradable membrane placed transcutaneously in rats. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, p.581-586, 1991.
- GILDING, D; REED, A.M. Biodegradable polymer for use in surgery – polyglycolic / poly (lactic acid) homo and copolymers. **Polymer.**, v.20, p.1459-1464, 1979.
- GILDING, D.K. Biodegradable polymers. in: WILLIAMS, D.F. **Biocompatibility of clinical implant materials**. v.2, CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., 1981, 228p.
- GIRAUD-GUILLE, .M.M., BESSAU, L. Banded patterns in liquid crystalline phases of type I collagen: relationship with crimp morphology in connective tissue architecture. **Connect. Tissue Res.**, v.37, p.183-193, 1998.
- GRAZIANI, M. Cirurgia dos cistos paradentários, in GRAZIANI, M. **Cirurgia Buco Maxilo Facial**, 7.ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., 1986, p.89-114.
- GUYTON, H.T; HALL, J.D. **Tratado de fisiologia médica**, 10.ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., 2002, 1003p.
- HEIDEMANN, W.; SCHUBBERT, S.J.; RUFFIEUX, K.; FISCHER, J.H.; JUNG, H.; KRUEGER, WINTERMANTEL, E.; GERLACH, K.L. pH- stabilization of pre degraded PDLLA by an admixture of water-soluble sodium hydrogen phosphate-results an in vitro- and on vivo- study. **Biomat.**, v.23, p.3567-3574, 2002.
- HIATT, W.H.; GENCO, R.J. Regeneration therapy in periodontics. In: GENCO, R.J.; GOLDMAN, H.M.; COHEN, W. **Contemporary periodontics**, C.V. Mosby Company, New York, N.Y, U.S.A., 1997, 726p.

- HOFFMANN, J.; TRITZSCH, D.; GUICHER, D.; ADAM, C.; REINERT, S. Significance of biodegradable implants in case of midfacial fractures. **Biomed. Tech. (Berl.)**, v.47 Suppl., p.496-499, 2002.
- HOLMES, R.E.; HAGLER, H.K. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstitution: A histometric study. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.81, p.662-671, 1988.
- HYADA, R.A.; BRIGHTON, C.T.; ESTERHAI Jr, J.L. Pathophysiology of delayed healing. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.355s, p.31S-40S, 1998.
- ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE-KRUGER, G.M.; YASZEMSKI, M.J. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomater.**, v.19, p.1405-1412, 1998.
- JARCHO, M. Biomaterials of calcium phosphates. Properties and applications. **Dent. Clin. North Amer.**, v.30, p.25-47, 1986.
- JEFFCOAT, M.K.; MEGUIRE, M.; NEWMAN, M.G. Evidence highlights from the 1966 World Workshop in Periodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.128, p.713-724, 1997.
- JERGESEN, H.E.; CHUA, J.; KAO, R.T.; KABAN, L.B. Age effects on bone induction by demineralized bone powder. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.268, p.253-259, 1991.
- KANABUDA, C.; OZDEMIR, O.; TOSUN, T.; ANIL, A.; OLGAC, V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **J. Periodontol.**, v.72, p.1436-1442, 2001.
- KASTEN, P.; LUGINBUHL, R.; VAN GRIENSVEN, M.; BARKHASEN, T.; KRETEK, C.; BOHNER, M.; BOSCH, U. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. **Biomater.**, v.15, p.2593-2603, 2003.
- KEENE, H. **History of Dental Caries in Human Populations: The First Million Years.** Symposium and Workshop on Animal Models in Cariology, Sturbridge, Massachusetts, Teem Hulfmann Press, 1980, 56p.
- KIRKER-HEAD, C.A.; GERHAR, T.N.; ARMSTRONG, R.; SCHELLING, S.H.; CARMEL, L.A. Healing bone recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. **Clin. Ortho. Relat. Res.**, v.4, p.205-217, 1998.
- KLAWITTER, J.J.; HULBERT, S.F. Application of porous ceramics for the attachment of loads bearing internal orthopedic applications. **J. Biomed. Mater. Res. Symp.**, Part I. v.6, p.161-229, 1972.

- KLINGE, B.; ALBERIUS, P.; ASAKSSON, S.; JONSSON, J. Osseous responses to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.241-249, 1992.
- KRANE, S.M.; NEER, R.M. Tecido conjuntivo. In: DMITH Jr., L.H.; THIER, S.O. **Fisiopatologia. Os princípios biológicos da doença**, 2.ed., Ed. Médica Panamericana, São Paulo, S.P., 1998, 1263p.
- KUDRYK, V.L.; SCHEIDT, M.J.; McQUADE, M.J.; SUTHERLAND, D.E.; Van DYKE, T.E.; HOLLINGER, J.O. Toxic effect of ethylene-oxide-sterilized freeze-dried bone allograft on human gingival fibroblasts. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.26, p.1477-1488, 1992.
- KULKARNI, R.K.; PANI, K.C.; NEUMAN, C.; LEONARD, F. Polylactic acid for surgical implants. **Arch. Surg.**, v.93, p.839-843, 1966.
- LARSEN, C.; MATTER, R.; GEBO, D. **Human Origins The Fossil Record**. 2.ed. Prospect Heights: Waveland Press, 1991, 112p.
- LEENSALAG, J.W.; PENNING, A.J.; BOS, R.R.M.; ROZEMA, F.R.; BOERING, J. Resorbable materials of poly(L-lactide). VI. Plates and screws for internal fracture fixation. **Biomater.**, v.8, p.70-73, 1987.
- LE GEROS, R.Z. Calcium phosphate biomaterials in preventive and restorative dentistry. In: LE GEROS, R.Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. Basel: Karger A.G., 1991, 201p.
- LEHTINEN, R.; KUUSILEKTO, A.; NIKKANEN, U.M. Bone response to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.48, p.107-108, 1990.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; KLOKKEVOLD, P.R.; WEINLAENDER, M.; KENNEY, E.B.; DIMITRIJEVIC, B.; NEDIC, M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. **J. Periodontol.**, v.69, p.1044-1049, 1998.
- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; WEINLAENDER, M.; NIKOLA, V.; DJORDJEVIC, M.; KENNEY, E.B. The Use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with an autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. **J. Periodontol.**, v.72, p.1157-1163, 2001.
- MAGNUSSON, I.; BATICH, C.; COLLINS, B.R. New attachment formation following tissue regeneration using biodegradable membranes. **J. Periodontol.**, v.59, p.1-7, 1988.
- MAINIL-VALET, P.; CURTIS, R.; GOGOLEWSKI, S. Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.36, p.360-380, 1997.

- MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V79 cells under apoptosis. **Genet. Mol. Biol.**, v.23, p.109-112, 2000.
- MARZZOCO, A; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, R.J., 1990, 245p.
- MELLO, M.L.S. Noções fundamentais de cariometria. In: MELLO, M.L.S. & vidal, B.C. **Práticas de Biologia celular**. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1980. p. 34-40.
- MELLONIG, J.T.; & LEVY, R.A. The effects of different particle sizes of freeze-dried bone allograft on bone growth. **J. Dent. Res.**, v.63, p.222-228, 1984
- MINABE, M.; SUGAYA, A.; SATOU, H.; TAMURA, T.; OGAWA, Y.; HORI, T.; WATANABE, Y. Histological study of the hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal defects in dogs. **J. Periodontol.**, v.59, p.671-678, 1988.
- MIDDLETON, J.C.; TRIPTON, J.A. Synthetic biodegradable polymers as medical devices, **Med. Plast. Bio. Mag.**, v.3, p.275-282, 1998.
- MIDWOOD, K.S.; WILLIAMS, L.V.; SCHWARRZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.36, p.1031-1037, 2004.
- MURAKAMI, N.; SAITO, N.; HORIUCHI, H.; OKADA, T.; NOZAKI, K. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP) and a synthetic polymer. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.62, p.169-174, 2003.
- NASR, H.F.; AICHELMANN-REIDY, M.E.; YUKNA, R. Bone and bone substitutes. **Periodontol.** **2000**, v.19, p.74-86, 1999.
- NIELSEN, I.M.; ELLGARD, B.; KARRING, T. Kielbone® in new attachment attempts in humans. **J. Periodontol.**, v.52, p.723-728, 1981.
- NUNAMAKER, D.M. Experimental models of features repair. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.355Sup., p.S56-S65, 1998.
- OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenegis. In AMERICAM ACADEMY of PERIODONTOLOGY (AAP). **Annals of periodontology – 1996 World workshop in periodontics**. A.A.P., Chicago, IL, v.1, 1996, 821-878.
- PAGE, D.G.; LASKIN, D.M. Tissue response a the bone-implant interface in a Hydroxyapatite augmented mandibular ridge. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.45, p.356-358, 1987.
- PAPAPANOU, P.N. Periodontal Disease: Epidemilogy. In AMERICAM ACADEMY of PERIODONTOLOGY (AAP). **Annals of periodontology – 1996 World workshop in periodontics**. A.A.P., Chicago, IL, v.1, 1996, p.1-36.
- PEREIRA, S.L.S.; SALLUM, A.W.; CASATI, M.Z.; CAFFESSE, R.G.; WENT, D.; NOCITI Jr.,

- F.H.; SALLUM, E.A. Comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A histomorphometric study in dogs. **J. Periodontol.**, v.71, p.1306-1314, 2000.
- PÉREZ-LUNA, V.H.; HORBETT, T.A.; RATNER, B.D. Developing correlation between fibrinogen adsorption and surface properties using multivariate statistics. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.28, p.111-1126, 1994.
- PIECUCH, J.F. Extraskelatal implantation of a porous hydroxyapatite ceramic. **J. Dent. Res.**, v.61, p.1458-1460, 1982.
- PINHOLT, E.M.; RUYTER, I.E.; HAANAES, H.R.; BANG, G. Chemical, physical and histologic studies on four commercial apatites used for alveolar ridge augmentation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.859-867, 1992.
- PINHOLT, E.M.; KNOW, P.H.J. The effect of therapeutic radiation on canine alveolar ridges augmented with hydroxyapatite. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.250-254, 1992.
- PISTNER, H.; BENDIX, D.R.; MÜHLING, J.; REUTHER, J.F. Poly(L-Lactide): A long-term degradation study in vivo. Part I biological results, **Biomat.**, v.14, p.671-677, 1993.
- QUATTLEBAUM, J.B.; MELLONIG, J.T.; HENSEL, N.F. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. **J. Periodontol.**, v.59, p.394-397, 1988.
- RAVI KUMAR, M.N.V.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. **Biomat.**, v.25, p.1771-1777, 2004.
- REDDI, A.H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.69, p.1601-1605, 1972.
- REDDI, A.H. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.4, p.850-855, 1992.
- REDDI, A.H. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.355S, p.66-72, 1998.
- RICCI, J.L.; BLUMENTAL, N.C.; SPIVAK, J.M.; ALEXANDER, H. Evaluation of a low-temperature calcium phosphate particulate implant material: Physical-chemical proprieties and in vivo bone response. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.50, p.969-978, 1992.
- RICHARDSON, C.R.; MELLONIG, J.T.; BRUNSVOLD, M.A.; McDONNELL, H.T.; COCHRAN, D.L. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J. Clin. Periodontol.**, v.26, p.421-428, 1999.

- ROSEN, P.S.; REYNOLDS, M.A. Guide bone regeneration for dehiscence and fenestration defects on implants using an absorbable polymer barrier. **J. Periodontol.**, v.72, p.250-256, 2001.
- ROSENTHAL, R.K.; FOLKMAN, J.; GLOWACKI, J. Demineralized bone implants for nonunion fractures, bone cysts, and fibrous lesions. **Clin. Orthop.**, v.364, p.61-69, 1999.
- ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, D; Van ASTEN, J.A.A.M.; NIJENHULS, A.J.; PENNING, A.J. The effects of different steamsterilization programs on material properties of poly(L-lactide). **J. Appl. Biomat.**, v.2, p.23-28., 1991.
- SAUBERLICH, H.E. Pharmacology of vitamin C. **Ann. Rev. Nutr.**, v.14, p.371-391, 1994.
- SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Importance of geometry of extracellular matrix in endochondral bone differentiation, **J. Cell. Biol.**, v.98, p.2192-2197, 1984.
- SAPKOS, S.M. The use of periograft in periodontal defects. Histologic findings. **J. Periodontol.**, v.57, p.7-13, 1986.
- SCHMITT, J.M.; HWANG, K.; WINN, R.; HOLLINGER, J.O. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance, **J. Orthop. Res.**, v.17, p.269-278, 1999.
- SCHWARTZ, Z.; SOMMERS, A.; MELLONIG, J.T. CARNES Jr., D.L.; DEAN, D.D.; COCHRAN, D.L.; BOYAN, B.D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. **J. Periodontol.**, v.69, p.470-478, 1998.
- SCOPP, I.W.; KASSOUNY, D.Y.; MORGAN, F.H. Bovine bone (Boplant). **J. Periodontol.**, v.35, p.400-407, 1966.
- SCOTT, C.K.; HIGHTOWER, J.A. The matrix of endochondral bone differs from matrix of intramembranous bone. **Calcif. Tissue Int.**, v.49, p.349-354, 1991.
- SEIBERT, J.S. Surgery treatment of bone defects and deformity. In: GOLDMAN, H.M. & COHEN, D.W. **Periodontal Therapy**, 6 ed., C.V. Mosby Company, St Louis, MS, 1983, 1114p.
- SHKLAR, G. The prehistoric era and early civilizations. In: CARRANZA, F; SHKLAR, G. **History of Periodontology**, Quintessence Publishing Co., Carol Stream, IL, USA, 2003, 214p.
- SICHER, H; Du BRUL, E.L. **Oral Anatomy**, 8.ed. C.V. Mosby Comp., Saint Louis, USA, 1992, 551p.
- SIMONDES, R.J.; HOLMBERG, S.D.; HURWITZ R.L. Transmission of human immunodeficiency virus type I from a seronegative organ and tissue donor. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.726-732, 1992.

- STEFFENS, G.C.M.; NOTHDURFT, L.; BUSE, G.; THISSEN, H.; HÖCKER, H.; KLEE, D. High density binding of proteins and peptides to poly(D,L-lactide) grafted with polyacrylic acid. **Biomat.**, v.23, p.3523-3531, 2002.
- STÄHELIN, A.C.; WEILER, A.; RÜFENACTH, H.; HOFFMANN, R.; GEISSMANN, A.; FEINSTEIN, R. Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases. **Arthroscopy**, v.13, p.238-244, 1997.
- SYFTESTAD, G.; URIST, M.R. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. **Clin. Orthop.**, v.141, p.281-288, 1979.
- SZYCHER, M. **Szycher's dictionary of biomaterials and medical devices**, Technomic Publ. Comp., Lancaster, PA, USA, 1992, 258p.
- TARCHA, P.J. **Polymer Controlled Drug Delivery**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1991, 291p.
- TATAKIS, D.N.; TROMBELLI, L. Gingival recession treatment: guided tissue regeneration with bioabsorbable membrane versus connective tissue graft. **J. Periodontol.**, v.71, p.299-307, 2000.
- TEIXEIRA, R.G.; VIDAL, B.C; LIMA, L. Reposicionamento cirúrgico de um segundo molar inferior direito impactado. **J. Bras. Ortod. Ortop. Fac.**, v.5, p.76-82, 2000.
- TETI, A; TARQUILLO, Q.; GRANO, M; COLUCCI, S.; LAFORGIA, A.; MANGINI, F.; ZALLONE, A.Z. Effects of calcium-phosphate based materials on proliferation and alkaline phosphate activity of newborn rat periosteal cells in vitro. **J. Dent. Res.**, v.70, p.997-1001, 1991.
- TRACY, R.M.; DOREMUS, R.H. Direct electron microscopy studies of bone-hydroxyapatite interface. **J. Biomed. Mat. Res.**, v.18, p.719-726, 1984.
- TREJO, P.M.; WELTMAN, R.; CAFESSE, R. Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. **J. Periodontol.**, v.71. p.1852-1861, 2000.
- TUNC, D.C.; JADHAY, B. Development of absorbable. Ultra-high-strength polylactides. **Polym. Mater. Sci. Eng.**, v.59, p.383-387, 1988.
- UPTON, J.; BOYAJIAN, M.; MULLIKEN, J.B.; GLOWACKI, J. The use of demineralized xenogeneic bone implants to correct phalangeal defects: a case report. **J. Hand. Surg. [Am.]**, v.9, p.388-391, 1984.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.698, p.893-899, 1965.

- USUI, Y.; ZERWEKH, J.E.; VANHARANTA, H.; ASHMAN, R.B.; MOONEY, V. Different effects of mechanical vibration on bone ingrowths into porous hydroxyapatite and fracture healing in a rabbit model. **J. Orthop. Res.**, v.7, p.559-567, 1989.
- Van KREVELEN, D.W. Crystallinity of polymers and the means to influence the crystallization process, **Chimia**, v.32, p.279-294, 1978.
- VACHIRAMON, A.; WANG, W.C.; VACHIRAMON, T. Delayed immediate single-step maxillary sinus lift using autologous fibrin adhesive in less than 4-millimeter residual alveolar bone: a case report. **J. Oral. Implantol.**, v.28, p.189-193, 2002.
- VALENTINI, P.; ABENSUR, D.J. Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v.18, p.556-602, 2003.
- VAN SCHELDREGT, A.; RADERR, A.M.; de GROOT, K.; Van BLITLERSWIJK, C.A. In vitro biocompatibility testing of polylactides. Part I: proliferation of different cell types. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.3, p.365-370, 1992.
- VAN SLIEDRGT A.; KNOOK, M.; HESSELING, S.C.; KOERTEN, H.K.; DE GROOT, K.; VAN BITTERSWIJK, C.A. Cellular reaction on the intraperitoneal injection of four types of polylactide particulates. **Biomater.**, v.13, p.819-824, 1992.
- VERT, M.; CHABOT, F. Stereoregular biosorbable polyesters for orthopedics surgery. **Makromol.**, v.5, p.30-41, 1981.
- WALTER, E.; MOELLING, K.; PAVLOVIC, J.; MERKLE, H.P. Microencapsulation of DNA using poly(DL-Lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, **J. Cont. Rel.**, v.61, p.361-374, 1999.
- WANG, J.; GLIMCHER, M.J.; MAH, J.; ZHOU, H.Y.; SALIH, E. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects, **J. Clin. Orthop. Sur. Res.**, v.22, p.621-628, 1998.
- WAKE, M.C.; GERECHT, P.D.; LU, L.; MIKOS, A. Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived. **Biomater.**, v.19, p.1255-1268, 1998.
- WEIR, N.A.; BUCHANAN, F.J.; ORR, J.F.; FARRAR, D.F.; BOYD, A. Processing annealing and sterilization of poly-lactide. **Biomater.**, 2003. In Press. Corrected Proof, available online 10 December.
- WHITE, E.; SHORS, E.C. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. **Dent. Clin. North Am.**, v.30, p.49-67, 1986.
- WILLIAMS, D.F. The biocompatibilities and clinical uses of calcium phosphate ceramics. In: WILLIAMS, D.F. **Biocompatibility of tissue analogs**. C.R.C. Press Florida, v.2, p.44-65, 1985.

- WILSON, J.; HENCH, L.L. **Bioactive ceramics, calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics**. Boca Raton: CRC Press, v.2, 1990, 233p.
- YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhance cell affinity of poly (D,L-Lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomat.**, v.23, p.2607-2614, 2002.
- YING YIP, E.Y.; WANG, J.; WANG, C.H. Sustained release system for highly water-soluble radiosensitizer drug etanidazole: irradiation and degradation studies. **Biomat.**, v.24, p.1977-1987, 2003.
- YUKNA, R.A.; CALLAN, D.P.; EVANS, G.H.; AICHELMANN-REIDY, M.E.; MOORE, K.; CRUZ, R.; SCOTT, J.B. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects.6-month results. **J. Periodontol.**, v.69, p.655-663, 1998.
- YUKNA, R.A.; KRAUZER, J.T.; EVANS, G.H.; CRUZ, R.; MARTIN, M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. **J. Periodontol.**, v.71, p.1671-1679, 2000.
- YUKNA, R.A.; KRAUSER, J.T.; CALLAN, D.P.; EVANS, G.H.; CRUZ, R.; MARTIN, M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. **J. Periodontol.**, v.73, p.123-128, 2002.
- ZHANG, Q.; OLIVER, C.; DELLOYE, C. Ethylene oxide does not exiting the osteoindutivo capacity of demineralized bone. **Acta Orthop. Scand.**, v.68, p.104-108, 1997.
- ZILIS, T.; MARK, D.E.; CERBAS, E.L.; HOLLINGER, J.O. Scanning electron microscopic study of cell attachment to biodegradable polymer implants. **J. Oral Implantol.**, v.15, p.160-167, 1989.