

# NOVO BIOMATERIAL COMPOSTO DE EVA (POLIETILENO-CO ACETATO DE VINILA) PARA ENXERTO “ONLAY” EM TECIDO ÓSSEO

*New biomaterial composed of EVA (polyethylene-co-vinyl acetate) for onlay grafting in bone tissue*

Brenda Froes<sup>1</sup>

Leandro A. Holgado<sup>2</sup>

Rebeca D. Simões<sup>3</sup>

Daniel Velasco Nieto<sup>4</sup>

Miguel Angel Rodriguez Perez<sup>4</sup>

Angela Kinoshita<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Odontologia, Universidade do Sagrado Coração - USC, Bauru, SP.

<sup>2</sup>Mestre em Biologia Oral, Cirurgião-dentista, Universidade do Sagrado Coração - USC, Bauru, SP.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências e Engenharia, Tupã, SP.

<sup>4</sup>University of Valladolid (UVA), Valladolid, Espanha

<sup>5</sup>Professora Doutora da Universidade do Sagrado Coração - USC, Bauru, SP.

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto “onlay” em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

## RESUMO

**Introdução:** o EVA (polietileno-co acetato de vinila) é um tipo de espuma, com baixo custo e ampla gama de aplicações. Misturas de EVA e amido proporcionam diferentes tipos de estrutura porosa favorecendo seu uso como *scaffold* para regeneração tecidual óssea.

**Objetivo:** resultados prévios mostraram reação tecidual favorável ao seu uso como biomaterial, sendo assim, os mesmos foram investigados para fins de regeneração óssea. **Método:** nesse trabalho, 22 ratos linhagem *Wistar* foram divididos em dois grupos (4 destinados ao experimento piloto e 18 destinados ao projeto). Primeiramente, 4 animais foram submetidos à cirurgia na calota craniana para en-

Recebido em: 01/12/2017

Aceito em: 26/01/2018

xerto *onlay* em tecido ósseo dos biomateriais: 1) EVA com amido a 15% espumado em alta pressão com ultrassom (EVAMCU), 2) EVA espumado em alta pressão com ultrassom (EVACU), 3) EVA espumado em alta pressão sem ultrassom (EVASU), 4) EVA com amido a 15% espumado em alta pressão sem ultrassom (EVAMSU). Após 30 dias do pós-operatório, os biomateriais EVACU e EVAMCU apresentaram resultados microscópicos com fibrovascularização favorável e bom desempenho. Em sequência, 18 ratos foram submetidos à cirurgia de enxerto e após 7, 14 e 90 dias, 6 animais foram submetidos à eutanásia para coleta dos biomateriais e tecidos adjacentes da calota craniana. Foi realizada análise qualitativa da região de fibrovascularização, bem como do possível potencial osteogênico da região ao redor dos biomateriais ao longo dos períodos. **Resultados e Conclusão:** os biomateriais testados demonstraram biocompatibilidade e capacidade para regeneração óssea, no entanto, mais estudos precisam ser realizados, como por exemplo, em defeitos ósseos bicorticais.

**Palavras-chave:** Regeneração tecidual. Biomaterial. EVA (polietileno-co acetato de vinila). Amido de milho. *Scaffold*. Enxerto *onlay*.

## ABSTRACT

**Introduction:** *the EVA (polyethylene-co-vinyl acetate) is a kind of foam with low cost and wide range of applications. EVA and starch mixtures provide different types of porous structure favoring its use as scaffold for bone tissue regeneration.* **Objective:** *Previous results showed tissue reaction favorable to its use as biomaterial, and thus, they were investigated for purposes of bone regeneration.* **Method:** *in this study, 22 male Wistar rats were divided into two groups, 4 of them for the pilot experiment and 18 for the project. First, 4 animals underwent surgery on the skull cap for onlay graft in bone tissue of the biomaterials: 1) EVA with starch to 15% foamed at high pressure with ultrasound, 2) EVA foam at high pressure with ultrasound, 3) EVA foam for high pressure without ultrasound, 4) EVA with 15% starch foamed at high pressure without ultrasound). The results were evaluated microscopically 30 days after surgery and the biomaterials EVACU and EVAMCU presented good performance with favorable fibrovascularization. Eighteen rats were submitted to graft surgery and after 7, 14 and 90 days, 6 animals were submitted to euthanasia for the collection of biomaterials and adjacent tissues of the skullcap. A qualitative analysis of the*

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

*region of fibrovascularization was performed, as well as the potential osteogenic based on the microscopic findings of the region surrounding the biomaterials throughout the periods. Results and Conclusion: the biomaterials tested demonstrated biocompatibility and capacity for bone regeneration, however, more studies need to be performed, for example, on bicortical bone defects.*

**Keywords:** *Tissue regeneration. Biomaterial. EVA (polyethylene-co vinyl acetate). Corn starch. Scaffold. Graft onlay.*

## INTRODUÇÃO

Os biomateriais são todas substâncias, excluindo medicamentos, que podem fazer parte de um sistema, o corpo, objetivando a reposição da parte perdida por dano acidental ou destruição por processos patológicos seja em seres humanos ou em animais (BHAT, KUMAR, 2013; RECUM, LABERGE, 1995).

Em adultos, em se tratando de reparo de tecido ósseo, apenas os defeitos pequenos são capazes de realizar este processo de forma espontânea. Portanto, existem situações clínicas que vão além do pequeno defeito e precisam ser reconstruídos: trauma, regiões de osteotomia, ressecção oncológica, infecções ou anomalias de desenvolvimento dentre outros desafios enfrentados na área da saúde aplicada à odontologia (GIANNOUDIS, EINHORN, MARSH, 2007; PORTO *et al.*, 2012).

Além disso, sabe-se que após a extração de um dente, deixar o alvéolo sem o emprego de enxertos ósseos em seu interior ocasionará logo em um processo de reabsorção óssea em sentido horizontal e vertical dificultando a futura inserção de implantes bem como a restauração da estética do paciente em procedimentos de reabilitação oral. Os resultados obtidos com o uso de enxertos aloplásticos (biomateriais) demonstraram também ajudar na preservação da tábua óssea alveolar, bem como possibilitam harmonização e estética na restauração ao utilizar-se de implante dentário (BAHAT, 1993; CALASANS, FERNANDES, GRANJEIRO, 2008).

Em situações fisiológicas de fratura o processo de reparo ósseo é dividido em quatro fases: inflamação, formação de calo mole, formação de calo duro e remodelação. Vascularização adequada, estabilidade mecânica, dimensão da área a regenerar e ausência de outras linhagens celulares proliferativas são características do meio essenciais para que o processo regenerativo ocorra adequadamente. Na fase da inflamação, com a presença de um hematoma na região

de fratura, a angiogênese libera o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) encaminhando a formação de uma rede de capilar que permite o início da osteogênese com o devido suprimento de nutrientes. Entretanto, previamente a formação do tecido ósseo em si, ainda na fase de inflamação, o estabelecimento de células inflamatórias e de células da linhagem fibroblástica e endotelial ao redor da zona de fratura gera um tecido de granulação formado pela deposição de substâncias: colágeno tipo I, fibronectina, proteoglicanas, ácido hialurônico, e colágeno tipo III. Na região do hematoma, que será reabsorvido, haverá deposição de tecido vascular fibroso e processos de neovascularização caracterizando a fase formação de calo mole. Pela deposição de osteoide os osteoblastos farão a subsequente mineralização e o processo de ossificação segue normal se os ossos estiverem fixados de maneira correta (formação de calo duro). Por último, a remodelação óssea, devolve a forma correta, estrutura e função do tecido ósseo com as devidas propriedades biomecânicas e biológicas pertencentes ao tecido ósseo original (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; COWIND, HEGEDUS, 1976).

Os biomateriais *scaffolds*, matrizes tridimensionais, denominados assim por sua forma e tamanho, auxiliam células isoladas a regenerarem tecidos ao delimitar o contorno do mesmo e assim promover integridade estrutural até o tecido neoformado ter condições para sua autossustentação. Aplicado em tecido ósseo, a matriz extracelular no interior interage com as células osteoprogenitoras e com os fatores de crescimento e de diferenciação celular estimulando a capacidade natural de regeneração (FREED *et al.*, 1994).

Comumente, três grupos individuais de biomateriais são usados na fabricação de *scaffolds* para a engenharia de tecidos: polímeros sintéticos, polímeros naturais e cerâmicas. Adentro ao primeiro grande grupo temos como exemplo os biomateriais poliestireno, ácido poli-L-lático (poly-L-lactic acid – PLLA), ácido poli-glicólico (poly glycolic acid – PGA) e PTFE-e (politetrafluoretileno). A quitosana, o colágeno e a fibronectina estão no grupo dos polímeros naturais e biomateriais como hidroxiapatita (HA) e fosfatos de tricálcio (TCP) são exemplos de cerâmicas de enxertia aplicadas no conceito de *scaffold* e frequentemente utilizados na prática clínica odontológica (O'BRIEN, 2011; BARBANTI, ZAVAGLIA, DUEK, 2005; SEGUNDO, VASCONCELOS, 2007).

Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, não devendo causar respostas inflamatórias a corpo estranho ou reações tóxicas, ter propriedades mecânicas estreitamente condizentes quando comparadas ao de tecido ósseo, bem como possuir mecanismos para permitir difusão acondicionada ou não a transporte de íons e nutrientes. Forte

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

afinidade com o tecido do hospedeiro, crescimento ósseo dinâmico, crescimento vascular interno e biodegradação dos biomateriais *scaffolds* são também desejáveis (OH et al., 2015).

A arquitetura do *scaffold* influencia diretamente no funcionamento e atuação de células e substâncias para crescimento do tecido. Uma estrutura interligada servirá como guia dos resíduos e produtos de degradação para fora do *scaffold*. É importante, além disso, ser altamente poroso a fim de que ocorra penetração celular e adequada difusão de nutrientes (O'BRIEN, 2011).

Outro fator influente é o tamanho médio dos poros. Em um estudo da degradação *in vitro* de estruturas porosas de PLLA concluiu-se que o efeito autocalítico é observado em função da espessura da parede do poro sendo que quanto maior a espessura menor a difusão dos produtos ácidos de degradação e conseqüentemente maior a velocidade de perda da massa (LU et al., 2000).

Dentre os materiais utilizados como biomateriais, os do tipo polímeros têm grande potencial de uso uma vez serem geralmente fáceis de produzir e de manusear (BARBANTI, ZAVAGLIA, DUEK, 2005).

Vários estudos visando aumento de tecido ósseo têm usado os polímeros sintéticos como agentes de preenchimento de espaço a exemplo dos polímeros vítreos. No entanto, a literatura fornece poucos estudos sobre materiais espumosos à base de polímeros semi-cristalinos que utilizem dióxido de carbono subcrítico, como o material EVA (polietileno-co acetato de vinila) (SIMÕES, 2009).

O EVA é formado pelo encadeamento de sequências aleatórias de polietileno e poli acetato de (vinila) e são espumas com uma ampla gama de produtos, ou seja, fabricadas em escala industrial que estão presentes em materiais de isolamento térmico ou mecânico, equipamentos esportivos e sistemas de liberação de fármacos (SIMÕES, 2009).

Misturas contendo copolímero de etileno-acetato vinil (EVA) e amido de milho nativo mostram a diferença de densidade do EVA que depende em muito da quantidade de amido encontrado em sua composição e influenciam também na obtenção de tipos diversificados de estrutura celular porosa (fechada, parcialmente ou totalmente interligada) além de diferentes tamanhos de poros. A porcentagem de poros do tipo abertos aumenta na presença de ultrassom durante o processo de formação das espumas de EVA. No entanto, uma limitação própria de técnicas baseadas a gás na formação de espuma é a produção de poros com estruturas fechadas e/ou a falta de interligação entre os mesmos, características essas que devem ser analisadas com a resposta tecidual do organismo (SIMÕES, 2009).

Tomando essa premissa, este estudo teve como objetivo analisar morfologicamente a fibrovascularização e osteogênese promovida pelos biomateriais baseados em EVA através de enxerto *onlay* em ratos. Adicionalmente, pretendeu realizar análise histológica da interface EVA/tecido ósseo através de enxerto *onlay* em tecido ósseo dos biomateriais na calota craniana de ratos focando em regiões de fibrovascularização e osteogênese.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Sagrado Coração previamente a sua execução (Protocolo nº 2585100216)

As espumas de EVA foram preparadas em colaboração com a UNOESTE (Universidade do Oeste Paulista), sob coordenação da Profa. Dra. Rebeca Delatore Simões. Foram recortadas em discos de 5 mm de diâmetro e esterilizados com radiação gama na dose de 25kGy, no IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) (Figura 1).

Foram utilizados 22 ratos machos adultos *Wistar*, obtidos do Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC). Durante o período experimental os mesmos foram mantidos em caixas plásticas, alimentados com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura e luz controladas (ciclos de 12 horas). Os animais foram divididos em dois grupos sendo 18 destinados ao experimento e 4 para piloto.

Na primeira etapa, os 4 animais foram submetidos à cirurgia “piloto” na calota craniana de enxerto em tecido ósseo *onlay* dos biomateriais.

Em dois animais foram implantados, em cada lado da calota craniana, os seguintes biomateriais:

- 1) EVA com amido a 15% espumado em alta pressão com ultrassom (EVAMCU),
- 2) EVA espumado em alta pressão com ultrassom (EVACU),

Nos outros dois animais, os outros biomateriais:

- 3) EVA espumado em alta pressão sem ultrassom (EVASU),
- 4) EVA com amido a 15% espumado em alta pressão sem ultrassom (EVAMSU).

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto “*onlay*” em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. SALUSVITA, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

Os animais foram observados 30 dias após a cirurgia. Dessa forma, elegemos os dois biomateriais que proporcionaram maior fibrovascularização, dessa forma atuando como *scaffold*, que foram utilizados para o projeto.

Após a escolha dos biomateriais, 18 ratos foram submetidos à cirurgia de enxerto *onlay* em tecido ósseo a fim de analisar a fibrovascularização e o potencial osteogênico promovido por estes. Após 7, 14 e 90 dias, 6 animais foram submetidos à eutanásia para recolhimento dos biomateriais da calota do rato a fim de serem analisados morfologicamente a fibrovascularização e a osteogênese na região dos mesmos.

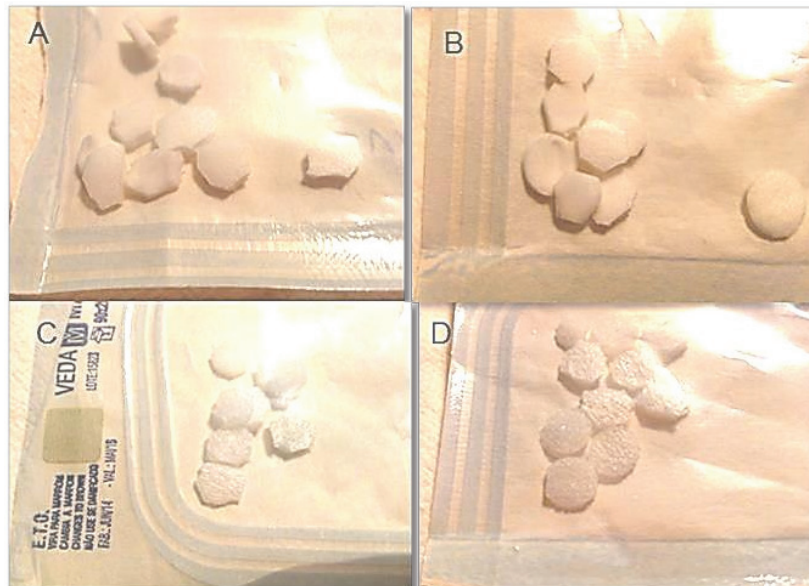


Figura 1 – Biomateriais EVA. Em A, EVA com amido a 15% espumado em alta pressão com ultrassom; em B, EVA com amido a 15% espumado em alta pressão sem ultrassom; em C, EVA espumado em alta pressão com ultrassom, em D, EVA espumado em alta pressão sem ultrassom.

Fonte: imagens obtidas pelos autores.

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Primeiramente, os quatro animais do experimento piloto foram submetidos ao procedimento cirúrgico, sob sedação profunda, para posterior implante do biomaterial na calota do animal, de acordo com a Tabela 1 a seguir:

Tabela 1 - Distribuição do grupo experimental A.

Grupos	Número de animais	Biomaterial
1	2	EVAMCU e EVACU
2	2	EVAMSU e EVASU

Fonte: elaborado pelos autores.

Em cada animal foi implantado uma fração de cada biomaterial de acordo com a Tabela 1 e figura 2. Após os períodos de preservação de 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação excessiva de isoflurano. A área contendo os materiais implantados foi removida para realização de análise microscópica. Os dois biomateriais que proporcionaram maior fibrovascularização foram eleitos para o Projeto. Essa avaliação foi realizada observando-se a formação de vasos sanguíneos na região do biomaterial.

Em seguida, tendo a escolha dos biomateriais mais adequados para o experimento, 18 ratos foram submetidos a procedimento cirúrgico para implante dos biomateriais, um em cada lado da calota craniana do animal, de acordo com a Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 - Distribuição do grupo experimental B.

Grupos	Número de animais	Período de Preservação
7	6	7 dias
14	6	14 dias
90	6	90 dias

Fonte: elaborado pelos autores.

Após os períodos de preservação citado no quadro acima os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação excessiva de isoflurano. A área contendo os materiais implantados foi coletada para realização de análise microscópica

## PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

### Anestesia e Antissepsia

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à sedação profunda com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intraperitoneal (IP) de cloridrato de

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.



FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

xilazina (Rompum-Bayer, São Paulo, Brazil) 10mg/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intraperitoneal de anestésico geral de cloridrato de Cetamina (Dopalen – Vetbrands) 90mg/kg de peso corpóreo.

## Técnica cirúrgica

Após realização da anestesia, foi feita tricotomia em região de cabeça e entre as orelhas e antisepsia com digliconato de clorexidina 2% tópico (Figura 3-A). Em sequência, sobre a montagem dos campos estéreis, em cada animal foi realizado uma incisão coronal em pele e em musculatura, entre as orelhas, e outra em pericrânio a fim de permitir o afastamento dos tecidos e visualização completa da superfície externa da calota craniana (Figura 3-B e C). Com um micromotor de baixa rotação e com uma broca carbide esférica sob irrigação, foram realizadas 3 perfurações concêntricas, uma em cada lado, equidistante da sutura sagital mediana, onde foram posteriormente colocados os dois biomateriais eleitos para o Projeto sobrepondo-os na calota craniana dos ratos conforme esquema representativo abaixo (Figuras 2 e 3-D e E). Em sequência, foi realizada a sutura dos tecidos moles, com fio de sutura absorvível 4-0 (Vicryl- Ethicon) e de seda 4-0 (Shalon) nos diferentes planos (Figura 3-F e G). Após os procedimentos cirúrgicos, seguiu-se com a administração oral de Paracetamol 2mg/mL durante um período de dois dias, sendo diluído em água dos animais por um período de 24 horas, bem como administração subcutânea de enrofloxacino na dose de 10mg/kg de peso corpóreo uma vez ao dia por um período de 7 dias.

Decorridos os períodos de observação de 7, 14, e 90 dias, os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação excessiva de gás isoflurano.

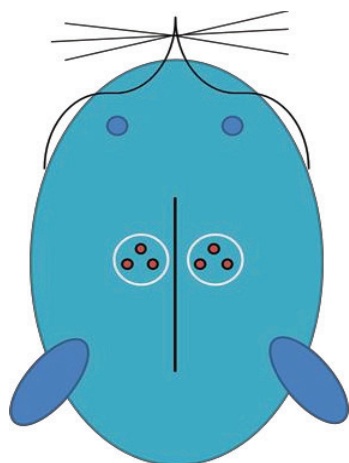


Figura 2 - Esquema representativo da técnica cirúrgica no qual se observa as perfurações em vermelho, e os biomateriais no lado direito e esquerdo da calota do rato abrangendo os defeitos ósseos realizados.

Fonte: figura elaborada pelos autores.

## Preparo das peças e forma de análise dos resultados

Na eutanásia, realizada após 30 dias do procedimento cirúrgico para teste piloto e aos 7, 14 e 90 dias do pós-operatório da cirurgia do projeto com os biomateriais já selecionados, o procedimento seguiu-se com tricotomia na região de cabeça. Durante procedimento histotécnico, as peças foram fixadas em formol a 10% seguida de descalcificação usando EDTA 18% (ácido etilendiaminotetracético) e inclusão em parafina para a obtenção das lâminas a fim de proceder futuramente com histomorfometria do tecido ósseo neoformado. Os cortes microscópicos obtidos foram corados pelo método da Hematoxilina-Eosina (HE) (Figura 3).

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

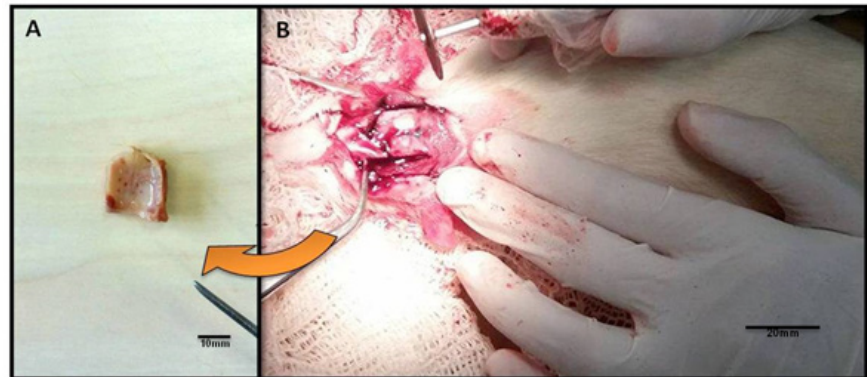


Figura 3 - Em A, aspecto macroscópico do espécime, interior da calota craniana do rato, notando-se as perfurações realizadas; em B, momento da remoção da peça com motor cirúrgico.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

## RESULTADOS

A reação inflamatória observada ao redor dos biomateriais implantados nos animais do teste piloto indica ausência de reações adversas ou de rejeições. Observou-se que todos os biomateriais demonstraram formação de vasos sanguíneos e de tecido ósseo na região do biomaterial (Figura 4).

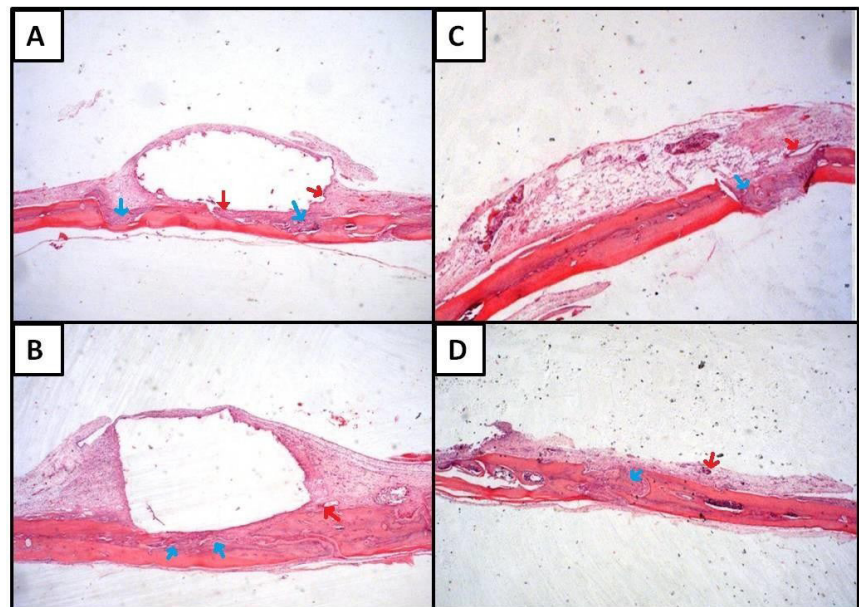


Figura 4 - Biomateriais utilizados no teste piloto na qual se observa formação de vasos sanguíneos e de tecido ósseo (setas vermelhas indicam vasos sanguíneos e setas azuis indicam neoformação de tecido ósseo). Em A, EVACU; em B, EVA-MCU; em C, EVASU; e em D, EVAMSU. Aumento na objetiva de 2x.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

## Análise Microscópica

Os biomateriais EVACU e EVAMCU proporcionaram, em recente estudo, melhor resposta celular com resposta inflamatória semelhante ao do PTFE, material comercial comprovadamente biocompatível (FROES, 2016). Os mesmos apresentaram bom desempenho no modelo experimental deste projeto com fibrovascularização favorável. Visto isso, esses foram considerados como os biomateriais de escolha para a elaboração do projeto. Os biomateriais com ultrassom em sua forma de processamento apresentam características importantes para a condução da osteogênese, como a presença de poros no interior de sua estrutura (Figura 5). Não foi necessária a utilização dos implantes para a fixação dos biomateriais uma vez que os mesmos aderiram-se adequadamente à calota do animal e ocuparam toda a região das perfurações realizadas.

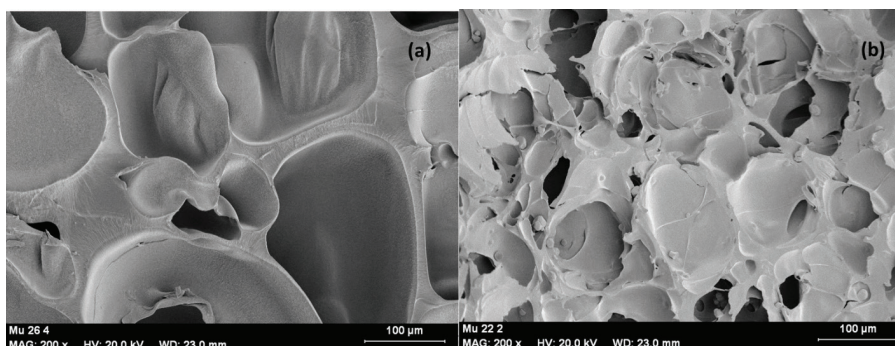


Figura 5 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do biomaterial EVACU em (a) e do EVAMCU em (b) demonstrando os poros em sua estrutura com diâmetros de aproximadamente 100µ.

Fonte: figura concedida pela professora Dra. Rebeca D. Simões.

Os biomateriais escolhidos para o projeto foram aplicados na calota craniana dos 18 animais e após procedimento de retirada de peças e obtenção de lâminas e análise microscópicas observamos alguns resultados. Durante o preparo histológico não foi possível se obter os cortes dos biomateriais junto com os tecidos, impedindo a análise do tecido ósseo no interior dos mesmos. Assim, nas imagens está visível o tecido neoformado ao redor dos mesmos. Seguimos dessa forma com a análise qualitativa da região de fibrovascularização, bem como do possível potencial osteogênico com base nos achados microscópicos da região ao entorno dos biomateriais.

Aos 7 dias, as amostras desses dois biomateriais apresentaram na região dos defeitos um tecido conjuntivo frouxo intensamente vascu-

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto “onlay” em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

larizado e celularizado e um intenso infiltrado inflamatório vascularizado ao redor da cápsula em contato com os biomateriais EVACU e EVAMCU (Figura 6).

Aos 14 dias do pós-operatório pode ser evidenciado também um tecido conjuntivo frouxo intensamente vascularizado e celularizado e intenso infiltrado inflamatório ao redor da cápsula em contato com os biomateriais, EVACU e EVAMCU, e também presença de tecido osteoide na região dos defeitos realizados (Figura 7).

Aos 90 dias do pós-operatório, observa-se nas duas amostras dos biomateriais, tecido conjuntivo intensamente vascularizado formando uma cápsula que envolve os biomateriais nos quais se encontram apoiado sobre tecido ósseo. Há também presença de células gigantes do tipo corpo estranho em contato com os biomateriais e tecido conjuntivo fibroso compatível com periósteo na interface biomaterial e tecido ósseo. Na região correspondente aos defeitos, há tecido ósseo neoformado (Figura 8).

Aos 14 dias do pós-operatório, pode ser observada uma diferença na forma de reparo no qual foi encontrado comportamento de barreira pelos biomateriais EVACU e EVAMCU tal como utilizada na técnica de ROG (Regeneração Óssea Guiada). Nessas lâminas, os defeitos localizados abaixo dos biomateriais apresentaram tecido ósseo no processo de reparo enquanto que os que não estiveram em contato ou perderam o contato com as espumas de EVA apresentaram tecido de cicatrização fibroso na região de reparo (Figuras 9-11), mostrando a capacidade destes materiais em atuar também como barreira oclusiva.

Em algumas lâminas (EVACU aos 14 e 90 dias do pós-operatório e EVAMCU aos 14 dias do pós-operatório) foi encontrado também região de neoformação óssea situada abaixo dos biomateriais fora da região dos defeitos (Figura 12).

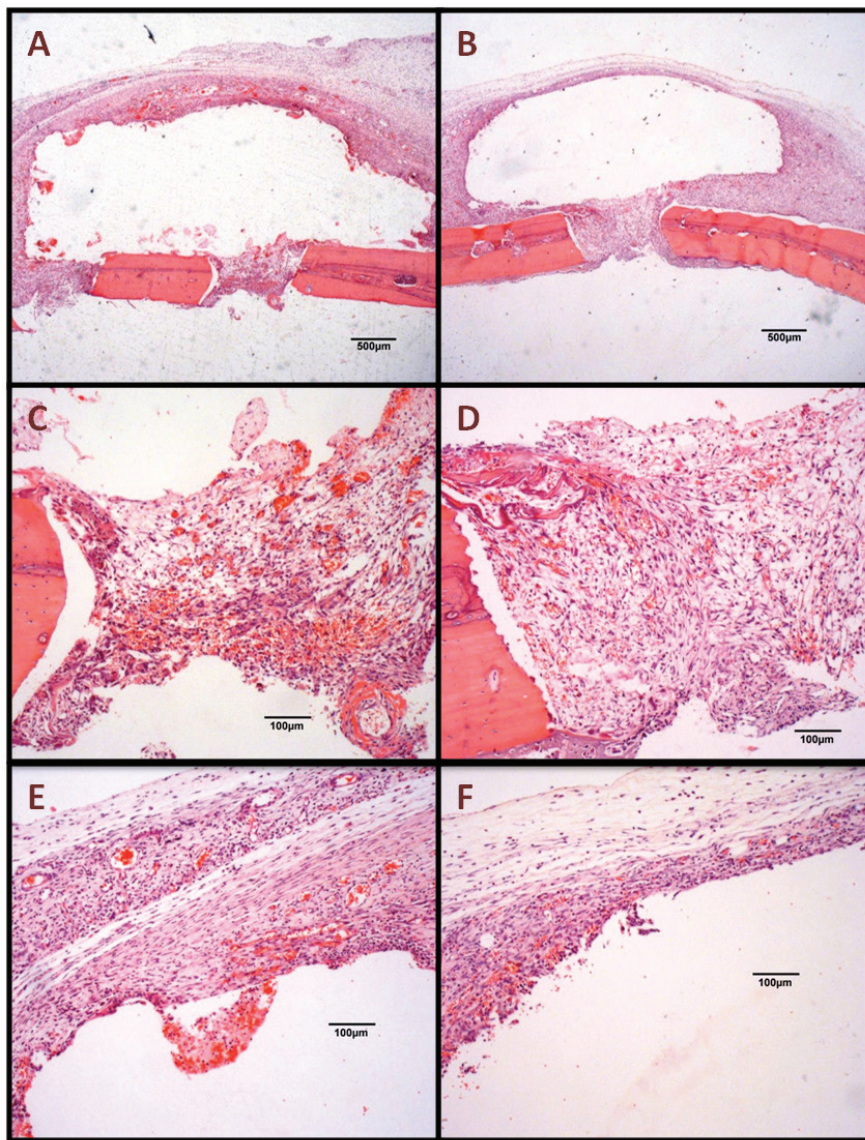


Figura 6 - Em A (EVACU) e em B (EVAMCU), objetiva de 2x, observa-se aos 7 dias do pós-operatório tecido conjuntivo frouxo intensamente vascularizado e celularizado preenchendo toda área dos defeitos realizados (setas azuis) e intenso infiltrado inflamatório ao redor da cápsula em contato com os biomateriais. Em C e D, objetiva de 10x, evidenciando os defeitos e em E e F, objetiva de 10x, evidenciando a região ao redor dos biomateriais.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

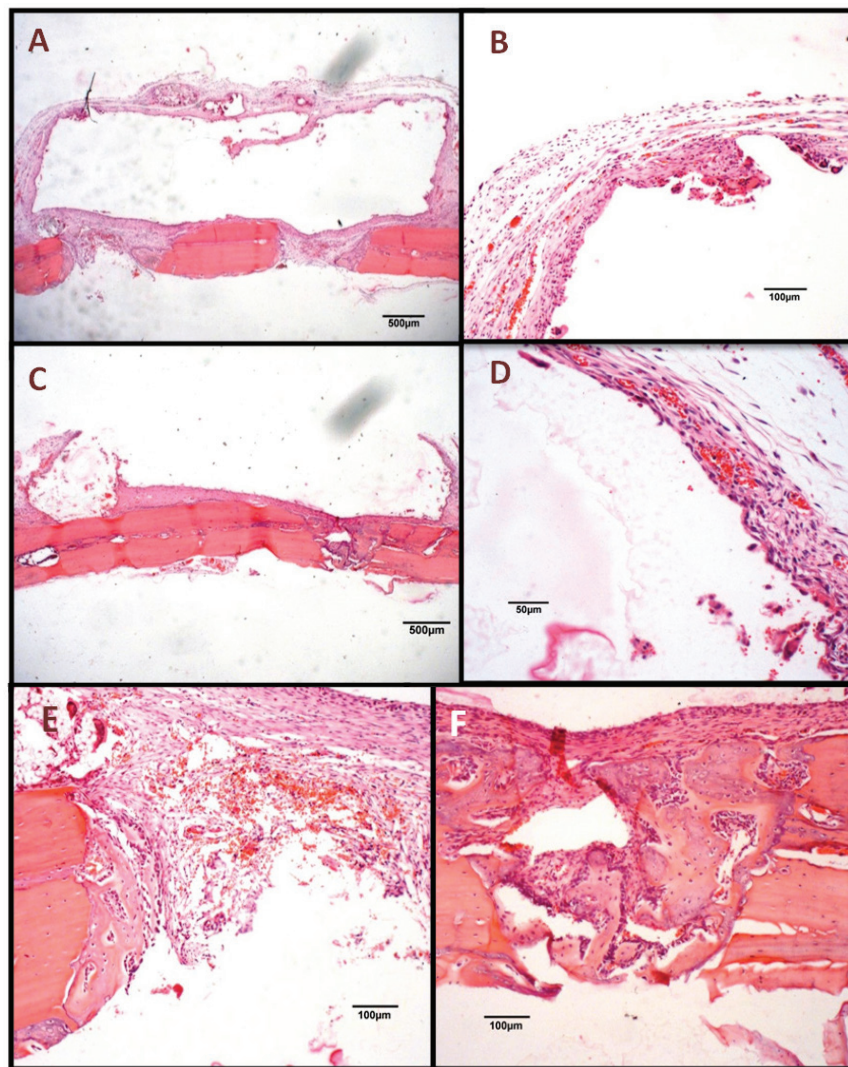
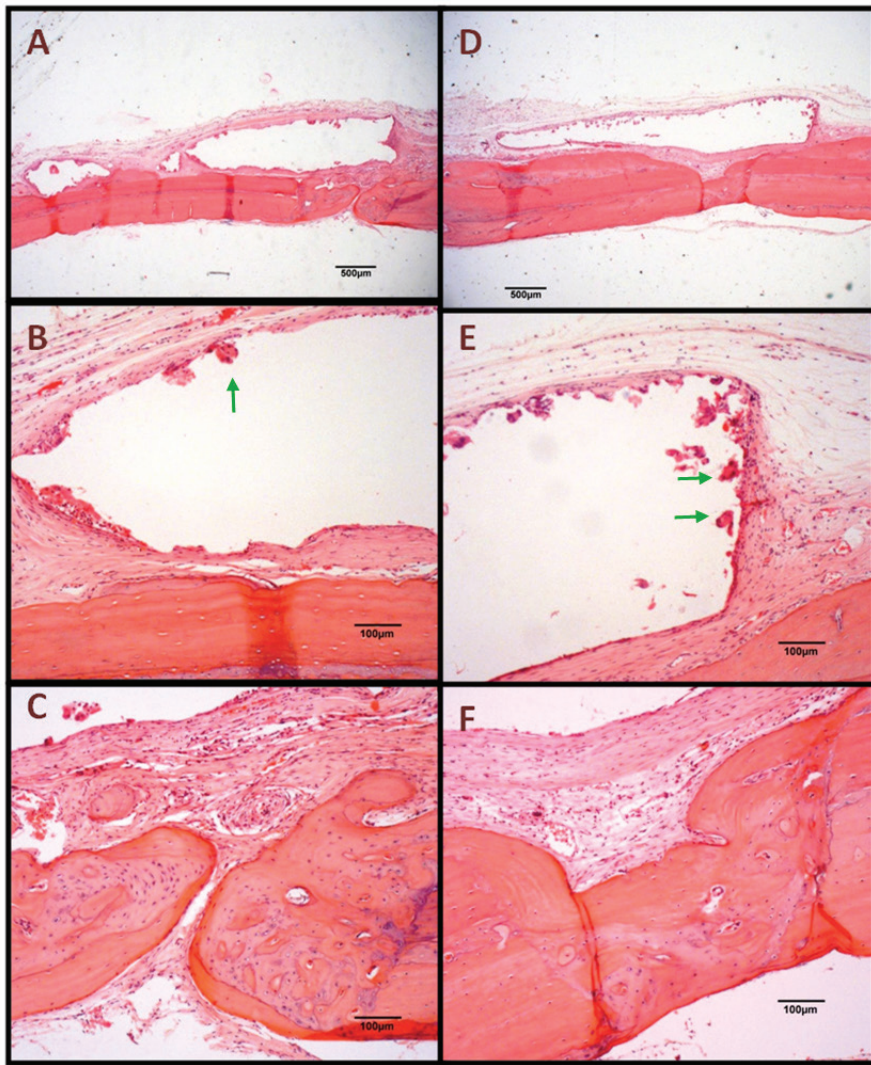


Figura 7 - Em A (EVACU) e em C (EVAMCU) aumento na objetiva de 2x do período de 14 dias do pós-operatório no qual se observa tecido conjuntivo frouxo intensamente vascularizado e celularizado, bem como infiltrado inflamatório ao redor da cápsula em contato com os respectivos biomateriais. Em E e F, aumento na objetiva de 10x evidenciando os defeitos com presença de tecido osteoide e em B e D, aumento na objetiva de 10x evidenciando a região ao redor dos biomateriais com diminuição do infiltrado inflamatório em relação ao período anterior.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.



FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

Figura 8 - Em A (EVACU) e D (EVAMCU), objetiva de 2x, período de 90 dias do pós-operatório onde se observa tecido conjuntivo intensamente vascularizado formando cápsula que envolve biomaterial. Observa-se na interface biomaterial/tecido ósseo, tecido conjuntivo fibroso (periósteo). Em C e F, objetiva de 10x, evidenciando os defeitos com presença de tecido osteoide e em B e E, objetiva de 10x, evidenciando a região ao redor dos biomateriais com presença de células gigantes do tipo corpo estranho em contato com os biomateriais (setas verdes).

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.



FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

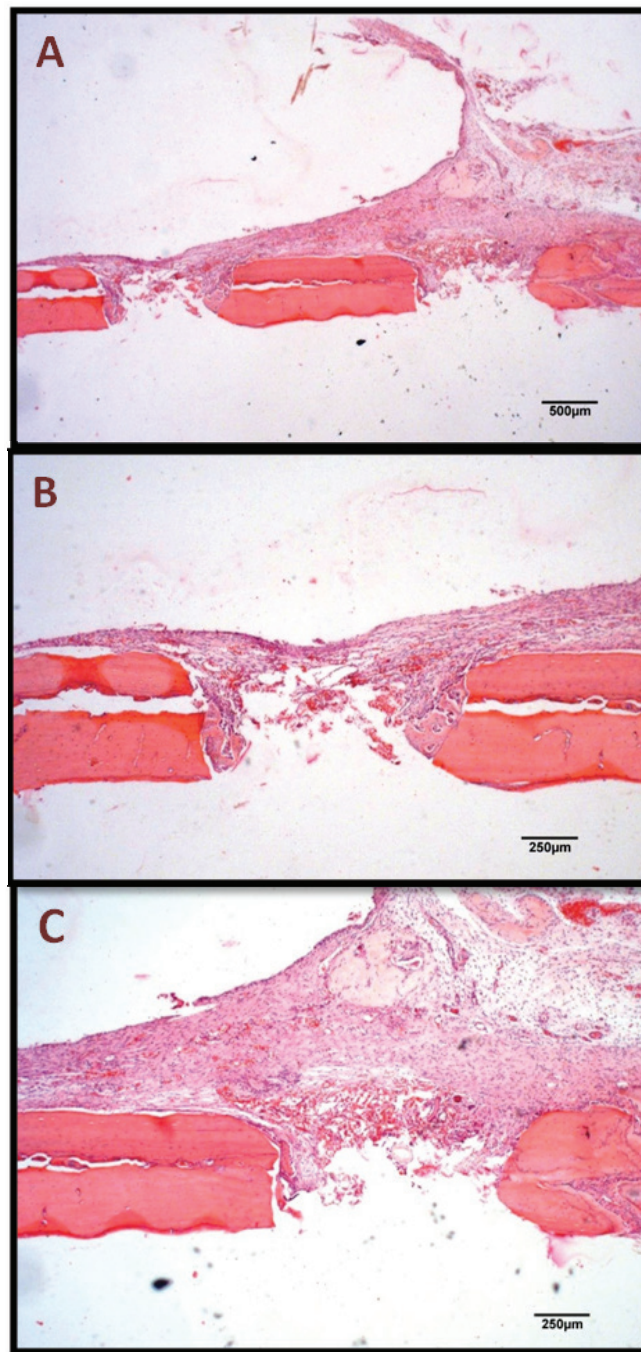
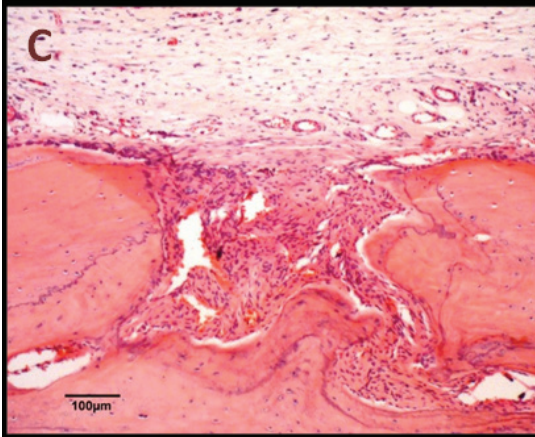
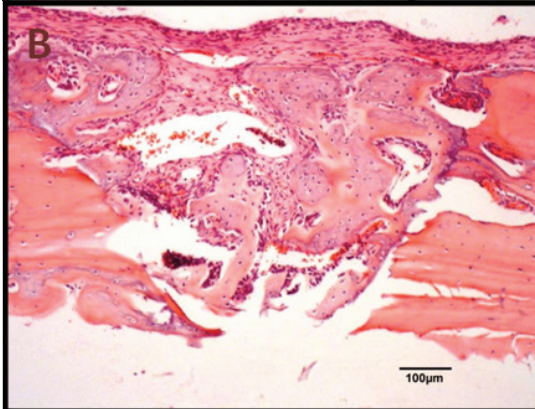
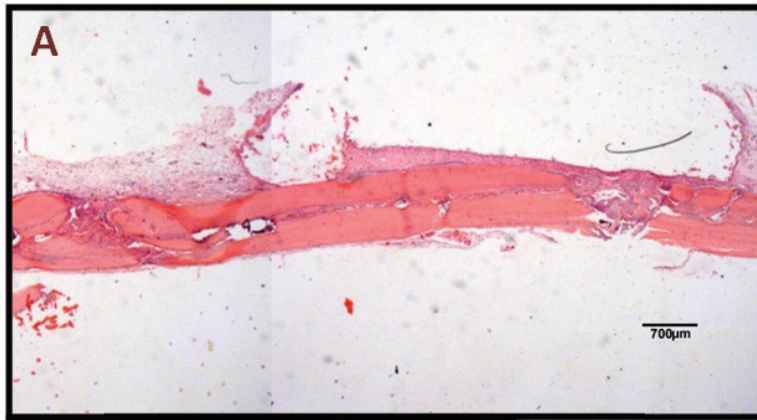


Figura 9 - Período de 14 dias do pós-operatório demonstrando comportamento de ROG pelo biomaterial EVACU. Em A, aumento de 2x e em B e C, aumento de 4x evidenciando presença de tecido conjuntivo junto a tecido ósseo (seta azul) e de somente tecido conjuntivo (seta verde), respectivamente.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.



FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

Figura 10 - Período de 14 dias do pós-operatório demonstrando comportamento de ROG pelo biomaterial EVAMCU. Em A, aumento de 2x e em B e C, aumento de 10x evidenciando região com presença de tecido conjuntivo junto a tecido ósseo (seta azul) e de somente tecido conjuntivo (seta verde), respectivamente.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

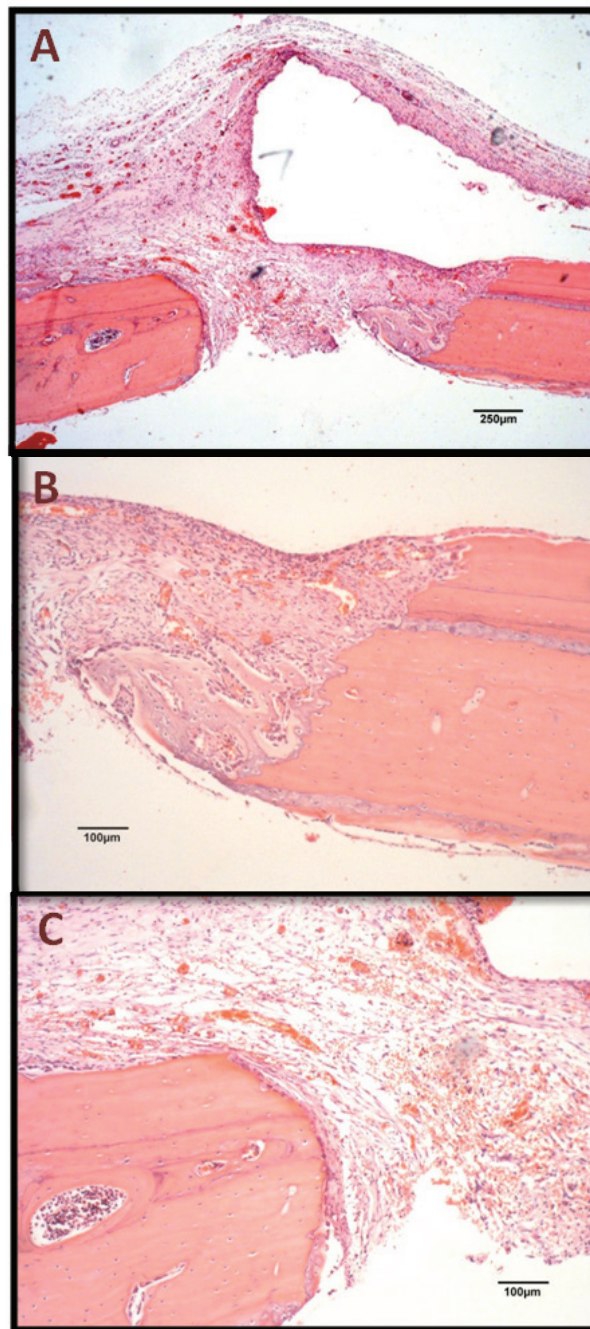


Figura 11 - Período de 14 dias do pós-operatório demonstrando comportamento de ROG pelo biomaterial EVACU. Em A, aumento de 2x e em B e C, aumento de 10x evidenciando região com presença de tecido conjuntivo junto a tecido ósseo (seta azul) e de somente tecido conjuntivo (seta verde), respectivamente.

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

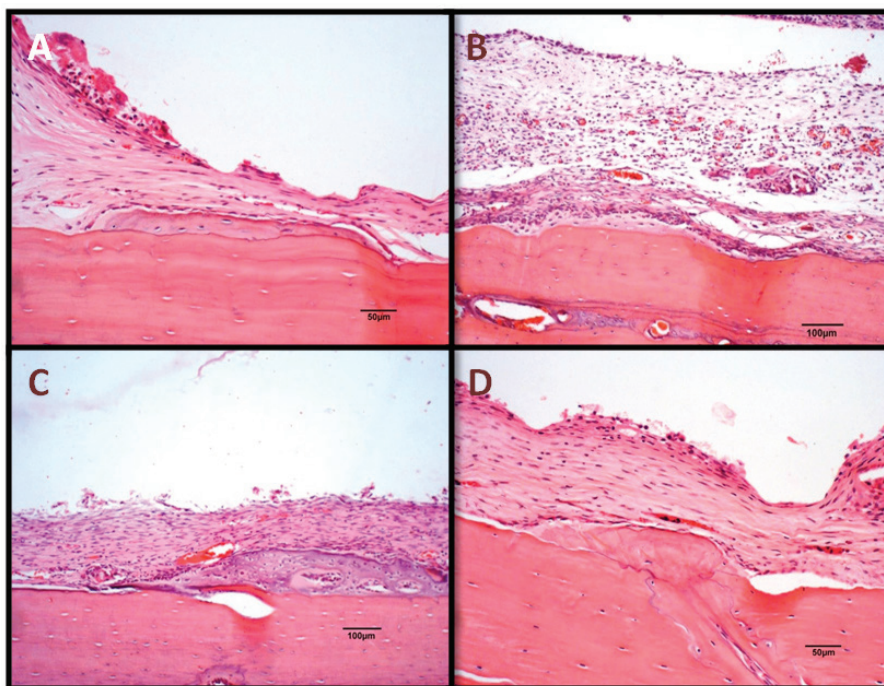


Figura 12 - Em A, B e C, biomaterial EVACU (representado pelo sinal (\*)), e em D, biomaterial EVAMCU (representado pelo sinal (\*)), no qual se observa região de neoformação óssea abaixo dos biomateriais (setas verdes).

Fonte: Imagens obtidas pelos autores.

## DISCUSSÃO

A busca por reabilitações orais com qualidade fonética, estética e funcional, principalmente em se tratando da instalação de implantes na qual exige para isso avaliação da quantidade de tecido ósseo presente é cada vez mais frequente. Nesse estudo, foi realizado a avaliação do EVA (polietileno-co acetato de vinila), biomaterial alternativo para regeneração óssea (TABATA *et al.*, 2007; GALLINA, VIEGAS, 2007).

O EVA espumado é fabricado em escala industrial com baixo custo. Misturas de EVA com amido de milho nativo influenciam na obtenção de diferentes tipos de estrutura celular (fechada, parcialmente interligada e totalmente interligada) e diferentes tamanhos de poros. Além disso, a presença de ultrassom durante o processo de formação de espuma aumenta a porcentagem de poros abertos. Em um estudo realizado pelos mesmos autores, os resultados preliminares mostraram que a reação tecidual é favorável ao seu uso como biomaterial. (SIMÕES, 2009). O EVACU e EVAMCU apresentaram

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

uma resposta inflamatória mononuclear relativamente pequena no período 7 e de 60 dias, último período, quando comparado com os outros materiais e suas respostas inflamatórias não diferiram estatisticamente ao do PTFE (material comercial comprovadamente biocompatível) ( $p > 0.05$  Kruskal Wallis). Unidos aos resultados apresentados e ao bom desempenho apresentado no modelo experimental deste trabalho consideramos esses dois biomateriais para a aplicação no desenvolvimento da mesma (FROES, 2016).

Na avaliação pós-operatória os animais não apresentaram sinais nocivos tais como perda de peso, dor ou supuração. Foi possível observar inicialmente a presença de cápsula fibrosa com espessura adequada ao redor dos biomateriais implantados, bem como o aspecto normal dos tecidos adjacentes. Aos 7 e 14 dias do pós-operatório, observa-se tecido conjuntivo frouxo intensamente vascularizado e celularizado e intenso infiltrado inflamatório em contato com os biomateriais (Figuras 6 e 7).

Aos 90 dias do pós-operatório, pode-se observar presença de tecido conjuntivo intensamente vascularizado e também a presença células gigantes em contato com os biomateriais (Figura 8).

Os biomateriais apresentaram capacidade para regeneração óssea tal como observado nos defeitos localizados abaixo dos biomateriais. Embora os defeitos não apresentassem tamanho crítico, nas regiões dos defeitos que não estiveram ou que vieram a perder contato com a espuma de EVA o reparo foi realizado mediante células de origem diversa ao da osteoblástica. Sendo assim, os resultados dos biomateriais apresentaram comportamento que define ao da barreira utilizada na técnica de ROG (Regeneração Óssea Guiada) (Figuras 10 - 12).

Dessa forma, uma vez que os biomateriais EVACU e EVAMCU apresentaram características semelhantes ao do PTFE, sua atuação como uma membrana de ROG é também de interesse.

Ademais, para se utilizar como uma membrana em ROG é interessante também considerar qual seria o grau de dificuldade para uma remoção pós-cirúrgica entre os biomateriais de EVA, identificando qual dos tipos demonstra mais resultados e menor complicação na segunda cirurgia, para a retirada da espuma de EVA após o período de neoformação óssea. Foi observado em um estudo realizado com pacientes objetivando um aumento vertical de tecido ósseo peri-implantar que entre o PTFE expandido e o PTFE denso, o que obteve um procedimento mais facilitado de remoção da membrana foi com do PTFE denso (RONDA *et al.*, 2014).

Sabe-se que quanto aos mecanismos realizados por biomaterias com atuação de *scaffolds*, devem existir idealmente características osteocondutoras, reabsorvíveis e de suscetibilidade à ação osteoclás-

tica para enfim, permitir a substituição por tecido ósseo na região enxertada (WILLIAMS, 1997).

Em outro um estudo realizado com coelhos, os enxertos empregados com atuação *scaffold* de origem xenógena (Osseus® e Bio-Oss®) mostraram após os períodos de análise, que os materiais foram parcialmente absorvidos e houve substituição por tecido ósseo na borda do osso desvitalizado se estendendo sobre a superfície do biomaterial confirmando assim, características de biocompatibilidade e de osteocondução, mesmo os defeitos não tendo tamanho crítico (CALASANS-MAIA *et al.*, 2009).

Em nossa pesquisa, houve perda do contato entre os biomateriais e a região de alguns defeitos. Desse modo, é possível ter ocorrido invasão do periósteo na região estudada e assim um contato estritamente direto entre o biomaterial e o tecido ósseo não deva ter ocorrido devidamente. No entanto, houve regiões que apresentaram deposição óssea neoformada abaixo dos biomateriais o que condiz com biocompatibilidade e talvez características de osteocondução pelo biomaterial ali presente, tal como apresentado por materiais xenógenos desvitalizados.

A potencialidade dos biomateriais EVA deve ser mais bem investigada, a presença de amido de milho na matriz de EVA comportando-se como material reabsorvível assim como também de poros são propriedades positivas para que um material atue como um osteocondutor. Alguns autores citam a importância do tamanho do poro frisando a necessidade de esses serem maiores que 50µm possibilitando a promoção da neoformação óssea. Vale ressaltar a diversidade de diâmetros na qual as blendas de EVA se constituem (TATUM, 1986; O'BRIEN, 2011).

Seguindo esse conceito, é preciso avaliar qual a melhor funcionalidade dada pelos biomateriais de EVA, se para biomaterial *scaffold* ou ROG, objetivando descobrir qual dessas é a mais eficaz para sua futura aplicabilidade em regeneração óssea.

## CONCLUSÃO

Os biomateriais EVACU e EVAMCU demonstraram biocompatibilidade e capacidade para regeneração óssea como pôde ser observado quanto ao bom comportamento apresentado com características para técnicas de enxertia em tecido ósseo, tal como a de ROG. No entanto, mais estudos precisam ser realizados, como por exemplo, em defeitos ósseos bicorticais.

FROES, Brenda *et al.* Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto "onlay" em tecido ósseo. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.

## REFERÊNCIAS

BAHAT, O. Treatment planning and placement of implants in the posterior maxillae: Report of 732 consecutive Nobelpharma implants. *Int j oral maxillofac surg.*, Copenhagen, v. 8, p. 151–61, 1993.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 15, p. 13–21, 2005.

BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomatter**, Austin, v.3, n. 3, 2013.

CALASANS, M.; FERNANDES, G.; GRANJEIRO, J. Preservação Alveolar com enxertos após exodontias e previamente à instalação de implantes. **Implant News**, São Paulo, v. 5, p. 583–90, 2008.

CALASANS-MAIA, M. et al. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tibia de coelho tratada com xenoenxertos. **Acta Ortopédica Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 6, p. 340-3, 2009.

COWIND, S. C.; HEGEDUS, H. Bone remodeling I: theory of adaptive elasticity. **Journal of Elasticity**, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 313-26, jul. 1976.

FREED, L.E. et al. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. **Biotech.**, New York, v. 12, n. 7, p. 689–93, jul. 1994.

FROES, B. **Reação Tecidual de um novo material composto por EVA(polietileno-co acetato de vinila) e amido para futuro uso como biomaterial**. 2016. 49 f. Tese (monografia). Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 2016.

GALLINA, C.; VIEGAS, V. Overdentures e próteses fixas para reabilitação com implantes em maxila edêntula. **Rev Odontol UNICID**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 61-7, 2007.

GIANNOUDIS, P.; EINHORN, T.; MARSH, D. Fracture healing: The diamond concept. **Inj.**, Bristol, v. 38, n. 4, p. 3-6, 2007.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 136-148.

LU, L. et al. In vitro and in vivo degradation of porous poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 18, p. 1837-45, 2000.

O'BRIEN, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Oxford, **Mater Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, mar. 2011.

OH, D.S. et al. Distinctive Capillary Action by Micro-channels in Bone-like Templates can Enhance Recruitment of Cells for Restoration of Large Bony Defect. **J Vis Exp.**, Boston, v. 1, n. 103, p. 1–9, 2015.

PORTO, G. et al. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical ? Um defeito de 5 mm em calota craniana de rato é realmente crítico ? **Acta Cirúrgica Bras.**, São Paulo, v. 27, n. 11, p. 757–60, 2012.

RECUM, V.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering Prospective view. **J App Biomater**, New York, v. 6, p. 137-44, 1995.

RONDA, M. et al. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 859-66, 2014.

SEGUNDO, A.; VASCONCELOS, E. Células-tronco e engenharia tecidual : perspectivas de aplicação em odontologia. **Rev Ciênc Méd.**, Campinas, v. 16, n. 1, p.23–30, 2007.

SIMÕES, R. **Fabricação e caracterização estrutural de filmes de materiais poliméricos visando a aplicação como biomateriais.** 2009. 128 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências de Bauru, 2009.

TABATA, L. et al. Critérios para seleção dos sistemas de retenção para overdentures. **RFO.**, Passo Fundo, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2007.

WILLIAMS, D. **Definitions in biomaterials.** Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. New York: England Elsevier, 1987.

FROES, Brenda et al. Novo biomaterial composto de EVA (polietileno-co acetato de vinila) para enxerto “onlay” em tecido ósseo. **SALUSVITA**, Bauru, v. 36, n. 4, p. 1019-1042, 2017.