ANDRÉ MICHELETTI HESPANHOL

**REPARAÇÃO ÓSSEA SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO
USINADAS OU TRATADAS POR ÓXIDO DE TITÂNIO COM ENXERTO
AUTÓGENO EM BLOCO COBERTO POR MEMBRANA
REABSORVÍVEL**

São Paulo
2009

André Micheletti Hespanhol

**Reparação óssea sobre superfícies de titânio usinadas ou tratadas
por óxido de titânio com enxerto autógeno em bloco coberto por
membrana reabsorvível**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Associado Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hespanhol AM. Reparação óssea sobre superfícies de titânio usinadas ou tratadas por óxido de titânio com enxerto autógeno em bloco coberto por membrana reabsorvível [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____ / ____ / 2009

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr.(a). _____

Titulação:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

2)Prof(a). Dr.(a). _____

Titulação:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

3)Prof(a). Dr.(a). _____

Titulação:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

À minha esposa, **Andressa**, dedico este trabalho e minha vida.

Aos meus pais, **Ary e Marly**, pelo amor incondicional a mim e aos meus irmãos, pelos valores de vida transmitidos e por nos incentivarem a continuar buscando o melhor sempre.

Aos meus sogros, **Reinaldo e Lea**, pela confiança, incentivo e paciência, durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos de sangue, **Marcelo e Luciano**, e aos meus co-irmãos **Fábio e André** por sempre me incentivarem através de seus exemplos de vida e de busca pelo conhecimento.

Aos meus amigos-irmãos, **Paulo, Felipe, Jacob, Kulik e Fábio**, pela ajuda e incentivo em importantes momentos da minha vida pessoal, profissional e acadêmica, desde que os conheci. A conquista de um, é a conquista de todos.

A **Deus**, por ter colocado em meu caminho, essas e outras pessoas iluminadas, que não me deixam esquecer o real sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima**, pelos ensinamentos científicos e orientação durante este trabalho. Pelo incentivo constante, companheirismo e confiança.

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, responsável pela Disciplina de Periodontia da FOUSP, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, e por ter me aceito no curso de Pós-graduação.

Ao **Prof. Cláudio Mendes Pannuti**, pela amizade e contribuição direta no trabalho, através da análise estatística dos resultados.

Ao **Prof. Jarbas Arruda Bauer**, por disponibilizar seu laboratório, seu conhecimento, e sua amizade, durante a fase experimental deste trabalho.

Aos **Professores Giorgio de Micheli e Roberto Fraga Moreira Lotufo** (*in memoriam*), pela postura profissional, amizade e ensinamentos transmitidos durante o curso de Mestrado.

Aos **Professores Giuseppe Alexandre Romito, Koto Nakae, Marco Antonio Paupério Georgetti, Cesário Antonio Duarte e Carlos Cheque** pelo apoio e ensinamentos durante o Estágio na Clínica da Graduação (alicerce de uma vida acadêmica).

A todos os colegas da Disciplina de Periodontia, alunos do curso de Mestrado ou Doutorado, por compartilharem suas experiências científicas e de vida. Em especial aos colegas, **Daniele Salami Lourenção, Flávia Sukekava, Leandro Chambrone, Mariana S. R. Zangrando, Silvia Linard Marcelino, Vanessa T. E. Alves.**

Aos colegas que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho, **Rodrigo Albuquerque Basílio dos Santos, Rodrigo Carlos N. de C. Pinto e Celey Silveira.**

Ao colega **Osmar Shizuo Okuda**, pela amizade e colaboração durante os anos de estágio e de Mestrado.

À **Daniele Salami Lourenção**, amiga e colega de especialização, à **Verônica Carvalho**, amiga e colega de graduação e ao **Fernando Peixoto Soares**, amigo e orientador de especialização pelas palavras de incentivo constante durante estes últimos anos.

À **Profa. Dra. Maria Aparecida Jardim** e a **Prof. Dra. Andrea de Marco**, pelo incentivo contagiante e pelo apoio fornecido nos momentos iniciais deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia: **Vera, Wilma** e, principalmente, **Márcia, Mara e Marília**, por toda a contribuição dispensada ao longo destes anos.

Às bibliotecárias **Cláudia Pestana** e **Gláucia E. D. Fidelis**, pelo profissionalismo e atenção dispensados durante a fase final deste trabalho. A vocês, muito obrigado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio à pesquisa de n 06/50450-9, que permitiu a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia desta Universidade** que me acolheu em 1996 e que me possibilitou à realização não só deste trabalho, mas também de toda a minha formação profissional.

Hespanhol AM. Reparação óssea sobre superfícies de titânio usinadas ou tratadas por óxido de titânio com enxerto autógeno em bloco coberto por membrana reabsorvível [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

Este estudo avaliou, quantitativamente, o osso regenerado após técnica de regeneração óssea guiada, utilizando osso autógeno em bloco e membrana de colágeno e descreveu seu processo de reparação ao redor de superfícies de implantes usinadas ou tratadas por jato de óxido de titânio em períodos de até 150 dias. Foram utilizados 60 ratos machos Wistar, divididos em 2 grupos: um recebeu implantes com superfície usinada (U) e o outro recebeu implantes com superfície tratada por jato de óxido de titânio (T). Uma trefina foi utilizada para a remoção do enxerto ósseo em bloco da calvária do animal. O enxerto foi fixado próximo ao ângulo da mandíbula do rato, na cortical vestibular, com o uso do implante. O conjunto foi coberto por membrana de colágeno. A ortotanásia foi realizada em 0, 14, 21, 45 e 150 dias. Foi realizado processamento histológico para material não-descalcificado, e um corte no longo eixo do implante foi obtido para cada espécime. Foram realizadas análises qualitativa e quantitativa. Os dados foram analisados estatisticamente, em um nível de significância de 5%, pelos testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Os resultados relativos aos períodos de observação mostraram que a média do tamanho do defeito inicial foi de DO-U = 604,13 μm e DO-T = 585,90 μm ($p=0,720$) e que a média de espessura inicial do leito foi de EL-U = 257,29 μm e EL-T = 243,57 μm ($p=0,07$); houve uma redução da espessura do enxerto no período de

150 dias para o grupo T em relação ao grupo U (EE-T = 338,25 μm ; EE-U = 407,71 μm) ($p=0,003$), não havendo outras diferenças significativas entre os grupos. Notou-se a presença de osso regenerado, vestibularmente ao enxerto, a partir de 21 dias, com uma nítida tendência ao aumento de sua espessura até o período de 150 dias, onde notamos um aumento da espessura óssea total de cerca de 4,6 (T) e 4,8 (U) vezes a espessura original da mandíbula, com valores de ETTO – U = 1254,40 μm e ETTO – T = 1141,85 μm ($p=0,48$).

Palavras-Chave: Regeneração óssea – Transplante ósseo – Transplante autólogo - Osseointegração; Análise qualitativa – Análise quantitativa

Hespanhol AM. Healing of bone on machined or grit-blasted titanium surfaces with autogenous block graft covered with resorbable membrane [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

This study quantitatively analyzed the regenerated bone after guided bone regeneration technique using autogenous block graft with resorbable membrane and described its pattern around machined titanium or oxide grit-blasted titanium surfaces in periods of up to 150 days. Sixty male, adult, Wistar rats were randomly assigned to one of two groups: machined titanium surface (U) or oxide grit-blasted titanium surface (T). A block graft was harvested from the rat calvarium with a trephine, laid and stabilized on the external cortex near the angle of the mandible with implants. A collagen membrane was adapted to completely cover the bone graft in both groups. The animals were euthanized at 0, 14, 21, 45 and 150 days after surgery. Non-decalcified histological sections were processed for each specimen and one section on the long axis of the implant was obtained. Qualitative and quantitative analysis were carried out. Statistical analyses were carried out with a significance level of 5% and used Kruskal-Wallis and Dunn tests. Results showed that the mean bone defect was DO-U = 604,13 μm and DO-T = 585,90 μm ($p=0,720$), and the mean mandible bone width was EL -U = 257,29 μm and EL-T = 243,57 μm at zero hour. The mean graft width was reduced after 150 days for the T group as compared to group U (EE-T = 338,25 μm and EE-U = 407,71 μm) ($p=0,003$). No other significant differences between groups were observed. Regenerated bone was observed buccal to the bone graft after 21 days increasing in width after 150 days. The final mean mandible bone

width after 150 days (ETTO-U = 1254,40 μm and ETTO-T = 1141,85 μm) achieved 4,8 (U) and 4,6 (T) times the original mandible width ($p=0,48$).

Keywords: bone regeneration – bone transplantation – transplantation, autologous; osseointegration; qualitative analysis – quantitative analysis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DO	Tamanho do defeito ósseo inicial
E	Enxerto
EC	Região cortical do enxerto
EE	Espessura do enxerto
EI	Espessura da interface leito-enxerto
EL	Espessura do leito receptor
ETTO	Espessura total de tecido ósseo
FLE	Distância da porção mais lingual da cabeça do implante até a porção mais lingual do leito receptor
FVE	Distância da porção mais lingual da cabeça do implante até a porção mais vestibular do leito receptor
FVOR	Distância da porção mais lingual da cabeça do implante até a porção mais vestibular do osso regenerado
I	Implante

ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
ILE	Interface leito-enxerto
INP	Instituto Nacional de Prótese
L	Leito receptor
LC	Região cortical do leito receptor
LM	Região medular do leito
M	Membrana
ONF	Osso neoformado
OR	Osso regenerado
ORVE	Osso regenerado vestibularmente ao enxerto ósseo
POR	Percentual de osso regenerado
PR	Percentual de reconstrução
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandida
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Enxerto ósseo.....	18
2.2 Regeneração óssea guiada.....	21
2.3 Osseointegração e tratamento de superfície.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Seleção dos animais.....	36
4.2 Superfície dos implantes.....	36
4.3 Membranas.....	37
4.4 Procedimento cirúrgico.....	37
4.5 Ortotanásia dos animais.....	41
4.6 Processamento histológico.....	42
4.7 Análise histológica.....	43
4.8 Análise histométrica.....	43
4.9 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Análise histológica.....	47
5.1.1 período de zero hora.....	47
5.1.2 período de catorze dias.....	52
5.1.3 período de vinte e um dias.....	56
5.1.4 período de quarenta e cinco dias.....	59

5.1.5 período de cento e cinquenta dias.....	64
5.2 Análise histométrica e análise estatística.....	69
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

O uso crescente de implantes osseointegrados, nas duas últimas décadas, devido aos resultados favoráveis dos estudos clínicos (ADELL et al., 1981; BABBUSH, 1986; BUSER et al., 1990) e a comprovação da sua integração tecidual (BUSER et al., 1991), levaram ao crescimento das indicações de técnicas para o aumento do volume ósseo (ARAÚJO et al., 2002; SATOW et al., 1997).

Sabe-se que, após a extração dental, a reabsorção do alvéolo pode alterar tanto a espessura, quanto a altura do remanescente da crista e que um dos principais requisitos para um sítio receptor de implantes é o seu adequado volume de osso alveolar. Nos dias atuais, técnicas como a colocação de enxertos ósseos, regeneração óssea guiada (ROG) e distração osteogênica permitem a colocação de implantes em áreas onde o remanescente ósseo inicial apresenta-se extremamente reabsorvido (BUSER et al., 1995, 1996; PROUSSAEFS; LOZADA, 2005).

Ensaio clínicos e histológicos demonstraram que a técnica de ROG e de enxertos ósseos autógenos são praticáveis e apresentam previsibilidade adequada. Foi demonstrado, pelos estudos de Dahlin et al. (1995), Rasmusson et al. (1997) e Simion, Trisi e Piatelli (1994), que o tecido ósseo pode ser criado em áreas corticais externas, fora do envelope ósseo original, sendo também previsível a sua regeneração em defeitos intra-ósseos.

Enxertos ósseos autógenos são considerados o padrão ouro em reconstrução de tecidos ósseos porque são imunologicamente inertes e osteogênicos. Eles funcionam como um arcabouço para a futura formação óssea e como transportadores de células vivas (GORDH et al., 1998).

Porém, seu uso requer a remoção de tecido ósseo do paciente, e uma segunda área de intervenção cirúrgica, muitas vezes extrabucal e em nível hospitalar, o que pode elevar a complexidade cirúrgica e os gastos financeiros. A perda da forma e do volume do enxerto com o passar do tempo, através de reabsorção, tem-se mostrado um problema contínuo (ALBERIUS et al., 1996; ERMIS; POOLE, 1992). Graus variados de reabsorção do enxerto têm sido mostrados, variando de aproximadamente 50% (TEN BRUGGENKATE et al., 1992) nos primeiros 6 meses de regeneração, até 70% (MAIORANA et al., 2005; PHILLIPS; RAHN, 1988) durante o primeiro ano após a inserção do enxerto.

Acredita-se que fatores como a microarquitetura interna, a origem embriológica, a taxa de revascularização e a fixação do enxerto interfiram na taxa de sucesso da técnica (ALBERIUS et al., 1996; BUCHMAN; OZAKI, 1999; GORDH et al., 1998; OZAKI et al., 1999).

Por sua vez, a técnica de regeneração óssea guiada visa manter as substâncias osteoindutivas *in situ* impedindo a penetração de fatores de inibição do crescimento ósseo e de fibroblastos e agindo como um mantenedor de espaço. Dessa forma, a técnica permitiria a neoformação óssea em todo o espaço criado pela membrana (LINDE et al., 1993; GORDH et al., 1998).

As membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) são consideradas o padrão ouro em ROG, porém exigem uma segunda cirurgia para a sua remoção e apresentam maiores riscos de contaminação por exposição de sua estrutura rígida ao meio bucal. Assim, as membranas reabsorvíveis têm sido cada vez mais utilizadas, destacando-se, entre os materiais usados para sua confecção, o colágeno e os polímeros sintéticos. Porém, apresentam uma menor estabilidade e menor

capacidade de manter espaço, quando comparadas às membranas de PTFE-e (SCHLIEPHAKE et al., 2000).

Do ponto de vista clínico, ainda há controvérsia sobre qual técnica é melhor isoladamente. Alguns autores são a favor da ROG (CHIAPASCO et al., 1999) e outros a favor do enxerto ósseo autógeno (BUSER et al., 1993).

O uso da técnica de ROG juntamente com enxertos ósseos tem sido sugerido para aumentar a capacidade do sítio receptor de incorporar o enxerto ósseo e ao mesmo tempo protegê-lo, diminuindo a reabsorção do mesmo. A presença do enxerto contribuiria para a manutenção do espaço e do volume ósseo, evitando o colapso da membrana. Estudos, que usaram a associação das duas técnicas, mostram resultados positivos, em animais (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002a; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005), e em humanos (SIMION et al., 1998; VON ARX; BUSER, 2006), sendo a membrana de PTFE-e a mais utilizada.

Quanto ao momento da colocação do implante, duas opções são as mais avaliadas: implante e enxerto colocados simultaneamente, em um único estágio cirúrgico, o que permitiria um ganho de tempo de tratamento até a reabilitação protética ou, enxerto com posterior colocação do implante, após a regeneração inicial do enxerto, o que prolongaria o tratamento, mas que permitiria a colocação do implante em osso totalmente revascularizado.

Com o advento de superfícies de implante que permitem uma osseointegração mais precoce e a utilização da técnica de aumento de tecido ósseo conjuntamente com a colocação de implantes, importante se faz o conhecimento dos mecanismos biológicos e da seqüência temporal dos eventos regenerativos envolvidos na formação de novo osso, seguido de ROG com membrana de colágeno e enxerto ósseo autógeno ao redor de implantes de titânio. Esse conhecimento é

necessário para entender os passos que levam à completa regeneração e maturação do tecido ósseo. Com essas informações, pode-se tornar possível influenciar positivamente o processo de reparação do enxerto ao redor de implantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para a melhor compreensão, esta revisão de literatura será dividida em 3 tópicos: enxerto ósseo, regeneração óssea guiada (ROG) e osseointegração e tratamento de superfície.

2.1 Enxerto ósseo

Os enxertos ósseos são utilizados desde 1878, tendo uma extensa aplicação em cirurgias ortopédicas. Na odontologia, eles têm sido usados cada vez mais para aumentar o volume de rebordos severamente comprometidos, principalmente para procedimentos que visam à reabilitação com implantes.

Estudos buscaram definir os fatores que interferem no sucesso do tratamento com enxertos. Reduzida atividade biológica e ausência de histocompatibilidade do enxerto com o hospedeiro, origem embriológica, ausência de pedículo vascular, presença de células osteogênicas vitais e histocompatíveis, ausência de estabilidade mecânica e ausência de íntimo contato com o leito, foram apontados como fatores que interferem na vascularização, na formação de novo osso e na união adequada do enxerto com o hospedeiro (De CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000; LIN et al., 1990; STEVENSON; EMERY; GOLDBERG, 1996).

Enxertos em bloco córtico-esponjosos apresentam maior taxa de reabsorção e são mais extensivamente incorporados que enxertos bicorticalizados (ALBERIUS

et al., 1996). Em relação aos enxertos autógenos particulados, a revascularização dos blocos mostra-se mais lenta (ENNEKING; EADY; BURCHARDT, 1980).

A avaliação da interferência de perfurações na cortical do leito, do enxerto ou de ambos, assim como da decorticalização total do leito, nos processos de reabsorção, revascularização, remodelação e incorporação de enxertos *onlay* córtico-esponjosos ou bicorticalizados, foram realizadas por diversos estudos experimentais em cães, coelhos e ratos (De CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000, FARIA et al., 2008)

A remodelação do enxerto autógeno ocorre pela substituição de osso necrótico por osso viável, dentro do enxerto, processo denominado de *creeping substitution* (BURCHARDT; ENNEKING, 1978). Esse processo é dependente da revascularização do enxerto e pode ocorrer de variados modos, de acordo com o tipo de tratamento recebido pelo leito (De CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000).

Segundo a literatura, a perfuração ou a decorticalização do leito permitem uma angiogênese precoce do enxerto, o que acelera o processo de remodelação e o torna mais extenso, propiciando o aumento da densidade do enxerto em períodos de avaliação de até 60 dias em coelhos (FARIA et al., 2008). Estudos mostram que a decorticalização permite ainda, um melhor assentamento do enxerto ao leito e facilita a sua incorporação, em períodos de cerca de 4 meses (PIKOS, 1999).

Por outro lado, tanto a perfuração quanto a decorticalização do leito propiciaram uma reabsorção acentuada do mesmo, ou por enfraquecimento de sua estrutura, ou por permitir um acentuado aporte vascular, levando à rápida remodelação do leito (De CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000) .

O íntimo contato e a estabilização do enxerto junto ao leito também podem interferir no resultado final. Um aumento da estabilização pode ser conseguido com

o uso de parafusos de fixação óssea (URBANI et al., 1998), ou com a colocação simultânea de implantes dentais (ADELL et al., 1990; BREINE; BRANEMARK, 1980).

Diante da viabilidade de incorporação do enxerto autógeno e do maior conhecimento do processo de revascularização e remodelação do mesmo, estudos em humanos buscaram definir uma técnica aplicável e que permitisse resultados previsíveis para diversas situações clínicas.

Enxertos intra-bucais de sínfise, túber e área retromolar (MATSUMOTO et al., 2002; MISCH, 1997; RAGHOEBAR et al., 1996), assim como de ramo da mandíbula (MISCH, 1997) e extra-bucais de ilíaco (MATSUMOTO et al., 2002) em bloco, mostraram incorporação ao leito e volume adequado, após 3 e 6 meses.

Os enxertos intra-orais, em bloco, de origem intramembranosa, apresentam menores taxas de reabsorção do que enxertos de origem endocondral (ZINS; WHITAKER, 1983). Taxas de 17,4% de reabsorção, após 4 a 6 meses da cirurgia, têm sido relatadas para o uso de enxerto autógeno em bloco associado a enxerto medular particulado (PROUSSAEFS; LOZADA, 2005). Raghoobar et al. (1996) notaram, no momento da colocação dos implantes, 25% de reabsorção do enxerto, assim como taxas de 60% foram observadas por Widmark, Andersson e Ivanoff (1997), no momento da conexão do pilar protético.

A qualidade da reparação óssea foi avaliada para enxertos de mento e de ilíaco em 10 pacientes, comprovando uma boa incorporação do enxerto autógeno em bloco, intra ou extra-bucal, com intensa osteogênese e ativa remodelação (MATSUMOTO et al., 2002). A manutenção da vitalidade de enxertos intramembranosos também foi mostrada por Proussaefs e Lozada (2005).

Enxertos ósseos autógenos são considerados o padrão ouro em reconstrução óssea, pois são imunologicamente inertes e osteogênicos. Um período de 4 a 6 meses parece ser o suficiente para a colocação de implantes em áreas reconstruídas com enxerto, pois o mesmo já se apresenta incorporado ao leito.

2.2 Regeneração óssea guiada

Os estudos de Hurley et al. (1959) e de Murray, Holden e Roschlau (1957), na década de 50, usavam barreiras físicas visando à regeneração tecidual guiada.

Na década de 60, a reparação óssea foi mostrada em estudos experimentais em cães e ratos, através da utilização de tubos de polietileno (LINGHORNE, 1960) e filtros de acetato (BOYNE, 1969) verificando a importância da proteção do coágulo sanguíneo para o processo de reparação (MELCHER; DENT, 1962).

O princípio de regeneração tecidual guiada (RTG) foi mostrado por Nyman et al. (1982), em estudo que objetivou a regeneração do periodonto de inserção, incluindo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar.

A técnica foi comprovada por estudos em animais (GOTTLOW et al., 1984; KARRING et al., 1985) e em humanos (GOTTLOW et al., 1986), tendo sido o mesmo princípio, posteriormente, testado para regeneração do tecido ósseo. Através do uso de membrana de barreira, um espaço deve ser criado sobre o defeito ósseo, promovendo crescimento de células osteogênicas e prevenindo a migração indesejada de células de tecido mole, circunjacentes ao defeito, para dentro deste

espaço. A sequência da reparação óssea pode ser afetada pelo tamanho e morfologia do defeito.

Defeitos ósseos bilaterais, em ratos ou primatas, não cobertos por membrana, apresentam pouca regeneração, ou preenchimento por tecido conjuntivo fibroso, comparados àqueles cobertos por membranas, que podem apresentar preenchimento ósseo em sua totalidade (DAHLIN et al., 1988, 1990).

O potencial da técnica de ROG com membranas de PTFE, ao redor de implantes, foi mostrado em tíbias de coelho. O recobrimento total das espiras do implante, através da neoformação óssea, em todos os sítios, em até 6 meses após a cirurgia, comprovou a viabilidade da técnica (DAHLIN et al., 1989).

A literatura mostra uma grande variedade de estudos em animais (ALBERIUS; DAHLIN; LINDE, 1992; HURZELER; QUINONES; SCHUPBACH, 1997; KOSTOPOULOS; KARRING, 1994a, 1994b; KOSTOPOULOS; KARRING; URAGUCHI 1994) e em humanos (BUSER et al., 1993, 1995; JOVANOVIC; SPIEKERMANN; RICHTER, 1992; PARMA-BENFENATI et al., 1999; SIMION et al., 1998; SIMION; TRISI; PIATELLI, 1994; TINTI; PARMA-BENFENATI; POLIZZI, 1996) que buscam ampliar as indicações do tratamento com implantes através da reconstrução de defeitos ósseos e dos aumentos, lateral e vertical, do rebordo.

Apesar de existirem diferenças biológicas entre enxertos intramembranosos e endocondrais, ambos apresentam menores taxas de reabsorção quando cobertos por membranas de PTFE para reconstrução de defeitos ósseos em ratos, após 12 semanas. O uso da membrana permite a fixação de enxertos *inlay* ou *onlay* de menor tamanho, pois induz à neoformação óssea (ALBERIUS; DAHLIN; LINDE, 1992).

Períodos prolongados, de 3 a 6 meses em ratos, parecem permitir a ROG em defeitos intra-ósseos mandibulares, ou externamente ao envelope ósseo. A avaliação de mandíbulas maceradas permite observar preenchimento completo dos defeitos cobertos por membrana de lenta reabsorção, ao contrário de defeitos com ausência de recobrimento, que apresentam preenchimento parcial de 35 a 40%. Aumentos de 5 a 6 vezes a largura original do ramo da mandíbula são observados após uso de uma cápsula rígida de PTFE fixada ao osso (KOSTOPOULOS; KARRING, 1994a,b).

O aumento horizontal do rebordo ósseo de humanos por ROG foi bem documentado nos anos 90, através dos estudos de Buser et al. (1993, 1995, 1996).

A utilização de técnica criteriosa de dois tempos cirúrgicos permite uma dupla ativação da neoformação óssea, além de um melhor posicionamento do implante (BUSER et al., 1993, 1995). Por sua vez, a utilização de enxerto sob a membrana, possibilita um maior aumento da largura do rebordo, de 3,5 mm para 7,1 mm em média em relação ao uso isolado da membrana. A quantidade do aumento pode ser atribuída à capacidade osteoindutiva e osteocondutiva do enxerto autógeno em bloco e à capacidade do mesmo de evitar o colapso da membrana (BUSER et al., 1996).

O uso da ROG para aumento vertical de rebordo foi testado por Hurzeler, Quinones e Schupbach (1997) em rebordos atróficos de macacos, após a colocação de implantes. Utilizaram dois tipos de membranas: grupo controle, membrana não absorvível e grupo teste, membrana reabsorvível. Verificaram a ocorrência da regeneração nos dois grupos, porém, esta sendo superior na quantidade de preenchimento ósseo no grupo controle, enquanto que o grupo teste apresentou uma reação inflamatória moderada.

Estudos clínicos demonstraram ser possível aumentar a altura do rebordo ósseo. O aumento foi mostrado ao redor de implantes de titânio, inseridos no rebordo alveolar, com 4 a 7 mm de seu comprimento total expostos acima do rebordo. Quando o implante foi recoberto por membrana de PTFE-e, com reforço de titânio, observou-se um aumento de 3 a 4 mm da altura do rebordo e osseointegração do osso regenerado ao enxerto, após 8 meses da remoção da membrana (SIMION; TRISI; PIATELLI, 1994). Um aumento de rebordo, de 4,95 mm em média, foi apresentado quando adicionado ao redor do implante, enxerto autógeno particulado coberto por membrana de PTFE-e com reforço de titânio, com tempo de cicatrização de 12 meses (TINTI; PARMA-BENFENATI; POLIZZI, 1996). O efeito benéfico do uso de enxertos com membranas para aumento ósseo vertical foi confirmado pela avaliação de 58 implantes, em 20 pacientes, independente do tipo de enxerto utilizado, autógeno ou alógeno. Ambos parecem ajudar na estabilização do coágulo sanguíneo e a evitar a formação de espaços vazios sob a membrana (SIMION et al., 1998).

Não está clara a correlação entre a densidade do osso pré-existente com a densidade do osso neoformado. Avaliações histológicas quantitativas e qualitativas demonstram tanto uma relação positiva (SIMION et al., 1998), quanto ausência de correlação. O osso neoformado apresenta uma menor densidade óssea ao redor das espiras do implante, em comparação com o osso pré-existente, após 12 meses de avaliação (PARMA-BENFENATI et al., 1999).

O uso de membrana no procedimento de ROG tem por função impedir a penetração de células não-osteogênicas no espaço criado pela membrana. Porém, a limitação de um espaço isolado dos tecidos adjacentes, diminui a possibilidade de vascularização da área a ser regenerada, evento fundamental para a ocorrência da

neoformação óssea. Estudos em animais demonstraram que a perfuração da cortical óssea, além de acelerar a neogênese em áreas protegidas por uma barreira, propiciou um aumento da densidade do osso neoformado. Porém, não foram conclusivos quanto à correlação da perfuração ou decorticalização e o aumento da quantidade de osso neoformado (LUNDGREN et al., 2000; MAJZOUN et al., 1999; SLOTT; LUNDGREN, 2002).

Como visto previamente, o uso de enxertos em bloco para aumento do volume ósseo pode apresentar uma alta taxa de reabsorção da superfície do enxerto além de ausência de incorporação devido à interposição de tecido conjuntivo entre o enxerto e o osso pré-existente.

Com a associação do enxerto à membrana na técnica de ROG, buscou-se comprovar os benefícios da associação através da compreensão dos mecanismos biológicos, assim como da seqüência temporal dos eventos do processo de formação de novo osso, permitindo minimizar o processo de reabsorção do enxerto, tornando o resultado final mais previsível.

Estudos em ratos demonstram que o enxerto autógeno, em bloco isolado, sofre reabsorção periférica contínua em avaliações de 6 a 12 meses (GORDH et al., 1998). O uso da membrana de PTFE-e sobre o enxerto possibilita o crescimento de osso neoformado entre eles, além de favorecer uma maior integração junto ao leito, que se inicia com a formação de pontes ósseas aos 7 dias. O aumento ósseo total pode chegar até 50% do volume inicial do enxerto (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005).

A avaliação da reparação do enxerto autógeno em bloco, sobre mandíbula de rato, associado a micro-implantes, demonstrou melhores resultados para os grupos cobertos por membrana de PTFE-e, em análise histológica de material não

descalcificado. Este grupo apresentou menor taxa de reabsorção da superfície do enxerto, quando comparado ao grupo sem membrana, assim como, aos 15 dias, início de formação de um fino trabeculado sobre a superfície externa do enxerto com largos espaços medulares. A continuidade com o leito pode ser observada aos 60 dias, sendo a maturação do osso neoformado, com aumento de sua densidade e preenchimento completo do espaço criado pela membrana, alcançado aos 120 dias. Em 180 dias o enxerto já não pode mais ser distinguido do osso neoformado (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002a).

Em contraste, estudos em coelhos sugerem que a membrana atrasa a incorporação do enxerto por restrição das fontes de vascularização, além de não influenciar no volume ósseo final do enxerto. Mesmo havendo presença de osso neoformado, a estrutura óssea formada sofreu redução de volume com o tempo (SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002), podendo ser essa redução devido à revascularização mais lenta, o que permite uma hipóxia transitória do enxerto (FARIA et al., 2008).

Muitos estudos foram realizados para a comprovação da técnica de ROG, associada ou não a enxertos, como os descritos acima. Porém, muitos relatam resultados obtidos, no máximo, logo após a remoção da membrana de PTFE-e. Dúvidas surgiram quanto à estabilidade do aumento ósseo alcançado a longo prazo, assim como sobre a qualidade do osso regenerado, e, principalmente, em sua relação com a osseointegração.

Uma menor quantidade de contato osso-implante é encontrada ao redor do osso neoformado na técnica de ROG, quando comparada ao osso nativo (PARMA-BENFENATI et al., 1999), com uma tendência ao aumento do contato na presença de osso regenerado após associação de enxerto com ROG (SIMION et al., 1998,

DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING 2002b), parecendo não haver benefício à osseointegração devido à presença da membrana (LIMA et al., 2003; SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002). Lima et al. (2003), porém, demonstraram a influência da superfície dos implantes de titânio no percentual de contato osso-implante em áreas de osso regenerado por ROG.

Estudo em ratos mostrou que, com a remoção da membrana, não há uma redução do contato osso-implante e nem da área de osso entre as espiras (RASMUSSEN et al., 1997). A presença do implante parece ter um efeito estabilizador sobre a reabsorção óssea devido a maior presença de tecido ósseo ao redor do implante quando comparada à presença de osso em áreas mais distantes do implante. Porém, estudo em coelhos mostra uma redução do volume ósseo ao redor do implante em acompanhamento de 16 meses, após a remoção da membrana de PTFE-e (RASMUSSEN et al., 1999).

Donos et al. (2005) compararam a estabilidade a longo prazo de enxertos ósseos autógenos, endocondral e membranoso, associados ou não às membranas de PTFE-e. Os resultados mostraram que os dois grupos de enxertos com membranas apresentaram, além da integração do enxerto ao leito e de formação de novo osso, um aumento de todas as dimensões do enxerto (em 5 meses), e que, após a remoção da membrana, apresentaram um decréscimo de volume ao final de 11 meses de cicatrização, aproximando-se das medidas originais dos enxertos. Nos grupos sem membranas, a reabsorção do enxerto foi constante, sendo um pouco inferior no grupo do enxerto endocondral. Concluíram que foi possível aumentar a espessura da mandíbula, e mantê-la a longo prazo, quando o enxerto ósseo foi associado à membrana, independente da origem embriológica do enxerto ósseo.

Para a obtenção de sucesso com o uso da técnica de ROG, especial atenção deve ser dada às características da membrana utilizada. Os materiais de barreira usados para ROG têm que apresentar as seguintes características: biocompatibilidade, integração tecidual, oclusão celular, capacidade de manutenção de espaço, adaptabilidade de forma e fácil manuseio (GOTLOW, 1993).

A técnica de ROG teve sua previsibilidade comprovada, principalmente através de estudos que utilizaram membranas de PTFE-e. Porém, diante das desvantagens e complicações geradas por essa membrana - não-absorvível, hidrofóbica, de difícil fixação, risco elevado de deiscências teciduais e subsequente risco de contaminação após exposição ao meio bucal e necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção da membrana (AUGTHUN et al., 1995; CHIAPASCO et al., 1999), outros materiais foram testados para atuarem como barreira no processo de regeneração. As membranas bioabsorvíveis ou reabsorvíveis surgiram visando à redução de custos e de riscos ao tratamento.

As membranas de colágeno e de ácido hialurônico são capazes de aumentar a síntese de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina e de estimularem a síntese de DNA e a secreção de TGF- β , *in vitro* (MARINUCCI et al., 2001).

Estudos que avaliaram a relação das membranas de colágeno ou de PTFE-e com enxerto autógeno em bloco, em animais, não mostraram diferenças no processo de reparação do enxerto ósseo. Houve total integração do enxerto ao leito e aumento do volume ósseo do enxerto no período de permanência das membranas (ADEYEMO et al., 2008; GIELKENS et al., 2008).

Apesar de existirem poucos estudos, até o momento, em humanos, sobre avaliação do aumento horizontal ou vertical do rebordo através da técnica de ROG com membranas de colágeno, os resultados apresentados são positivos.

Em áreas de deiscências ósseas, as membranas de colágeno podem favorecer um ganho ósseo comparável àquele conseguido com o uso de membranas de PTFE-e, em animais (HURZELER et al., 1998), ou em humanos (HAMMERLE; LANG, 2001; ZITZMANN; NAEF; SCHARER, 1997).

Em defeitos ósseos horizontais, em humanos, o uso da membrana de colágeno associada ao enxerto ósseo possibilitou um aumento significativo na espessura do rebordo de 3,06 mm para 7,66 mm após 6 meses (VON ARX; BUSER, 2006) e de 3,2 mm para 6,9 mm após 9 e 10 meses (HAMMERLE et al., 2008), com valores semelhantes aos obtidos com membranas de PTFE-e (BUSER et al., 1996).

Em defeitos ósseos verticais, a ROG com membrana de colágeno possibilitou o preenchimento de 83% da área média dos defeitos, em áreas de colocação imediata de implantes, demonstrando a previsibilidade da técnica através de uma série de 11 casos (LLAMBÉS; SILVESTRE; CAFFESSE, 2007).

A facilidade de manipulação da membrana, a ausência de necessidade de uma segunda etapa cirúrgica, ausência de infecção e baixo percentual de exposição da membrana tornaram o uso das membranas de colágeno mais fácil do que o de membranas de PTFE-e (FRIEDMANN et al., 2002; MOSES et al., 2005).

Apesar das vantagens existentes, a membrana de colágeno apresenta propriedades mecânicas desfavoráveis (HURZELER et al., 1998) e uma degradação precoce, principalmente quando exposta ao meio bucal, o que pode reduzir a regeneração óssea (MELLONIG; NEVINS, 1995).

A literatura mostra que as membranas de colágeno apresentam uma degradação de leve à moderada no primeiro e segundo meses após a sua colocação, estando ausente ou com degradação severa após 4 meses de avaliação

em cães (OWENS; YUKNA, 2001), ou em até 6 meses de avaliação em humanos (TAL et al., 2008).

Ainda com poucos estudos que relacionam as membranas de colágeno aos enxertos ósseos para reconstruções externas ao envelope ósseo original, a literatura aponta a precoce degradação da membrana de colágeno como o principal empecilho para a utilização deste material na técnica de ROG.

2.3 Osseointegração e tratamento de superfície

A reabilitação de áreas edêntulas sempre motivou inúmeras pesquisas científicas na busca de um tratamento que pudesse ser rápido e também, o mais próximo à condição natural do paciente. O conceito de osseointegração começou a ser definido no final da década de 70 e início da década de 80, com os estudos de Branemark et al. (1969, 1977), que demonstraram a integração de implantes de titânio em osso, tendo seu sucesso a longo prazo confirmado com os estudos de Adell et al. (1990).

Em 1992, a American Academy of Periodontology definiu osseointegração como o contato direto, em nível de microscopia óptica, entre tecido vital e implante. Dessa forma, diversos estudos histológicos foram realizados e associados aos estudos clínicos, para comprovar a viabilidade da osseointegração de diversos modelos de implantes.

Diversas formas de avaliação da osseointegração foram utilizadas: avaliação histológica do contato osso-implante, avaliação da densidade óssea na região das

espiras, mensuração do torque necessário para a remoção de um implante, análise da frequência de ressonância e avaliação radiográfica.

Com o desenvolvimento de implantes com composições, formatos e tratamentos de superfície variados, e o aumento das indicações de aplicação dos implantes, diversos estudos procuraram definir as variáveis que influenciam a aposição óssea na proximidade da superfície do implante. Em seu estudo, Thomas e Cook (1985), concluíram que, dos parâmetros estudados, apenas a rugosidade de superfície apresentou um efeito significativo na integração do implante. A análise histológica mostrou que as superfícies lisas apresentaram diversos graus de encapsulamento por tecido conjuntivo denso, enquanto que as superfícies rugosas exibiram aposição óssea direta.

Estudos como os de Carlsson et al. (1988) e Wennerberg et al. (1995) definiram que a resistência ao torque para a remoção de implantes osseointegrados era maior em implantes de superfícies tratadas e consideradas rugosas, quando comparados aos implantes de superfícies lisas.

Avaliando a porcentagem de osseointegração, através de avaliação histométrica, estudos de Buser et al. (1991), Ericsson et al. (1994) e Wennerberg et al. (1995), realizados em implantes com diferentes tratamentos de superfície, apresentaram, como resultado comum, um maior contato osso-implante nos implantes com superfície tratada, quando comparados com os implantes de superfície lisa.

Na mesma época, trabalhos de Martin et al. (1995) e Schwartz et al. (1997), demonstraram, *in vitro*, que os tecidos moles interagiam melhor com superfícies de titânio polidas e lisas, enquanto que a osseointegração era favorecida pela superfície rugosa, devido a uma aumentada afinidade de osteoblastos a esta superfície e maior

produção de matriz extracelular, como demonstrado pelos trabalhos de Bowers et al. (1992), Brunette e Chehroudi (1999), Cochran et al. (1998) e Ivanoff et al. (2001, 2003).

Mesmo em defeitos intra-ósseos, onde a superfície do implante não estava em íntimo contato com a superfície óssea, no período inicial, foi possível observar que a osseointegração dos implantes neste tipo de defeito era influenciada pelas características de superfície do implante. Após quatro meses de cicatrização, os defeitos marginais ao redor dos implantes de superfície rugosa apresentaram um preenchimento ósseo substancial e um alto grau de osseointegração, nas duas técnicas utilizadas. Por outro lado, a cicatrização ao redor de implantes de superfície lisa foi incompleta, havendo a presença de uma zona de tecido conjuntivo entre o implante e o tecido ósseo neoformado.

Com a confirmação de que as superfícies consideradas rugosas permitiam um aumento na porcentagem de osseointegração, quando comparadas com as superfícies polidas, novos estudos buscaram definir as microcaracterísticas das superfícies e as suas relações com moléculas e grupos celulares.

Implantes com superfície tratada (SLA) apresentaram presença de hidretos de titânio (20-40%) sobre sua superfície, diferentemente de implantes usinados (TABORELLI et al., 1997). Uma superfície de dióxido de titânio hidroxilada/hidratada apresenta maior energia livre de superfície, o que possibilita a aceleração do processo de adsorção de moléculas inorgânicas (íons cálcio e fosfato) e orgânicas (proteínas, lipoproteínas e peptídeos), facilitando a inserção de osteoblastos à superfície dos implantes (FENG et al., 2003; KILPADI; LEMONS, 1994).

Quanto ao padrão da aposição óssea ao redor dos implantes, a literatura mostra que este depende da natureza do recipiente ósseo, da dimensão do espaço

entre o implante e a cavidade óssea pré-existente e das propriedades e qualidades da superfície do implante (FUTAMI et al., 2000). Quando avaliadas as respostas teciduais às superfícies de hidroxiapatita ou de Al_2O_3 , observou-se que a formação óssea dirigiu-se da proximidade do implante para o tecido ósseo pré-existente no grupo de hidroxiapatita, enquanto que no segundo grupo (Al_2O_3), o processo aconteceu no sentido contrário (SHIRAKURA et al., 2003).

Estes 2 mecanismos de integração endóssea, foram denominados de osteogênese de contato e osteogênese à distância (DAVIES, 2003).

Com a comprovação da capacidade das superfícies de titânio rugosas em favorecer a osseointegração, estudos recentes têm-se voltado para a avaliação do contato osso-implante, em períodos precoces de cicatrização óssea.

Franchi et al. (2007) instalaram 72 implantes em tíbias de ovelhas. Após 2 semanas, todos os implantes encontravam-se fixados, biologicamente, por um osso imaturo neoformado, preenchendo o espaço entre o osso receptor e o implante. A espessura desse tecido aumentou através de deposição gradual de osso lamelar em forma de fibras paralelas, após 4 semanas.

Slaets et al. (2007), em estudo em coelhos, observaram o padrão de formação óssea ao redor de implantes instalados na tíbia, em períodos de 7, 28 e 42 dias. Verificaram um equilíbrio na ação de osteoclastos e osteoblastos em 7 dias, sendo que, em 28 dias, a ação de osteoblastos foi maior, ocorrendo deposição máxima de osteóide durante o experimento. Em 42 dias, observou-se uma intensa remodelação óssea e formação de osso neoformado, possivelmente promovendo a osseointegração.

Em 2008, Burgos et al., buscaram descrever os eventos iniciais da integração óssea de implantes de titânio com superfícies oxidadas ou usinadas. Através da

colocação de 18 implantes, em metáfise de tíbia de coelhas, avaliações foram realizadas em 7, 14 e 21 dias, com análise do grau de contato osso-implante e área do osso entre as espiras. Os autores puderam concluir que o contato osso-implante aumentou com o tempo, sendo maior na superfície tratada, e que os implantes com superfícies diferentes apresentaram caminhos diferentes de osseointegração: enquanto a formação ocorreu, diretamente, sobre a superfície oxidada, na superfície usinada a integração ocorreu por crescimento do osso medular adjacente em direção à superfície do implante.

Em estudo em humanos, Grassi et al. (2006) buscaram avaliar, histologicamente, a fase precoce da osseointegração. Através da avaliação de 28 mini-implantes de superfície usinada, ou tratada por jato de areia e ataque ácido, verificaram após 2 meses, maiores valores de contato osso-implante para a superfície tratada (42%) em relação à superfície usinada (23%), sem diferenças entre a densidade óssea.

A literatura é vasta em estudos que demonstram a influência das superfícies tratadas dos implantes sobre a velocidade e a quantidade de osseointegração, porém, poucas são as informações sobre a existência ou não de interferência da superfície do implante no processo de reparação de enxertos ósseos.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- 1- Avaliar quantitativamente o osso regenerado após técnica de regeneração óssea guiada utilizando osso autógeno em bloco e membrana de colágeno.
- 2- Analisar o processo de reparação do enxerto ósseo autógeno em bloco ao redor de superfícies de implantes usinadas ou tratadas por jato de óxido de titânio por um período de até 150 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar (*rattus norvegicus*), com peso aproximado de 250 a 300g, originados do biotério do ICB-USP, após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Anexo A).

4.2 Superfície dos implantes

Foram utilizados implantes de titânio (Sistema INP, São Paulo, Brasil) de 1,5 mm de diâmetro de cabeça, 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento. A característica da superfície dos implantes foi o fator de divisão dos animais em dois grupos, sendo:

Grupo U: 30 animais com implantes de superfície totalmente usinada.

Grupo T: 30 animais com implantes de superfície tratada por jato de óxido de titânio.

4.3 Membranas

Todos os animais receberam enxerto autógeno em bloco do tipo *onlay*, fixados pelos próprios implantes e recobertos por membrana de colágeno bioabsorvível (Bio-Gide, Geistlich Pharmaceutical, Wollhausen, Suíça).

4.4 Procedimento cirúrgico

A técnica utilizada foi modificada de Jardini, De Marco e Lima (2005). Os animais foram anestesiados com Cloridrato de xilazína (Rompum, Bayer S.A., Saúde Animal, São Paulo, Brasil) mais Ketamina (Francotar, Vibrac Ind. e Com. LTDA, Roseira, Brasil), na proporção de 1:1, sendo administrados 0,2 ml para cada 100 mg de peso do animal. Após a anestesia, com o uso de uma lâmina de barbear, foi realizada a tricotomia das regiões temporal e parotídeo-massetérica esquerda, e frontal bilateral. A anti-sepsia das áreas foi realizada com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%.

Uma incisão em meia-lua, paralela ao arco zigomático, próximo ao ângulo da mandíbula, foi realizada na pele do animal, permitindo a visualização do músculo masseter. O músculo masseter foi divulsionado, permitindo o acesso à tábua óssea vestibular da mandíbula (Figura 4.1), com o uso de instrumentais desenvolvidos especialmente para esta finalidade.

As estruturas anatômicas linguais foram deslocadas com o uso de uma espátula desenvolvida para esta finalidade. Com o leito receptor exposto, procedeu-

se o acesso ao leito doador do enxerto. Tanto para a remoção do enxerto ósseo, quanto para a realização das perfurações do enxerto e do leito receptor, foi utilizado um motor elétrico que permitiu uma velocidade constante de 800 RPM e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

Uma incisão linear foi realizada no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal. Com o auxílio de uma broca do tipo trefina, de 3,5 mm de diâmetro interno (Sistema INP, São Paulo, Brasil), um bloco ósseo foi removido, com cuidado para não envolver a região da sutura de crescimento sagital e coronal (Figura 4.2).

Figura 4.1 – Vista da cortical vestibular da mandíbula

Figura 4.2 – Enxerto ósseo delimitado, no osso parietal

Figura 4.3 – Implante transpassando o enxerto

Figura 4.4 – Enxerto fixado ao leito por meio do implante

Figura 4.5 – Membrana de colágeno perfurada

Figura 4.6 – Membrana posicionada sobre enxerto e implante

O enxerto foi perfurado em sua região central, com o uso de uma broca helicoidal de 1,2 mm de diâmetro (Sistema INP, São Paulo, Brasil) e acondicionado em uma placa de Petri contendo solução fisiológica estéril.

Para a perfuração da região do ângulo da mandíbula, medidas foram realizadas com o uso de uma sonda periodontal, de maneira que a perfuração permanecesse equidistante 3 mm tanto da região da chanfradura mandibular, quanto da borda mais inferior do corpo da mandíbula.

Após a perfuração do leito receptor, com o uso da mesma broca helicoidal, o enxerto ósseo foi transpassado pelo implante (Figura 4.3), sendo o conjunto enxerto-implante, posicionado e fixado ao leito receptor, com o uso de uma chave para implantes.

O implante foi travado no leito receptor mantendo o enxerto ósseo justaposto ao mesmo e isento de mobilidade (Figura 4.4).

O recorte da membrana bioabsorvível foi realizado em sua porção oclusiva, com um bisturi circular de 6,0 mm de diâmetro interno (Factory Instrumentais Cirúrgicos, São Paulo, Brasil) (Figura 4.5). A membrana foi então posicionada sobre o conjunto enxerto-implante cobrindo todo o enxerto, sendo estabilizada na cabeça

do implante através de uma perfuração feita previamente no centro da mesma com a sonda periodontal (Figura 4.6).

Na área experimental, as suturas foram realizadas por planos, suturando-se inicialmente o músculo, com fio 5.0 absorvível de poligalactina 910 (Vicryl, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). A pele foi suturada com fio 6.0 de Nylon (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil), tanto na área doadora quanto na área receptora.

Os animais permaneceram em gaiolas aquecidas até o término do efeito da sedação e em seguida foram transferidos para o biotério onde receberam dieta pastosa e água à vontade.

4.5 Ortotanásia dos animais

A ortotanásia dos animais foi realizada em zero hora, 14, 21, 45 e 150 dias. Para cada período, a ortotanásia foi realizada nos 6 animais de cada grupo (U e T).

Para esse procedimento, os animais foram novamente anestesiados, como foi descrito anteriormente, sendo em seguida realizada a técnica da perfusão transcardíaca. Nesta técnica, o coração do animal foi exposto e o vértice e o átrio direito cortados. Imediatamente após, heparina foi injetada (0,1 ml por animal) para impedir a coagulação sanguínea e uma cânula, previamente conectada a uma bomba de irrigação, foi introduzida na aorta ascendente. Uma solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) foi inicialmente bombeada, para remoção de todo o sangue do

animal e, posteriormente, uma solução de formaldeído a 3,7%, para a fixação do animal.

Seguiu-se com a decapitação do animal e remoção da hemi-mandíbula, incluindo a área operada, que foi fixada com formaldeído a 3,7% por mais uma semana. Os espécimes foram catalogados.

4.6 Processamento histológico

Os espécimes receberam processamento histológico para material não-descalcificado (SCHENK et al., 1994). Após permanecerem 24 horas em água corrente, os espécimes foram trimados e desidratados em escala ascendente de concentrações alcoólicas. Os espécimes foram incluídos em resina metilmetacrilato (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça). Os cortes foram realizados no sentido vestibulo-lingual, perpendicular ao enxerto. Secções de 500 µm foram obtidas com um disco de diamante (Varicut -50, Leco Instrumente GMBH, Monchengladbach, Alemanha), utilizando baixa velocidade e com irrigação constante. Em seguida, as secções foram coladas às lâminas de acetato opaco, desgastadas e polidas com o uso de uma politriz (Knuth-Rotor-3, Struers, Copenhagen, Dinamarca), até uma espessura aproximada de 80 µm e coradas com Azul de Toluidina.

4.7 Análise histológica

Foram selecionados os cortes centrais de cada peça para a análise qualitativa dos diferentes componentes teciduais.

Utilizamos um microscópio de luz (Axioskop 2 Plus, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha), com objetivas que permitiram o aumento de 25 a 400 vezes. A análise foi iniciada em pequeno aumento (25 vezes) para que pudéssemos visualizar o corte como um todo. Com a ampliação da imagem, realizamos, sistematicamente, a análise dos seguintes aspectos dos cortes: características do enxerto ósseo (tipo de osso, vitalidade do tecido ósseo, área de reabsorção óssea, substituição e neoformação óssea, área do enxerto voltada para a membrana, área do enxerto voltada para a interface leito-enxerto e área do enxerto voltada para a superfície do implante); em seguida, a interface leito-enxerto, avaliada quanto à presença de áreas de tecido conjuntivo interposto, áreas de reabsorção e neoformação óssea, integração do enxerto com o leito receptor através da presença de pontes ósseas e formação óssea sobre a superfície do implante. Na análise do leito receptor, avaliamos o tipo de osso, áreas de reabsorção e neoformação óssea e formação óssea sobre a superfície do implante.

4.8 Análise histométrica

As mensurações foram realizadas em microscopia de luz, com aumento de 25X, utilizando-se uma câmera digital (SV Micro, Sound Vision Inc., Estados Unidos) acoplada ao microscópio óptico (Axioskop 2 Plus, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha) e um computador (Pentium 4, Intel Brazil, Brasil) com um software Axio Vision 3.0 (Carl-Zeiss MicroImaging GMBH, Alemanha). As imagens foram capturadas, digitalizadas e calibradas no software, sendo posteriormente obtidas as seguintes medidas lineares (Figura 4.7).

Figura 4.7 - Esquema representativo do corte histológico

1. Distância da porção mais lingual da cabeça do implante até a cortical vestibular do leito (**Média do tamanho do defeito – DO**).
2. Distância da porção mais lingual da cabeça do implante (ponto fixo) até a porção mais vestibular do enxerto (**FVE**).
3. Distância da porção mais lingual da cabeça do implante (ponto fixo) até a porção mais vestibular de osso regenerado (**FVOR**).

4. Distância da porção mais lingual da cabeça do implante (ponto fixo) até a porção mais lingual do enxerto ósseo (**FLE**).
5. Distância da porção mais vestibular do osso pré-existente até a cortical lingual do osso pré-existente (**Espessura do leito - EL**).
6. Distância da porção mais vestibular do enxerto ósseo até a porção mais lingual na interface enxerto-implante (**Espessura do enxerto - EE**).
7. Espessura da interface leito-enxerto (**EI**).
8. Espessura de osso regenerado (**OR**).
9. Espessura total de tecido ósseo (**ETTO**).
10. Osso regenerado vestibularmente ao enxerto ósseo (**ORVE**).

Foram ainda obtidos, os seguintes valores percentuais:

11. Percentual de osso regenerado em relação ao defeito original (**POR**), onde:

$$POR = \frac{OR \times 100\%}{DO}$$

Sendo a medida DO considerada a média do grupo zero hora.

12. Percentual de reconstrução óssea em relação à espessura inicial do leito

(**PR**), onde:
$$PR = \frac{ETTO \times 100}{EL}$$

Sendo a medida EL considerada a média do grupo zero hora.

Para a obtenção das medidas supracitadas, consideramos a medida “osso regenerado” (OR) como a somatória de enxerto ósseo com osso neoformado.

4.9 Análise estatística

Para avaliar o efeito do tratamento na regeneração óssea ao longo do tempo, foram calculados os valores médios para cada medida linear obtida nos cortes histológicos.

Inicialmente foi verificada a normalidade da distribuição das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Devido a não normalidade dos dados e/ou variâncias não homogêneas, foram usados testes não paramétricos. Foram sacrificados diferentes animais em cada tempo experimental, portanto, foram utilizados testes para amostras independentes.

Para verificar se havia diferença entre os grupos e entre os períodos experimentais, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando o valor do teste foi significativo ($p\text{-valor} < 0,05$), foi feita uma análise de comparações múltiplas (teste de Dunn), com a finalidade de determinar em quais pares se encontrava a diferença.

Os dados coletados foram registrados em um banco de dados elaborado em programa Excel (versão 7.0). A análise estatística foi realizada em programa STATISTICA versão 5.1 e programa SPSS para Windows (versão 5.2).

Foi utilizado um nível de significância α de 5% em todos os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

Do ponto de vista clínico, não observamos deiscências de sutura, infecção ou morte de animais. Os procedimentos transcorreram sem quaisquer problemas.

Os 60 animais operados originaram 60 peças para processamento histológico. Porém, 2 peças (grupo zero hora) sofreram fratura durante o processamento histológico. Sendo assim, foram avaliadas, qualitativamente, 58 lâminas, sendo 29 do grupo de superfície usinada e 29 do grupo de superfície tratada.

5.1 Análise histológica

5.1.1 período de zero hora

Observou-se o enxerto estabilizado pelo implante osseointegrado junto ao leito receptor (Figura 5.1). As fresas do implante penetravam o enxerto e também o leito receptor. Nessas regiões observaram-se áreas de microfraturas no tecido ósseo. As microfraturas caracterizavam-se por serem em “galho verde”, mostrando “debris” próximos à área e justaposição óssea às fresas e aos passos de rosca (Figura 5.2).

O enxerto, do ponto de vista microscópico, apresentou-se distanciado do leito, em média 150 μm (aproximadamente um passo de rosca, não estando justaposto). O enxerto apresentou algumas lacunas com ausência de osteócitos, assim como canais vasculares com diversas células em seu interior. A estrutura lamelar das corticais apresentou-se bem definida, assim como a região medular da região central do enxerto (Figura 5.3).

O espaço entre o enxerto e o leito estava preenchido por um coágulo em formação, rico em hemácias (glóbulos vermelhos) e fibrina (Figura 5.4). O leito apresentou uma superfície regular com uma cortical bem definida e uma região medular subjacente com diversos espaços vasculares preenchidos por células (Figura 5.5). Podem-se observar áreas de perfurações preparadas no leito receptor (Figura 5.6).

Figura 5.1 - Fotomicrografia representativa do grupo de zero hora. Observa-se o leito receptor (L), o enxerto (E) e a interface leito-enxerto (ILE). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 25X

Figura 5.2 - Aumento maior da interface leito (L) – implante (I) em zero hora. Note a presença de debris (*) oriundos de microfraturas (cabeça de seta) e a justaposição do leito à superfície do implante (seta). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.3 - Fotomicrografia representativa do grupo de zero hora. Região do enxerto. Note as regiões corticais (EC), com lacunas, sem a presença de osteócitos (setas) e a região medular. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.4 - Aumento maior da região enxerto (E) e leito (L) em zero hora. Presença de coágulo na interface leito-enxerto (ILE). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.5 - Fotomicrografia representativa da região do leito receptor em zero hora, onde nota-se a cortical (LC) e a região medular (LM) com seus espaços vasculares (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.6 - Aumento maior da interface leito-enxerto (ILE) em zero hora. Observe a perfuração realizada na cortical do leito receptor (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

5.1.2 período de catorze dias

Observou-se intensa formação de osso imaturo a partir do leito receptor (Figura 5.7). Essa neoformação óssea, originária do leito, estendeu-se além dos limites das bordas laterais do enxerto sob as áreas protegidas pela membrana (Figura 5.8). Em algumas lâminas, observou-se formação de osso imaturo entre a cortical externa do enxerto e a membrana (Figura 5.9). Na lingual do leito receptor também se observou intensa formação de osso imaturo. O osso imaturo neoformado mostrou-se em contato com a superfície do implante, demonstrando osseointegração nas regiões do leito receptor e da interface enxerto-leito (Figura 5.10). Nessa fase, observamos contatos osso-implante em áreas de osso pré-existente, tanto no enxerto quanto no leito, assim como em áreas de osso neoformado.

A membrana mostrou-se recoberta por tecido muscular. A estrutura da membrana apresentou-se preservada e mostrou intensa penetração celular (Figura 5.11). Logo abaixo da membrana observou-se deposição óssea sobre a cortical externa do enxerto ósseo. O enxerto ósseo apresentou lacunas esvaziadas e canais vasculares repletos de células. A superfície externa e o bordo lateral do enxerto apresentaram sinais de reabsorção/neoformação óssea. Pode-se observar deposição mineral no interior de alguns canais vasculares do enxerto.

Na região da interface leito-enxerto, o osso imaturo neoformado apresentou trabéculas espessas e osteócitos volumosos. A região da interface apresentou muitos vasos e osteoblastos junto às trabéculas de osso imaturo. O leito receptor mostrou intensa remodelação nos canais vasculares em seu interior (Figura 5.12).

Nas áreas das perfurações realizadas na superfície do leito encontrou-se osso neoformado em toda a sua extensão.

Figura 5.7 - Fotomicrografia representativa do grupo de 14 dias. Observa-se o leito receptor (L) e o enxerto (E) e a presença de osso neoformado imaturo (*). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 25X

Figura 5.8 - Aumento maior da região do bordo lateral do enxerto (E) em 14 dias. Observa-se o osso neoformado (*) estendendo-se além dos limites desse bordo sob a membrana (M) e o leito (L). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.9 - Aumento maior da região da cortical externa do enxerto (E) em 14 dias. Nota-se a presença de osso imaturo (*) entre o enxerto e a membrana (M). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.10 - Fotomicrografia representativa da região da interface leito (L) – implante (I) em 14 dias. Presença de osso neoformado imaturo na interface leito-enxerto (*) e osseointegrado à superfície do implante na região do leito (cabeça da seta). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.11 - Fotomicrografia representativa da região da membrana (M) e cortical do enxerto (E) em 14 dias. Note a penetração celular na estrutura da membrana (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.12 - Aumento maior da interface leito-enxerto (ILE) em 14 dias. Presença de trabéculas espessas (*) no osso neoformado imaturo, o qual está delimitado por linha de reversão na região da perfuração do leito (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

5.1.3 período de vinte e um dias

No período de 21 dias, na área de osso regenerado, observou-se total integração enxerto-leito com a formação de pontes de osso neoformado com trabéculas espessadas, entre ambos (Figura 5.13). Sobre a cortical externa do enxerto, abaixo da membrana, observou-se osso neoformado em maturação, com características de deposição lamelar. O interior do enxerto mostrou avançada revascularização e remodelação junto às áreas de canais vasculares (Figura 5.14). A ponte de osso neoformado entre o leito e o enxerto mostrou um trabeculado espesso e em organização com extenso contato nas superfícies do enxerto e do leito receptor.

O leito apresentou linhas de reversão junto a canais vasculares em seu interior, denotando remodelação. A osseointegração pode ser observada em áreas de osso neoformado (Figura 5.15), na área de enxerto (Figura 5.16) e na área do leito receptor, mas ainda observamos áreas de contato do implante com osso pré-existente tanto no leito quanto no enxerto.

Figura 5.13 - Fotomicrografia representativa da interface leito-enxerto (ILE) em 21 dias. Note a presença de ponte de osso neoformado em organização com trabéculas espessadas (*). O mesmo apresenta extenso contato com o leito (L) e o enxerto (E). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.14 - Aumento maior da região do enxerto (E) em 21 dias. Presença de revascularização e remodelação (setas). Note a presença de osso regenerado (OR) em maturação com característica de osso lamelar. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.15 - Aumento maior na área de osso neoformado na interface leito-enxerto (ILE), em 21 dias, demonstrando osseointegração (setas) à superfície do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.16 - Fotomicrografia representativa da região do enxerto (E) em 21 dias. Note presença de osseointegração (setas) à superfície do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

5.1.4 período de quarenta e cinco dias

No período de 45 dias, observou-se osso neoformado com trabéculas bem espessadas unindo o enxerto ao leito, e osso neoformado envolvendo tanto a parte superior do enxerto (vestibular) quanto os seus bordos, denotando continuidade. A porção interna do enxerto apresentou lacunas com ausência de osteócitos, assim como linhas de reversão junto a canais de reabsorção, evidenciando reabsorção e neoformação. Assim, notou-se osso neoformado na porção interna do enxerto (Figuras 5.17 e 5.18).

Junto à superfície do implante notou-se contato osso-implante nas regiões de leito (Figura 5.19), de enxerto (Figura 5.20) e de osso regenerado (Figura 5.21). Observaram-se diversas áreas onde o osso neoformado interpôs a superfície do implante e o enxerto pré-existente. Algumas regiões sugerem uma redução na espessura original do leito.

O osso regenerado apresentou trabeculado espessado e organizado em lamelas (Figura 5.22). O osso regenerado envolveu totalmente o enxerto pré-existente e apresentou-se em continuidade ao leito, resultando em uma espessura óssea cerca de três vezes maior que a do leito original. A espessura total de osso em contato com a superfície do implante atingiu até a terceira fresa mais próxima à cabeça do implante (Figura 5.23).

Figura 5.17 - Fotomicrografia representativa da região da interface leito-enxerto (ILE) em 45 dias. Note o osso neoformado (ONF) unindo o leito (L) ao enxerto (E) e a presença de linhas de reversão (cabeça de seta) e canais de reabsorção (*). Há presença de osso regenerado (OR) envolvendo a parte superior do enxerto. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.18 - Fotomicrografia representativa da região do bordo lateral do enxerto (E), em 45 dias, demonstrando o osso regenerado (OR) envolvendo o mesmo (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.19 - Aumento maior da região do leito (L) em 45 dias. Presença de contato osso-implante (seta). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.20 - Aumento maior da região do enxerto (E), em 45 dias, onde nota-se a osseointegração (setas) à superfície do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.21 - Aumento maior da região do osso regenerado (OR) vestibularmente ao enxerto (E) em 45 dias. Observe a osseointegração (setas) à superfície do implante. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.22 - Fotomicrografia da região do osso regenerado (OR), em 45 dias, apresentando trabeculado espessado e organizado em lamelas, ao redor da borda do enxerto (E). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.23 - Fotomicrografia representativa do grupo de 45 dias. Note o osso regenerado (OR) envolvendo totalmente o enxerto (E) e em continuidade com o leito (L). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 25X

5.1.5 Período de cento e cinquenta dias

No período de 150 dias, observou-se regeneração óssea recobrindo totalmente a cabeça do implante (Figura 5.24). O osso neoformado apresentou-se maduro, mostrando linhas de reversão e organização em lamelas com diversos osteócitos no seu interior. As áreas de contato do osso neoformado com o enxerto mostraram áreas de reabsorção-neoformação óssea, onde já se podia observar osso neoformado maduro (Figura 5.25). O interior do enxerto mostrou extensas áreas de reabsorção-neoformação, assim como áreas de osso pré-existente com lacunas sem a presença de osteócitos (Figura 5.26). A espessura total de osso regenerado atingiu cerca de duas vezes a espessura original do enxerto, mostrando a região do leito com tênue espessura e, em alguns lugares, totalmente reabsorvida (Figura 5.24).

Observou-se assim, que a nova estrutura óssea formou-se, praticamente, apenas pelo osso regenerado. O osso regenerado mostrou extensas áreas de contato osso-implante tanto junto às estruturas de enxerto pré-existente (Figura 5.27) quanto na região da interface leito-enxerto (Figura 5.28) ou ainda sobre a cabeça do implante (Figura 5.29). Numa visão panorâmica observou-se, em alguns espécimes, que a posição da tábua óssea modificou-se no sentido vestibular ou da cabeça do implante (Figura 5.30). Áreas com linhas de reversão sugerem a continuidade da remodelação nesta fase (Figura 5.31).

Figura 5.24 - Fotomicrografia representativa do grupo de 150 dias. Note o osso regenerado (OR) com cerca de duas vezes a espessura do enxerto (E) e cobrindo totalmente a cabeça do implante (I). O leito apresenta-se reabsorvido. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 25X

Figura 5.25 - Aumento maior da região da cortical externa do enxerto (E) em 150 dias. Presença de osso regenerado (OR) maduro com organização em lamelas (*) e linhas de reversão (seta). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.26 - Fotomicrografia representativa do interior do enxerto (E), em 150 dias, mostrando extensas áreas de reabsorção-neoformação (*). Observe a presença de osso pré-existente com lacunas sem a presença de osteócitos (setas). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 200X

Figura 5.27 - Aumento maior da região do enxerto (E) em 150 dias. Visualize a extensa área de contato (setas) do osso regenerado (OR) com o implante (I) e com o enxerto (E). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 400X

Figura 5.28 - Aumento maior da região da interface leito–enxerto em 150 dias. Observe a presença de contato (setas) do osso regenerado (OR) com a superfície do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 400X

Figura 5.29 - Fotomicrografia representativa do osso regenerado (OR) em 150 dias. Note o contato secundário de novo osso (setas) com a superfície do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 400X

Figura 5.30 - Fotomicrografia representativa do grupo de 150 dias. Observe a mudança de posição do tecido ósseo (O) em direção à cabeça do implante (I). Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 100X

Figura 5.31 - Aumento maior das regiões de osso regenerado (OR) e enxerto (E) em 150 dias. Observe a presença de linhas de reversão (setas) e área de reabsorção. Coloração Azul de Toluidina. Aumento de 400X

5.2 Análise histométrica e análise estatística

Para a análise quantitativa, foram realizadas medidas lineares próximas à superfície do implante. Foram consideradas duas áreas de avaliação para cada corte histológico: lado direito à superfície do implante e lado esquerdo à superfície do implante. Todas as medidas foram mensuradas em ambos os lados de um corte histológico e a média desses valores realizada para este corte. Em seguida, foi obtida a média para cada grupo experimental em cada um dos períodos avaliados. Foi possível realizar as análises em 45 lâminas. Nas 13 lâminas restantes, observou-se uma intensa reabsorção dos tecidos ósseos ao redor da superfície do implante. Dessas 13 lâminas, 4 pertenciam ao grupo de 14 dias (sendo 3 lâminas representativas do grupo U e 1 lâmina representativa do grupo T), 5 pertenciam ao grupo de 21 dias (sendo 4 lâminas representativas do grupo U e 1 representativa do grupo T), e 4 lâminas pertenciam ao grupo de 45 dias (sendo 2 representativas do grupo U e 2 representativas do grupo T).

No período de 150 dias não foi possível identificar o limite entre osso regenerado e osso pré-existente da mandíbula, em alguns cortes histológicos, devido à integração do osso neoformado. O mesmo ocorreu em um corte histológico do período de 45 dias. Por esse motivo, na avaliação de algumas medidas lineares, dependentes dessa delimitação, o valor de “N” apresentou-se reduzido ou inexistente.

Inicialmente, foram obtidas as médias para o tamanho do defeito ósseo (DO) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação à medida DO (tamanho do defeito ósseo) em μm

	U			T		
	N	Média	DP	N	Média	DP
0 HORA	5	604,13	65,89	5	585,90	95,68
14 DIAS	3	608,00	73,91	5	673,16	97,92
21 DIAS	2	590,31	127,66	5	558,13	60,40
45 DIAS	4	603,76	89,06	4	658,24	91,45
150 DIAS*	-	-	-	-	-	-

P (Kruskal-Wallis) = 0,720 - nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos e tempos experimentais. * Em 150 dias não foi possível realizar esta medida, pois não houve delimitação adequada do leito pré-existente.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, não havia diferença entre os grupos e tempos experimentais com relação à média do tamanho do defeito.

Por não haver diferença estatisticamente significativa entre os períodos, os valores médios em zero hora foram padronizados como os valores representativos do tamanho do defeito neste estudo experimental.

Os resultados mostraram a padronização da técnica, uma vez que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais no período de zero hora para as medidas de espessura do leito (EL), espessura do enxerto (EE), espessura da interface leito-enxerto (EI), distância do ponto fixo à face vestibular (FVE) ou a face lingual do enxerto (FLE) e tamanho do defeito ósseo (DO). Esses resultados podem ser visualizados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação às medidas EL, EE, EI, FVE, FLE e DO no período de zero hora, em μm

	U (N = 5)		T (N = 5)		p(Kruskal-Wallis)*
	Média	DP	Média	DP	
EL	257,29	48,27	243,57	63,59	0,07
EE	379,89	30,71	368,32	35,85	0,05
EI	136,22	65,59	144,31	107,66	0,33
FVE	87,95	14,40	72,87	13,19	0,73
FLE	467,91	28,95	441,59	28,22	0,33
DO	604,13	65,89	585,90	95,68	0,72

* Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos U e T.

Na tabela 5.3 nota-se que a espessura do enxerto foi afetada pelo tipo de superfície de titânio e pelo tempo. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, houve diferença entre os grupos e tempos experimentais com relação à média de espessura do enxerto ($p=0,048$). O teste de Dunn detectou diferença entre os grupos U e T após período 150 dias ($p=0,003$), onde os valores médios foram de EE-U150 = 407,71 μm e de EE-T150 = 338,25 μm . No grupo U houve diferença significativa entre o início do estudo (EE-U0 = 379,89 μm) e período de 45 dias (EE-U45 = 440,14 μm) ($p=0,02$). No grupo T foi verificada diferença significativa entre os períodos de 14 dias (EE-T14 = 393,94 μm) e 150 dias (EE-T150 = 338,25 μm) ($p=0,02$) e entre os períodos de 45 (EE-T45 = 396,84 μm) e 150 dias (EE-T150 = 338,25 μm) ($p=0,02$). Observa-se que há uma tendência a uma discreta perda de espessura do enxerto no período final do experimento, sendo este maior para o grupo T aos 150 dias.

Tabela 5.3 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação à medida EE (espessura do enxerto) em μm

	U			T		
	N	Média	DP	N	Média	DP
0 HORA	5	379,89 ^B	30,71	5	368,32	35,85
14 DIAS	3	385,25	14,17	5	393,94 ^C	16,48
21 DIAS	2	392,35	31,37	5	375,48	35,07
45 DIAS	4	440,14 ^B	88,64	4	396,84 ^D	33,52
150 DIAS	6	407,71 ^A	26,37	6	338,25 ^{ABCD}	35,07

P (Kruskal-Wallis) = 0,048 - diferença estatisticamente significativa entre os grupos e tempos experimentais. P (Dunn): ^A p = 0,003; ^B p = 0,02; ^C p = 0,02; ^D p = 0,02, onde letras iguais indicam diferenças entre as médias.

Na tabela 5.4, observamos que a distância da cabeça do implante à porção mais vestibular do enxerto (FVE) não mostrou diferenças entre os grupos ou entre os períodos analisados, o que reforça a padronização do estudo.

Ainda observamos, já aos 21 dias, osso regenerado vestibular ao enxerto (ORVE), na direção da cabeça do implante, que continua a aumentar até os 150 dias para ambos os grupos (U e T).

Tabela 5.4 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação às medidas FVE (distância da porção mais lingual da cabeça do implante até a porção mais vestibular do enxerto ósseo) e ORVE (espessura de osso regenerado vestibularmente ao enxerto ósseo) em μm

	U						T					
	FVE			ORVE			FVE			ORVE		
	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP
0 HORA	5	87,95	14,40	-	-	-	5	72,87	13,19	-	-	-
14 DIAS	3	80,95	10,66	-	-	-	5	103,70	65,83	-	-	-
21 DIAS	2	85,25	23,79	1	43,28	-	5	78,63	33,97	4	135,44	112,85
45 DIAS	4	88,97	11,51	3	199,07	66,29	4	68,62	25,93	4	116,03	73,68
150 DIAS	6	126,52	113,27	6	467,23	109,24	6	97,43	62,15	6	486,50	107,04

FVE : P (Kruskal-Wallis) = 0,730 e ORVE: P (Kruskal-Wallis) = 0,06 - nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos e tempos experimentais.

Quando comparamos as medidas de osso regenerado às médias de defeito ósseo inicial, observamos que estas variaram de 91% (aos 21 dias) a 120% (aos 45 dias) para o grupo U e de 108,50% (aos 21 dias) a 92,75% (aos 45 dias) para o grupo T (Tabela 5.5), sem diferença entre os grupos ou entre os tempos analisados.

Tabela 5.5 - Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação à medida POR (percentual de osso regenerado vestibularmente ao leito) em μm

	U (%)			T (%)		
	N	Média	DP	N	Média	DP
21 DIAS	1	91,00	-	4	108,50	19,12
45 DIAS	3	120,00	12,12	4	92,75	16,92
150 DIAS*	-	-	-	-	-	-

P (Kruskal-Wallis) = 0,08 - nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos e tempos experimentais. * Em 150 dias não foi possível delimitar adequadamente o leito pré-existente.

Na tabela 5.6 observamos que a espessura total de tecido ósseo (ETTO) variou de 992,79 μm a 1254,40 μm para o grupo U, no período de 14 dias a 150 dias, enquanto o grupo T mostrou valores variando de 936,70 μm a 1141,85 μm no mesmo período, sem qualquer diferença estatística entre os grupos ou períodos experimentais.

Tabela 5.6 – Média, desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação à medida ETTO (espessura total de tecido ósseo) em μm

	U			T		
	N	Média	DP	N	Média	DP
0 HORA		-	-		-	-
14 DIAS	3	992,79	68,97	5	936,70	66,77
21 DIAS	2	912,23	110,65	5	933,33	187,08
45 DIAS	4	1084,60	171,75	4	1105,46	221,82
150 DIAS	6	1254,40	113,19	6	1141,85	177,59

P (Kruskal-Wallis) = 0,48 - nenhuma diferença estatisticamente significante entre os grupos e tempos experimentais

A tabela 5.7 mostra que a espessura total de tecido ósseo alcançou ao redor de 2 vezes o tamanho do defeito original (DO-U = 604,13 μm a ETTO-U = 1254,50 μm ; DO-T = 585,9 μm a ETTO-T= 1141,66 μm) para ambos os grupos e sem diferenças estatísticas.

Quando a ETTO foi comparada à espessura média do enxerto (EE-U = 379,89 μm e EE-T = 368,32 μm) o ganho ósseo alcançou cerca de 3 vezes sua espessura original, sem diferenças entre os grupos.

Na comparação de ETTO com a espessura média do leito (EL-U = 257,29 μm e EL-T = 243,17 μm) observamos que o ganho ósseo atingiu 4,8 e 4,6 vezes a média original de espessura do leito, sem diferença entre os grupos.

Tabela 5.7 – Média (M), desvio padrão (DP) e comparação dos grupos U e T em relação às medidas DO, EE, EL em zero hora e ETTO em 150 dias (espessura total de tecido ósseo) em μm

		U (μm)			T (μm)		
		N	M	DP	N	M	DP
0 HORA	DO		604,13	65,89		585,9	95,68
	EE	5	379,89	30,71	5	368,32	35,85
	EL		257,29	48,27		243,57	63,59
150 DIAS	ETTO	6	1254,5	113,17	6	1141,66	177,49

6 DISCUSSÃO

Este trabalho dá seqüência a uma linha de pesquisa da Disciplina de Periodontia do Departamento de Estomatologia da FOUSP, que teve início com o trabalho de Jardim, De Marco e Lima (2005), cujo objetivo foi estabelecer o padrão de formação óssea utilizando enxertos ósseos autógenos em bloco, associados ou não à membrana de PTFE-e. Com o sucesso do modelo cirúrgico implantado, um segundo trabalho foi realizado por De Marco, Jardim e Lima (2005), no qual se estudou o processo de revascularização do enxerto no mesmo modelo, em razão da importância da nutrição, como fonte de células osteogênicas, para propiciar o aumento de volume e a neoformação óssea verificada histologicamente.

No estudo presente, propusemo-nos a estudar o padrão de reparação do enxerto autógeno, em bloco do tipo *onlay*, ao redor de implantes com diferentes tratamentos de superfície e verificar, quantitativamente, o osso regenerado após técnica de Regeneração Óssea Guiada com membranas bioabsorvíveis de colágeno.

Verificamos que houve uma possível influência da superfície do implante no padrão de reparação do enxerto, pois este apresentou uma espessura significativamente menor para o grupo T em relação ao grupo U, no período de 150 dias. Colnot et al. (2007) demonstraram em seu estudo, que a presença da superfície do implante ao redor de áreas ósseas, em estágios iniciais de reparação, acelera a diferenciação de células periimplantares em osteoblastos, acelerando a remodelação da matriz do novo osso. Uma superfície, considerada rugosa, tende a favorecer essa diferenciação devido à maior afinidade dos osteoblastos a este tipo

de superfície e maior produção de matriz extracelular, em relação à superfície usinada (BRUNETTE; CHEHROUDI, 1999; IVANOFF et al., 2001, 2003).

Em relação ao osso regenerado, pudemos observar que a técnica de ROG, com membranas de colágeno, permitiu um crescimento significativo de osso regenerado neste modelo experimental. Houve incorporação do enxerto ósseo e completo preenchimento do defeito pré-existente, gerando o aumento da espessura final do tecido ósseo. Este resultado está de acordo com outros estudos experimentais em ratos, que aplicaram a técnica de ROG com membranas reabsorvíveis (KOSTOPOULOS; KARRING, 1994a) ou não-reabsorvíveis (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002a; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005). Kostopoulos e Karring, 1994a, observaram um preenchimento médio de 50% do defeito ósseo após ROG com membrana reabsorvível de polihidroxibutirato. Jardim, De Marco e Lima, 2005, obtiveram um ganho de tecido ósseo de 55% além da área do enxerto ósseo, em 45 dias, após ROG com membrana de PTFE-e associada ao enxerto autógeno em bloco. No nosso estudo, a espessura final do tecido ósseo alcançou cerca de 4,7 vezes a espessura original do leito, após 150 dias.

Em zero hora, notamos que o enxerto bicortical de estrutura lamelar estava estabilizado pelo implante, porém, não justaposto ao leito. A interface leito-enxerto era rica em hemácias e fibrina e o leito, de corticais bem definidas, e com áreas de perfuração na cortical externa, apresentava espaços vasculares preenchidos por células na região medular. Em nosso estudo, 4 perfurações foram realizadas na cortical do leito hospedeiro, ao redor de uma perfuração central lado a lado do leito para a fixação do implante. De acordo com a literatura, a incorporação do enxerto difere com o tipo de preparação do leito, sendo que a integração do enxerto ao leito tende a ser mais significativa quando este é perfurado ou decorticalizado, devido à

maior presença de vasos sanguíneos na região (DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000; DE MARCO; JARDINI; LIMA, 2005).

Aos 14 dias, observamos a formação de osso imaturo a partir do leito, principalmente na região das perfurações, estendendo-se além das bordas laterais do enxerto e bordas linguais do leito, o que está de acordo com Jardim, De Marco e Lima, 2005, que observaram penetração vascular do enxerto nas áreas de perfuração, nos bordos do enxerto e na interface com o leito, nos espécimes recobertos por membrana de PTFE-e, e De Marco, Jardim e Lima, 2005, que notaram que a revascularização do enxerto, no grupo com membrana, após 7 dias, deriva de vasos provenientes do leito. Notamos ainda, presença de contato secundário entre osso imaturo e a superfície do implante nas áreas do leito e na interface leito-enxerto, assim como presença de contato de osso pré-existente com a superfície do implante nas áreas do enxerto. Em seu estudo, aos 15 dias, Donos, Kostopoulos e Karring (2002a) observaram uma camada de tecido conjuntivo entre o micro-implante e o enxerto ósseo e entre este e o leito mandibular, no grupo do enxerto ósseo coberto por membrana de PTFE-e.

Em 21 dias, Jardim, De Marco e Lima, 2005, notaram neoformação de osso imaturo além dos limites do enxerto, totalmente integrado às suas bordas laterais e unindo o enxerto ao leito, sob a membrana de PTFE-e. Neste período, observamos total integração enxerto-leito com a formação de pontes, de osso neoformado com trabéculas espessadas, entre ambos. Sobre a cortical externa do enxerto, abaixo da membrana, observamos osso regenerado em maturação, com características de deposição lamelar, mostrando uma aceleração do processo de neoformação em relação aos estudos de Donos, Kostopoulos e Karring (2002a). Nesse estudo, os autores observaram, em 30 dias, presença de osso imaturo com fino trabeculado e

largos espaços medulares, acima da cortical externa do enxerto. Ainda aos 21 dias, pudemos observar uma maior quantidade de contato secundário entre osso neoformado e superfície do implante nas áreas do leito, na interface leito-enxerto e também na região do enxerto.

Aos 45 dias o enxerto continua sendo substituído, apresentando osso neoformado em seu interior, sendo completamente envolvido, externamente, pelo osso regenerado organizado em lamelas, e em continuidade com o leito, gerando aumento da espessura óssea final. Esta observação está de acordo com a literatura (BURCHARDT 1983; ENNEKING et al., 1975; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005). Entre a superfície do implante e a borda lateral do enxerto pré-existente, observamos diversas áreas de osso neoformado interposto.

Aos 150 dias a espessura óssea total está aumentada em relação ao período inicial. A estrutura óssea apresenta extensas áreas de contato osso-implante secundário, e é praticamente formada apenas por osso regenerado, devido à redução ou ausência do leito original, notando-se uma vestibularização do tecido ósseo, em relação à sua posição original. Em seu estudo, Donos, Kostopoulos e Karring (2002a), não conseguiram definir o limite entre o enxerto e o tecido neoformado, em período de 180 dias. No estudo presente, esse limite foi verificado em ambos os grupos, para todos os espécimes avaliados no período de 150 dias, apesar das extensas áreas de reabsorção-neoformação presentes no enxerto. Notamos que o padrão de reparação do enxerto ósseo autógeno, após técnica de ROG com o uso de membranas de colágeno bioabsorvíveis, assemelha-se ao padrão demonstrado pela literatura após ROG com o uso de membranas não absorvíveis de PTFE-e. (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002a; De MARCO; JARDINI; LIMA, 2005; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005).

Através da análise quantitativa, notamos uma padronização da metodologia desenvolvida, pois não foram observadas diferenças significativas entre os grupos U e T, em relação às medidas analisadas no período de zero hora para as medidas de espessura do leito (EL-U = 257,29 μm e EL-T = 243,57 μm), espessura do enxerto (EE-U = 379,89 μm e EE-T 368,32 μm) e espessura da interface leito-enxerto (EI-U = 136,2 μm e EI-T = 144,31 μm). Notamos ainda, ausência de diferença estatisticamente significante para o tamanho do defeito ósseo (DO) e para a distância da porção mais lingual da cabeça do implante – ponto fixo – até a porção mais vestibular do enxerto ósseo (FVE), entre os períodos analisados.

Quando avaliamos a espessura do enxerto entre os períodos, notamos que a característica da superfície do implante pode ter influenciado o processo de substituição do mesmo. A análise estatística confirma uma reabsorção mais acentuada do enxerto no grupo T, em 150 dias (EE-U = 407,71 μm e EE-T = 338,25 μm). A literatura mostra que a reabsorção da superfície do enxerto deve ocorrer para que haja o início da sua revascularização, propiciando sua posterior substituição e remodelação (BURCHARDT, 1983). A superfície tratada, por apresentar um grau de rugosidade moderado, pode ter estimulado o início do processo de substituição, uma vez que acelera a formação do contato direto entre osso e implante.

Ao mesmo tempo, a reabsorção do enxerto com ausência de sua total substituição, deixa claro que o processo de remodelação ainda não terminou aos 150 dias, apesar do enxerto apresentar-se completamente englobado por osso regenerado.

Em 21 dias, notamos a presença de osso regenerado vestibularmente ao enxerto (ORVE), em ambos os grupos, próximo à superfície do implante. Estatisticamente, não observamos diferença na espessura de ORVE entre os

períodos, o que se deve, possivelmente, aos elevados valores dos desvios padrões e ao reduzido valor de N, nos períodos de 21, 45 e 150 dias. Ao compararmos os valores médios entre os períodos de 21 e de 150 dias, notamos uma tendência ao aumento do osso regenerado vestibular ao enxerto para os grupos U (ORVE -21 = 43,28 μm e ORVE-150 = 467,23 μm) e T (ORVE-21 = 78,63 μm e ORVE-150 = 486,50 μm). Em 45 e 150 dias notamos presença de osso regenerado vestibularmente ao ponto fixo pré-estabelecido e muitas vezes recobrimo totalmente a cabeça do implante.

Ainda aos 21 dias, o defeito ósseo, que é cerca de 2 vezes maior que a espessura original do leito, apresenta-se preenchido por pontes de tecido ósseo imaturo na interface leito-enxerto, pelo enxerto, em nítido processo de remodelação, e pelo osso regenerado, vestibular ao enxerto. A regeneração óssea neste período já é igual ou maior, que o defeito ósseo original, sem diferença entre os grupos U e T. O percentual de osso regenerado vestibularmente ao leito variou de 91% a 120% (grupo U) e de 108,50 μm a 92,75 μm (grupo T) entre 21 e 45 dias, sem diferenças entre os grupos e períodos.

Os resultados do presente trabalho mostraram que a espessura total de tecido ósseo já havia sido alcançada no período de 14 dias. Neste período já observamos formação de osso imaturo a partir do leito, estendendo-se além das bordas laterais do enxerto, e lingualmente ao leito, assim como trabéculas espessadas de osso imaturo na interface leito-enxerto, unindo as duas estruturas ósseas, com presença de muitos vasos e osteoblastos. A espessura total de tecido ósseo variou de 992,79 μm a 1254,40 μm para o grupo U e de 936,70 μm a 1141,85 μm para o grupo T no período de 14 a 150 dias, porém, sem qualquer diferença estatística entre os grupos ou períodos experimentais. Uma vez que os valores de N

são reduzidos e os valores dos desvios padrões são elevados, consideramos que há uma tendência ao aumento da espessura óssea com o passar do tempo, assim como da maturação do osso regenerado, ainda em remodelação, denotando uma organização de aspecto lamelar.

A presença de osso neoformado, lingualmente ao leito, aumentou de 14 para 21 dias e sofreu redução de sua espessura, de 21 para 150 dias. Esse padrão assemelha-se a formação do calo ósseo em área de fratura. O calo ósseo apresenta um crescimento periosteal e um crescimento endosteal. O crescimento periosteal é mais extenso na fase inicial da reparação, sendo reduzido, posteriormente, após consolidação da união das bordas da fratura (SCHELL et al., 2006). Podemos considerar a existência de uma área de fratura, em nosso estudo na região da perfuração do leito, que foi estabilizada pela presença do implante. Nesta região, notados aos 14 e 21 dias, uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado imaturo de origem periosteal, próximo à superfície do implante. Nos períodos mais avançados, notamos que o osso torna-se mais lamelar e que sofre uma redução do seu volume.

Correlacionando a espessura total de tecido ósseo (ETTO), no grupo de 150 dias com o tamanho inicial do defeito (DO), notamos que esta alcançou cerca de 2 vezes o DO para ambos os grupos, sem diferenças estatísticas (DO-U = 604,13 μm a ETTO-U = 1254,50 μm ; DO-T = 585,90 μm a ETTO-T = 1141,66 μm).

Quando correlacionamos a ETTO final com a espessura média do enxerto, verificamos que o ganho ósseo alcançou cerca de 3 vezes sua espessura original, sem diferença entre os grupos (EE-U = 379,89 μm e EE-T = 368,32 μm).

Quando correlacionamos a ETTO final à espessura média do leito, observamos que o ganho ósseo atingiu cerca de 4,8 (grupo U) e 4,6 (Grupo T) vezes

a média original da espessura do leito, sem diferença entre os grupos. Fica evidente o potencial da técnica de ROG, com o uso de membranas de colágeno absorvíveis, associadas a enxerto autógeno em bloco, neste modelo experimental, o que está de acordo com a literatura (HAMMERLE et al., 2008; LLAMBÉS; SILVESTRE; CAFFESSE, 2007; VON ARX; BUSER, 2006).

Quando analisamos a relação do tecido ósseo com a superfície do implante, notamos que em zero hora as fresas do implante penetravam o enxerto e também o leito receptor e que haviam áreas de microfraturas em “galho verde” e justaposição óssea às fresas e aos passos de rosca. Já aos 14 dias, notamos a presença de contato secundário entre osso e implante, com presença de osso imaturo entre o implante e a superfície de osso pré-existente, a qual aumentou nos períodos seguintes, para as duas superfícies. Altos níveis de contato osso-implante foram observados para ambos os grupos aos 150 dias. Exceto por uma maior redução na espessura do enxerto, no período de 150 dias para o grupo de superfície tratada, não existiram diferenças estatisticamente significantes entre as duas superfícies em relação às outras medidas avaliadas.

Ao analisarmos a posição da estrutura óssea inicial com a encontrada em 150 dias, verificamos uma tendência à vestibularização da tábua óssea. Inicialmente, a estrutura óssea encontrou-se posicionada entre a primeira e a terceira espira dos implantes, com o leito mandibular posicionado perpendicularmente à superfície do implante, em toda a sua extensão. No período final de avaliação, notamos que a estrutura óssea encontrava-se entre a cabeça do implante (ou acima desta) e entre a segunda ou terceira espira do implante, apenas próximo à superfície do mesmo.

Quando a avaliação da posição do tecido ósseo foi realizada a uma distância maior da superfície do implante, notamos a vestibularização do posicionamento do

tecido ósseo, em relação ao período inicial. Observamos uma nítida reabsorção do leito mandibular original. Em um modelo experimental semelhante, no qual avaliaram as alterações do tecido ósseo através de microradiografias e de tomografias computadorizadas, Gielkens et al. (2008) notaram que a diminuição da radiodensidade vista nos exames foi resultado da perda de volume do osso hospedeiro e, provavelmente da diminuição da densidade do enxerto, em períodos de 12 semanas. Para os autores, a reabsorção do leito, neste modelo, pode ter sido causada por uma atividade osteoclástica mais elevada no osso mandibular, devido à revascularização aumentada gerada pelas perfurações corticais no leito. Salata, Rasmusson e Kahnberg (2002) consideraram que enxertos predominantemente corticalizados cobertos por membranas podem ser menos susceptíveis à revascularização e podem depender de prévia reabsorção do leito para se tornarem vascularizados e sofrerem remodelação, o que está de acordo com De Marco, Jardim e Lima (2005).

A vestibularização do tecido ósseo pode também ser em função de uma adaptação da estrutura óssea às novas linhas de distribuição de forças na região, possivelmente induzidas pela presença do enxerto e do implante (DHERT et al., 1998).

Das 58 lâminas obtidas, 13 não puderam ser utilizadas para análise quantitativa, pois apresentaram uma reabsorção tanto do enxerto quanto do leito, próxima à superfície do implante, impossibilitando a realização das medidas lineares. Das 13 lâminas afetadas pela reabsorção, 9 pertenciam ao grupo U e 4 ao grupo T. Essa redução à metade das lâminas afetadas no grupo T pode ser reflexo da interferência que a superfície tratada impõe sobre as células osteogênicas. Mesmo diante de um reduzido aporte vascular, pode ter havido um estímulo às

células nesta região, pela presença da superfície tratada, o que possibilitou a proliferação celular e a deposição de matriz óssea.

Esse processo de reabsorção, notado principalmente nos períodos de 14 e 21 dias, não demonstrou ser de origem infecciosa, pois não foram encontradas características de tecido contaminado e também não houve aumento da reabsorção com o passar do tempo, em direção às áreas mais distantes do implante. As características e a extensão da reabsorção foram semelhantes entre os períodos envolvidos.

Após a colocação do implante, segue-se uma seqüência de eventos: formação de coágulo sanguíneo, reabsorção óssea e formação óssea. Os eventos iniciais do processo de reparação óssea estão associados à intensa atividade osteoclástica (SCHELL et al., 2006), sendo o processo de reabsorção do osso cortical maior do que no osso esponjoso, ao redor do implante, independentemente do tipo de implante utilizado (DHERT et al., 1998). Branemark et al. (1997) observaram em ratos, aos 14 dias, uma redução do torque máximo necessário para a remoção do implante. Dhert et al. (1998), notaram entre 3 e 28 dias, uma redução no contato osso-implante, confirmando a presença de um crítico período pós-operatório, em relação à estabilidade do implante, caracterizado pela acentuada reabsorção óssea ao redor da superfície do implante. Esse processo de reabsorção no osso cortical pode ser aumentado por pressão excessiva exercida pelo implante.

Acreditamos que a pressão exercida pelo implante, no momento da fixação do enxerto ao leito, possa ter contribuído para uma maior extensão da reabsorção óssea ao redor do implante, devido à isquemia dos tecidos adjacentes e à necrose óssea, havendo uma preservação do tecido ósseo mais distante ao implante. Essa hipótese está de acordo com Gielkens et al. (2008) e com Bashutski, D'Silva e Wang

(2009). Os autores discutem, através da apresentação de um relato de caso envolvendo a perda de 5 implantes, os fatores biológicos e mecânicos que podem interferir na osseointegração do implantes. Dentre elas, destacam a sobre pressão, como possível causa para a falha precoce do tratamento com implantes. Destacam que a colocação de um implante, com compressão além da tolerância fisiológica do osso pode, mais facilmente, gerar isquemia óssea seguida de uma necrose local ou seqüestro ósseo. Consideram que esse torque excessivo é ainda mais crítico, quando exercido sob um osso corticalizado, que apresenta, naturalmente, uma vascularização reduzida.

A literatura ortopédica mostra que quando uma distorção excede um limiar, danos irreversíveis ocorrem na estrutura óssea, sob a forma de microfraturas e deformação plástica (WINWOOD et al., 2006). Na análise das lâminas, podemos notar a presença de debris ósseos, ao redor das espiras dos implantes. As espessuras reduzidas do enxerto e do leito, assim como seu padrão, predominantemente cortical, frente ao comprimento do implante utilizado, fazem-nos considerar a hipótese de uma reabsorção óssea mais acentuada que a fisiológica, derivada de uma isquemia por compressão.

Dentro das limitações do modelo experimental proposto, foi possível analisar a regeneração óssea guiada com membrana de colágeno, associada ao enxerto em bloco ao redor de superfícies de implante e constatar que esta é uma técnica eficiente para gerar aumento da espessura óssea. Estudos futuros devem ser realizados, nesta linha de pesquisa, para detalhar a influência da pressão exercida pelo implante sobre o tecido ósseo em reparação, permitindo um maior conhecimento de todos os fatores que podem interferir no processo de reparação como um todo.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, achamos lícito concluir que:

- 1- A técnica de ROG associada à membrana de colágeno permitiu um crescimento significativo de osso regenerado, neste modelo experimental, incorporando o enxerto ósseo e preenchendo completamente o defeito pré-existente entre 21 e 45 dias, para ambas as superfícies.
- 2- A espessura final do tecido ósseo, em relação ao leito original, foi aumentada cerca de 4,8 vezes para o grupo U e 4,6 vezes para o grupo T aos 150 dias, período em que o osso regenerado apresentou-se maduro.
- 3- O osso regenerado apresentou contato com a superfície do implante a partir de 14 dias na região do leito e na interface leito-enxerto, e a partir de 21 dias na região do enxerto, para ambas as superfícies.
- 4- Verificamos influência da superfície tratada do implante no padrão de reparação do enxerto, acelerando a sua substituição.

REFERÊNCIAS¹

Adell R, Lekholm U, Grondahl K, Branemark PI, Lindstrom J, Jacobsson M. Reconstruction of severely resorbed edentulous maxillae using osseointegrated fixtures in immediate autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990 Fall;5(3):233-46.

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981 Dec;10(6):387-416.

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zoller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008 Jul;37(7):651-9.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg* 1992 Aug;50(8):829-34.

Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996 Jul;82(1):22-33.

American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms 3rd ed. Chicago: American Academy of Periodontology; 1992.

Araujo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *J Clin Periodontol* 2002 Dec;29(12):1122-31.

Augthun M, Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S. Healing of bone defects in combination with immediate implants using the membrane technique. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995 Jul-Aug;10(4):421-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Babbush CA. ITI endosteal hollow cylinder implant systems. *Dent Clin North Am* 1986 Jan;30(1):133-49.

Bashutski JD, D'Silva NJ, Wang HL. Implant compression necrosis: current understanding and case report. *J Periodontol* 2009 Apr;80(4):700-4.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992 Fall;7(3):302-10.

Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc* 1969 Apr;78(4):767-76.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3(2):81-100.

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.

Branemark R, Ohnrell LO, Nilsson P, Thomsen P. Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in vivo study in the rat. *Biomaterials* 1997 Jul;18(14):969-78.

Breine U, Branemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14(1):23-48.

Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng* 1999 Feb;121(1):49-57.

Buchman SR, Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg* 1999 Jul;43(1):49-56.

Burchardt H. The biology of bone graft repair. Clin Orthop Relat Res 1983 Apr(174):28-42.

Burchardt H, Enneking WF. Transplantation of bone Surg Clin North Am 1978 Apr;58(2):403-27.

Burgos PM, Rasmusson L, Meirelles L, Sennerby L. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. Clin Implant Dent Relat Res 2008 Sep;10(3):181-90.

Buser D, Bragger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. Clin Oral Implants Res 1990 Dec;1(1):22-32.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. Int J Periodontics Restorative Dent 1993;13(1):29-45.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. Int J Periodontics Restorative Dent 1995 Feb;15(1):10-29.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. J Oral Maxillofac Surg 1996 Apr;54(4):420-32; discussion 32-3.

Buser D, Weber HP, Bragger U, Balsiger C. Tissue integration of one-stage ITI implants: 3-year results of a longitudinal study with Hollow-Cylinder and Hollow-Screw implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1991 Winter;6(4):405-12.

Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T. Removal torques for polished and rough titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1988 Spring;3(1):21-4.

Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. Clin Oral Implants Res 1999 Aug;10(4):278-88.

Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998 Apr;40(1):1-11.

Colnot C, Romero DM, Huang S, Rahman J, Currey JA, Nanci A, et al. Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. *J Dent Res* 2007 Sep;86(9):862-7.

Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1990;24(1):13-9.

Dahlin C, Lekholm U, Becker W, Becker B, Higuchi K, Callens A, et al. Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995 May-Jun;10(3):312-8.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988 May;81(5):672-6.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989 Spring;4(1):19-25.

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003 Aug;67(8):932-49.

de Carvalho PS, Vasconcellos LW, Pi J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000 Jul-Aug;15(4):565-70.

De Marco AC, Jardim MA, Lima LP. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005 Nov-Dec;20(6):867-74.

Dhert WJ, Thomsen P, Blomgren AK, Esposito M, Ericson LE, Verbout AJ. Integration of press-fit implants in cortical bone: a study on interface kinetics. *J Biomed Mater Res* 1998 Sep 15;41(4):574-83.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the mandible with GTR and onlay cortical bone grafting. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2002a Apr;13(2):175-84.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2002b Apr;13(2):192-202.

Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2005 Apr;16(2):133-9.

Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 1975 Mar;57(2):237-52.

Enneking WF, Eady JL, Burchardt H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg Am* 1980 Oct;62(7):1039-58.

Ericsson I, Johansson CB, Bystedt H, Norton MR. A histomorphometric evaluation of bone-to-implant contact on machine-prepared and roughened titanium dental implants. A pilot study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1994 Dec;5(4):202-6.

Ermis I, Poole M. The effects of soft tissue coverage on bone graft resorption in the craniofacial region. *Br J Plast Surg* 1992 Jan;45(1):26-9.

Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res* 2008 Apr;19(4):393-401.

Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* 2003 Nov;24(25):4663-70.

Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, De Pasquale V, Martini D, Fini M, et al. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *J Periodontol* 2007 May;78(5):879-88.

Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin Oral Implants Res* 2002 Dec;13(6):587-94.

Futami T, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi N, Kusakari H, Ohshima H, et al. Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface. *J Periodontol* 2000 Feb;71(2):287-98.

Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM, et al. The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res* 2008 Nov;87(11):1048-52.

Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998 Feb;27(1):67-73.

Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol* 1993 Nov;64(11 Suppl):1157-65.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984 Sep;11(8):494-503.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986 Jul;13(6):604-16.

Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol* 2006 Oct;77(10):1736-43.

Hammerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 2008 Jan;19(1):19-25.

Hammerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res* 2001 Feb;12(1):9-18.

Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 1959 Oct;41-A:1243-54.

Hurzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998 Aug;27(4):315-20.

Hurzeler MB, Quinones CR, Schupbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Implants Res* 1997 Aug;8(4):323-31.

Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 2001 Apr;12(2):128-34.

Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003 May-Jun;18(3):341-8.

Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005 Dec;100(6):666-73.

Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992 Summer;7(2):233-45.

Juodzbals G, Raustia AM, Kubilius R. A 5-year follow-up study on one-stage implants inserted concomitantly with localized alveolar ridge augmentation. *J Oral Rehabil* 2007 Oct;34(10):781-9.

Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 1985 Jan;12(1):51-60.

Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1994 Dec;28(12):1419-25.

Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1994a Jun;5(2):75-82.

Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Implants Res* 1994b Jun;5(2):66-74.

Kostopoulos L, Karring T, Uraguchi R. Formation of jawbone tuberosities by guided tissue regeneration. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 1994 Dec;5(4):245-53.

Lima LA, Fuchs-Wehrle AM, Lang NP, Hammerle CH, Liberti E, Pompeu E, et al. Surface characteristics of implants influence their bone integration after simultaneous placement of implant and GBR membrane. *Clin Oral Implants Res* 2003 Dec;14(6):669-79.

Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1990 Sep;86(3):449-56.

Linde A, Thoren C, Dahlin C, Sandberg E. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 1993 Aug;51(8):892-7.

Linghorne WJ. The sequence of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. *Ann N Y Acad Sci* 1960 Mar 29;85:445-60.

Llambes F, Silvestre FJ, Caffesse R. Vertical guided bone regeneration with bioabsorbable barriers. *J Periodontol* 2007 Oct;78(10):2036-42.

Lundgren AK, Lundgren D, Hammerle CH, Nyman S, Sennerby L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res* 2000 Apr;11(2):99-106.

Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005 Feb;25(1):19-25.

Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Aldini NN, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol* 1999 Dec;70(12):1501-10.

Marinucci L, Lilli C, Baroni T, Becchetti E, Belcastro S, Balducci C, et al. In vitro comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in bone regeneration. *J Periodontol* 2001 Jun;72(6):753-9.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Jr., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995 Mar;29(3):389-401.

Matsumoto MA, Filho HN, Francischone E, Consolaro A. Microscopic analysis of reconstructed maxillary alveolar ridges using autogenous bone grafts from the chin and iliac crest. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 Jul-Aug;17(4):507-16.

Melcher AH, Dent HD. The use of heterogenous anorganic bone as an implant material in oral procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962 Aug;15:996-1000.

Mellonig JT, Nevins M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995 Apr;15(2):168-85.

Misch CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 Nov-Dec;12(6):767-76.

Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2005 Apr;16(2):210-9.

Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008 May;79(5):905-11.

Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* 1957 Mar;93(3):385-7.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982 May;9(3):257-65.

Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent* 2001;10(1):49-58.

Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 1999 Jul;104(1):139-47.

Parma-Benfenati S, Tinti C, Albrektsson T, Johansson C. Histologic evaluation of guided vertical ridge augmentation around implants in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999 Oct;19(5):424-37.

Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plast Reconstr Surg* 1988 Nov;82(5):872-7.

Pikos MA. Block autografts for localized ridge augmentation: Part I. The posterior maxilla. *Implant Dent* 1999;8(3):279-85.

Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005 Aug;25(4):351-63.

Raghoobar GM, Batenburg RH, Vissink A, Reintsema H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1996 Oct;54(10):1180-5; discussion 5-6.

Rasmusson L, Meredith N, Cho IH, Sennerby L. The influence of simultaneous versus delayed placement on the stability of titanium implants in onlay bone grafts. A histologic and biomechanic study in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999 Jun;28(3):224-31.

Rasmusson L, Sennerby L, Lundgren D, Nyman S. Morphological and dimensional changes after barrier removal in bone formed beyond the skeletal borders at titanium implants. A kinetic study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* 1997 Apr;8(2):103-16.

Salata LZ, Rasmusson L, Kahnberg KE. Effects of a mechanical barrier on the integration of cortical onlay bone grafts placed simultaneously with endosseous implant. *Clin Implant Dent Relat Res* 2002;4(2):60-8.

Satow S, Slagter AP, Stoelinga PJ, Habets LL. Interposed bone grafts to accommodate endosteal implants for retaining mandibular overdentures. A 1-7 year follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997 Oct;26(5):358-64.

Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 2006 Apr;38(4):547-54.

Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994 Jan-Feb;9(1):13-29.

Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Implants Res* 2000 Jun;11(3):230-41.

Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res* 1997 Jan;32(1 Pt 2):166-71.

Shirakura M, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi Y, Ohshima H, Nomura S, et al. Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effects of surface conditions on bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2003 Dec;14(6):687-96.

Simion M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998 Feb;18(1):8-23.

Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994 Dec;14(6):496-511.

Slaets E, Carmeliet G, Naert I, Duyck J. Early trabecular bone healing around titanium implants: a histologic study in rabbits. *J Periodontol* 2007 Mar;78(3):510-7.

Slotte C, Lundgren D. Impact of cortical perforations of contiguous donor bone in a guided bone augmentation procedure: an experimental study in the rabbit skull. *Clin Implant Dent Relat Res* 2002;4(1):1-10.

Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. Clin Orthop Relat Res 1996 Mar(324):66-74.

Taborelli M, Jobin M, Francois P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. Clin Oral Implants Res 1997 Jun;8(3):208-16.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration. Clin Oral Implants Res 2008 Mar;19(3):295-302.

ten Bruggenkate CM, Kraaijenhagen HA, van der Kwast WA, Krekeler G, Oosterbeek HS. Autogenous maxillary bone grafts in conjunction with placement of I.T.I. endosseous implants. A preliminary report. Int J Oral Maxillofac Surg 1992 Apr;21(2):81-4.

Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. J Biomed Mater Res 1985 Oct;19(8):875-901.

Tinti C, Parma-Benfenati S, Polizzi G. Vertical ridge augmentation: what is the limit? Int J Periodontics Restorative Dent 1996 Jun;16(3):220-9.

Urbani G, Lombardo G, Santi E, Tarnow D. Localized ridge augmentation with chin grafts and resorbable pins: case reports. Int J Periodontics Restorative Dent 1998 Aug;18(4):363-75.

von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. Clin Oral Implants Res 2006 Aug;17(4):359-66.

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. Clin Oral Implants Res 1995 Mar;6(1):24-30.

Widmark G, Andersson B, Ivanoff CJ. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. Int J Oral Maxillofac Surg 1997 Apr;26(2):106-9.

Winwood K, Zioupos P, Currey JD, Cotton JR, Taylor M. The importance of the elastic and plastic components of strain in tensile and compressive fatigue of human cortical bone in relation to orthopaedic biomechanics. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006 Apr-Jun;6(2):134-41.

Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1983 Dec;72(6):778-85.

Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 Nov-Dec;12(6):844-52.

ANEXO A – Certificado CEEA

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cap@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° 097 nas fls. 19 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Jarbas Arruda Bauer, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa *"Padrão de ósseo integração sobre superfícies de titânio maquinadas e superfícies tratadas com óxido de titânio após enxerto ósseo autólogo em bloco"* do qual participou(aram) o(s) pesquisadores: **André Micheletti Hespanhol, Luiz A P A Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.09.2005**.

São Paulo, 20 de setembro de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA