JÚLIO LEONARDO OLIVEIRA LIMA

Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos

São Paulo

2013

JÚLIO LEONARDO OLIVEIRA LIMA

Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lima, Júlio Leonardo Oliveira.

Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos / Júlio Leonardo Oliveira Lima; orientadora Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2013.

84 p.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Enxerto ósseo. 2. Regeneração óssea. 3. Transplante homólogo. 4. Liofilização. 5. Osso e ossos. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Lima JLO. Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico às pessoas que fortalecem e inspiram diariamente o meu ser.

Ao Sr. João Luiz Silva Oliveira e a Sra. Maria José Ferreira de Lima Oliveira que por amor me concederam o presente da vida, por terem sido meus primeiros mestres e modelos de honestidade, respeito ao próximo e gratidão. Vocês são os alicerces da minha vida. Amo-os.

Ao meu irmão João Luiz Oliveira Lima e sua família por me incentivarem diariamente a buscar minhas metas com perseverança e dedicação. Irmão, nossos sentimentos puros e sinceros, peculiares à nossa convivência, servem de estímulo e força para desbravar novos horizontes. Sua presença em minha vida é a certeza do amor companheiro e amigo que existe entre dois irmãos.

À Patrícia de Freitas Kobayashi que, com sua paz e espiritualidade, diariamente me mostra que entre tantas escolhas e caminhos que devemos seguir durante a vida, os mais corretos são, sem dúvida, aqueles que simplesmente seguem o coração. Serei eternamente grato por toda sua dedicação ao nosso amor. Te amo.

À toda minha família, sempre presente nos momentos essenciais de meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, o meu eterno companheiro, minha fonte de energia, minha inspiração, minha segurança. Obrigado MEU PAI.

À Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, querida orientadora, exemplo de objetividade e coerência, que sempre foi tão atenciosa e prestativa, mostrando seu enorme conhecimento e sua disposição em orientar o desenvolvimento deste estudo. Sou muito grato pela convivência e conhecimento adquirido.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk pela sugestão do tema e pela orientação na primeira fase deste estudo. A sua grandiosa experiência e o seu estímulo foram fundamentais na execução desta pesquisa.

Às Profas. Dras. Maria da Graça Naclério-Homem e Andréa Mantesso PobociK pela participação no processo de qualificação deste estudo, contribuindo com comentários construtivos.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa por abrir as portas do laboratório de Patologia Bucal da FOUSP e pelas valiosas orientações durante as análises histomorfométrica e histomorfológica.

À amiga Cristiane Ibanhês Polo, colega do Mestrado e Doutorado, conhecedora de cada parte desta pesquisa, presente desde o projeto até o final de sua execução, participando com competência, dedicação e paciência. A sua solidariedade será sempre lembrada durante a minha existência. Minha sincera gratidão e amizade.

Ao Banco de Tecidos Musculoesqueléticos do Instituto de Ortopedia da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas de São Paulo, em especial ao Sr. Luiz Augusto Ubirajara Santos, pela parceria na captação e processamento dos aloenxertos ósseos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), na pessoa da Dra. Mônica Mathor, pela irradiação dos aloenxertos ósseos.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial às Profas. Dras. Olga Maria Ripinskas Russomanno e Alessandra Figueiredo de Castro Nassar pela colaboração na análise microbiológica dos aloenxertos ósseos.

Ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Biotério da Universidade de Santo Amaro, em especial à Profa. Dra. Andréa Barbosa e aos residentes da anestesiologia por realizarem as anestésias e a provisão dos animais.

Aos colegas Leandro de Lucca, Christiano Piacezzi, Márcio Marques, Carlos Alberto Sarmiento, Daniel Sendyk e a minha querida Patrícia de Freitas Kobayashi pelo inestimável auxílio nas diferentes fases desta pesquisa – projeto, processamento ósseo, cirurgias e processamento histológico. Todos vocês tornaram este estudo menos cansativo e mais prazeroso.

Aos pós-graduandos Alexandre Borba, Ana Carolina Junqueira, Daniel Falbo Gabriel Haddad, Mariana Brozski e Rafael Burim pelo valioso aprendizado durante a nossa pós-graduação. Lembrarei saudosamente destes anos convivência.

Aos funcionários do departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Bucomaxilofaciais da USP, que sempre foram tão solícitos no desenvolver das atividades do Doutorado, sobretudo Edison Henrique Vicente, Aparecida Conceição de Souza e Natália Conceição Afonso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração e desenvolvimento deste estudo.

"É necessário apenas saber e haverá asas."

Leonardo da Vinci

RESUMO

Lima JLO. Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Considerando as diferentes aplicações clínicas dos enxertos ósseos nas reconstruções alveolares e a dificuldade de se obter ganhos ósseos em altura, o presente estudo avaliou do ponto de vista histológico a integração do enxerto autógeno (AU), do aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado (ALD), do aloenxerto ósseo congelado mineralizado (ACM) e do coágulo sanguíneo (CO) em um modelo de regeneração óssea vertical. Foram utilizados nove coelhos, sendo um animal doador primário de enxertos ósseos e oito animais submetidos a um modelo de regeneração óssea guiada (ROG), onde 32 cilindros de titânio foram fixados na calota craniana e preenchidos aleatoriamente com AU, ALD, ACM e CO. Após 13 semanas, os animais sofreram eutanásia e o conteúdo dos cilindros submetido à avaliação histológica e histomorfométrica para quantificar a área total de tecido neoformado (AT), o osso neoformado (ON) e o remanescente do material enxertado (MR). Os dados foram submetidos aos testes t-Student e Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que em relação à AT os valores médios foram significantes para ACM e ALD e seguiram a seguinte relação: $ACM = ALD > AU > CO$. Para a variável neoformação óssea as intervenções ALD e ACM mostraram maior quantidade de tecido ósseo formado do que as que empregaram osso autógeno ou coágulo. Já em relação à MR, a média da variável obedeceu à relação: $ACM > ALD = AU = CO$ (valores-p < 5%). Todas as intervenções apresentaram médias mais significativas de crescimento tecidual nas regiões mais próximas ao leito receptor. Foi possível concluir que os aloenxertos podem ser considerados soluções adequadas para o crescimento ósseo vertical.

Palavras-chaves: Enxerto ósseo. Regeneração óssea. Transplante homólogo. Liofilização.

ABSTRACT

Lima JLO. Comparative analysis of demineralized freeze-dried bone, fresh frozen bone allograft and autogenous bone graft: a histologic study in rabbits [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Regarding different clinical applications for bone grafts in alveolar reconstructions and difficulties on achieving vertical osseous increase the present study performed a comparative histological evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA), of fresh frozen bone allograft (FFBA), autogenous graft (AU) and blood clot (CO) on vertical guided bone regeneration (GBR) in rabbit calvarium. Nine rabbits were used, with one as the primary bone graft donor and eight that were subjected to a model of GBR, whereby 32 titanium cylinders were fixed to the calvaria and randomly filled with DFDBA, FFBA, AU, or CO. The animals were sacrificed 13 weeks later, and the content of the cylinders was subjected to histomorphological and histomorphometric analysis to quantify the total area of neoformed tissue (AT), the new bone tissue (NB) and residual graft particles (RG). The results showed that mean values for AT were significant to DFDBA and FFBA and followed the relation $DFDBA = FFBA > AU > CO$. Considering new bone formation DFDBA and FFBA showed better results than the AU and CO. The amount of residual bone particles was larger in the DFDBA and followed the relation $FFBA > DFDBA = AU = CO$ (p-values < 5%). All interventions showed greater new tissue formation nearby the receptor site. It was possible to conclude that allografts – DFDBA and FFBA – can be considered good strategies for new bone formation in vertical increasing bone.

Keywords: Bone transplantation. Bone regeneration. Transplantation Homologous. Freeze Drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Fluxograma da captação do enxerto ao transplante	39
Figura 4.2 - Captação e procesamento dos aloenxertos ósseos	43
Figura 4.3 - Fluxograma com a organização dos grupos	44
Figura 4.4 - Técnica cirúrgica	47
Figura 4.5 - Espécimes associados ao leito receptor	47
Figura 4.6 - Análise histomorfométrica da área (mm^2) de tecido formado (AT)	49
Figura 4.7 - Análise histomorfométrica da área (mm^2) de material remanescente (MR).....	49
Figura 4.8 - Análise histomorfométrica da área (mm^2) de osso neoformado (ON)..	49
Figura 4.9 - Ilustração das regiões analisadas no estudo histomorfométrico.....	50
Figura 5.1 - Intervenção ALD (a) e (b) e ACM (c) e (d). (★) Trabéculas de tecido ósseo neoformado exibindo (■) tecido hematopoético interposto e (◆) presença focal de material remanescente (Aumento: 100x e 400x).....	53
Figura 5.2 - Intervenção AU (a) e (b) e CO (c) e (d). (★) Trabéculas de tecido ósseo neoformado exibindo (■) tecido hematopoético interposto e (✚) presença tecido conjuntivo fibroso (Aumento: 100x e 400x)	54
Figura 5.3 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável AT (mm^2) por intervenção.....	56

Figura 5.4 - Média da variável AT (mm ²) por intervenção	56
Figura 5.5 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável AT (mm ²) por intervenção e região de observação histomorfométrica	58
Figura 5.6 - Média da variável AT (mm ²) por intervenção e posição.....	59
Figura 5.7 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável MR (mm ²) quanto à intervenção.....	62
Figura 5.8 - Média da variável MR (mm ²) quanto à intervenção	62
Figura 5.9 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável MR (mm ²) por material e região.....	64
Figura 5.10 - Média da variável MR (mm ²) por intervenção e região	65
Figura 5.11 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável ON (mm ²)	67
Figura 5.12 - Média da variável ON (mm ²) por material	67
Figura 5.13 - Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável ON (mm ²) segundo a intervenção e região de observação histomorfométrica	69
Figura 5.14 - Média da variável ON (mm ²) por intervenção e região	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Protocolo de desmineralização	40
Tabela 4.2 - Protocolo de liofilização.....	42
Tabela 5.1 - Mediana dos valores da morfologia tecidual obtidos na histomorfologia.....	51
Tabela 5.2 - Valores-p para diferença de medianas das variáveis: osso neoformado, material exógeno e tecido conjuntivo fibroso quanto a relação entre os diferentes pares de intervenções.....	52
Tabela 5.3 Valores-p para diferença de medianas das variáveis: tecido hematopoiético, tecido adiposo e resposta de corpo estranho, quanto a relação entre os diferentes pares de intervenções	52
Tabela 5.4 - Estatísticas descritivas para a variável AT (mm ²)	55
Tabela 5.5 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm ²) sob os diferentes pares de intervenções.....	57
Tabela 5.6 - Estatísticas descritivas para a variável AT (mm ²)	58
Tabela 5.7 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm ²) sob os diferentes pares de materiais, por posição. 60	
Tabela 5.8 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm ²) sob as duas regiões, para cada intervenção	60
Tabela 5.9 - Estatísticas descritivas para a variável MR (mm ²)	61

Tabela 5.10 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável MR (mm ²) sob os diferentes pares de materiais.....	63
Tabela 5.11 - Estatísticas descritivas para a variável MR (mm ²)	64
Tabela 5.12 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável MR (mm ²) sob os diferentes pares de materiais.....	66
Tabela 5.13 - Estatísticas descritivas para a variável ON (mm ²)	66
Tabela 5.14 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm ²) sob os diferentes pares de materiais.....	68
Tabela 5.15 - Estatísticas descritivas para a variável ON (mm ²)	69
Tabela 5.16 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm ²) sob os diferentes pares de intervenções, por região.....	71
Tabela 5.17 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm ²) sob as duas posições, para cada material	71

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	grau Celcius
cm	centímetros
cm ³	centímetros cúbicos
µl	microlitro
µm	micrometro
g	grama
Kg	Kilograma
h	hora
kGy	kiloGray
mg	miligramas
mBar	milésios de Bar
mEq	miliEquivalente
mm	milimetro
mm ²	milimetro quadrado
mm ³	milimetro cúbico
Ø	diâmetro

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AATB	Associação Americana de Bancos de Tecidos
ACM	Aloenxerto Ósseo Congelado Mineralizado
ALD	Aloenxerto Ósseo Liofilizado Desmineralizado Irradiado
AT	Área Total
AU	Enxerto Autógeno
BBM	Osso Bovino Mineralizado
BTME	Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos
CAN	Aloenxerto Ósseo Esponjoso
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
CO	Coágulo Sanguíneo
CTR	Centro de Tecnologia das Radiações
DFDBA	Aloenxerto Ósseo Liofilizado Desmineralizado
EATB	Associação Europeia de Bancos de Tecidos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ePTFE	Politetrafluoretileno Expandido
FDBA	Aloenxerto Ósseo Liofilizado
GMC	Manual de Boas Práticas Clínicas
HBV	Hepatite B
HCV	Hepatite C
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICLAS	International Council of Laboratory Animal Science
IOT FMUSP	Instituto de Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPEN/CNEN-SP	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo
IV	Intra Venoso
MR	Material Remanescente
MS	Massa Sólida
ON	Osso Neoformado
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>

PF	Peso Final
pH	potencial Hidrogeniônico
PI	Peso Inicial
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
rhBMP2	Proteína Morfogenética Óssea recombinante humana 2
ROG	Regeneração Óssea Guiada
rpm	rotações por minuto
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UNISA	Universidade de Santo Amaro
UR	Umidade Residual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISTA DE LITERATURA	19
2.1 NOMENCLATURA E BIOLOGIA DOS ENXERTOS ÓSSEOS	19
2.2 ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS.....	21
2.3 ENXERTOS ÓSSEOS ALÓGENOS.....	25
2.4 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	31
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.2 MÉTODO	37
5 RESULTADOS	51
5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	51
5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	54
5.2.1 Quanto à Área Total de Tecido Formado (AT: mm ²)	55
5.2.2 Quanto à Área de Material Remanescente (MR: mm ²)	61
5.2.3 Quanto à Área de Osso Neoformado (ON: mm ²)	66
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentários osseointegrados para substituir dentes perdidos ou ausentes em pacientes edêntulos tornou-se um tratamento cientificamente aceito, a partir dos estudos de Per-Ingvar Brånemark. A aposição direta do osso vital à superfície do titânio – osseointegração – fundamentou a implantodontia e permitiu que as reabilitações por meio de próteses implantossuportadas se tornassem realidade.

Nas reabilitações orais com implantes osseointegrados o volume e o contorno do rebordo alveolar adequados são fundamentais para um resultado funcional bem sucedido. Diferentes técnicas têm sido propostas para correção das deficiências volumétricas e de contorno do rebordo alveolar, tais como próteses implantossuportadas com gengiva artificial, técnicas para ganhos de tecido mole e enxertos ósseos associados ou não a técnicas de regeneração óssea guiada (ROG).

As opções atuais de enxertos incluem os autógenos, os alógenos e os xenógenos, produtos que diferem em qualidade, por apresentar propriedades biológicas distintas. O osso autógeno é o único que apresenta as três propriedades biológicas fundamentais para as reconstruções ósseas: osteogênese, osteoindução e osteocondução, tornando-o o enxerto de referência. Os autoenxertos ósseos sem vascularização podem ser utilizados em blocos ou particulados. Os últimos podem ser coletados por meio de raspadores ósseos, apresentando como vantagem a redução da morbidade na área doadora, e como desvantagem a baixa resistência à reabsorção.

O osso alógeno – transplantado de um indivíduo para outro de mesma espécie, porém geneticamente diferente – tem sido uma alternativa ao uso dos autoenxertos, por apresentar vantagens como disponibilidade nos bancos de tecidos musculoesqueléticos (BTME), diminuição da morbidade na área doadora e redução do tempo operatório. Atualmente, estão disponíveis aloenxertos ósseos congelados, aloenxertos ósseos liofilizados mineralizados e aloenxertos ósseos liofilizados desmineralizados.

Embora a disponibilidade dos aloenxertos ósseos liofilizados seja grande em

diversos países, e sua eficácia clínica seja cientificamente comprovada, no Brasil existem poucos BTME que forneçam esse tipo de enxerto. Assim, torna-se essencial a realização de pesquisas experimentais que viabilizem a implantação de protocolos de liofilização óssea, e proporcionem um biomaterial de enxertia com qualidade, amplamente testado e de pronta disponibilidade.

Os defeitos ósseos alveolares têm múltiplas etiologias – reabsorção óssea após exodontias, traumas dentoalveolares, lesões maxilomandibulares, perdas ósseas de origem dentária e morfologia genética – e necessitam de técnicas reconstrutivas que possibilitem a terapia por meio de implantes. Nos anos 1980 e início dos anos 1990, diversas tentativas foram realizadas, com o intuito de desenvolver novas técnicas cirúrgicas para correção dos defeitos ósseos alveolares.

Os enxertos alveolares *onlay* têm sido utilizados com frequência para correção de defeitos ósseos horizontais e verticais, sendo os últimos mais difíceis de serem resolvidos. Enxertos em blocos, enxertos particulados, distração osteogênica, interposição de malha de titânio, ou a associação destes têm sido utilizados na reconstrução óssea vertical. O grande desafio nessas situações é controlar a pressão do tecido mole sobre o enxerto, com o intuito de limitar a reabsorção e o deslocamento do biomaterial.

Tendo em vista a quantidade e a difícil resolubilidade dos defeitos ósseos verticais, o presente estudo avaliou comparativamente o comportamento de três tipos de enxerto – aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado (ALD), aloenxerto ósseo congelado mineralizado (ACM) e enxerto autógeno (AU) – e do coágulo (CO) em um modelo experimental de regeneração óssea guiada na calota craniana de coelhos para ganho em altura.

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 NOMENCLATURA E BIOLOGIA DOS ENXERTOS ÓSSEOS

O enxerto ósseo pode receber uma nomenclatura e ser classificado de diversas maneiras, por exemplo, quanto à sua origem, quanto ao sítio receptor e quanto ao tipo de tecido ósseo. No primeiro caso, podem ser denominados de enxerto autógeno, autólogo, ou autoenxerto: enxerto de tecidos no mesmo indivíduo de um local para outro; de enxerto alógeno, homólogo ou aloenxerto: enxerto de tecidos entre indivíduos de uma mesma espécie com características genéticas distintas; e de enxerto xenógeno, heterólogo ou xenoenxerto: enxerto de tecidos entre indivíduos de espécies diferentes (Kao; Scott, 2007; Tanaka et al., 2008).

Em relação ao sítio receptor, o local onde será integrado, o enxerto pode ser classificado em ortotópico, quando é posicionado na localização anatômica de origem; e heterotrópico, quando é transplantado para uma região anatômica diferente.

Quanto ao tecido ósseo envolvido em enxertos, ele pode ser do tipo cortical, esponjoso ou corticoesponjoso. Enxertos frescos são aqueles transferidos diretamente do doador para a região receptora; comumente são os autoenxertos devido ao alto potencial imunogênico dos aloenxertos. Com o intuito de reduzir a imunogenicidade, os aloenxertos são processados e passam a ser chamados de congelado, liofilizado e irradiado. Por fim, podem ser vascularizados, com suprimento sanguíneo próprio, e não vascularizados, quando a vascularização é oriunda do leito receptor (Goldberg; Akhavan, 2005).

O mecanismo de regeneração e cicatrização óssea após os enxertos é um processo complexo, que depende de variáveis locais do leito receptor e do enxerto utilizado. Às interações biológicas entre o material de enxerto e a área receptora, que resultam na formação de osso com propriedades mecânicas adequadas, dá-se o nome de incorporação (Tanaka et al., 2008).

As incorporações dos enxertos ósseos diferem em qualidade, por apresentar propriedades biológicas distintas – osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese acontece por meio das células osteoprogenitoras presentes no enxerto, que sobrevivem ao transplante e se diferenciam em osteoblastos, produzindo ativamente novo osso. Já a osteoindução refere-se ao processo pelo qual as células-tronco mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao local do enxerto, são induzidas à diferenciação em células de linhagem osteogênica. Essa diferenciação está sob a influência das proteínas indutoras ou morfogenéticas do osso, dos fatores de crescimento e das citocinas. Por fim, a osteocondução refere-se à capacidade do biomaterial em conduzir a neoformação óssea por meio de sua matriz de suporte (arcabouço). A matriz deve ser reabsorvida e substituída pelo tecido ósseo (Jelic; Perciaccante, 2004; Giannoudis; Dinopoulos, 2005).

O processo de incorporação do enxerto ósseo se inicia com a formação do coágulo dentro e ao redor do enxerto, com a finalidade de nutrir a região até que haja a formação de novos capilares e vasos sanguíneos. Com a lesão inicial, provocada pelo procedimento cirúrgico, há uma resposta inflamatória, que resulta no crescimento de tecido de granulação na área enxertada. Esse processo de crescimento tecidual induz a revascularização do tecido e traz células osteoprogenitoras para o enxerto. Uma vez revascularizado, as células viáveis contidas no enxerto e as células osteoprogenitoras do leito receptor promovem a reabsorção do osso enxertado e a formação de um novo osso. Ao final, o osso é mineralizado e remodelado (Buck; Dumanian, 2012).

Embora a sequência de incorporação dos enxertos ósseos seja semelhante durante a formação do coágulo e sua organização pela malha de fibrina, a integração dos enxertos ósseos esponjosos diferem em alguns aspectos dos enxertos corticais. A revascularização ocorre mais rapidamente no osso esponjoso, pois estruturalmente a parte medular do osso esponjoso é mais porosa do que os canais de Havers do osso cortical, facilitando a angiogênese pelo enxerto esponjoso. Outra diferença entre os processos de incorporação dos enxertos esponjosos e corticais está relacionada à sequência de substituição do osso necrótico pelo osso neoformado. No enxerto esponjoso a neoformação tecidual sobre as trabéculas necróticas acontece sem reabsorção prévia da estrutura óssea, prevalecendo, dessa forma, uma resposta osteoblástica inicial. Já no enxerto cortical, a deposição do

novo osso sobre o tecido necrótico acontece após a finalização do processo de reabsorção óssea inicial, predominando assim a resposta osteoclástica. A última diferença está envolvida com a integralidade da reparação tecidual. No enxerto ósseo esponjoso, o trabeculado é completamente reabsorvido durante a fase de remodelação, e toda a região reparada torna-se osso lamelar maduro. Já nos enxertos corticais, o tecido ósseo continua sendo uma combinação de osso necrótico e osso viável por vários anos, podendo nunca se transformar em um osso completamente viável (Burchardt, 1983).

Em relação aos aloenxertos ósseos esponjosos, os processamentos – congelamento e liofilização – reduzem significativamente as reações imunogênicas e ajudam na incorporação dos enxertos. A revascularização e a remodelação dos aloenxertos são mais lentas em comparação com os autoenxertos, mas a osteoindução e a osteocondução estão preservadas até a completa incorporação do enxerto. De uma forma geral, todo o processo de incorporação dos aloenxertos ósseos acontece de forma similar aos autoenxertos, com a diferença de que é uma incorporação mais demorada (Goldberg; Akhavan, 2005).

2.2 ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS

São os enxertos retirados do mesmo indivíduo, comumente de uma área doadora distante da área receptora. É considerado o enxerto-padrão (*gold standard*) para as reconstruções ósseas alveolares. Tem como principal vantagem o fornecimento de células ósseas vivas imunocompatíveis, essenciais às fases iniciais da osteogênese, além de apresentar as características de osteoindução, osteocondução e osteogênese (Tanaka et al., 2008). No entanto, apresentam como desvantagens a necessidade de uma segunda cirurgia na área doadora, a quantidade limitada de tecido ósseo, os altos índices de reabsorção e o enfraquecimento da área doador (Giannoudis; Dinopoulos, 2005).

Os autoenxertos podem ser removidos de regiões extraorais (crista ilíaca, calvária e tíbia) e intraorais (ramo e sínfise mandibular, pilar zigomático e tuberosidade maxilar). A coleta intraoral pode ser realizada sob anestesia local (com

ou sem sedação) no consultório ou no hospital. Essa opção ajuda não apenas a minimizar os custos dos procedimentos para o paciente, mas também diminui a percepção que o paciente tem da complexidade do procedimento. As vantagens dos sítios doadores intraorais são o acesso cirúrgico conveniente e a proximidade dos sítios doadores e receptores, ambos fatores reduzem o tempo operatório (Peleg et al., 2004).

Blocos ósseos, osso particulado, lascas ósseas (raspas) e aglutinado ósseo são os quatro tipos de enxertos ósseos avascularizados que podem ser obtidos por acesso intraoral (Bosshart; Schenk, 2010).

Especificamente, as lascas ósseas são coletadas com raspadores ou cinzéis nas superfícies ósseas corticais e, com menos frequência, usando-se curetas ou colheres nos compartimentos ósseos medulares. Esse tipo de enxerto, quando removido da superfície cortical, apresenta alta porosidade e favorece a rápida revascularização. Outro fator positivo é o elevado potencial de sobrevivência das células, reforçado pela baixa temperatura gerada durante a instrumentação manual do raspador ósseo (Peleg et al., 2004). Sabe-se que o tamanho médio das raspas ósseas é de 1,3 mm de comprimento, 200 µm de largura e 100 µm de espessura, e a porcentagem viável de osteócitos nas lascas ósseas varia de 45% a 70% (Zaffe; D'Avenia, 2007).

Pallesen et al. (2002) avaliaram a influência do tamanho das partículas do enxerto autógeno nos estágios iniciais da regeneração óssea. Defeitos ósseos bicorticais com 6 mm de diâmetro foram realizados na calota craniana de 15 coelhos e preenchidos aleatoriamente com partículas de osso autógeno pequenas (0,5 a 2 mm³), grandes (10 mm³) e com coágulo sanguíneo. Após quatro semanas, a quantidade de osso neoformado foi maior nos defeitos ósseos preenchidos com partículas pequenas, em comparação com aqueles preenchidos com as partículas grandes. Além disso, as partículas pequenas foram mais reabsorvidas quando comparadas com as grandes. Os defeitos que receberam osso autógeno foram completamente preenchidos, já os do grupo de controle (coágulo) tiveram cicatrização incompleta após quatro semanas e apresentaram tecido conjuntivo fibroso no centro do defeito.

Al-Sebaei et al. (2004) publicaram uma série de casos, em que o osso foi coletado da calota craniana com “raspador ósseo” e o volume obtido chegou a 14 cm³. Os autores afirmaram que é uma técnica segura e uma fonte alternativa de osso autógeno, que pode ser utilizada nas reconstruções ósseas pré-implante, ou seja, no levantamento do assoalho do seio maxilar, na regeneração óssea guiada de todo o rebordo alveolar, no preenchimento de alvéolos, em enxertos associados à distração osteogênica ou em fissuras alveolares. Serve também para o fechamento de grandes comunicações bucossinuais com levantamento do seio maxilar e nos enxertos em mandíbulas atroficas com instalação simultânea de implantes dentários via acesso submental.

Peleg et al. (2004) realizaram 156 levantamentos do seio maxilar e 37 aumentos alveolares, utilizando “raspador ósseo” para coleta de osso autógeno de regiões intraorais – parede anterior do seio maxilar, tuberosidade maxilar, pilar zigomático, corpo e ramo da mandíbula. Nos procedimentos para levantamento do seio maxilar unilateral apenas com osso autógeno, a média de 4 a 5 cm³ de enxerto foi utilizada. Já nas fenestrações e deiscências ósseas da região anterior da maxila, utilizou-se a média de 1 a 1,5 cm³ de enxerto. Quatro a cinco meses após o enxerto, as amostras coletadas demonstraram a média de 27% a 37% de osso maduro formado.

Zaffe e D’Avenia (2007) estudaram as características histológicas de enxertos realizados com lascas ósseas em procedimentos para levantamento do seio maxilar e para preenchimentos de alvéolos pós-exodontia. Os autores observaram que o osso sofre diferentes padrões de reabsorção e que todos os fragmentos enxertados são parcialmente reabsorvidos no período de 2 a 4 meses. As partículas maiores sofrem redução de tamanho, mas suportam a ação dos osteoclastos, sendo rodeadas por novo osso nove meses após o procedimento cirúrgico.

Johansson et al. (2010) avaliaram a condição dos implantes dentários, a perda óssea marginal e o resultado do enxerto em seio maxilar, realizados em pacientes submetidos a levantamento do seio maxilar e instalação de implante no mesmo tempo cirúrgico, utilizando enxertos ósseos coletados com “raspador ósseo” e coletor ósseo acoplado ao sugador. A taxa de sobrevivência dos implantes foi 98,8% em um período de acompanhamento de 12 a 60 meses. Não houve diferença

significativa na perda óssea marginal dos lados mesial e distal do implante, quando se comparou o valor aferido inicialmente com o final. No mesmo período, a altura do enxerto diminuiu significativamente na região apical e distal dos implantes. Para os autores, os dois métodos de coleta óssea podem ser utilizados para aumento do seio maxilar e proporcionam volume ósseo suficiente para instalação de um a três implantes. Ressaltaram que o prejuízo para a área doadora é mínimo, e que a taxa de sobrevivência dos enxertos, implantes e próteses é satisfatória (Johansson et al., 2010).

Pekovits et al. (2012) compararam, por um estudo *in vitro*, a influência de dois diferentes tipos de osso particulado em relação à qualidade do enxerto – aquele obtido pelo “raspador ósseo” e aquele obtido pelo motor piezoelétrico. Quarenta amostras de osso autógeno foram obtidas durante a exodontia de terceiros molares utilizando-se um dos métodos descritos. As variáveis investigadas foram a morfologia da partícula óssea, a viabilidade celular e a diferenciação osteogênica. As duas formas de coleta apresentaram partículas ósseas semelhantes morfologicamente. O crescimento das células aderidas após 7 e 18 dias não foi significativo e a viabilidade das células foi a mesma em ambos os grupos. Tanto a técnica manual utilizando-se o raspador ósseo quanto a piezoelétrica são adequadas para enxertia em aumentos alveolares de pequeno volume.

O comportamento do osso autógeno obtido por quatro diferentes técnicas – triturador ósseo, piezocirurgia, perfuração óssea e raspador ósseo – durante o processo de consolidação foi estudado por Miron et al. (2013). A viabilidade celular e a liberação de moléculas que influenciam na formação óssea foram maiores nas amostras que utilizaram o triturador e o raspador ósseo, quando comparadas com as amostras obtidas por meio de perfuração óssea e piezocirurgia. A forma de coleta também afeta a expressão do gene. As amostras oriundas do triturador ósseo e do raspador ósseo proporcionaram uma elevada expressão dos fatores de crescimento, como a rhBMP2 e o fator de crescimento endotelial, quando comparadas com as duas outras formas de coleta. Para os autores, o estudo ajuda na compreensão dos diferentes comportamentos durante a incorporação do osso autógeno ao se utilizar formas distintas de coleta.

2.3 ENXERTOS ÓSSEOS ALÓGENOS

O enxerto alógeno refere-se à transferência de tecidos ou órgãos retirados de um indivíduo e transplantado em outro da mesma espécie. A grande vantagem dos aloenxertos ósseos é a possibilidade de armazenamento em banco de tecidos, o que proporciona uma quantidade satisfatória de tecido doador. Assim como os autógenos, os enxertos alógenos são muito utilizados nas áreas médica e odontológica, porém apresentam como desvantagens a possibilidade de causar reação de imunogenicidade e a possibilidade de transmissão de doenças. O processamento dos aloenxertos diminui o risco de transmissão de doenças, porém reduz significativamente as propriedades biológicas e mecânicas do tecido ósseo. Após o processamento, estes biomateriais podem ser classificados como aloenxerto ósseo congelado, aloenxerto ósseo liofilizado mineralizado e aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado (Kao; Scott, 2007).

A seleção de um doador é um dos passos mais importantes do transplante de órgãos entre humanos. A utilização de tecidos de bancos é uma alternativa viável no tratamento de várias doenças, porém existe o risco de infecção do receptor com aloenxertos contaminados, o que é motivo de grande preocupação para todos os que lidam com transplantes de órgãos em sua prática diária. Por isso, um rígido protocolo de seleção de doadores, visando diminuir ou mesmo eliminar esse risco, é executado pelos bancos de tecidos, incluindo uma anamnese minuciosa e uma bateria completa de exames sorológicos e bacteriológicos em todos os doadores potenciais (Feofiloff; Garcia, 1996; Roos et al., 2000).

Os tecidos que compõem os bancos podem ser coletados de doadores vivos ou de cadáveres. Os de doadores vivos são obtidos, principalmente, de cirurgias de artroplastia total de quadril, nas quais são ressecadas porções ósseas da cabeça femoral. Porém, atualmente, a principal fonte de aloenxertos é o doador cadáver, do qual podem ser retiradas quantidades mais significativas de tecidos, como fêmur, tíbia, ossos da pélvis e estruturas de partes moles como ligamentos, tendões e meniscos (Rondinelli et al., 1994; Alencar et al., 2007).

O questionário, direcionado ao doador ou aos seus familiares, visa coletar informações pré-operatórias que possam indicar critérios de exclusão. São investigados fatores locais, como infecção, irradiação e fraturas dos ossos; fatores sistêmicos, como infecção bacteriana, viral, parasitária e micoses; e outros fatores, como o consumo de drogas ilícitas, comportamento sexual, proveniência de zona de doenças endêmicas, etc. Além disso, todos os doadores são submetidos a exames sorológicos para hepatite A, hepatite B, hepatite C, sífilis, doença de Chagas, SIDA, citomegalovírus, toxoplasmose, infecção pelo Epstein-Baar (Amatuzzi et al., 2000).

As equipes de captação têm até 12 horas após a interrupção da circulação para a captação dos tecidos musculoesqueléticos, mesmo em temperatura ambiente (Amatuzzi et al., 2000). Após a captação dos demais órgãos (córnea, rim, fígado, etc.) os ossos são removidos em ambiente cirúrgico e submetidos à esqueletização (remoção das partes moles). Nesse momento, são colhidas amostras e enviadas ao laboratório para testes bacteriológicos e fúngicos (Feofiloff; Garcia, 1996). Após o período de quarentena, onde os tecidos aguardam confirmação para liberação a partir dos exames sorológicos, inicia-se o preparo e processamento dos ossos para finalidade de transplante.

O primeiro tipo de processamento é o da estocagem. O osso, normalmente, é obtido quando o processo de necrose tecidual se encontra na fase inicial de isquemia. Fases avançadas de necrose e proliferação bacteriana são indesejáveis, porque as enzimas liberadas podem danificar a matriz óssea, formar toxinas e aumentar o risco de infecção. Tais eventos são resultantes de hidrólise e oxidação, processos que requerem água em fase líquida. Assim, a base de todos os processos de estocagem é a redução de água em estado líquido a níveis mínimos (Tanaka et al., 2008).

Em termos gerais, o processamento dos tecidos é baseado em conceitos e fundamentos similares. Após a coleta, os aloenxertos ósseos humanos são submetidos a desnudamento, com a remoção dos tecidos moles e redução do seu tamanho em peças menores. Posteriormente, os técnicos limpam rigorosamente o osso através de lavagem, agitação, centrifugação ou da combinação desses, utilizando soluções salinas, acetona, etanol ou peróxido de hidrogênio, visando assim remover tecidos biológicos e diminuir a antigenicidade. Os técnicos de

processamento, em seguida, tratam os aloenxertos ósseos com antibióticos, antimicóticos e agentes antivirais, e os congelam a aproximadamente 80°C negativos. Nesse momento, obtém-se o osso fresco congelado (Holtzclaw et al., 2008).

O ultracongelamento é utilizado para imobilizar a água, pois, a uma temperatura de -80 °C, toda a água existente no bloco encontra-se cristalizada. Ao mesmo tempo, as células são inviabilizadas pela formação de cristais de gelo no seu interior, o que pode ser associado à diminuição da resposta imunológica a esse tipo de processamento (Tanaka et al., 2008).

Quando o osso fresco congelado é submetido à liofilização – desidratação óssea por sublimação – obtém-se o aloenxerto ósseo liofilizado (FDBA). Esse processo reduz, quase totalmente, a umidade do enxerto e, conseqüentemente, diminui a antigenicidade, facilitando o armazenamento do biomaterial em temperatura ambiente. O aloenxerto ósseo liofilizado é submetido a uma segunda redução de tamanho, e as partículas ósseas chegam a um tamanho final de aproximadamente 250 a 750 micrometros. Alguns técnicos adicionam a desmineralização ao processo, imergindo as partículas em ácido clorídrico. Posteriormente, submete-se o biomaterial à solução-tampão para remover o ácido residual, e a sucessivas lavagens com soluções (por exemplo, água destilada) para remover o remanescente da solução-tampão. Nesse momento, obtém-se o aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) (Holtzclaw et al., 2008).

Diferentes processamentos e protocolos são empregados por diferentes bancos de tecidos, na tentativa de assegurar adequada desinfecção e esterilização aos aloenxertos. Irradiação, imersão e lavagem com agentes químicos e antibióticos são exemplos dos diferentes métodos. Sabe-se que apenas a manipulação asséptica não elimina as chances de infecções virais, fúngicas, bacterianas e por esporos, enquanto que esterilizações com óxido de etileno e radiação gama, eliminam bactérias, fungos e esporos, sendo a eliminação dos vírus dose dependente (Vaishnav et al., 2009). A dose de irradiação gama empregada para esterilização de enxertos ósseos homólogos varia entre 10 e 35 KGy (Vastel et al., 2004).

Os aloenxertos ósseos podem permanecer armazenados dentro dos Bancos de Tecidos por até cinco anos após a data do seu processamento, desde que devidamente acondicionados em suas embalagens e refrigerados em temperaturas baixas, em torno de -80 °C. No caso de abertura das embalagens e exposição dos ossos ao meio ambiente, estes deverão ser prontamente utilizados nos procedimentos de reconstrução e, caso algum problema impeça o andamento do procedimento cirúrgico, o tecido ósseo exposto e descongelado deverá ser imediatamente descartado, de acordo com as normas vigentes para descarte de lixo hospitalar, e os Bancos de Tecidos deverão ser imediatamente informados (Pelegrine et al., 2008).

Comumente, a preocupação com doenças infecciosas recai sobre a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a hepatite B (HBV), a hepatite C (HCV), a sífilis, outras infecções bacterianas e o agente responsável pela Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) ou encefalopatias espongiformes transmissíveis provocada pelo prions. Desta forma, testes laboratoriais para determinadas infecções são mandatórios no processo de seleção dos doadores de aloenxertos ósseos (Holtzclaw et al., 2008).

Embora fosse claro que o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é 100% transmissível pelo sangue, não se sabia da possibilidade de infecção através dos aloenxertos ósseos. Até que em 1984, o primeiro caso de transmissão do HIV por meio de transplante ósseo foi relatado. Desde a primeira ocorrência, até o ano de 2012, doze casos de infecções por HIV devido à utilização dos aloenxertos musculoesqueléticos foram relatados na literatura. Com exceção de um caso envolvendo doador não submetido ao teste para HIV em 1996, todos os outros ocorreram entre 1984 e 1986. Nove casos aconteceram em uma época em que os testes virais ainda não estavam disponíveis, e um caso, pela impossibilidade de realizar o teste no doador. Em relação às contaminações pelo vírus da hepatite C, todos os dez casos de transmissão foram resultantes do transplante de aloenxertos congelados ou criopreservados, que não foram processados e esterilizados, sendo a última ocorrência em 2000 (Hinsenkamp et al., 2012).

Os bancos de tecidos responderam ao desafio de fornecer aloenxertos mais seguros por meio do desenvolvimento de novos protocolos de triagem, captação e

processamento dos enxertos, e elaboraram o manual *Standards* desenvolvidos pelas principais associações de bancos de tecidos como a Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB) e a Associação Europeia de Bancos de Tecidos (EATB), o que contribuiu para o ganho de qualidade dos tecidos disponibilizados pelos bancos (Tomford, 2000).

A influência positiva dos manuais de processamento nos bancos de tecidos musculoesqueléticos fez com que as reações adversas oriundas da utilização dos aloenxertos reduzissem significativamente. Historicamente, com uma possível exceção, todos os casos de contaminação viral envolveram aloenxertos musculoesqueléticos frescos congelados ou criopreservados. Poucos efeitos adversos e nenhuma infecção viral foram observados nos aloenxertos liofilizados. A segurança dos aloenxertos ósseos não pode ser tida como certa, mas os registros de segurança têm sido animadores. Mais de um milhão de aloenxertos ósseos foram realizados nos últimos dez anos sem evidências de transmissão de SIDA ou hepatite (Hinsenkamp et al., 2012).

Soluções ácidas concentradas têm demonstrado capacidade de romper a cadeia do DNA viral. Assim sendo, foi observado que HIV, HBV, HCV, citomegalovírus e poliovírus podem ser inativados pelo processo de desmineralização utilizado na preparação do DFDBA (Buck et al., 1990). A chance de infecção por HIV quando ao processamento se associa a desmineralização é de 1 em 2,8 bilhões (Holtzclaw et al., 2008).

Com relação à sífilis, causada pelo organismo *Treponema pallidum*, essa é uma doença que pode ser transmitida via osso ou tecido mole. No entanto, o agente causador é sensível a antibióticos, aquecimento e desidratação. Dentre as infecções bacterianas, os organismos mais comumente isolados foram *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter cloacae* (Biagini et al., 1999) e *Staphylococcus epidermidis* que, se encontrado na pele do doador, pode contaminar o enxerto no momento da coleta (Aho et al., 1998).

Le et al. (2010) avaliaram a eficácia da utilização do osso alógeno mineralizado particulado nos aumentos de defeitos alveolares verticais, objetivando a instalação de implantes. O procedimento foi avaliado clinicamente quatro a cinco

meses após o aumento, no momento da instalação dos implantes e da remoção das amostras para avaliação histológica. Após avaliação dos resultados, o ganho médio em altura do rebordo alveolar foi de 9,7 mm. Dois pacientes tiveram deiscência de sutura, resultando em perda do enxerto e necessidade de segunda cirurgia antes da instalação do implante. Cinco pacientes necessitaram de cirurgias em dois estágios para alcançar a altura ideal. A análise histomorfométrica dos espécimes ósseos coletados no momento da instalação dos implantes revelou 43% (em média) de novo osso. Houve osseointegração dos 32 implantes instalados. Para os autores, a técnica oferece uma reconstrução estética e funcional do rebordo alveolar satisfatória, sem a necessidade de enxertos autógenos, e também possibilita a osseointegração.

Eskan et al. (2013) avaliaram clinicamente e histologicamente 28 pacientes com defeitos alveolares que receberam aloenxerto ósseo esponjoso (CAN) ou aloenxerto ósseo esponjoso associado a plasma rico em plaquetas (PRP). Todas as regiões enxertadas foram cobertas com membrana reabsorvível e foram acompanhadas por quatro meses. Amostras foram coletadas no momento da instalação dos implantes e submetidas à avaliação histológica. Para o grupo CAN, nove amostras foram avaliadas: a média de osso vital foi $36 \pm 14\%$, de osso não vital $10 \pm 5\%$ e de espaço trabecular $54 \pm 13\%$. Para o grupo PRP, dez amostras foram avaliadas: a média de osso vital foi $51 \pm 15\%$, de osso não vital $6 \pm 5\%$ e de espaço trabecular $42 \pm 15\%$. A perda na espessura alveolar aumentada foi maior para o grupo CAM do que para o grupo PRP. Os achados clínicos e histológicos sugeriram que o aloenxerto ósseo esponjoso associado a PRP mostrou um maior ganho horizontal no osso alveolar e uma porcentagem maior de osso vital, quando comparado ao grupo sem PRP.

Deluiz et al. (2013) avaliaram 24 pacientes submetidos a reconstrução alveolar com aloenxerto ósseo em bloco quanto às taxas de reabsorção e incorporação dos enxertos. O estudo foi realizado em períodos de reparo diferentes, ou seja, quatro, seis e oito meses antes da instalação dos implantes. A taxa de reabsorção, avaliada por meio de tomografia computadorizada, foi $50.78\% \pm 10.43$, $32.77\% \pm 7.84$, e $13.02\% \pm 3.86$ para quatro, seis e oito meses, respectivamente. Na avaliação histológica foi observada neoformação óssea com osteócitos próximos ao osso enxertado em todos os grupos, sendo menor o número de osteócitos no

período de quatro meses. O remanescente do aloenxerto foi significativamente maior nos períodos de tempo menores. Todos os enxertos demonstraram quantidades satisfatórias de osso neoformado.

Chiapasco et al. (2013) compararam a integração do aloenxerto ósseo fresco congelado de crista ilíaca (grupo A) com os autoenxertos (grupo B) utilizados em blocos nas reconstruções ósseas maxilares e mandibulares. A análise histomorfométrica demonstrou no grupo A uma média de osso lamelar de $24.7 \pm 14.7\%$, de osso neoformado de $28.4 \pm 13.3\%$ e de osso medular de $46.9 \pm 16.9\%$; no grupo B, os valores correspondentes foram $25.3 \pm 15.3\%$, $22.9 \pm 11.0\%$ e $51.7 \pm 15.7\%$. Não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados histológicos entre os grupos A e B.

2.4 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Na mesma época da osseointegração por implantes de titânio, foi introduzido o conceito de ROG, quando se utilizam barreiras que promovem a exclusão de tecido conjuntivo no espaço preenchido pelo coágulo, e que favorecem a reconstrução óssea (Becker; Becker, 1990; Buser et al., 1990; Nyman et al., 1990; Dahlin et al., 1991; Jovanovic et al., 1992).

Diferentes materiais têm sido utilizados como barreiras no estudo da regeneração óssea guiada: titânio (Pelegrine et al., 2011; Polo et al., 2013), politetrafluoretileno expandido (ePTFE) (Dahlin et al., 1988; Dahlin et al., 1990; Tatakis et al., 1999), poliésteres sintéticos (Piattelli et al., 1998; Von Arx et al., 2005) e colágeno (Rothamel et al., 2005; Bornstein et al., 2007; Jung et al., 2013). Atualmente, sabe-se que as barreiras necessitam ter algumas características básicas: 1) biocompatibilidade, 2) oclusão celular, 3) integração tecidual, 4) formação e manutenção do espaço, 5) fácil manejo clínico durante a cirurgia e 6) baixo índice de complicações.

Em relação às pesquisas que utilizam barreiras oclusivas de titânio como modelo de estudo da regeneração óssea guiada, os resultados têm auxiliado à

compreensão dessa forma de tratamento. A maioria dos estudos inclui a utilização de animais, sendo que a calvária de coelhos tem sido o modelo mais comumente utilizado.

Linde et al. (1993) avaliaram diferentes tipos de membranas de politetrafluoretileno em um modelo de regeneração óssea na calota craniana de ratos. A avaliação histológica feita de 9 a 16 semanas após a cirurgia mostrou diferentes volumes de osso neoformado sob as membranas. Para os autores, a quantidade de neoformação óssea é dependente da qualidade – rigidez e porosidade – da membrana e do tempo de cicatrização.

A permeabilidade de membranas utilizadas nos modelos de regeneração tecidual guiada (RTG) foi avaliada quanto ao seu papel no mecanismo de formação óssea. Schmid et al. (1994) avaliaram 16 cilindros de titânio instalados na calota craniana de oito coelhos, sendo dois por animal, um coberto com membrana ePTFE e outro selado com tampa de titânio. Para induzir o sangramento da região medular e favorecer a irrigação no interior do cilindro, a cortical externa do crânio do coelho foi desgastada com brocas. Após oito meses de cicatrização, observaram que um novo tecido ósseo havia se formado em todos os cilindros. Baseados nesses resultados, os autores concluíram que a permeabilidade da barreira não foi condição primordial ao processo de regeneração óssea guiada.

Em um estudo experimental em coelhos, Lundgren et al. (1995) avaliaram a formação óssea sob uma barreira oclusiva de titânio, na qual o tecido ósseo era o único tecido em contato com o espaço confinado pela barreira. Doze casquetes de titânio foram instalados em três coelhos, quatro por animal. Antes da inserção dos casquetes, realizaram-se sulcos na calota craniana do animal para promover irrigação sanguínea do espaço confinado. Após um período de cicatrização de três meses, os animais sofreram eutanásia e as amostras com os casquetes em posição foram removidas, para avaliação histológica. Todos os casquetes estavam completamente preenchidos com tecido ósseo, indicando que esse tipo de barreira oclusiva é um excelente isolante, com ótima rigidez e estabilidade.

O efeito da perfuração intramedular na taxa de neoformação óssea em espaços confinados por barreiras de titânio foi estudado por Majzoub et al. (1999). Foram instaladas 32 esferas na calota craniana de 16 coelhos. Cada animal recebeu

duas esferas ocas na calvária, sendo que uma confinava um espaço com a cortical óssea perfurada (grupo teste) e a outra um espaço sem perfurações (grupo controle). Após 10, 21, 42 e 60 dias as amostras foram removidas e submetidas à avaliação histológica e histomorfométrica. A densidade óssea foi consideravelmente maior no grupo teste em todos os períodos observados. Assim, as perfurações intramedulares propiciam a neoformação óssea inicial, resultando em aumento no volume e densidade do tecido ósseo.

Lundgren et al. (2000) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se a decorticalização e exposição do endóstio aumenta a neoformação óssea em um modelo de regeneração óssea guiada na calota craniana de coelhos. Dois cilindros de titânio foram posicionados sobre o crânio de oito coelhos, um delimitando uma área decorticalizada (grupo teste) e outro delimitando uma área de osso intacta (grupo controle). Após três meses, os animais foram sacrificados e submetidos a avaliação histológica e histomorfométrica. Após análise dos resultados, os autores concluíram que não houve diferença na aparência morfológica do osso neoformado entre os grupos e que a decorticalização não promove mais neoformação óssea.

Em um estudo realizado em coelhos, Slotte et al. (2003) mostraram que a utilização do enxerto ósseo autógeno ou do osso bovino mineralizado (BBM), quando combinada com o uso de uma barreira de titânio, pode favorecer a regeneração óssea, quando comparada ao uso da barreira de titânio de forma isolada. Os autores instalaram 32 cilindros de titânio, nos ossos parietais de 16 coelhos com perfuração do leito receptor. Um cilindro permaneceu vazio (grupo controle) e o outro foi preenchido com raspas de osso autógeno (BBM: grupo teste). Após 12 semanas, os animais sofreram eutanásia e as amostras foram avaliadas histológica e histomorfometricamente. Os resultados demonstraram taxas significativamente maiores de tecido ósseo nos grupos testes quando comparados com o grupo controle.

Yamada et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes casquetes de titânio na regeneração óssea guiada em calvárias de coelhos. Foram utilizados 16 casquetes de titânio em oito coelhos, dois por animal. Inicialmente, realizaram-se sulcos circulares com broca trefina de 8 mm de diâmetro e perfurações no centro dos sulcos para provocar sangramento na área confinada pelo casquete. Nesses sulcos

foram acoplados dois casquetes semicirculares, sendo um totalmente fechado e o outro com perfurações de 1,5 mm. Após períodos de um e três meses, os animais sofreram eutanásia e as amostras foram submetidas à avaliação histológica e histomorfométrica. Os resultados mostraram que após um mês de cicatrização não houve diferenças relevantes entre os dois tipos de casquetes. No entanto, após três meses, observou-se uma quantidade de formação óssea mais significativa no fechado do que no perfurado. Para os autores, a oclusão do casquete e o tempo de reparo adequado permitem uma formação óssea mineralizada previsível nesse modelo.

Nishimura et al. (2004) desenvolveram um estudo para avaliar histológica e histomorfometricamente os efeitos da perfuração do osso cortical na neoformação óssea em um modelo de regeneração óssea na calota craniana de coelhos. Após a remoção do periósteo, defeitos corticais com tamanhos diferentes (Grupo A: 1 x 15 mm e Grupo B: 3 x 15 mm) foram realizados na cortical externa do osso frontal e ocluídos com membrana não reabsorvível. Ao fim de 12 semanas, o espaço foi preenchido com tecido conjuntivo e osso em ambos os grupos. A análise estatística apresentou diferenças significativas entre os dois grupos. Os autores concluíram que uma perfuração maior está associada com uma formação maior de osso na regeneração óssea guiada.

Estudo experimental em coelhos realizados por Lima (2010) avaliou as alterações de volume do ALD, comparando-o com o ACM, com o AU e com o coágulo sanguíneo (CO). Após 13 semanas, os animais foram sacrificados e o conteúdo dos cilindros submetido à avaliação clínica para quantificar o volume tecidual resultante. O ALD apresentou maior média de volume tecidual resultante ($73,73 \text{ mm}^3 \pm 18,28$). No entanto, quando comparado com o ACM ($71,54 \text{ mm}^3 \pm 16,40$), não apresentou diferença significativa. O osso AU apresentou volume resultante médio de $45,42 \text{ mm}^3 \pm 22,46$, diferença significativa quando comparado com ALD e ACM. Para o autor, a utilização de aloenxertos ósseos, em especial o DFDBA por ser mais seguro e de fácil armazenamento, é uma alternativa ao osso autógeno na correção das deficiências volumétricas do rebordo alveolar, já que se mostrou mais efetiva na manutenção do volume enxertado neste modelo de ROG para ganhos teciduais em altura.

Pelegrine et al. (2011) também utilizaram 60 cilindros de titânio fixados na calota craniana de 30 coelhas. Os cilindros foram preenchidos com osso autógeno (A), osso autógeno associado à medula óssea (AM), aloenxerto fresco congelado (H), aloenxerto fresco congelado associado à medula óssea (HM), medula óssea autógena pura (M) e coágulo sanguíneo (C). Alguns animais foram sacrificados após 2 meses e outros após 3 meses. Após avaliação clínica, as amostras foram submetidas a estudo histológico. Os grupos experimentais que receberam materiais mineralizados (A, AM, H e HM) apresentaram os melhores resultados de formação óssea, não apresentando diferença estatística entre eles. Os grupos M e C apresentaram os piores resultados, mas o grupo M foi melhor que o grupo C.

Polo et al. (2013) avaliaram o efeito rhBMP-2 associado a substitutos ósseos em um modelo de regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. Quatro cilindros de titânio foram utilizados na calota craniana de 22 coelhos. Três cilindros foram preenchidos aleatoriamente com BioOss®, Bone ceramic® e Cerasorb®, e um permaneceu com coágulo. Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo associou a rhBMP-2 e o grupo controle não teve essa associação. Após 14 semanas os espécimes foram coletados e submetidos à análise histológica e histomorfométrica. Após análise dos resultados, observou-se que a utilização de rhBMP-2 combinada com todos os substitutos ósseos resultou em maior neoformação óssea, quando comparada ao grupo sem rhBMP-2.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi realizar uma análise comparativa, do ponto de vista histológico, entre quatro intervenções – aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado, aloenxerto ósseo congelado mineralizado, enxerto autógeno e coágulo – em um modelo de regeneração óssea guiada para ganho em altura na calvária de coelhos e responder as seguintes perguntas:

1. Qual intervenção resulta em maior neoformação óssea ?
2. Qual intervenção resulta em maior quantidade de material remanescente?
3. As regiões próximas ao leito receptor se comportam de forma diferente das mais distantes em relação a quantidade de neoformação óssea?

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (parecer nº 126/2009 – vide Anexo A) e realizada mediante os princípios éticos de experimentação animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), segundo normas nacionais para a utilização de animais em pesquisas.

4.1 MATERIAL

Foram utilizados nove coelhos albinos da raça Nova Zelândia, fêmeas, pesando entre 3,5 e 4 kg e com idade entre 11 e 15 meses. Um animal foi o doador dos enxertos ósseos e os oito restantes foram utilizados como receptores. Todos foram provenientes de criadouro particular e ficaram em observação por um período de sete dias após a chegada, para que fossem descartadas quaisquer anomalias no estado geral de saúde. Após o período de observação, foram mantidos no biotério da Universidade de Santo Amaro (UNISA) com ventilação e temperaturas controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), sendo alimentados com ração própria para coelhos e hidratados com água *ad libitum*.

4.2 MÉTODO

Captação dos Aloenxertos Ósseos

Um animal sofreu eutanásia e foi utilizado como doador primário de enxertos ósseos (Figura 4.1). Os aloenxertos foram retirados bilateralmente das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia após sacrifício do animal doador. Segundo as normas consideradas aceitáveis, os animais inicialmente foram anestesiados com uma

sobredosagem de barbitúricos (Thionembutal®): 100 mg/kg IV e, uma vez anestesiados, foi administrado cloreto de potássio 1 a 2 mEq/kg IV.

Os protocolos de captação, processamento e criopreservação dos aloenxertos do coelho doador foram os mesmos empregados pelo Banco de Tecidos Musculoesqueléticos do IOT-FMUSP, sob cuidados estritos de assepsia e controle ambiental, e seguiram as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira (Portaria nº 1686 de 20 de setembro de 2002) e pelos padrões da EATB e da AATB.

Após a eutanásia, realizou-se a tricotomia dos membros inferiores do animal, antissepsia com solução degermante de clorexidina 2% seguida de clorexidina alcoólica 0,5% e isolamento da região operatória com campos cirúrgicos estéreis. Com o animal posicionado em decúbito dorsal, o acesso à articulação fêmoro-tíbio-patelar foi realizado por meio de incisão, divulsão dos tecidos subcutâneos e descolamento periosteal (Figura 4.2a). Em seguida, realizou-se a osteotomia e a ressecção das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia com o uso de serras sob irrigação com solução fisiológica 0,9% (Figura 4.2b).

Após a captação dos aloenxertos, as epífises foram submetidas a esqueletização, por meio da remoção dos tecidos moles, e fragmentação com uso de triturador ósseo elétrico de baixa rotação sob intensa irrigação (Figura 4.2c). Os tecidos ósseos de cada animal foram tratados separadamente, passando por um processo de lavagem e agitação com solução fisiológica estéril a 0,9%, peróxido de hidrogênio a 3% e etanol a 70% (Figura 4.2d e 4.2e).

Figura 4.1 – Fluxograma da captação do enxerto ao transplante

Do animal doador foram obtidas amostras de medula e espécimes ósseos, os quais foram acondicionados em meio contendo caldo tioglicolato para a pesquisa de bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias e fungos (Figura 4.2f). As análises microbiológicas foram realizadas pelo laboratório de bacteriologia geral e pelo laboratório de análises fúngicas do Instituto Biológico de São Paulo.

Cada amostra foi acondicionada e identificada em triplos invólucros estéreis resistentes a baixas temperaturas (atóxicos, apirógenos e confeccionados por um coextrusado de cinco camadas de nylon e polietileno com 0,5 mm de espessura). Logo após, foram identificadas e encaminhadas à sala de criopreservação do Banco de Tecidos – IOT FMUSP, onde permaneceram em quarentena por um período mínimo de 40 dias. Durante essa etapa os tecidos foram mantidos a -80 °C em *ultrafreezer* (Marca: Thermoforma®) equipado com *backup* de CO₂, sistema de

controle de temperatura, alarme via satélite e gerador de energia. Mediante o resultado da análise microbiológica, parte dos tecidos foi submetida aos processos de desmineralização, liofilização e irradiação.

Desmineralização

O processo de descalcificação do tecido ósseo foi realizado através da imersão da amostra em ácido clorídrico (0,6%), sob refrigeração (4 °C), na proporção de 250 ml / 5 g de tecido ósseo e por um período de seis horas. Em seguida, as amostras foram imersas em solução salina de fosfato tamponado (*Phosphate-buffered saline – PBS*) e centrifugadas a 3500 rpm/min. Sucessivas trocas de PBS foram realizadas para obter o $\text{PH} \geq 7$, sendo a validação do PH realizada através do pHmetro microprocessado (PHTEK® Modelo: PH100).

As amostras foram agitadas em solução fisiológica 0,9%, secadas em papel filtro, novamente embaladas em triplos invólucros estéreis resistentes a baixas temperaturas e submetidas à criopreservação (-80 °C) para posterior liofilização.

Tabela 4.1 – Protocolo de desmineralização

Procedimento	Indicadores	
Imersão em Ácido Clorídrico 0,6 %	Sob refrigeração (4 °C) Proporção: 250 ml / 5 g Tecido Ósseo	6 horas
Tamponamentos com solução tampão	Solução PBS Formulação: NaCl (8 g), KCl (0,2 g), NA ₂ HPO ₄ (1,44 g), KH ₂ PO ₄ (0,24 g) Volume Final em AD: 1000 ml (PH 7,4)	Centrifugação a 3500 rpm/min. Troca da solução até atingir PH ≥ 7 .
Validação do Ph	Uso de pHmetro microprocessado Marca: PHTEK® Modelo: PH100	
Agitação em solução fisiológica, secagem em papel-filtro, embalagem e criopreservação (-80 °C) para posterior liofilização.		

Liofilização

A liofilização foi realizada em conformidade com o Manual de Boas Práticas Clínicas (GMC) e de acordo com os padrões internacionais de literatura e legislação. Utilizou-se um sistema de liofilização automatizada composto por câmara de liofilização Marca Labconco® (Modelo 79480) e Câmara de Condensação / Vácuo (Modelo 77530). Durante a liofilização os tecidos permaneceram congelados para prevenção da liquefação dos cristais de gelo no interior da matriz. O processo de sublimação foi validado através de análise da Umidade Residual por método termogravimétrico automatizado.

- Fase 1: Liofilização primária

Durante esta fase, foi removida a maior fração de água presente na matriz em seu estado sólido (cristais de gelo) por indução da sublimação e migração gasosa. Essa indução foi alcançada pela força motora resultante da diferença de gradiente de pressão entre a câmara de liofilização e o condensador. O calor gerado por esse transporte gasoso foi controlado continuamente por sensores digitais estrategicamente posicionados dentro da câmara de liofilização.

Ao término da sublimação, a alíquota de água não congelada ligada aos componentes orgânicos da matriz (proteínas) foi removida na próxima fase denominada liofilização secundária.

- Fase 2: Liofilização secundária

Nesta fase promoveu-se aumento da pressão da câmara de liofilização seguida do aumento gradual de temperatura em níveis positivos. A análise e controle da umidade residual objetivaram a manutenção da integridade da matriz proteica.

- Análise de umidade residual

A determinação da umidade residual neste estudo foi através do método termogravimétrico. Para tal utilizamos um analisador de umidade Marca: Ohaus® Modelo MB45. Este método analisa o peso inicial da amostra em balança de precisão e em seguida promove-se um aquecimento com contínuo registro da

evaporação e peso. São analisados neste método a porcentagem de umidade residual (UR), massa sólida (MS), peso inicial (PI) e peso final (PF). O limite de UR adotado é < 6%.

Tabela 4.2 – Protocolo de liofilização

Tempo	Processo	Indicadores	Temperatura
2 horas	Pré-congelamento da câmara de liofilização	Temperatura Câmara: -40 °C	-80 °C
10 minutos	Vácuo	Temperatura Câmara: -30 °C Vácuo Câmara: 8×10^{-3} mBar Vácuo Condensador: 2×10^{-3} mBar	-65 °C
6 horas	Liofilização Primária	Temperatura Câmara: -30°C Vácuo Câmara: 8×10^{-3} mBar Vácuo Condensador: 1×10^{-3} mBar	-40 °C
4 horas	Liofilização Secundária	Temperatura Câmara: até +5°C Vácuo Câmara: 7×10^{-3} mBar Vácuo Condensador: 1×10^{-3} mBar	+5°C

Radioesterilização dos tecidos liofilizados

O processo de irradiação das amostras de osso liofilizado foi realizado no Irradiador Multipropósito, com radiação gama proveniente de fontes de ^{60}Co , localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN/CNEN-SP). A dose de irradiação foi de 25 kGy, com uma taxa de dose de aproximadamente 7 kGy/h. De forma a evitar variação da temperatura, as amostras foram irradiadas na presença de elementos refrigerantes, mantendo a temperatura entre 4 e 8 C. Para o controle de dose foram utilizados dosímetros Red Perspex.

Figura 4.2 – Captação e processamento dos aloenxertos ósseos

Fotos clínicas demonstrando as epífises distal do fêmur e proximal da tíbia após divulsão dos tecidos moles (4.2a); Osso corticoesponjoso após a esqueletização (4.2b); Redução do tamanho das epífises com tritador ósseo elétrico (4.2c); Aspecto do osso após lavagem com solução fisiológica estéril a 0,9%, peróxido de hidrogênio a 3% e etanol a 70% (4.2d e e). Coleta de parte do aloenxerto para avaliações microbiológicas (4.2f); Aloenxerto ósseo após criopreservação a -80 °C (4.2g); Aloenxerto ósseo sendo reduzido a 500 µm após a desmineralização, liofilização e irradiação (4.2h); Hidratação do ALD com solução fisiológica estéril a 0,9% no momento da cirurgia (4.2i)

Modelo experimental de regeneração óssea guiada e formação dos grupos teste e controles

Oito animais receberam na região da calvária (osso frontal e parietal) quatro cilindros de titânio fixados por miniparafusos, os quais foram preenchidos aleatoriamente por aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado (teste: ALD), aloenxerto ósseo congelado mineralizado (teste: ACM), enxerto autólogo (controle positivo: AU) e coágulo (controle negativo: CO). A figura 4.3 ilustra a distribuição dos grupos no modelo experimental

Figura 4.3 – Fluxograma com a organização dos grupos

Protocolo anestésico

A indução e manutenção anestésica foram obtidas através da associação de Quetamina na dose de 30 a 50 mg/kg/IM, Xilazina na dose de 5 a 10 mg/kg/IM, Meperidina na dose de 5 a 10 mg/kg/IM e Fentanil na dose de 8 mg/kg/IV. As drogas foram administradas com agulha de pequeno diâmetro (20 X 0,5 mm) após contenção. Foi realizada também infiltração local de Xylocaína® a 2% no local da incisão, visando obter analgesia extra, bem como hemostasia.

Técnica cirúrgica

Antes dos transplantes ósseos, a amostra liofilizada foi submetida a uma segunda redução de volume. Foram utilizados um triturador ósseo manual para fragmentar o tecido ósseo liofilizado desmineralizado irradiado e uma peneira granulométrica de 500 µm para padronizar o tamanho dos fragmentos (Figura 4.2h).

Uma vez anestesiado e verificado o plano anestésico, realizou-se antissepsia com clorexidina 2% e isolamento da região operatória com campos cirúrgicos estéreis. Com o animal posicionado em decúbito ventral, o acesso à calvária foi realizado através de uma incisão paralela à sutura craniana sagital. Após a exposição dos ossos frontais e parietais, pela divulsão dos tecidos subcutâneos e do descolamento do periósteo, foram executadas as seguintes etapas:

- Remoção de tecido ósseo da calota craniana do animal, utilizando raspador ósseo (CONEXÃO® Sistema de Próteses), com consequente correção das irregularidades da calvária (Figura 4.4a). Repouso do osso autógeno em solução fisiológica estéril até o momento do enxerto.
- Instalação de quatro cilindros ocos de titânio nos ossos cranianos frontais e parietais (Figura 4.4c). Os cilindros medem 5 mm de Ø por 5 mm de altura e foram fixados à calota craniana através de dois parafusos com 1,5 mm Ø por 4 mm de comprimento. Em sua extremidade superior contam com uma tampa rosqueável que isola o seu conteúdo dos tecidos moles adjacentes (CONEXÃO® Sistema de Próteses).
- Perfurações da cortical óssea que fica em contato com a base do cilindro, com brocas de 1,2 mm de Ø adaptadas a contra-ângulos com rotação de 1500 rpm, sob irrigação com solução fisiológica (figura 4.4b).
- Para cada animal foram destinados aloenxertos liofilizados desmineralizados e congelados mineralizados de um mesmo coelho doador. O ACM foi retirado do *ultrafreezer* antes da utilização e encaminhado à sala de cirurgia sob refrigeração em geladeira portátil com gelo seco.

- Abertura asséptica das embalagens contendo os aloenxertos. A hidratação do ALD e o descongelamento do ACM foram realizados pela imersão dos tecidos em solução fisiológica à temperatura ambiente por 20 minutos.
- Preenchimento de forma aleatória dos cilindros de titânio com coágulo, osso autógeno, aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado e aloenxerto ósseo congelado mineralizado (Figura 4.4c). Posicionamento das tampas rosqueáveis (figura 4.4d).
- Sutura dos tecidos moles por planos com fio mononylon 3.0 com pontos contínuos. Nos casos em que houve tensão no momento da sutura, foi realizada incisão de alívio no periósteo da base do retalho (figura 4.4e).
- Limpeza com gaze e solução fisiológica.

Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibiótico – Enrofloxacina (5-10 mg/kg 3ID/SC) por sete dias, e anti-inflamatório – Meloxicam (0,2 mg/kg 5ID/SC) por três dias. Além dos medicamentos subcutâneos, foi aplicado sobre a ferida cirúrgica Iodopovidine (solução) e rifomicina (*spray*). Todos os animais foram acompanhados por um médico veterinário durante o pré, trans e pós-operatório. Não foram constatados sinais clínicos de complicações pós-operatórias em nenhum dos coelhos.

Eutanásia

Todos os animais foram sacrificados após 13 semanas. Inicialmente foi realizada a anestesia do animal com Quetamina na dose de 30 a 50 mg/kg/IM e Xilazina na dose de 5 a 10mg/kg/IM, e posteriormente procedeu-se a eutanásia por sobredosagem de Tiopental 100mg/kg IV e Cloreto de Potássio 19,1%.

Remoção e análise das amostras

Após a eutanásia, realizou-se o acesso ao leito receptor e foi feita a remoção dos cilindros de titânio (Figura 4.4f) e a coleta das amostras com brocas trefinas de 8 mm, de modo a conter o material enxertado e parte do leito ósseo receptor.

Figura 4.4 – Técnica cirúrgica

Fotos clínicas demonstrando coleta do osso autólogo (4.4a); Cilindro de titânio fixado na calota craniana com dois microparafusos e as perfurações na cortical para promover o suprimento sanguíneo da região (4.4b); Preenchimento dos cilindros com AU, ALD, ACM e CO, respectivamente, da esquerda para direita, no sentido horário (4.4c); Posicionamento das tampas rosqueáveis para isolar os biomateriais dos tecidos adjacentes (4.4d); Sutura da pele com nylon 3-0 (4.4e); Remoção dos cilindros de titânio após 13 semanas (4.4f).

Figura 4.5 – Espécimes associados ao leito receptor

Aspecto macroscópico das intervenções ALD, ACM, AU e CO, respectivamente, da esquerda para a direita, demonstrando aderência ao leito receptor e angiogênese (seta preta).

Processamento histológico e avaliações histológicas

Os espécimes foram imersos em solução de paraformaldeído tamponado a 4%, mantidos sob refrigeração por 48h e encaminhados para o Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para lavagem em solução tampão, desidratação gradual em álcoois, descalcificação em EDTA 4,13% e inclusão em parafina.

Posteriormente, a partir de cada espécime, foram obtidos seis cortes histológicos seriados de 5 μ , distribuídos em duas lâminas com três cortes em cada uma, corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análises histomorfológica e histomorfométrica.

Utilizando-se microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd. – Japan) sob foco fixo e clareza de campo, com aumento inicial de 100X e final de 400X, foram avaliados cortes histológicos de cada espécime, escolhidos de forma aleatória. A observação aconteceu de forma cega, sem que fosse possível identificar os grupos. A avaliação histomorfológica dos cortes aconteceu de forma subjetiva por meio de uma escala arbitrária: (0) ausente (1) pouco (2) moderado (3) intenso e (4) muito intenso, considerando na morfologia tecidual: neoformação de tecido ósseo, presença de material exógeno, tecido conjuntivo fibroso, tecido hematopoiético, tecido adiposo e resposta de corpo estranho, comparativamente entre as intervenções.

Para o estudo histomorfométrico, as imagens das lâminas foram capturadas por câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a microscópio Jeol® e transferidas para o software ImageJ®. Quatro cortes de cada espécime foram escolhidos aleatoriamente e avaliados quanto à área total de tecido formado (AT: mm²) (Figura 4.6), quantidade de material remanescente (MR: mm²) (Figura 4.7) e osso neoformado (ON: mm²) (Figura 4.8). Cada corte histológico foi dividido em duas partes para análise, a saber: base (B), região que compreende os 2,5 mm acima do leito receptor, e ápice (A), 2,5 mm acima da base (Figura 4.9).

Figura 4.6 – Análise histomorfométrica da área (mm^2) de tecido formado (AT)

Figura 4.7 – Análise histomorfométrica da área (mm^2) de material remanescente (MR)

Figura 4.8 – Análise histomorfométrica da área (mm^2) de osso neoformado (ON)

Figura 4.9 – Ilustração das regiões analisadas no estudo histomorfométrico

Os dados para análise, em relação as variáveis AT, MR e ON, foram coletados na região A, na região B e na região A+B, e inseridos em planilhas do programa Excel[®] para análise estatística.

Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes estatísticos Mann-Whitney e t-Student com nível de significância de 5%.

Na análise descritiva, foram calculados valores de estatísticas descritivas para as variáveis AT (mm²), MR (mm²) e ON (mm²), nos materiais ACM, ALD, AU e CO, somando-se os valores observados sob as posições A e B. As médias das variáveis analisadas por material foram representadas graficamente.

Na análise inferencial foi adotado um modelo de análise de variância com medidas repetidas em um fator (intervenção), para o qual os efeitos nos animais seriam aleatórios e os efeitos dos quatro materiais, fixos. O uso de um modelo de medidas repetidas para a análise dos dados pode ser justificado ao notarmos que um mesmo coelho é avaliado sob os quatro materiais.

5 RESULTADOS

Foram operados oito coelhos e não houve perdas nos períodos trans e pós-operatório. Os animais, durante as 13 semanas que ficaram em observação, mantiveram o peso entre 3,5 e 4 kg e não apresentaram complicações pós-operatórias.

5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

O resultado da avaliação subjetiva dos cortes histológicos (Figuras 5.1 e 5.2), considerando na morfologia tecidual: neoformação de tecido ósseo, presença de material exógeno, tecido conjuntivo fibroso, tecido hematopoiético, tecido adiposo e resposta de corpo estranho está apresentado na tabela 5.1 por meio das medianas dos valores da escala arbitrária dos oito animais. As tabelas 5.2 e 5.3 mostram o resultado do teste estatístico (Mann-Whitney) entre os diferentes pares de intervenções.

Tabela 5.1 – Mediana dos valores da morfologia tecidual obtidos na histomorfologia

	OSSO NEOFORMADO	MATERIAL EXÓGENO	CONJUNTIVO FIBROSO	HEMATOPOIÉTICO	ADIPOSO	CORPO ESTRANHO
ACM	2,125	2,375	1,75	2,375	1,375	0,375
ALD	2,25	0,75	1,125	1,875	2,125	0,25
AU	1	0	2,125	0,75	1,25	0
CO	0,25	0	0,5	0,125	0,25	0

Legenda: ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Tabela 5.2 - Valores-p para diferença de medianas das variáveis: osso neoformado, material exógeno e tecido conjuntivo fibroso quanto a relação entre os diferentes pares de intervenções

INTERVENÇÃO	OSSO NEOFORMADO	MATERIAL EXÓGENO	CONJUNTIVO FIBROSO
ACM X ALD	0,955	0,026*	0,135
ACM X AU	0,03*	0,017*	0,07
ACM X CO	0,005*	0,001*	0,007*
ALD X AU	0,0032*	0,017*	0,07
ALD X CO	0,0013*	0,017*	0,06
AU X CO	0,013*	N/A	0,01*

Legenda: ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; N/A – Não se aplica; * significância para $p \leq 0,05$.

Tabela 5.3 - Valores-p para diferença de medianas das variáveis: tecido hematopoiético, tecido adiposo e resposta de corpo estranho, quanto a relação entre os diferentes pares de intervenções

INTERVENÇÃO	HEMATOPOIÉTICO	ADIPOSO	CORPO ESTRANHO
ACM X ALD	0,247	0,05	0,479
ACM X AU	0,003*	0,356	0,337
ACM X CO	0,0006*	0,003*	0,337
ALD X AU	0,05*	0,063	0,20
ALD X CO	0,009*	0,0016*	0,20
AU X CO	0,041*	0,023*	N/A

Legenda: ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; N/A – Não se aplica; * significância para $p \leq 0,05$.

Figura 5.1 - Intervenção ALD (a) e (b) e ACM (c) e (d). (★) Trabéculas de tecido ósseo neoformado exibindo (■) tecido hematopoético interposto e (◆) presença focal de material remanescente (Aumento: 100x e 400x)

Figura 5.2 - Intervenção AU (a) e (b) e CO (c) e (d). (★) Trabéculas de tecido ósseo neoformado exibindo (■) tecido hematopoético interposto e (✚) presença tecido conjuntivo fibroso (Aumento 100x e 400x)

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise dos dados obtidos na histomorfometria foi realizada em duas etapas: descritiva e inferencial.

Na análise descritiva, foram calculados valores de estatísticas descritivas para as variáveis: área total de tecido formado (AT: mm^2), material remanescente (MR: mm^2) e osso neoformado (ON: mm^2), nos materiais ACM, ALD, AU e CO, somando-se os valores observados sob as posições da base (B) e do ápice (A). As médias das variáveis analisadas por material foram representadas graficamente.

Na análise inferencial, foi adotado um modelo de análise de variância com medidas repetidas em um fator (intervenção), para o qual os efeitos nos coelhos seriam aleatórios e os efeitos das quatro intervenções, fixos. O uso de um modelo de medidas repetidas para a análise dos dados pode ser justificado, pois um mesmo coelho foi avaliado quanto aos quatro tipos de intervenção (Winer et al., 1991; Kutner et al., 2004).

A verificação da adequação do ajuste do modelo foi realizada por meio da construção de gráficos de probabilidades para os resíduos condicionais, conforme sugerido por Kutner et al. (2004). O modelo mostrou-se bem ajustado.

5.2.1 Quanto à Área Total de Tecido Formado (AT: mm²)

A tabela 5.4 apresenta a média e o desvio padrão (DP) da variável AT (mm²), para cada intervenção.

Tabela 5.4 - Estatísticas descritivas para a variável AT (mm²)

Intervenção	n	Média ± DP
ACM	8	15,50 ± 3,00
ALD	8	15,89 ± 4,17
AU	8	9,82 ± 2,54
CO	8	4,28 ± 3,58

Legenda: AT – Área total de tecido formado; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo

As figuras 5.3 e 5.4 mostram o comportamento da média amostral para a variável AT quanto a cada intervenção.

Figura 5.3 – Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável AT (mm²) por intervenção

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo

Figura 5.4 – Média da variável AT (mm²) por intervenção

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo

As figuras 5.3 e 5.4 mostram que houve diferença estatisticamente significativa (valor-p < 0,001) entre as médias da variável AT para pelo menos duas intervenções.

As médias da variável AT foram comparadas entre as quatro intervenções. A tabela 5.5 mostra que não houve evidência estatística de que a média da variável AT foi diferente entre as intervenções ACM e ALD (valor-p > 5%). A média da variável AT obedeceu à relação: ACM = ALD > AU > CO. Assim, a média da variável AT foi maior para as intervenções ACM e ALD. A Tabela 8 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável AT (mm²), para cada intervenção e posição de observação histomorfométrica.

Tabela 5.5 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm²) sob os diferentes pares de intervenções

Diferença de médias	Valor-p
ACM - ALD	0,990
ACM - AU	0,001
ACM - CO	< 0,001
ALD - AU	0,001
ALD - CO	< 0,001
AU - CO	0,001

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$.

Tabela 5.6 – Estatísticas descritivas para a variável AT (mm²)

Material	n	Posição	
		A	B
		Média ± DP	Média ± DP
ACM	8	6,364 ± 1,477	9,138 ± 1,745
ALD	8	6,686 ± 2,167	9,203 ± 2,207
AU	8	2,089 ± 1,560	7,733 ± 1,462
CO	8	0,495 ± 1,401	3,786 ± 2,361

Legenda: AT – Área total de tecido formado; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

As figuras 5.5 e 5.6 mostram o comportamento da média amostral da variável AT para cada intervenção e a posição de observação (A ou B).

Figura 5.5 – Representação da média ± 1 erro padrão da variável AT (mm²) por intervenção e posição de observação histomorfométrica

Legenda: AT – Área total de tecido formado;; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Figura 5.6 – Média da variável AT (mm²) por intervenção e posição

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Houve evidência (valor-p = 0,001) de efeito de interação entre grupo e intervenção (Figura 5.5). Mediante esse resultado, a média da variável AT foi comparada entre as quatro intervenções para cada posição, e foram comparadas as médias entre as duas posições para cada intervenção.

A tabela 5.7 mostra, tanto para a posição A quanto para a B, que não houve evidência estatística de que a média da variável AT foi diferente entre os ACM e ALD (valores-p > 5%). A média da variável AT obedeceu à seguinte relação: ACM = ALD > AU > CO (valores-p ≤ 5%). A tabela 5.8 mostra que a média da variável AT na posição B foi maior do que na posição A, para todos os materiais (valores-p ≤ 5%). A maior média da variável AT ocorreu para as intervenções ACM e ALD na posição B.

Tabela 5.7 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm²) sob os diferentes pares de materiais, por posição

Posição	Diferença de médias	p
A	ACM – ALD	0,922
	ACM – AU	<0,001
	ACM – CO	<0,001
	ALD – AU	<0,001
	ALD – CO	<0,001
	AU – CO	0,006
B	ACM – ALD	0,902
	ACM – AU	0,014
	ACM – CO	<0,001
	ALD – AU	0,010
	ALD – CO	<0,001
	AU – CO	<0,001

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$.

Tabela 5.8 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável AT (mm²) sob as duas posições, para cada intervenção

Material	Diferença de médias	Valor-p
ACM	A – B	<0,001
ALD	A – B	<0,001
AU	A – B	<0,001
CO	A – B	<0,001

Legenda: AT – Área total de tecido formado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; A – Posição A; B – Posição B; * significância para $p \leq 0,05$

5.2.2 Quanto à Área de Material Remanescente (MR: mm²)

A tabela 5.9 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável MR (mm²), para cada intervenção. As figuras 5.7 e 5.8 mostram o comportamento da média amostral dessa variável para cada intervenção.

Tabela 5.9 – Estatísticas descritivas para a variável MR (mm²)

Material	n	Média ± DP
ACM	8	0,4040 ± 0,3300
ALD	8	0,1309 ± 0,1471
AU	8	0,0003 ± 0,0009
CO	8	0,0002 ± 0,0005

Legenda: MR – Material remanescente; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Houve evidência (valor-p = 0,001) de efeito da intervenção, ou seja, a média da variável MR diferiu para pelo menos duas intervenções. Mediante esse resultado, foram comparadas as médias da variável MR entre as quatro intervenções

Figura 5.7 – Representação da média $\pm$ 1 erro padrão da variável MR (mm²) quanto à intervenção

Legenda: MR – Material remaescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Figura 5.8 – Média da variável MR (mm²) quanto à intervenção

Legenda: MR – Material remaescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

A tabela 5.10, mostra que não houve diferença estatística entre a média da variável MR para as intervenções ALD, AU e CO (valores-p > 5%). Além disso, a média da variável MR obedeceu à relação: ACM > ALD = AU = CO (valores-p < 5%). A média da variável MR foi maior para o material ACM.

Tabela 5.10 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável MR (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor-p
ACM – ALD	0,047
ACM – AU	0,002
ACM – CO	0,002
ALD – AU	0,544
ALD – CO	0,544
AU – CO	>0,999

Legenda: MR – Material remanescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$.

A tabela 5.11 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável MR (mm²), para cada intervenção e posição de observação histomorfométrica dos cortes. As figuras 5.9 e 5.10 mostram o comportamento da média amostral dessa variável.

Tabela 5.11 – Estatísticas descritivas para a variável MR (mm²)

Material	n	Posição	
		A	B
		Média ± DP	Média ± DP
ACM	8	0,191 ± 0,148	0,213 ± 0,215
ALD	8	0,046 ± 0,049	0,084 ± 0,107
AU	8	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,001
CO	8	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Legenda: MR – Material remanescente; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo

Figura 5.9 - Representação da média ± 1 erro padrão da variável MR (mm²) por material e posição

Legenda: MR – Material remanescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Figura 5.10 – Média da variável MR (mm²) por intervenção e posição

Legenda: MR – Material remanescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Não houve evidência (valor-p = 0,796) de efeito de interação entre posição e intervenção. A média da variável MR não foi estatisticamente diferente entre as regiões A e B (valor-p = 0,410). Houve diferença de efeito da intervenção (valor-p = 0,001), ou seja, a média da variável MR foi diferente entre pelo menos duas intervenções.

As médias da variável MR foram comparadas entre os diferentes pares de intervenções, sendo que os resultados dessas comparações valeram para as duas posições. A tabela 5.12 mostra que não houve evidência estatística de que a média da variável MR tenha sido diferente entre as intervenções ALD, AU e CO (valores-p > 5%). A média da variável MR obedeceu à seguinte relação: ACM > ALD = AU = CO (valores-p < 5%). A maior média da variável MR ocorreu para o material ACM.

Tabela 5.12 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável MR (mm²) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor-p
ACM – ALD	0,010
ACM – AU	<0,001
ACM – CO	<0,001
ALD – AU	0,192
ALD – CO	0,191
AU – CO	0,999

Legenda: MR – Material remanescente; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p < 0,05$.

5.2.3 Quanto à Área de Osso Neoformado (ON: mm²)

A tabela 5.13 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral para a variável ON (mm²), para cada intervenção. As figuras 5.11 e 5.12 mostram o comportamento da média amostral dessa variável.

Tabela 5.13 – Estatísticas descritivas para a variável ON (mm²)

Material	n	Média ± DP
ACM	8	3,01 ± 1,53
ALD	8	3,89 ± 1,75
AU	8	2,16 ± 0,76
CO	8	0,65 ± 0,55

Legenda: ON – Osso Neoformado; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Figura 5.11 – Representação da média ± 1 erro padrão da variável ON (mm²)

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Figura 5.12 – Média da variável ON (mm²) por material

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Houve evidência (valor- $p < 0,001$) de efeito da intervenção, ou seja, a média da variável ON foi diferente para pelo menos duas intervenções. Mediante esse resultado, as médias da variável ON foram comparadas entre as quatro intervenções.

A tabela 5.14 mostra que não houve evidência estatística entre as médias da variável ON entre as intervenções ACM e ALD e entre ACM e AU (valores- $p > 5\%$). A média da variável ON obedeceu à seguinte relação: $ACM > CO$, $ALD > AU$, $ALD > CO$ e $AU > CO$ (valores- $p < 5\%$). A média da variável ON foi maior para ACM ou ALD.

Tabela 5.14 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm^2) sob os diferentes pares de materiais

Diferença de médias	Valor-p
ACM – ALD	0,387
ACM – AU	0,424
ACM – CO	0,002
ALD – AU	0,022
ALD – CO	<0,001
AU – CO	0,049

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$.

A tabela 5.15 apresenta a média amostral e o desvio padrão amostral da variável ON (mm^2), para cada intervenção e posição de observação histomorfométrica. As figuras 5.13 e 5.14 mostram o comportamento da média amostral dessa variável.

Tabela 5.15 – Estatísticas descritivas para a variável ON (mm²)

Material	n	Posição	
		A	B
		Média ± DP	Média ± DP
ACM	8	0,981 ± 0,470	2,027 ± 1,121
ALD	8	1,408 ± 0,776	2,478 ± 1,075
AU	8	0,225 ± 0,226	1,940 ± 0,659
CO	8	0,000 ± 0,000	0,655 ± 0,552

Legenda: ON – Osso Neoformado; n – número de animais; DP – Desvio padrão; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo.

Figura 5.13 – Representação da média ± 1 erro padrão da variável ON (mm²) segundo a intervenção e posição de observação histomorfométrica

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo. A – Posição A; B – Posição B

Figura 5.14 - Média da variável ON (mm²) por intervenção e posição

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autólogo; CO – Coágulo.

Podemos concluir que houve evidência (valor-p = 0,018) de efeito de interação entre posição de observação e intervenção. A média da variável ON, foi comparada entre as quatro intervenções para cada posição e entre as duas regiões, para cada intervenção.

A tabela 5.16 mostra que para a posição A não houve diferença estatística entre ACM e ALD para a média da variável ON, e entre as intervenções AU e CO (valores-p > 5%). A média da variável ON obedeceu à seguinte relação: ACM = ALD > AU = CO (valores-p < 5%). Para a posição B, não houve evidência estatística de que a média da variável ON tenha sido diferente entre ACM e AU (valores-p > 5%). A média da variável ON para a posição B obedeceu às seguintes relações: ACM > CO e ALD > ACM e ALD > AU > CO (valores-p < 5%). A tabela 5.17 mostra que a média da área de neoformação óssea (ON) na posição B foi maior do que na posição A, em todas as intervenções (valores-p < 5%). A maior média de área de ON ocorreu para o material ALD na posição B.

Tabela 5.16 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm²) sob os diferentes pares de intervenções, por posição

Posição	Diferença de médias	Valor-p
A	ACM – ALD	0,059
	ACM – AU	0,002
	ACM – CO	<0,001
	ALD – AU	<0,001
	ALD – CO	<0,001
	AU – CO	0,306
B	ACM – ALD	0,048
	ACM – AU	0,689
	ACM – CO	<0,001
	ALD – AU	0,020
	ALD – CO	<0,001
	AU – CO	<0,001

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$.

Tabela 5.17 - Valores-p dos testes t-Student para a diferença de médias da variável ON (mm²) sob as duas posições, para cada material

Material	Diferença de médias	Valor-p
ACM	A - B	<0,001
ALD	A - B	<0,001
AT	A - B	<0,001
CO	A - B	0,006

Legenda: ON – Osso Neoformado; ACM – Aloenxerto ósseo congelado mineralizado; ALD – Aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado; AU – Enxerto autógeno; CO – Coágulo; * significância para $p \leq 0,05$; A – Região A; B – Região B

6 DISCUSSÃO

Considerando as diferentes aplicações clínicas dos enxertos ósseos nas reconstruções alveolares e a dificuldade de se obter ganhos ósseos em altura para reabilitações com implantes dentários, o presente estudo avaliou o comportamento do osso autógeno (AU) coletado por meio de raspador ósseo, do ALD, do ACM e do CO na regeneração óssea vertical.

Os aloenxertos ósseos (ALD e ACM) foram as intervenções que apresentaram maior área de tecido formado, e o ALD a intervenção que mais apresentou neoformação óssea neste modelo de regeneração óssea para ganhos ósseos em altura. Os achados do estudo sugerem que os aloenxertos ósseos conservam melhor o volume tecidual enxertado e que o ALD – quando comparado com o AU e o CO – é a intervenção mais competente na transformação do volume ósseo enxertado em osso maduro.

O animal utilizado foi o coelho, uma vez que esses animais se prestam ao desenvolvimento de modelo para análise do tecido ósseo, conforme relatado por alguns autores. Entre estes, destacamos alguns estudos que também avaliaram o comportamento de enxertos ósseos posicionados em barreiras de titânio instaladas na calota craniana do animal, como modelo de regeneração óssea guiada (Schmid et al., 1994; Lundgren et al., 1995; Majzoub et al., 1999; Slotte et al., 2003; Yamada et al., 2003; Pelegrine et al., 2011; Polo et al., 2013).

Ainda que haja similaridade com alguns trabalhos em relação ao modelo experimental adotado, não encontramos descrição na literatura de um estudo que comparasse o aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado, o aloenxerto ósseo congelado mineralizado e o enxerto autógeno.

A escolha das epífises distais do fêmur e proximais da tíbia do grupo doador levou em conta a presença de grande quantidade de osso corticoesponjoso e fácil acesso cirúrgico no momento da captação. Os protocolos de captação, processamento e criopreservação dos aloenxertos do coelho doador foram os mesmos empregados pelo BTME do IOT do HCFMUSP, mas ainda havia a necessidade de experimentos padronizados que pudessem confirmar a qualidade

deste protocolo nacional. Estes seguem as diretrizes estabelecidas pela legislação brasileira (Portaria nº 1686 de 20 de setembro de 2002) e pelos padrões da EATB e AATB.

A cortical do leito receptor na base de aplicação dos dispositivos para regeneração guiada na calvária dos animais foi perfurada para permitir a entrada de células osteogênicas oriundas da medula óssea e endóstio, e assim promover a formação do coágulo sanguíneo e favorecer a angiogênese da área, características importantes para o sucesso da ROG. Apesar de controversa por alguns como Lundgren et al. (2000) e Nishimura et al. (2004), esta medida parece ser importante na manutenção da vitalidade do enxerto (Nishimura et al., 2004). Macroscopicamente, todas as amostras coletadas estavam aderidas ao leito receptor e apresentavam vasos sanguíneos visíveis nas paredes laterais

O fechamento dos cilindros de titânio com tampas rosqueáveis e a ausência de perióstio sobre os enxertos podem gerar alguma controvérsia, pois se presume que o perióstio seja indispensável no fornecimento de células osteogênicas e na nutrição dos enxertos em técnicas de regeneração óssea guiada (Linde et al., 1993). Entretanto, os achados do presente estudo corroboram outros (Schmid et al., 1994; Pelegrine et al., 2011; Polo et al., 2013), empregando o mesmo modelo animal no qual a formação óssea, muito provavelmente, foi oriunda de células da medula óssea e endóstio.

A diferença estatisticamente significativa entre as médias dos aloenxertos ósseos (ALD e ACM) e do AU em relação à área total de tecido formado pode ser atribuída aos diferentes padrões de incorporação dos enxertos ósseos corticais e esponjosos (Burchardt, 1983; Goldberg; Akhavan, 2005) e, também, à lenta reabsorção do ACM. O osso autógeno utilizado no estudo foi cortical, oriundo da calota craniana, e o aloenxerto ósseo foi corticoesponjoso, captado da epífise distal do fêmur e proximal da tíbia. Os resultados microscópicos estão de acordo com os achados macroscópicos obtidos na primeira fase deste estudo (Lima, 2010), no qual o volume total de tecido formado seguiu a sequência $ALD = ACM > AU > CO$.

Diferentes estudos têm demonstrado a eficácia clínica das reconstruções por meio dos aloenxertos (Le et al., 2010; Chiapasco et al., 2013; Eskin et al., 2013). Alguns autores também descrevem a presença de material remanescente no

momento da instalação dos implantes (Deluiz et al., 2013). Corroborando alguns resultados clínicos, o resultado do presente estudo demonstra que o ACM apresentou maior média de material remanescente. Pelegrine et al. (2011), em estudo com metodologia semelhante, também observou que o ACM foi o enxerto com maior média de material remanescente.

Neste estudo, a porção superior dos cilindros (posição A) mostra menor área de formação tecidual e de neoformação óssea em comparação com a porção inferior (posição B) para as quatro intervenções. Os aloenxertos ósseos (ALD e ACM) foram as intervenções com maiores médias de área de tecido formado e de neoformação óssea na posição A, demonstrando o bom potencial osteocondutor dos enxertos. A proximidade com o leito receptor e, conseqüentemente, com os vasos sanguíneos e células osteogênicas, podem explicar os melhores resultados obtidos na posição B.

O osso autógeno tem sido considerado o enxerto “padrão ouro” nas reconstruções ósseas, por ser o único material osteogênico, osteocondutor e osteoindutor (Giannoudis et al., 2005). Embora alguns estudos tenham demonstrado a eficácia clínica do osso autógeno obtido com raspador ósseo (Al-Sebaei et al., 2004; Peleg et al., 2004; Zaffe; D’Avenia, 2007; Johansson et al., 2010; Pekovits et al., 2012; Miron et al., 2013), neste estudo o AU se mostrou menos eficaz nas médias de área de tecido formado e de osso neoformado quando comparado com o ALD. Os resultados apresentados pelo grupo que utilizou o osso autógeno se justificam porque as partículas eram pequenas e compostas apenas por osso cortical, características que favorecem o processo de reabsorção e que podem dificultar a integração do enxerto ao leito receptor (Burchardt, 1983; Zaffe; D’Avenia, 2007).

Embora alguns autores como Pallesen et al. (2002) tenham demonstrado a importância da padronização do tamanho das partículas dos enxertos, nesta pesquisa elas apresentavam tamanhos diferentes. A decisão de não se padronizar o tamanho das partículas dos enxertos, em especial do ACM e do AU, teve o objetivo de simular a prática cirúrgica de rotina quando se utiliza os trituradores ou os coletores ósseos.

O grupo coágulo (CO) apresentou as piores médias de área total de tecido e de neoformação óssea. Esse resultado, que já era esperado, sugere que a ausência

de um material sólido que atue como um arcabouço ou estrutura pode reduzir o potencial de crescimento ósseo em enxertos *onlay*, como foi reportado por outros autores (Slotte et al., 2003; Pelegrine et al., 2011; Polo et al., 2013). Ainda em relação à neoformação óssea, a intervenção com AU apresentou resultado semelhante estatisticamente ao CO no ápice do cilindro (posição A), resultado que pode ser atribuído à rápida biodegradação dos fragmentos de osso autógeno nas fases iniciais da incorporação do enxerto (Zaffe; D'Avenia, 2007).

Além das principais vantagens dos aloenxertos ósseos – pronta disponibilidade em quantidades variadas e diminuição do trauma operatório – o ALD apresenta mais benefícios quando comparado com o ACM, no que se refere ao armazenamento, transporte e segurança (Holtzclaw et al., 2008). Quando se avalia a biomecânica do biomaterial, por sua vez, os aloenxertos congelados mineralizados são mais vantajosos do que os liofilizados desmineralizados irradiados (Tanaka et al., 2008).

Especificamente na prática cirúrgica odontológica, diferente da ortopédica, a maioria dos procedimentos reconstrutivos não é submetida às exigências biomecânicas na fase inicial da cicatrização óssea. Tal situação faz com que o uso do ALD seja mais interessante do que o ACM, já que o primeiro é facilmente armazenado e transportado, e oferece menor risco de contaminação cruzada durante o transplante ósseo (Hinsenkamp et al., 2012). Em um país com as dimensões territoriais como as do Brasil, sujeito a variações climáticas intensas, o transporte de tecidos ósseos ultracongelados das regiões de captação e processamento compromete as taxas de sucesso dos procedimentos realizados nas regiões mais distantes. Assim sendo, a disponibilidade do ALD em nosso país tem relevância clínica, pois pode ser transportado em temperatura ambiente sem alterar suas propriedades biológicas.

Alguns autores ressaltam a importância do processamento na redução das reações imunogênicas provocadas pelos aloenxertos (Kao; Scott, 2007; Holtzclaw et al., 2008; Tanaka et al., 2008). A efetividade do processamento dos aloenxertos ósseos adotado pelo BTME IOT HCFMUSP foi comprovada pelo resultado histomorfométrico, onde a reação de corpo estranho foi igual estatisticamente entre as quatro intervenções.

É importante salientar que o termo liofilização é utilizado de forma bastante genérica na literatura e que, na maioria das vezes, não esclarece a respeito dos diferentes métodos e técnicas de execução desse processamento ósseo os quais resultam em produtos com características físico-químicas e mecânicas muito diferentes. Um dos fatos mais relevantes deste estudo, foi observar que o ALD – processado por meio de um protocolo experimental de liofilização óssea no IOT HCFMUSP – apresentou resultados comparáveis aos estudos internacionais.

Tendo em vista o grande crescimento no estudo da engenharia de tecidos, os trabalhos futuros podem inserir na metodologia adotada nesta pesquisa as células-tronco mesenquimais, onde o aloenxerto ósseo seria o arcabouço para proliferação celular e, conseqüente, neoformação óssea.

7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos após análise histomorfológica e histomorfométrica das intervenções com aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado, aloenxerto ósseo congelado mineralizado, enxerto ósseo autógeno e coágulo sanguíneo, em um modelo de regeneração óssea em calvária de coelhos para ganhos em altura, conclui-se que:

- O aloenxerto ósseo liofilizado desmineralizado irradiado e o aloenxerto ósseo congelado mineralizado mostraram maior área total de neoformação óssea.
- O aloenxerto ósseo congelado mineralizado foi a intervenção que mostrou maior quantidade de material remanescente.
- Para todas as intervenções as regiões mais próximas ao leito receptor exibiram maior neoformação óssea, sendo que os aloenxertos foram capazes de neoformação óssea nas regiões mais distantes.
- Os aloenxertos podem ser considerados soluções adequadas para o crescimento ósseo vertical.

REFERÊNCIAS¹

Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkila JT, Meurman O. Bone bank service in Finland. Experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank 1972-1995. *Acta Orthop Scand*. 1998 Dec;69(6):559-65.

Al-Sebaei MO, Papageorge MB, Woo T. Technique for in-office cranial bone harvesting. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Sept;62(9 Suppl 2):120-2.

Alencar PGC, Bortoletto CV, Gomes TM, Schroeder RS, Pegoraro D, Barros IR. Captação de tecidos músculo-esqueléticos em cadáver. *Rev Bras Ortop*. 2007 jun.;42(6):181-4.

Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop*. 2000 maio;35(5):165-72.

Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10(5):376-91.

Biagini S, Melende S, Wendel RF, Wendel S, Rudelli AS, Amatuzzi M. Padronização da rotina operacional em banco de ossos realizada por um serviço hemoterápico: propostas de elaboração de normas. *Rev Bras Ortop*. 1999 jun.;34(6):381-4.

Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol*. 2007 Oct;78(10):1943-53.

Bosshart DD, Schenk RK. Base biológica da regeneração óssea. In: Buser D, editor. 20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia. 2a ed. São Paulo: Quintessence; 2010. p. 15-45.

Buck BE, Resnick L, Shah SM, Malinin TI. Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clin Orthop Relat Res*. 1990 Feb;(251):249-53.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Buck DW, 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Jun;129(6):1314-20.

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

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.

Chiapasco M, Giammattei M, Carmagnola D, Autelitano L, Rabbiosi D, Dellavia C. Iliac crest fresh-frozen allografts and autografts in maxillary and mandibular reconstruction: a histologic and histomorphometric evaluation. *Minerva Stomatol*. 2013 Jan-Feb;62(1-2):3-16.

Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 1991 Oct-Dec;2(4):159-65.

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

Deluiz D, Oliveira LS, Pires FR, Tinoco EM. Time-Dependent Changes in Fresh-Frozen Bone Block Grafts: Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Findings. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Jul 9. doi 10.1111/cid.12108. [Epub ahead of print].

Eskan MA, Greenwell H, Hill M, Morton D, Vidal R, Shumway B, Girouard ME. Platelet-rich Plasma Assisted Guided Bone Regeneration for Ridge Augmentation: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2013 Jul 29. doi 10.1902/jop.2013.130260. [Epub ahead of print].

Feofiloff ET, Garcia RJ. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos: protocolo do banco de ossos da escola paulista de medicina. *Rev Bras Ortop*. 1996 Nov;31(11):895-03.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.

Goldberg VM, Akhavan S. Biology of bone grafts. In: Lieberman JR, Friedlander GE, editors. *Bone regeneration and repair: biology and clinical applications*. New Jersey: Humana Press; 2005.

Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noel L, Strong DM. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop*. 2012 Mar;36(3):633-41.

Holtzclaw D, Toscano N, Eisenlohr L, Callan D. The safety of bone allografts used in dentistry: a review. *J Am Dent Assoc*. 2008 Sept;139(9):1192-9.

Jelic JS, Perciaccante VJ. Reconstrução bucomaxilofacial. In: Abubaker AO, Benson KJ, editors. *Segredos em cirurgia bucomaxilofacial*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 344-59.

Johansson LA, Isaksson S, Lindh C, Becktor JP, Sennerby L. Maxillary sinus floor augmentation and simultaneous implant placement using locally harvested autogenous bone chips and bone debris: a prospective clinical study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Apr;68(4):837-44.

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.

Jung UW, Lee JS, Lee G, Lee IK, Hwang JW, Kim MS, Choi SH, Chai JK. Role of collagen membrane in lateral onlay grafting with bovine hydroxyapatite incorporated with collagen matrix in dogs. *J Periodontal Implant Sci*. 2013 Apr;43(2):64-71.

Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007 Nov;19(4):513-21.

Kutner MH, Nachtsheim CJ, Neter J. *Applied linear statistical models*. 5th ed. Irwin: McGraw-Hill; 2004.

Le B, Rohrer MD, Prasad HS. Screw "tent-pole" grafting technique for reconstruction of large vertical alveolar ridge defects using human mineralized allograft for implant site preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Feb;68(2):428-35.

Lima JLO. Análise clínica comparativa entre aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo em coelhos [dissertação]. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, Faculdade de Odontologia; 2010.

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.

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.

Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1995 Jun;6(2):67-72.

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.

Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Impact of Bone Harvesting Techniques on Cell Viability and the Release of Growth Factors of Autografts. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Aug;15(4):481-9.

Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):293-300.

Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990 Spring;5(1):9-14.

Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 Jul-Aug;17(4):498-506.

Pekovits K, Wildburger A, Payer M, Hutter H, Jakse N, Dohr G. Evaluation of graft cell viability-efficacy of piezoelectric versus manual bone scraper technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jan;70(1):154-62.

Peleg M, Garg AK, Misch CM, Mazor Z. Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Dec;62(12):1535-44.

Pelegrine A, Macedo L, Cosmo L. Transplantes ósseos na odontologia. 1a ed. Nova Odessa: Napoleão; 2008.

Pelegrine A, Sorgi da Costa CE, Sendyk WR, Gromatzky A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank*. 2011 Aug;12(3):171-84.

Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, Matarasso S. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials*. 1998 May;19(10):889-96.

Polo CI, Lima JL, De Lucca L, Piacezzi CB, Naclerio-Homem Mda G, Arana-Chavez VE, Sendyk WR. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. *J Periodontol*. 2013 Mar;84(3):360-70.

Rondinelli PC, Cabral FP, Freitas EH, Penedo JL, Leite JER, Silveira SLC. Rotina do banco de ossos do Hospital de Traumatologia-Ortopedia (HTO-RJ). *Rev Bras Ortop*. 1994 jun.;29(6): 385-88.

Roos MV, Camisa Jr. A, Michelin AF. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. *Acta Ortop Bras*. 2000 jul.-set.;8(3):122-7.

Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Hertel M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Jun;16(3):369-78.

Schmid J, Hammerle CH, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Sept;5(3):125-30.

Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Nov-Dec;18(6):795-806.

Tanaka R, Yamazaki JS, Sendyk WR, Teixeira VP, França CM. Incorporação dos enxertos ósseos em bloco: processo biológico e considerações relevantes. *ConScientiae Saúde*. 2008;7(3):323-7.

Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjo UM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 1999 Feb;19:59-73.

Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(2):105-9.

Vaishnav S, Thomas Vangsness C, Jr., Dellamaggiora R. New techniques in allograft tissue processing. *Clin Sports Med*. 2009 Jan;28(1):127-4.

Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied JP. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials*. 2004 May;25(11):2105-10.

Von Arx T, Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Nov-Dec;20(6):843-53.

Winer BJ, R. BD, Michels KM. *Statistical principles in experimental design*. 3th ed. Tokio: McGraw-Hill; 1991.

Yamada Y, Nanba K, Ito K. Effects of occlusiveness of a titanium cap on bone generation beyond the skeletal envelope in the rabbit calvarium. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Aug;14(4):455-63.

Zaffe D, D'Avenia F. A novel bone scraper for intraoral harvesting: a device for filling small bone defects. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):525-33.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 126/2009**REGISTRO CEP UNISA N.º 008/09**

Projeto de Pesquisa: "Avaliação in vivo da adição de células-tronco de medula óssea a homoenxertos ósseos liofilizados".

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk
Pós-Graduando: Júlio Leonardo Oliveira Lima

Curso: Mestrado em Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais da Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece as Normas para Prática Didáticas – Científica da Viviseção de Animais e os Princípios Internacionais para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto "Avaliação in vivo da adição de células-tronco de medula óssea a homoenxertos ósseos liofilizados".

São Paulo, 18 de novembro de 2009.

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
UNISA - Universidade de Santo Amaro