Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Marcus Gustavo Silva Rodrigues

*Efeito da desmineralização das superfícies de contato
na resistência à tração de enxertos ósseos autógenos em
tíbia de coelhos. Análise mecânica e à microscopia
eletrônica de varredura*

Bauru
2009

MARCUS GUSTAVO SILVA RODRIGUES

**Efeito da desmineralização das superfícies de contato na
resistência à tração de enxertos ósseos autógenos em tíbia de
coelhos. Análise mecânica e à microscopia eletrônica de
varredura**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Reabilitação Oral
(Opção Periodontia)

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo
de Rezende

BAURU
2009

Rodrigues, Marcus Gustavo Silva

R618e Efeito da desmineralização das superfícies de contato na resistência à tração de enxertos ósseos autógenos em tíbia de coelhos. Análise mecânica e à microscopia eletrônica de varredura / Marcus Gustavo Silva Rodrigues. – Bauru, 2009
169p.: Il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

**Comitê de Ética da FOB/USP
Protocolo nº: 13/2007
Data: 19/06/2007**

Folha Aprovação

DADOS CURRICULARES

MARCUS GUSTAVO SILVA RODRIGUES

Nascimento	13 de Junho de 1980 Volta Redonda/RJ
Filiação	Walcir de Souza Rodrigues Lenice Francisca da Silva Rodrigues
1998 - 2002	Graduação em Odontologia Unifoa – Centro Universitário de Volta Redonda / RJ
2003 - 2005	Especialização em Periodontia Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos - FUNBEO
2007 - 2009	Mestrado em Odontologia – Área de concentração Reabilitação Oral (Opção Periodontia) Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
Associações	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha família:

*A meu pai, **Walcir de Souza Rodrigues**, sua força, carinho, atenção e amor sempre se fizeram em abundância em nossa casa e em meu coração... A cada prova as quais éramos testados me mostravam cada vez mais sua grandeza como Homem e como Pai ...*

*... a minha mãe, **Lenice Francisca da Silva Rodrigues**, porto seguro em todas as nossas aflições e medos, que fez da sua vida um exemplo de amor e doação aos seus ...*

*... a minha irmã, **Natália Mara da Silva Rodrigues**, amiga, companheira, valente e guerreira... Só Deus sabe a sua importância na minha vida e o quanto eu te amo...*

*... a minha noiva **Marcella Cid Pinto Martins**, pelo amor, carinho, cuidado, paciência, atenção e por entender que a minha ausência se fez apenas em matéria visto que meu coração sempre esteve ao seu lado e de todos os seus...*

Vocês são a minha vida, a minha luz e o bem maior da minha existência...

Amo todos vocês!!!

Agradecimentos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A **Professora Doutora Maria Lúcia Rubo de Rezende**, professora associada da Disciplina de Periodontia do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo apoio incondicional em todas as fases deste trabalho e pelos ensinamentos, orientações, incentivos e amizade de quem eu tive a feliz oportunidade de desfrutar em todos esses anos. Meus sinceros agradecimentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Bauru e a Universidade de São Paulo, na pessoa do **Professor Doutor Euloir Passanezi**, chefe da Disciplina de Periodontia, por ter aberto as portas desta casa para meu crescimento profissional e humano;

Ao **Professor Doutor Waldyr Antônio Janson**, exemplo de força, profissionalismo e amor a odontologia;

Ao **Professor Doutor Sebastião Luiz Aguiar Gregghi** e a **Professora Doutora Adriana Campos Passanezi Sant'ana** da Disciplina de Periodontia do Departamento de Prótese, pela amizade, generosidade, sabedoria e por todos os valiosos ensinamentos que contribuíram sobremaneira para o meu crescimento profissional;

Aos professores do Departamento de Prótese: **Professores Doutores Acácio Lins do Valle, Paulo Martins Ferreira, Gerson Bonfante, Carlos dos Reis Pereira de Araújo, Paulo César Rodrigues Conti, José Henrique Rubo, Vinicius Carvalho Porto, Pedro César Garcia de Oliveira, Renato de Freitas e Wellington Bonachella**;

A **Professora Doutora Ana Lúcia Alvarez Capellozza** chefe do Departamento de Estomatologia, pela amizade, alegria, generosidade e exemplo de dedicação a docência;

Ao **Professor Doutor Gustavo Pompemayer Garlet** do Departamento de Histologia, pela amizade, ensinamentos e valiosas sugestões;

Ao **Professor Doutor José Roberto Pereira Lauris**, pela elaboração da análise estatística do trabalho;

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia e do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru, nas pessoas das funcionárias **Ivânia Komatsu da Costa Arruda, Edilaine Lúcio Torrecilha e Marcos Antônio de Godoy**, pelo profissionalismo, apoio e amizade;

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Erasmus Gonçalves da Silva, Elias, Luiz Carlos da Silva e Richard Nelson Guanaes Simões**, pelo cuidado com os animais e ajuda incondicional na fase experimental do trabalho;

Ao funcionário do Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Edmauro**, pela ajuda na realização na análise à microscopia eletrônica de varredura;

Ao funcionário do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) da Faculdade de Odontologia de Bauru, **Marcelo**, pela ajuda na realização dos ensaios micro-mecânicos;

Aos estagiários da Disciplina de Periodontia e futuros mestrandos **Amparito, Carlos, Diego, Mônica, Rafael, Román e Samira**, pelo apoio e ajuda durante todas as fases da pesquisa, pelo auxílio nas cirurgias e nas clínicas de graduação;

Aos meus colegas de Mestrado em Reabilitação Oral, **Ana Carolina de Faria Morandini, Bruna Fidêncio Rahal Ferraz, Roberta Santos Domingues, Aline Dantas, Cíntia Lumi, Daniel Hiramatsu, David Garcia, Emílio, Fábio Kenji, Fábio Lorenzoni, Felipe Martins, Gustavo Pimentel, João Paulo, José Luiz, Marcelo Ramos, Oswaldo Alarcón, Paulo Maurício, Priscila Brenner e Rosalyn Chidiak-Tawil**, pela amizade, ajuda, companheirismo e incentivo incondicional, fazendo com que todas as dificuldades e a distância da família fossem mais facilmente superadas;

Aos meus colegas de Doutorado em Reabilitação Oral, **Eduardo Aleixo Figueira (Noel)**, **Pedro Teixeira Garcia Coesta**, **Renata Rodrigues de Freitas Blagitz**, **Jefferson Sanada (Buda)**, **Thiago Pegoraro**, **Romão**, **Daniel Sartoreri**, **Rafael**, **Eduardo Meira** e em especial ao **Leandro de Moura Martins**, pela amizade, ensinamentos e sugestões fundamentais para conclusão deste trabalho;

Ao **Carlos Eduardo Palanch Repeke**, **Bruno Furquim**, **Erivan Ramos Júnior**, **Samuel Ferreira Júnior**, **Marcela Claudino**, **Wagner**, **Flávia** e **Ricardo Virgulino**, amigos que eu tive a felicidade de construir e sempre contar nesses anos. Tenho certeza que as levarei para toda a vida.

Muito Obrigado!

Epígrafe

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante”

(Charles Chaplin)

Resumo

RESUMO

Vinte e nove coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*) tiveram fragmentos ósseos corticais de 8mm de diâmetro removidos com trefina da metáfise proximal tibial que foram transplantados para uma área adjacente após a realização de um dos seguintes tratamentos: G-EDTA (desmineralização com EDTA pH neutro a 24% na forma de gel por 3 minutos das superfícies ósseas de contato); G-EDTA-P (o mesmo tratamento de G-EDTA e perfuração do leito receptor); G-P (perfuração do leito receptor) e G-C (nenhum tratamento adicional ao transplante). Noventa dias após as cirurgias, os animais foram eutanasiados para obtenção de blocos ósseos contendo os enxertos e preparo de corpos de prova para ensaio mecânico de determinação da resistência à tração e módulo de elasticidade. Os valores encontrados para resistência à tração foram: G-C = 2.086 ± 1.200 MPa; G-EDTA = 2.033 ± 0.976 MPa; G-EDTA-P = 1.977 ± 0.795 MPa e G-P = 1.826 ± 0.800 MPa. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.819$). Os valores médios do módulo de elasticidade foram: G-C = 38.80 ± 22.72 MPa; G-EDTA-P = 26.24 ± 14.17 MPa; G-EDTA = 25.11 ± 9.89 MPa e G-P = 17.51 ± 7.94 MPa, sendo identificada diferença estatística apenas entre o G-C e os demais. Concluiu-se que a desmineralização por EDTA das superfícies ósseas de contato em enxertos autógenos em bloco do tipo *onlay* não interfere na resistência à tração da interface independentemente da perfuração do leito receptor e que tanto a desmineralização como a perfuração aumentam a deformação dos corpos de prova sugerindo um melhor comportamento elástico nesses grupos.

Palavras-chave: Transplante ósseo. Desmineralização. Osseointegração.

Abstract

ABSTRACT

Effect of the demineralization of the contacting surfaces in the tensile strength of autogenous bone grafts in rabbit's tibiae. Mechanical and scanning electron microscopy analysis

Cortical bone fragments of 8mm of diameter were removed with trephine burr from the proximal tibial metaphysis of twenty nine male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and transplanted to an adjacent area after one of the following treatments: G-EDTA (demineralization of the contacting bone surfaces with EDTA pH 24% during 3 minutes); G-EDTA-P (the same treatment of G-EDTA and perforation of the receiving host bed); G-P (perforation of the receiving host bed) and G-C (no additional treatment to the transplant). Ninety days post-operatively, the animals were euthanized in order to attain bone blocks with the grafts. The specimens were prepared to mechanical assay for tensile strength and Young modulus. The values found for tensile strength were: G-C = 2.086 ± 1.200 MPa; G-EDTA = 2.033 ± 0.976 MPa; G-EDTA-P = 1.977 ± 0.795 MPa and G-P = 1.826 ± 0.800 MPa. These differences, therefore, were not statically significant ($p=0.819$). The Young modulus average values for the specimens were: G-C = 38.80 ± 22.72 MPa; G-EDTA-P = 26.24 ± 14.17 MPa; G-EDTA = 25.11 ± 9.89 MPa and G-P = 17.51 ± 7.94 MPa. There were statistically significant differences only between the G-C and the other groups. The results showed that EDTA demineralization of the contacting bone surfaces in onlay autogenous bone grafts does not interfere in the tensile strength at the interface independently of the perforation of the host bed. On the other hand, demineralization as well as perforation increased the deformation of the specimens suggesting a better elastic behavior for these groups.

Keywords: Bone transplantation. Demineralization. Osseointegration.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Procedimento cirúrgico. **A:** região da metáfise proximal da tíbia direita tricotomizada de um animal usado no experimento; **B:** a mesma região coberta, após a antissepsia, por um campo estéril descartável fenestrado; **C:** incisão no tegumento de aproximadamente 5,0 cm; **D:** exposição da metáfise proximal tibial pelo descolamento de um retalho dermo-epidérmico-periostal; **E:** broca trefina posicionada para o início da remoção do enxerto; **F:** canaleta produzida com a trefina na superfície óssea; **G:** perfuração no centro do enxerto para transfixação do parafuso do enxerto; **H:** deslocamento do osso seccionado empregando um cinzel de Wedelstaedt 3/4; **I e J:** desmineralização com EDTA por 3 minutos da superfície interna do enxerto e da cortical externa da área receptora (G-EDTA); **K:** lavagem profusa com solução de cloreto de sódio do gel de EDTA; **L:** perfurações da cortical externa da área receptora (G-EDTA-P e G-P); **M:** ausência de tratamento da superfície óssea da área receptora no grupo controle (G-C); **N:** blocos ósseos transplantados e fixados com parafusos de titânio; **O:** sutura do retalho com fio de seda 4-0..... 99
- Figura 2 –** Coleta das amostras ósseas para realização do ensaio mecânico. **A:** aspecto da região do enxerto e da área doadora 90 dias após o transplante; **B:** discos diamantados monoface liso e picotado usados para remoção dos blocos ósseos; **C:** bloco de tecido ósseo contendo o enxerto e o osso hospedeiro circundante..... 101
- Figura 3 –** Preparo dos espécimes para realização do ensaio mecânico. **A:** dispositivo de nylon quadrangular especialmente desenhado e confeccionado para inclusão dos fragmentos ósseos em resina composta; **B:** vista superior do dispositivo com incremento de resina; **C:** posicionamento do espécime sobre os incrementos de resina na metade da altura do dispositivo; **D:** espécime completamente coberto pelo compósito; **E:** dispositivo desmontado; **F:** aspecto final do bloco resina/osso..... 103

- Figura 4 –** Confeção dos corpos de prova para realização do ensaio mecânico. **A:** espécime fixado em um suporte de acrílico com godiva para adaptação na máquina de cortes seriados; **B:** corte com disco de diamante em baixa velocidade paralelamente ao longo eixo dos blocos de resina/osso; **C:** vista dos cortes realizados nas laterais; **D:** aspecto do espécime após descarte das laterais de resina; **E:** divisão e corte do espécime para obtenção dos corpos de prova; **F:** aspecto final dos corpos de prova..... 105
- Figura 5 –** Ensaio mecânico de microtração. **A:** medição das dimensões do corpo de prova com paquímetro digital; **B:** corpo de prova fixado ao dispositivo ligado a máquina de ensaio universal com adesivo a base de cianocrilato; **C:** fratura do corpo de prova após a realização do ensaio de microtração..... 107
- Figura 6 –** Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão..... 114
- Figura 7 –** Representação gráfica dos valores da resistência à tração por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Destaque para o corpo de prova com maior resistência à tração entre os grupos... 114
- Figura 8 –** Representação gráfica da média dos valores do módulo de elasticidade, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão..... 116
- Figura 9 –** Representação gráfica dos valores do módulo de elasticidade por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Destaque para o corpo de prova com maior valor do módulo de elasticidade entre os grupos (G-C, CP18 - E = 88,82 MPa)..... 116
- Figura 10 –** Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração e módulo de elasticidade, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão... 117

- Figura 11 –** Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração e módulo de elasticidade por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Observar o maior desvio padrão e discrepância de resultados no G-C.. 117
- Figura 12 –** **A:** Fotomicrografia de um corpo de prova do G-EDTA no qual se pode notar em visão panorâmica, no aumento de 35X, a região da fratura/rompimento ao nível das trabéculas ósseas formadas entre a face interna do enxerto ósseo (E) (seta preta) e a cortical externa do leito receptor (L) (seta branca). O destaque em vermelho é para a região da fratura/rompimento do espécime. **B** representa uma ampliação (aumento 100X) da interface enxerto-leito de um outro corpo de prova do G-EDTA rompida durante o ensaio micromecânico. **C** corresponde ao destaque em amarelo de **B**, no aumento de 350X, onde se observa o aspecto das trabéculas ósseas (setas amarelas) presentes na interface enxerto-leito. Letra R representa a resina composta no corpo de prova..... 119
- Figura 13 –** **A:** Fotomicrografia de um corpo de prova do G-EDTA-P submetido ao ensaio micromecânico. Observa-se a presença e a disposição das trabéculas ósseas na região da interface enxerto-leito (destaque em vermelho) no aumento de 75X. **B** corresponde ao destaque em vermelho de **A** no aumento de 200X, e possibilita a melhor observação dessas trabéculas ósseas (T). Seta branca representa a cortical interna do enxerto. Seta preta representa a cortical externa do leito receptor. Letra R representa a resina no corpo de prova..... 121
- Figura 14 –** **A:** Representação de um corpo de prova do G-P, no aumento de 50X, submetido ao teste micromecânico. A área destacada em vermelho corresponde à região da interface enxerto-leito. Observa-se a impossibilidade de identificação do local e desenho da fratura/rompimento do corpo de prova. **B** corresponde ao aumento de 100X do destaque em amarelo de **A**. Seta preta representa a cortical interna do enxerto (E). Seta branca representa a cortical externa do leito receptor (L). Letra R representa a resina no corpo de prova..... 123

- Figura 15 – A:** Representação do local da fratura/rompimento da interface enxerto-leito em um corpo de prova do G-P no aumento de 200X. Notar que a fratura, assim como no G-EDTA e G-EDTA-P, correu ao nível do osso medular formado entre o enxerto e o leito. **B** corresponde ao aumento de 350X de **A**..... 123
- Figura 16 –** Fotomicrografia em visão de topo das superfícies fraturadas/rompidas no ensaio micromecânico de um corpo de prova do G-P. Diferentemente das figuras 12, 13, 14 e 15, as porções fragmentadas desse corpo de prova foram posicionadas verticalmente para a obtenção dessa imagem. Observa-se o conteúdo de osso medular e a disposição mais superficial das trabéculas ósseas (T) na interface enxerto-leito (destaque em verde), e as superfícies corticalizadas (C) do enxerto (à esquerda) e do leito (à direita) mais ao fundo. Setas brancas indicam a distribuição mais superficial das trabéculas ósseas. A presença de trabéculas ósseas em contato com a cortical interna do enxerto indica a invasão do conteúdo medular na interface enxerto-leito durante o reparo..... 125
- Figura 17 – A:** Fotomicrografia eletrônica de varredura de um corpo de prova do G-C (destaque em vermelho) no aumento de 50X. Notar que a fratura apresenta o mesmo padrão observado nos grupos experimentais e ocorreu ao nível das trabéculas ósseas (T) formadas entre a cortical interna do enxerto (seta preta) e a cortical externa do leito receptor (seta branca). **B** corresponde ao aumento de 75X da área destacada em amarelo de **A**. **C** corresponde ao aumento de 100X da área destacada em verde de **B**. **D** representa a visão de topo da superfície interna do enxerto fraturada/rompida no ensaio micromecânico. Notar as projeções das trabéculas ósseas (T) advindas do leito em direção ao enxerto (setas brancas) e a presença da cortical interna do enxerto mais ao fundo..... 127

- Figura 18 –** Estudo piloto em calvárias frescas de coelho - Fotomicrografias demonstrando o efeito do condicionamento ácido e a desmineralização (porosidade) da superfície cortical externa da calvária condicionadas por 3 minutos através de diferentes agentes químicos e soluções ácidas. **A:** gel de EDTA a 24% pH neutro; **B:** solução aquosa de ácido cítrico a 37%; **C:** solução aquosa de ácido cítrico a 50%; **D:** associação de ácido cítrico a 37% e tetraciclina na forma de gel..... 135

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número total de corpos de prova obtidos, testados, classificados como outliers e desprezados nos diferentes grupos experimentais e controle.....	113
Tabela 2 –	Valores médios obtidos para resistência à tração (RT) nos diferentes grupos estudados.....	114
Tabela 3 –	Comparação entre o módulo de elasticidade médio (E) nos grupos estudados.....	115
Tabela 4 –	Revisão dos modelos experimentais propostos para avaliação da resistência à tração (RT) e módulo de elasticidade (E) do tecido ósseo desde o ano de 1974 até 2007.....	140

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPases = enzima adenosina trifosfatase

bFGF = fator básico de crescimento de fibroblastos

BMPs = proteínas morfogenéticas ósseas

BMU = unidade óssea multinuclear

BSP = sialoproteína óssea

CAII = enzima anidrase carbônica II

CATK = catepsina K

COMP = cartilagem oligomérica da matriz extracelular

CP = corpo-de-prova

DBM = demineralized bone matrix (matriz óssea desmineralizada)

DFDBA = demineralized freeze dried bone allograft (aloenxerto ósseo desmineralizado congelado a seco)

E = módulo de elasticidade

e-PTFE = politetrafluoretileno expandido

FDBA = freeze dried bone allograft (aloenxerto ósseo congelado e desidratado)

HA = hidroxiapatita

hBMP = proteína morfogenética humana

IGF = fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β = interleucina 1 beta

IL-6 = interleucina 6

IL-10 = interleucina 10

IL-17 = interleucina 17

MG63 = linhagem de células oriundas de osteossarcoma humano

MCT = tomografia micro computadorizada

MSCs = células-tronco mesenquimais

OPN = osteopontina

OPG = osteoprotegerina

OVX = ovariectomia

PCA = apatita pobremente cristalina

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE₂ = prostaglandina E2

PRELP = do inglês “proline/arginine-rich leucine repeat protein” traduzido como proteína rica em prolina/arginina e leucina repetidas

PRP = plasma rico em plaquetas

PTH = paratormônio

RANK = receptor de ativação do fator nuclear κ B

RANKL = ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B

R_a = valor de rugosidade superficial média

rhBMP = proteína morfogenética óssea recombinante humana

RT = resistência à tração

TCs = tomografias computadorizadas

TGF- β = fator de crescimento transformador

TGF- β 1 = fator de crescimento transformador beta - 1

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TRAP = fosfatase ácida tartarato-resistente

V-ATPases = enzima adenosina trifosfatase vacuolar

VEGF = fator de crescimento endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

Å = angstrom

Ca = cálcio

CO₂ = gás carbônico

d = coeficiente de deformação

Er:YAG = Laser de erbio:YAG

GPa = gigapaschal

H⁺ = hidrogênio trivalente, ou trítio

H₃-timidina = timidina tritiada

HCl = ácido clorídrico ou hidrocloração

KDa = kilodalton

L_i = largura inicial

L_f = largura final

M = molar

MPa = megapaschal

mm = milímetro

mm² = milímetro quadrado

N = Newton

N = normal

P = fósforo

Pa = paschal

T_{max.} = valor máximo de tensão

µm = micrometro

ε = deformação

δ = estresse

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	61
2	REVISÃO DE LITERATURA	67
2.1	REMODELAÇÃO ÓSSEA	69
2.2	DESMINERALIZAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS	71
2.3	INFLUÊNCIA DA DESCORTICALIZAÇÃO DO LEITO HOSPEDEIRO NA CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO	79
2.4	ASPECTOS BIOMECÂNICOS DO TECIDO ÓSSEO	82
3	PROPOSIÇÃO	91
4	MATERIAL E MÉTODOS	95
4.1	AMOSTRA	97
4.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	97
4.3	COLETA DO MATERIAL PARA O ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO	101
4.4	PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA O ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO	101
4.5	ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO	107
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	110
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS	110
5	RESULTADOS	111
5.1	MICROTRAÇÃO	113
5.1.1	Resistência à tração	113
5.1.2	Módulo de elasticidade	115
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	119
5.2.1	G-EDTA	119
5.2.2	G-EDTA-P	121
5.2.3	G-P	121
5.2.4	G-C	127
6	DISCUSSÃO	129
7	CONCLUSÕES	143
	REFERÊNCIAS	147
	ANEXOS	159

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A reconstrução de processos alveolares reabsorvidos em decorrência de avulsão ou agenesia dentária representa um dos objetivos primordiais da terapia reabilitadora protética implantossuportada. Desde que Breine e Brånemark (1980) relataram pela primeira vez o uso de enxertos ósseos como parte dessa terapia, uma grande variedade de técnicas e materiais tem sido testada com este propósito, incluindo-se o osso autógeno, alógeno, xenógeno, hidroxiapatita e outros substitutos ósseos compostos na forma de partículas ou de blocos (BUSER et al., 1996; FUGAZZOTO; VLASSIS, 1998; JENSEN; SINDET-PEDERSEN, 1991; NEVINS; MELLONIG, 1994; NISHIBORI et al., 1994; SHULMAN, 1998; SIMION et al., 1998; SUMMERS, 1998; TATUM, 1986; VAN DEN BERGH et al., 2000). O osso autógeno, entretanto, ainda representa o “padrão-ouro” entre os materiais de enxerto devido à ausência de imunogenicidade e à presença de células ósseas viáveis com a capacidade osteogênica. Os outros biomateriais e substitutos ósseos, por sua vez, apresentam índices variados de sucesso, devendo seguir critérios rígidos de seleção e utilização (LOURENÇO, 2002).

Áreas doadoras intra e extra-orais oferecem material autógeno adequado para correção da maior parte dos defeitos ósseos da região craniofacial (KELLER; TOLMAN; ECKERT, 1999; MISCH; MISCH, 1995; SANT’ANA, 1997) com destaque para a crista ilíaca, mento, ramo da mandíbula e calota craniana (JENSEN; SIMONSEN; SINDET-PEDERSEN, 1997; SANT’ANA, 1997; VERHOEVEN, 1997).

Especial atenção tem sido dispensada ao estudo dos mecanismos envolvidos não apenas na consolidação dos enxertos em bloco, como na remodelação e manutenção, ao longo do tempo, do volume ósseo obtido no momento da sua execução. Fatores possivelmente envolvidos nesses mecanismos já foram alvos de especulação e controvérsia, como a influência da origem embrionária dos enxertos (se endocondral ou membranosa) na velocidade de sua revascularização (ALBERIUS et al., 1996; HARDESTY; MARSH, 1990; ZINS; WHITAKER, 1983), a composição estrutural dos enxertos (ALBERIUS et al., 1996; CHEN et al., 1994; HARDESTY; MARSH, 1990), orientação da porção medular dos enxertos em relação ao leito (ALBERIUS et al., 1996; HARDESTY; MARSH, 1990), tipos de tratamento da interface enxerto-leito (ALBERIUS; GORDH, 1998; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000; GORDH et al., 1997), forma de fixação dos enxertos

(rígida e não rígida) (ALBERIUS et al., 1996; LIN et al., 1990; PHILLIPS; RAHN, 1990) e a concentração de fatores de crescimento no local (FINKELMAN et al., 1994; SOLTAN et al., 2007).

De particular interesse para esta pesquisa é o fato de que a consolidação parcial ou a falta de consolidação dos enxertos pode produzir seu destacamento durante o preparo para instalação de implantes osseointegráveis em sua estrutura. Tal ocorrência pode ser atribuída a fatores que interferem nos eventos biológicos que ocorrem na interface prejudicando sua reparação ou gerando a interposição de tecido mole entre o enxerto e o leito hospedeiro. Neste sentido, convém considerar que os enxertos autógenos em bloco do tipo *onlay*, quando comparados aos enxertos de osso particulado, têm demonstrado menor atividade osteogênica e processo de revascularização mais lento (ENNEKING; EADY; BURCHARDT, 1980). Sendo a celularidade do bloco ósseo recém-transplantado diretamente dependente da difusão de nutrientes e elementos advindos da microcirculação periférica, não é rara a ocorrência de necrose da porção mais central do enxerto (ORSINI et al., 2003), o que torna o prognóstico desses enxertos frequentemente difícil de ser avaliado.

Objetivando melhorar o potencial de consolidação e diminuir as taxa de reabsorção desses enxertos, foram propostos diferentes métodos de tratamento da interface enxerto-leito. Tem sido demonstrado que a incorporação dos enxertos é substancialmente melhorada quando o conteúdo medular do leito e/ou do enxerto é exposto através de perfurações da cortical óssea (GORDH et al., 1997; BUSER et al., 1993), ou pela remoção por desgaste da camada cortical mais superficial do leito receptor (ALBERIUS; GORDH, 1998; DE CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000). Esta melhora seria resultado de uma revascularização mais rápida e de um maior aporte de células osteogênicas dos espaços medulares junto à área da interface enxerto-leito. Outros tratamentos também foram propostos com esta finalidade, como a aplicação de plasma rico em plaquetas (PRP) (MIRANDA et al., 2006), de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (GORDH et al., 1999) e de laser de baixa potência (O'DONNELL et al., 1996) na interface.

A desmineralização é um evento biológico inerente à fisiologia óssea. Durante a remodelação, células clásticas lançam ácidos sobre a matriz mineralizada expondo os fatores osteoindutores presentes no interior da fase orgânica dessa matriz. A liberação desses fatores de crescimento ou proteínas ósseas morfogenéticas

(BMPs) no meio tissular permitem a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e a formação de novo osso (MELCHER, 1976). Este é o princípio no qual se baseia o emprego do osso alógeno congelado a seco e desmineralizado (DFDBA) (REYNOLDS; BOWERS, 1996), o qual é incorporado ao osso hospedeiro, constituindo-se em um material regenerativo devido à sua natureza indutiva, principalmente quando combinado a osteogenina (proteína óssea morfogenética-3) (BOWERS et al., 1991).

Entretanto, embora o princípio da desmineralização da matriz óssea venha demonstrando sucesso no aumento do potencial osteoindutor de enxertos ósseos tanto em bloco como particulados (LEWANDROWSKI et al., 1997; O'DONNELL et al., 1996), a desmineralização das superfícies de contato enxerto-leito *in situ* não tem sido citada como método para melhorar ou antecipar a consolidação dos enxertos. Recentemente, Rezende (2008) promoveu a desmineralização por ácido cítrico das superfícies ósseas de contato quando da realização de enxertos ósseos autógenos em bloco do tipo *onlay* e verificou que este procedimento resultou em um significativo aumento e aceleração da formação e da densidade do novo osso na interface enxerto-leito, assim como da extensão das superfícies de consolidação óssea.

Os achados de Rezende (2008) motivaram o estudo de outros agentes químicos e/ou desmineralizantes com o mesmo objetivo e o emprego de outras metodologias que possam comprovar seus resultados. Assim, esta investigação procurou avaliar como se comportam os enxertos ósseos autógenos em bloco frente a forças de tração quando a interface enxerto-leito é tratada com ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) associado ou não a perfurações da cortical do leito receptor. Desta forma, busca-se alcançar subsídios para a otimização dos procedimentos cirúrgicos que visam à consolidação desses enxertos e à antecipação dos fenômenos biológicos de reparação, para que os pacientes sejam beneficiados por um tratamento mais curto e mais seguro.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A hipótese desta dissertação está diretamente associada com a remodelação óssea, de modo que se torna interessante abordar, ainda que conceitualmente, os mecanismos de reabsorção e neoformação, já que fazem parte dos eventos biológicos que culminam com a consolidação dos enxertos ósseos. Em seguida serão apresentados estudos que justificam o emprego de substâncias desmineralizantes em dentina e osso, com o objetivo de promover a reparação dos tecidos duros e moles tanto em feridas periodontais como em reconstruções maxilo-mandibulares. Os métodos desenvolvidos para aumentar a previsibilidade dos enxertos serão abordados em sequência e, por último, serão apresentados os trabalhos que se propuseram a testar o comportamento do tecido ósseo frente a diferentes testes e ensaios mecânicos.

2.1 REMODELAÇÃO ÓSSEA

Os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas, originadas a partir da diferenciação de células precursoras da linhagem dos monócitos-macrófagos próximos à superfície óssea. Seu citoplasma é abundante em lisossomos, os quais contêm fosfatase ácida e são células que participam ativamente do mecanismo de remodelação através da reabsorção óssea pela dissolução de cristais minerais e por hidrólise da matriz orgânica permanecendo no interior das lacunas de Howship (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; ROODMAN, 1999).

Importantes descobertas em relação à diferenciação e ativação dos osteoclastos surgiram a partir da identificação dos componentes moleculares do sistema de remodelação óssea, expressos na forma de proteínas derivadas da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR): RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), e osteoprotegerina (OPG) (KHOSLA, 2001). O mecanismo de reabsorção óssea, de uma maneira geral, é coordenado pela expressão desses fatores osteoclastogênicos na membrana citoplasmática. A ligação de RANK a RANKL, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para sua diferenciação e posterior ativação. A OPG é um receptor solúvel “decoy” para RANKL, que inibe a reabsorção óssea impedindo a

ligação entre RANK e RANKL e a diferenciação das células pré-osteoclásticas (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; TEITELBAUM, 2000).

De acordo com a descrição de Melcher (1976), para que o tecido ósseo seja reabsorvido e remodelado, deve haver, em um primeiro momento, a mobilização dos cristais minerais, os quais não precisam ser totalmente dissolvidos, mas desalojados para serem fagocitados. Em seguida, a matriz orgânica começa a ser destruída pela ação de enzimas produzidas pelos osteoclastos. Essa mobilização dos cristais minerais estaria associada principalmente à produção de ácidos, provavelmente ácidos láctico e cítrico, durante os ciclos glicolítico e de Krebs. A enzima anidrase carbônica também tem sido citada nesse processo pela produção de íons H^+ . Boyle, Simonet e Lacey (2003) esclareceram que a acidificação do meio pelo H^+ ocorre por ação da anidrase carbônica II (CAII) sobre o CO_2 . Dessa forma, o H^+ secretado pelas ATPases vacuolares (V-ATPases) levam a ativação das enzimas TRAP e CATK, que são as principais responsáveis pela degradação da porção mineral e colágena da matriz óssea.

Kim et al. (2001) também verificaram a participação dos ácidos secretados pelos osteoclastos na dissolução dos cristais de apatita pobremente cristalinos (PCA). Os autores observaram que variações do pH no ambiente exerciam efeito significativo na dissolução dos cristais de PCA. Quando o ambiente era acidificado (pH abaixo de 6,5) aumentava-se consideravelmente a atividade dos osteoclastos na dissolução dos cristais, enquanto que à medida que o meio tornava-se alcalino e o pH atingia níveis próximos do fisiológico (7,15 e 7,4), esse processo era revertido até ser totalmente bloqueado.

À medida que os osteoclastos reabsorvem o tecido mineralizado, formam-se cavidades que vão sendo recobertas com osteopontina (DODDS et al., 1995) e outras proteínas (EK-RYLANDER et al. 1994) produzidas pelos próprios osteoclastos. Acredita-se que estas servem como sítios de inserção para células osteoprogenitoras, que migram para essas áreas e sofrem diferenciação em osteoblastos, que, por sua vez, iniciam a deposição de novo osso (DODDS et al., 1995).

2.2 DESMINERALIZAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS

A base científica que deu origem aos procedimentos de desmineralização de enxertos ósseos para reconstrução de rebordos severamente atróficos advém de procedimentos regenerativos periodontais. Estudos bem conduzidos demonstraram que é fundamental, para a estabilização da doença e reparo dos tecidos periodontais, que a natureza superficial das raízes dentárias alterada pela exposição ao ambiente da bolsa periodontal, seja biomodificada de forma a torná-las mais receptivas à adesão de tipos celulares específicos. Nesse sentido, os agentes químicos e desmineralizantes, em especial os ácidos, mostraram-se os mais efetivos e amplamente estudados. O ácido fosfórico a 50% foi um dos pioneiros nessa filosofia de tratamento que visava à obtenção de superfícies radiculares mais “limpas” e favoráveis a reinserção de fibras conjuntivas (HERITIER, 1983). Entretanto, os trabalhos mais importantes que culminaram na seleção do ácido cítrico como substância de primeira escolha para raízes dentais foram os de Register (1973) e Register e Burdick (1975). O primeiro observou reinserção de tecido conjuntivo em raízes contaminadas, com evidências de formação de novo cemento e novo osso após aplicação de ácido clorídrico por 15 minutos. Os segundos observaram que a aplicação de ácido cítrico pH 1,0 por 3 minutos apresentava melhor resultado de reparação em comparação aos ácidos hidrocloreídrico, láctico, fosfórico, tricloroacético e fórmico. Diversos outros trabalhos, com diferentes agentes desmineralizantes, foram, a partir de então, empregados com os mesmos propósitos e não serão todos abordados nesta revisão.

O ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 24%, empregado nesta dissertação, age por quelação, é eficiente na remoção da superfície radicular hipermineralizada e da “smear-layer” resultante da raspagem radicular, expõe o colágeno da matriz orgânica dentinária e passou a ser utilizado por não comprometer o potencial de reparação dos tecidos circundantes já que seu pH é próximo da neutralidade (BLOMLÖF et al., 2000).

Baker, Pavlow e Wikesjö (2005) avaliaram a formação e o potencial de adesão do coágulo sanguíneo sobre fragmentos dentinários condicionados com solução concentrada de ácido cítrico (AC), EDTA 24% pH neutro e solução fisiológica (PBS), por 5 minutos. Para o estudo, os autores utilizaram sangue fresco de um doador voluntário saudável. Os fragmentos dentinários de 4 x 6 x 1mm, foram

obtidos de dentes uniradiculares superiores e inferiores recém extraídos por lesões cariosas e/ou doença periodontal. Os mesmos foram mantidos hidratados, em solução salina tamponada com pH 7,4 a 4°C até que se processe o condicionamento. Após o condicionamento, os fragmentos dentinários eram subdivididos e submetidos ao tratamento com proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMP) e com albumina do soro bovino (BSA), possibilitando a criação dos grupos: AC; EDTA; PBS; AC+EMP; AC+BSA; EDTA+EMP e EDTA+BSA. Subsequentemente, procedia-se a aplicação das amostras de sangue fresco sobre as superfícies de todos os grupos para a formação do coágulo. A estabilização e adesão desse coágulo à dentina era desafiada por “agitação” dos fragmentos dentinários em soro fisiológico, através de aparelhos agitadores, simulando as cargas às quais o coágulo sanguíneo é exposto durante as fases iniciais de cicatrização. As análises à microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram a presença de “smear-layer” sobre todas as superfícies tratadas com PBS, não sendo possível a identificação de túbulos dentinários e fibras colágenas. As superfícies, nos grupos tratados com AC, apresentavam-se mais “limpas” e permitiam a identificação de túbulos e fibras colágenas peri e inter-tubulares em todas as amostras avaliadas. Muito embora as superfícies tratadas com EDTA também se apresentassem “limpas”, a exposição de túbulos e fibras colágenas ocorria com menos frequência e em menor número do que nas amostras tratadas com AC. Somente os grupos tratados com ácido cítrico (AC; AC+EMP e AC+BSA) permitiam a formação de uma rede de fibrina sobre a superfície do fragmento dentinário. Todos os outros tratamentos experimentais, incluindo os tratados com EDTA, levavam a formação de grupos de eritrócitos isolados e pobremente aderidos à superfície dentinária.

Os efeitos do condicionamento radicular com EDTA também foram avaliados por Ruggeri Jr et al. (2007). Os autores identificaram, através de análises imuno-histoquímicas, a presença de colágeno do tipo I (COL-I) e proteoglicanas (sulfato de condroitina) após o condicionamento ácido da superfície radicular de 21 dentes periodontalmente comprometidos. Estes foram aleatoriamente divididos em três grupos de acordo com o tratamento mecânico proposto: raspagem e alisamento radicular manual (n=7); raspagem e alisamento radicular ultra-sônica (n=7); e ausência de instrumentação (n=7). Após a terapia mecânica os dentes foram extraídos e as raízes preparadas para o condicionamento com ácido cítrico a 10% e

EDTA a 17% por 2 minutos. A marcação imuno-histoquímica foi realizada com anticorpos IgA anti-COL-I e IgM anti-sulfato de condroitina. Todas as amostras eram posteriormente avaliadas à MEV no aumento de 20.000X e 50.000X. A marcação para COL-I e sulfato de condroitina foi maior no grupo tratado com ácido cítrico. Esse tratamento resultava na eliminação do conteúdo mineral mais superficial da raiz e levava a exposição dos túbulos dentinários e a disposição tridimensional das fibras colágenas inter e peri-tubulares. No grupo tratado com EDTA essa marcação para COL-I e sulfato de condroitina era menor, embora também não houvesse sido identificado a presença de “smear-layer” e artefatos sobre a superfície da raiz. A presença de “smear-layer” era evidente em todas as amostras que não foram submetidas ao tratamento com ácidos, independente da raspagem ter sido realizada de maneira manual ou ultra-sônica. Esse não condicionamento da raiz inviabilizava a marcação pelos anticorpos e eliminava qualquer chance de exposição de COL-I e sulfato de condroitina. Os autores concluíram que, muito embora o resultado do grupo tratado com ácido cítrico tenha sido superior, o condicionamento com EDTA era igualmente eficiente na preservação das propriedades estruturais e bioquímicas da matriz dentinária desmineralizada, que por sua vez serviria como um arcabouço para maior adesão celular, em especial de fibroblastos.

O princípio da desmineralização aplicado em raízes dentais também tem sido empregado em tecido ósseo com o objetivo de modificar as propriedades dos blocos de enxertos ósseos corticais, expondo as proteínas e outros elementos presentes na fase orgânica da matriz óssea.

Urist (1965) foi o primeiro a demonstrar o processo de formação de novo osso ectopicamente, a partir da implantação de uma matriz óssea derivada de osso cortical bovino, recém-preparada e desmineralizada em ácido clorídrico 0,6N, no tecido muscular e subcutâneo de ratos e camundongos. Análises microscópicas e bioquímicas demonstraram que a matriz óssea desmineralizada (DBM) primeiro induzia a formação de células cartilaginosas, as quais mais tarde, se submetiam a uma sequência endocondral de diferenciação levando a formação de novo osso tanto nas áreas esqueléticas como em áreas de tecido mole. Posteriormente, foi confirmado que a desmineralização ácida de osso e dentina, liberava citocinas específicas, as quais foram denominadas de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), permitindo a indução das células estromais dos tecidos adjacentes e a posterior diferenciação destas em osteoblastos (URIST et al., 1970). Seguindo a

mesma linha de pesquisa, Urist et al. (1983) descreveram a sequência de eventos inerente à implantação do osso alógeno desmineralizado, desidratado e congelado a seco (DFDBA) no tecido muscular de camundongos e ratos, demonstrando que estes eventos começam com a mobilização de MSCs, formação de cartilagem, vascularização e por fim a formação óssea.

Mais tarde, Reddi, Wientroub e Muthukumaren (1987) demonstraram a complexidade de eventos necessários para a formação óssea a partir da implantação da DBM. Afirmaram que, dentro dos múltiplos eventos envolvidos, os principais são a quimiotaxia e a divisão das MSCs por volta do terceiro dia de implantação. Por volta do 5º dia, as MSCs são diferenciadas em condroblastos sendo possível identificar a presença de numerosos condrócitos entre o 7º e 8º dias. Subsequentemente, ocorre a invasão capilar entre o 9º e 11º dia, além da hipertrofia dos condrócitos e condrólise. Ao mesmo tempo, novo osso é formado na superfície da matriz mineralizada e da matriz implantada. Entre o 12º e 16º dias os osteoclastos circundam e modelam o osso recém sintetizado resultando na dissolução seletiva da matriz implantada e na formação de ossículos consistindo essencialmente de osso recém-induzido.

Modificações estruturais, além da desmineralização, foram propostas por O'Donnell et al. (1996), que preparam discos ósseos obtidos da calvária de ratos com desmineralização por HCL a 0,5M por 3 horas e com perfurações de 0,5mm de diâmetro feitas com laser de érbio, permitindo a criação de 4 grupos experimentais: sem tratamento (discos tipo I), desmineralizados (discos tipo II), tratados a laser (discos tipo III) e com associação de laser e desmineralização (discos tipo IV). Os mesmos foram posteriormente transplantados para o subcutâneo dos animais e acompanhados por 6 semanas. A análise histológica realizada em intervalos semanais confirmou a formação de novo osso nos discos do tipo III e IV, demonstrando que o tratamento por desmineralização e por perfuração seguida de desmineralização, foi fundamental para a maior formação de novo osso. Os autores chamaram a atenção para as alterações superficiais e para a manutenção da integridade estrutural provocadas pelo laser, o que permitia a formação de novo osso dentro dos orifícios criados sem, no entanto, alterar a sua resistência mecânica.

Também Lewandrowski et al. (1997) objetivaram aumentar o potencial osteoindutor dos enxertos alógenos através da associação de perfurações de

0,33mm de diâmetro com laser pulsado de érbio e desmineralização com ácido clorídrico 0,5M por 3 horas, de maneira muito semelhante ao preconizado no trabalho de O'Donnell et al. (1996). Seis tipos de enxertos corticais removidos da tíbia de ratos foram analisados: sem tratamento (tipo I), desmineralizado a 25µm de profundidade (tipo II), desmineralizado a 150µm de profundidade (tipo III), perfurados a laser com um comprimento de onda de 2,94µm (tipo IV), perfurados a laser e desmineralizados a 25µm (tipo V) e perfurados a laser e desmineralizados a 150µm (tipo VI). Esses enxertos foram transplantados para a tíbia de ratos adultos e acompanhados por 4 meses. Foi observado o crescimento de novo osso nos enxertos tipo II, III, IV e V. Essa quantidade de crescimento era estimada pela diferença da densidade mineral do bloco ósseo medida antes e após a remoção do mesmo. Esses resultados demonstraram que a desmineralização parcial extensa e a perfuração dos blocos ósseos a laser aumentaram significativamente o crescimento de novo osso. Nos enxertos tipo I (sem tratamento) não foi observado o crescimento de novo osso, sendo que aos 16 dias de pós-operatório esses espécimes estavam envolvidos apenas por tecido inflamatório fibroso. No grupo tratado apenas com perfuração (tipo IV) observou-se a ocorrência de reabsorção no local das perfurações. No grupo tratado por desmineralização à profundidade mínima de 25µm (tipo II) foi observada a formação de um calo ósseo endocondral e formação óssea periosteal, enquanto que a desmineralização intensa de 150µm (tipo III) resultou na formação de novo osso imaturo e maior atividade de remodelação óssea. Essa maior atividade de remodelação também foi observada nos enxertos tratados pela associação de perfurações e desmineralização intensa a 150µm (tipo IV). Os autores mostraram que o tratamento proposto de perfuração a laser e desmineralização parcial, ou ambos, além de eficientes na estimulação da osteogênese, podem manter a resistência original do osso.

Wang e Glimcher (1999) observaram que a formação de novo osso após a implantação de DBM, em defeitos críticos criados na calvária de ratos, seguia um curso diferente do observado anteriormente nas áreas subcutâneas e musculares. Nas calvárias, a DBM primeiro induzia a proliferação de MSCs, que se diferenciavam em osteoblastos e estes sintetizavam osso diretamente. A formação de células cartilaginosas ocorria em um número muito menor e mais tardiamente, sendo separadas do novo osso formado pelos osteoblastos. A identificação da origem das

células formadoras de osso foi realizada com a implantação de: DBM; DBM com extração do resíduo insolúvel guanidina-HCL; e DBM com extração e posterior reposição de guanidina-HCL. Os defeitos foram revestidos nas suas margens com uma barreira de acetato de celulose de forma a impedir que as células do tecido ósseo circunvizinhas participassem do reparo. As células da dura-máter e do tecido subcutâneo receberam marcação por H3-timidina para identificação da origem das células que foram estimuladas a se dividirem e diferenciarem em osteoblastos. Os achados microscópicos revelaram que os osteoblastos eram originados inicialmente das MSCs da dura-máter e depois aumentado pelas células-tronco do tecido conjuntivo suprajacente e não do osso circundante ao defeito.

Para verificar se a origem do osso a ser preparado para enxerto (endocondral ou intramembranosa) exercia alguma influência na sua propriedade osteoindutora, Rabie, Wong e Hagg (2000) criaram trinta e cinco defeitos ósseos, no osso parietal de vinte coelhos, que foram posteriormente reconstruídos com diferentes modalidades de enxerto: 5 com osso autógeno de origem endocondral (EC), 5 com osso autógeno endocondral associado com matriz óssea desmineralizada intramembranosa (EC-DBMIM), 5 com osso autógeno de origem intramembranosa associado com DBMIM (IM-DBMIM) e 6 com osso autógeno de origem endocondral (EC) associado com matriz óssea desmineralizada de origem endocondral (EC-DBMEC). Nos grupos controle, 10 defeitos foram deixados sem mistura (controle negativo) e 4 preenchidos com colágeno de pele de coelho (controle ativo). As análises histológicas aos 14 dias revelaram respectivamente 414%, 708% e 85% mais novo osso nos defeitos tratados com EC-DBMIM, IM-DBMIM e EC-DBMEC do que no grupo tratado somente com EC. Concluíram que há diferença no potencial osteogênico e na quantidade de novo osso formado de modo que a integração dos enxertos ósseos autógenos era bem superior quando combinados com a DBMIM. Segundo os autores, o processo de desmineralização permite uma maior interação entre os fatores osteoindutores e citocinas da DBM com as células precursoras osteogênicas indiferenciadas do leito hospedeiro e na sua posterior diferenciação em elementos osteogênicos funcionalmente ativos.

Em 2006, Pietrzak investigou detalhadamente o processo de hidratação em compostos ósseos mineralizados e desmineralizados. Fragmentos de osso cortical humano foram divididos em discos, liofilizados e particulados de modo que se obtivessem frações ósseas de diferentes tamanhos: maiores que 850µm; 710-

850µm; 150-710µm; 75-150µm e menores que 75µm. O autor procedeu a desmineralização da metade dessas frações ósseas através de banhos em soluções de 50ml de ácido clorídrico (HCL) a 0.5N, enquanto a outra metade era mantida mineralizada e servia como controle. As frações ósseas foram submetidas à análises para determinação da concentração final de água, da concentração de cálcio residual, do potencial de armazenamento de água (hidratação) e da energia cinética através da medição da temperatura durante a hidratação. O processo de desmineralização levava à uma diminuição do nível de cálcio residual de 25%, nas amostras mineralizadas, para 0,014%, nas amostras desmineralizadas. As frações ósseas desmineralizadas apresentavam uma maior liberação de calor durante o processo de hidratação (14°C) enquanto que nas amostras mineralizadas essa temperatura era menor (2°C). No conjunto das análises do trabalho, os fragmentos com tamanho de 150-710µm demonstraram um maior equilíbrio entre o conteúdo mineral residual e o potencial de hidratação. Os resultados sugeriram que a concentração residual do conteúdo mineral poderia, de fato, limitar ou inibir a interação das BMPs expostas pela desmineralização com a água. Ao mesmo tempo, este protocolo de desmineralização adotado levava à diminuição do concentrado final de BMPs na DBM, visto que parte dessas proteínas estavam presentes no meio ácido e eram posteriormente eliminadas.

Em 2007 Canter, Vargel e Mavili chamaram a atenção para a necessidade utilização de um carreador para garantir a liberação local de fatores de crescimento e BMPs, visto que essas proteínas podem ser rapidamente adsorvidas antes mesmo de instituir seu efeito no local do reparo. Para tanto, os mesmos preconizaram a utilização de enxertos medulares autógenos e alógenos como agentes carreadores em associação às DBMs. No trabalho, três reconstruções mandibulares foram feitas com enxerto não vascularizado de osso ilíaco misturado com DBM alógena como fonte de BMPs e obtiveram aumento da capacidade de reparação do autoenxerto. Segundo os autores, embora os enxertos autógenos possuam todas as propriedades essenciais dos substitutos ósseos, os mesmos dependem da “creeping substitution” para formar novo osso. Assim que o osso autógeno é transplantado, a disponibilidade dos osteócitos é mantida pela difusão de nutrientes do microambiente do hospedeiro. A porção central do material transplantado normalmente sofre necrose e a partir do hematoma da ferida inicia-se uma resposta inflamatória que pode persistir de meses a anos. Clinicamente, o sucesso do

procedimento reconstrutivo é principalmente associado ao tamanho da área a ser reconstruída, volume e potencial osteoindutor do material selecionado para a enxertia e a vascularização presente no local.

As propriedades bioquímicas, a morfologia superficial e o comportamento térmico de extratos ósseos bovinos desmineralizados (DBX) foram estudados por Murugan, Ramakrishna e Rao (2008) que identificaram uma série de proteínas e moléculas ósseas viáveis após a desmineralização por HCl a 0.5M por 3 dias. Os resultados bioquímicos demonstraram a presença de uma concentração de 2,94% de hidroxiprolina; 21,93% de colágeno e 24,86% de conteúdo protéico, enquanto a análise à microscopia eletrônica de varredura revelou porosidade e o aspecto irregular superficial do extrato ósseo resultante do tratamento com ácido. Esta característica superficial foi explicada pelos autores como resultado da ausência do conteúdo ósseo mineral na sua porção mais superficial e consideraram este resultado como suficiente para determinar o sucesso do processo de desmineralização. O tamanho das partículas do extrato desmineralizado foi outro fator capaz de influenciar a atividade biológica e o potencial osteoindutor do material, de modo que partículas menores que 100µm podem causar uma redução significativa desse potencial, uma vez que essas são mais fácil e rapidamente reabsorvidas. No trabalho, as partículas de todos os extratos avaliados possuíam entre 40-200µm, sendo que seu tamanho médio era de 120µm. Isto facilitou sua integração à área receptora e permitiu sua manutenção no local por um período de tempo maior. Verificaram ainda, que o processo de desmineralização pelo qual o DBX é submetido parece eliminar todas as características e sinais que poderiam indicar a presença de um determinado componente inorgânico ou mineral ósseo na sua constituição, justificando sua seleção como um material osteoindutor próximo ao ideal.

O primeiro trabalho a empregar o princípio da desmineralização óssea *in situ* das superfícies de contato em enxertos ósseos em bloco *onlay* foi o realizado em cobaias por Rezende (2008). Essa desmineralização foi realizada com uma associação de tetraciclina e ácido cítrico pH1,0 na forma de gel por 3 minutos e os efeitos microscópicos foram analisados qualitativa e quantitativamente aos 7, 30 e 90 dias. Observou-se que nos espécimes tratados com ácido houve significativo aumento da formação e da densidade do novo osso na interface enxerto-leito, assim como da extensão das superfícies de consolidação óssea. Aos 30 dias, o grupo que

recebeu desmineralização ácida apresentou maior área de formação óssea na interface ($34,39 \pm 13,4\%$) em relação ao controle ($17,14 \pm 8,6\%$) e superfícies de consolidação óssea mais extensas ($40,19 \pm 8,45\%$) do que o grupo controle ($22,99 \pm 12,77\%$), sendo que essas diferenças foram estatisticamente significantes. Aos 90 dias houve significativamente maior densidade óssea na interface dos espécimes teste ($54,00 \pm 11,23\%$) do que nos controle ($38,65 \pm 7,76\%$) e maior extensão de superfícies de integração com o osso neoformado nos espécimes teste ($55,46 \pm 19,65\%$) do que nos controle ($40,99 \pm 13,60\%$). A análise dos resultados permitiu a conclusão de que essa nova abordagem de tratamento do bloco e da superfície óssea receptora foi efetiva na promoção da osteogênese na interface e na aceleração da consolidação desses enxertos.

2.3 INFLUÊNCIA DA DESCORTICALIZAÇÃO DO LEITO HOSPEDEIRO NA CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO

Mesmo não tendo sido o objetivo central desta pesquisa avaliar o efeito da descorticalização do leito hospedeiro no resultado do teste de tração, faz-se necessário apresentar um breve embasamento científico o qual justificou o emprego de perfurações com brocas no leito hospedeiro como parte da técnica cirúrgica.

Mesmo sendo um método comumente descrito na técnica cirúrgica dos enxertos em bloco, Gordh et al. (1997) foram um dos primeiros a testar a perfuração como modalidade metodológica, avaliando os efeitos da exposição do conteúdo medular no processo de incorporação e na preservação do volume inicial do enxerto, através de análises histológicas e imuno-histoquímicas de rotina com anticorpos para identificação das proteínas ósseas ($\alpha 62$ KDa, BSP e OPN) e cartilaginosas (PRELP, COMP e fibromodulina). Adicionalmente, também foram estudadas as consequências da orientação do enxerto nesse processo de incorporação. O estudo foi realizado com 22 ratos Lewis, que receberam dois enxertos na porção anterior das tíbias direita e esquerda. No grupo experimental (lado direito), a cortical da área receptora era perfurada múltiplas vezes (7 a 10) com uma broca de 0,25mm, de modo que toda a extensão do enxerto ficasse sobreposta às perfurações. No lado controle (esquerdo), a área receptora era mantida intacta. Quanto à orientação, metade dos enxertos foi posicionada com as superfícies medulares voltadas contra o

leito receptor, enquanto que na outra metade da amostra, as superfícies corticais do enxerto estavam em contato com o leito. Na 4^a semana foi observada incorporação parcial do enxerto nos grupos onde a superfície medular do enxerto estava em contato com o leito. Na 4^a semana, encontraram resultados mais expressivos no grupo tratado com perfurações. Ambos os grupos mostraram atividade osteogênica na interface entre o enxerto e o leito, com mudanças volumétricas pequenas. No lado tratado com perfurações havia reabsorção do leito receptor, enquanto que no lado contralateral não tratado, o leito receptor manteve-se inalterado. Ainda na 4^a semana, para os enxertos que foram orientados com a porção cortical em contato com o leito, o processo de incorporação e osteogênese estava ligeiramente mais avançado no grupo onde o leito havia sido perfurado. Na 20^a semana havia maior atividade de remodelação do leito receptor tratado com perfuração. No grupo mantido sem tratamento, a interface enxerto-leito possuía uma aparência mais corticalizada. Nesse estudo, foi nítida a maior incorporação e osteogênese no grupos onde os enxertos haviam sido sobrepostos ao leito perfurado. Em alguns casos onde a porção medular do enxerto foi colocada em contato com o leito, o componente medular do enxerto pareceu inibir a amalgamação cortical desses enxertos, enquanto que nos animais que tiveram a porção cortical do enxerto voltada para o leito perfurado, ocorreu a integração por amalgamação da cortical na maioria dos espécimes.

Alberius e Gordh (1998) avaliaram o efeito da descorticalização completa da superfície externa do leito receptor por desgaste e a expressão de duas fosfoproteínas não-colágenas (BSP e OPN) envolvidas no processo de regulação da osteogênese. Para a realização do trabalho foram utilizados 22 ratos Lewis adultos nos quais o enxerto ósseo autógeno em bloco foi posicionado sobre o osso parietal, seguindo os modelos experimentais (sem tratamento e descorticalização por desgaste do leito receptor). Os animais foram sacrificados após a 4^a e a 20^a semana para o processamento histológico e imuno-histoquímico. Os autores mostraram que ambos os grupos apresentaram remodelação e atividade de reabsorção na interface enxerto-leito. Quanto à incorporação, a mesma era potencialmente melhorada após a descorticalização do leito receptor. A maior formação óssea inicial foi observada com a descorticalização, porém esse resultado era visto como temporário, uma vez que esse osso era posteriormente reabsorvido e remodelado. Os autores também observaram que o tratamento do leito receptor por

descorticalização ao mesmo tempo em que favorecia a incorporação, integração e a revitalização do enxerto, aumentava a atividade de reabsorção. A perda óssea sucessiva do contorno dos enxertos com o tempo, em muitos casos, foi relacionado à reabsorção da área receptora e com a perda da projeção do enxerto pela submergência do enxerto na área receptora, ao invés da reabsorção do enxerto. Mais tarde, esses mesmos autores mostrariam que osso transplantado sobrevive aproximadamente 24 horas sob hipóxia e então, uma rápida e eficiente vascularização do enxerto seria fator vital para o seu sucesso (GORDH; ALBERIUS, 1999).

De Carvalho, Vasconcelos e Pi (2000) analisaram histologicamente o comportamento dos enxertos autógenos obtidos da região posterior da mandíbula de cães, fixados sobre leitos corticalizados, perfurados e descorticalizados. Aos 45 dias, nos enxertos fixados sob o leito corticalizado, os autores observaram a presença de algumas áreas de contato direto entre o enxerto e o leito. No entanto, ainda havia áreas de tecido conjuntivo interposto e presença de células inflamatórias ao redor do enxerto. Clinicamente, era visível a reabsorção sofrida pelo enxerto. Esses resultados foram atribuídos à dificuldade de revascularização de enxertos extremamente densos, como os mandibulares, sobre uma área também corticalizada. No grupo onde o leito foi tratado com perfuração, havia áreas com integração entre o enxerto e o leito em todos os animais, presença de tecido ósseo imaturo com amplos espaços medulares e áreas de tecido conjuntivo no interior do osso neoformado. No grupo descorticalizado, notava-se a presença de uma completa integração entre o enxerto e o leito. É importante destacar que nos grupos tratados com perfuração e descorticalização, o enxerto manteve-se vital. Aos 90 dias, nos grupos em que o leito receptor foi mantido corticalizado ou tratado com perfuração, o padrão de cicatrização era o mesmo do observado aos 45 dias. No grupo com perfuração era possível observar a presença de algumas projeções de tecido ósseo em direção ao enxerto. A maior presença de tecido conjuntivo interposto entre o enxerto e o leito se deu na periferia do enxerto, provavelmente pela dificuldade de se obter uma adaptação satisfatória entre o enxerto e leito receptor nessa região. No grupo descorticalizado, os enxertos estavam integrados e totalmente vitais.

Faria et al. (2008) investigaram a participação do tratamento por perfuração do leito receptor no tempo para a revascularização do enxerto, na manutenção do

volume/densidade do enxerto e na expressão de proteínas de remodelação liberadas no enxerto. Os autores realizaram enxertos ósseos do tipo *onlay* da crista ilíaca bilateralmente na mandíbula de trinta e seis coelhos. A área receptora foi tratada com perfuração (grupo experimental) na metade da amostra, enquanto que na outra metade a mesma foi mantida intacta (grupo controle). Imediatamente após a realização dos transplantes ósseos, os animais foram submetidos a tomografia, posteriormente repetida antes da eutanásia dos animais. Os espécimes ósseos sofreram marcações com anticorpos específicos para identificação de OPN, OCN, COL-I e VEGF. As análises por imagem (tomografias) não revelaram nenhuma diferença estatisticamente significante entre as áreas perfuradas e não perfuradas. O aumento do volume era detectado 10 dias após o procedimento cirúrgico, de modo que o processo de reabsorção voltou até o 60^a dia em ambos os grupos. A expressão de VEGF revelou a tendência para a revascularização mais precoce dos enxertos sobrepostos ao leito perfurado. Essa revascularização, por sua vez, acelerava o processo de remodelação óssea, como comprovada pela expressão de OCN, OPN e COL-I. Esse processo de deposição óssea iniciava-se nas porções mais periféricas do enxerto/leito. No grupo tratado com perfuração, o início do processo de reabsorção óssea era observado perto das perfurações. A análise desses resultados levou os autores concluírem que a revascularização mais lenta nas áreas não perfuradas causou hipóxia transitória do enxerto. O tratamento do leito com perfuração levou à revascularização mais precoce do enxerto e a uma remodelação mais extensiva até que os mesmos alcançassem seu volume máximo no 10^o dia.

2.4 ASPECTOS BIOMECÂNICOS DO TECIDO ÓSSEO

Grande parte dos trabalhos que se propuseram avaliar o comportamento biomecânico ósseo está associada a determinadas patologias. No entanto, o estudo do comportamento mecânico do tecido ósseo saudável, sob a perspectiva de um material, torna-se complexo pela presença de elementos orgânicos e inorgânicos de diferentes naturezas na sua composição, sendo suas propriedades mecânicas dependentes, principalmente, da disposição e constituição dos polímeros de colágeno e dos sais de apatita (LUCCHINETTI; THOMAN; DANUSER, 2000).

Para auxiliar no entendimento da metodologia e na interpretação dos resultados dos testes mecânicos, breve atenção será dispensada às propriedades biomecânicas do tecido ósseo e ao seu comportamento frente ao estresse provocado pelas forças de tração e aos testes laboratoriais que procuraram mimetizar situações reais.

O osso apresenta propriedades mecânicas diferentes quando cargas ou forças são aplicadas em direções e sentido diferentes, caracterizando-o como um material anisotrópico (TURNER; CHANDRAN; PIDAPARTI, 1995). Além da anisotropia, a viscoelasticidade é outra propriedade marcante do osso, explicada pela presença de água na sua constituição e caracterizada pelo somatório dos comportamentos de um material elástico com o de um material viscoso (SELDIN, 1965). Um material com comportamento elástico ideal é caracterizado pelo potencial de armazenamento de energia potencial elástica, exemplificado pelo comportamento de uma mola. Um material viscoso, por sua vez, é caracterizado por ter toda a energia a ele fornecida dissipada na forma de calor, imitando o comportamento de um amortecedor. O comportamento mecânico de um material viscoelástico depende diretamente da intensidade e velocidade de aplicação das cargas sobre o mesmo. Neste sentido, o aumento da intensidade dessa carga diminui o tempo reservado para sua deformação, aumentando seu módulo de elasticidade à medida que diminui sua tensão final. Sob cargas de baixa intensidade, o tecido ósseo não demonstra sofrer grandes deformações elásticas, de modo que a concentração e orientação das fibras colágenas e a microarquitetura trabecular, quanto ao número, tamanho e disposição das trabéculas, participam diretamente desse processo de dissipação de forças (BOWMAN et al., 1999). Entretanto, quando uma carga de alta intensidade é aplicada, a capacidade adaptativa do material é extrapolada, ficando o tecido susceptível a grandes deformações e fraturas (BURSTEIN; WRIGHT, 1994).

Segundo Bilezikian, Rasz e Rodan (2002), a complexidade estrutural do osso permite que o mesmo seja classificado em cinco diferentes níveis: 1) macroestrutural (osso cortical e medular); 2) microestrutural (trabéculas, ósteons e sistemas harvesianos); 3) submicroestrutural (lamelas); 4) nanoestrutural (fibras colágenas) e 5) subnanoestrutural (moléculas colágenas, minerais e proteínas ósseas. Na condição *in vivo*, está constantemente sujeito a deformação quando uma força é aplicada sobre ele. Se estiver confinado a uma parcela de sua estrutura, de modo que não possa se movimentar, ou se uma força da mesma intensidade for aplicada

em direção contrária, este irá se deformar, resultando na geração de uma resistência interna à força aplicada conhecida como estresse (σ). O estresse é igual em magnitude e oposto ao sentido da força aplicada, sendo normalmente distribuído sobre sua área de secção transversal. É expresso em uma unidade internacional de força (N) sobre a área (m^2) e representado pela unidade Pascal (Pa), onde $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$. O estresse é basicamente originado pela aplicação das forças de tensão (tração), compressão e cisalhamento.

A tração é produzida quando duas forças são aplicadas em direções contrárias sobre determinado corpo ou estrutura, ao longo de um mesmo eixo. A resistência a essas forças dá-se pelas forças atrativas intermoleculares presentes no material. O resultado da medida dessa força coesiva é chamado de resistência à tração, matematicamente definida pela força aplicada sobre sua área de atuação (área de secção transversal do corpo de prova, em condições laboratoriais). A deformação (ϵ) sofrida pelo material durante o ensaio, por sua vez, é calculada pela relação do comprimento final (L_f) e o inicial (L_i) do CP, de modo que: $\epsilon = L_f - L_i / L_i$. (BILEZIKIAN; RASZ; RODAN, 2002)

De acordo com Shimano, Shimano e Volpon (2002), a viscoelasticidade do tecido ósseo faz com que o mesmo não se comporte como uma mola ideal, visto que há perda da energia elástica durante a sua deformação (histérese). A resistência máxima do osso, ou de um determinado espécime mineralizado é determinada através de um cálculo matemático baseado na carga máxima aplicada no ponto de falha. No caso específico de aplicação de uma força de tração, essa resistência passa a ser chamada de resistência à tração.

O módulo ou coeficiente de elasticidade é representado pela taxa de variação da deformação em função de uma determinada tensão, carga ou esforço aplicado sobre um material (ANUSAVICE, 1999). Alguns autores também o definem como uma constante de proporcionalidade da tensão sobre a deformação (BILEZIKIAN; RASZ; RODAN, 2002). O módulo de elasticidade depende do tipo de ensaio e de carga aplicada sobre o material, podendo ser compressivo, flexural, de cisalhamento, de tração (módulo de Young) e torção. A determinação do módulo de elasticidade informa a deformação máxima que um material consegue suportar dentro da sua fase elástica, ou seja, antes de sua fratura ou rompimento. Segundo Anusavice (1999), quanto menor a deformação sofrida pelo material, maior será o

seu módulo de elasticidade. Isso significa que, materiais com maior módulo de elasticidade, necessitam de maior carga para induzir a sua deformação.

Reilly e Burstein (1974) foram os primeiros a determinar a média do módulo de elasticidade do osso cortical. Os autores, através da revisão dos trabalhos da época, observaram que a mesma era de 15,0 GPa. Posteriormente, trabalhos com protocolos mais rígidos e modelos experimentais mais bem definidos, como os utilizados por Ashman et al. (1984), através de ultrassonografias com propagação de ondas com velocidade e frequência pré-estabelecidas, mostraram resultados bastante semelhantes, com valores variando entre 20,0 e 22,0 GPa, quando a carga era aplicada no sentido longitudinal e entre 12,0 e 14,0 GPa no sentido transversal dos espécimes.

O teste de flexão de 3 pontos foi empregado no trabalho de Kuhn et al. (1989), para comparar o módulo de elasticidade do osso medular e cortical humano da crista ilíaca. Os resultados demonstraram que o módulo de elasticidade do osso medular foi significativamente menor (22%) do que o osso cortical (3,81 GPa e 4,89 GPa, respectivamente), mas não foi observada nenhuma correlação positiva entre a densidade mineral e o módulo de elasticidade. Segundo os autores, essa variação seria atribuída às diferenças microestruturais existentes entre os espécimes de osso cortical e medular, principalmente em relação à orientação das fibras colágenas.

O mesmo teste foi empregado por Choi et al. (1990) para o cálculo do módulo de elasticidade do osso subcondral, cortical e medular, obtido da tíbia de um único doador com 60 anos. A uniformização da geometria e do tamanho dos espécimes eram variáveis importantes e influenciaram sobremaneira nos resultados do trabalho. À medida que se padronizava a geometria e se aumentava o tamanho dos espécimes aumentava-se também o valor do módulo de elasticidade. Os autores obtiveram os valores do módulo de elasticidade de 1,15 GPa para o osso subcondral, $5,44 \pm 1,25$ GPa para o osso cortical e de $4,59 \pm 1,60$ GPa para o osso medular. Esses resultados foram, em parte, explicados pelas características biológicas e estruturais do osso cortical, de modo que a presença de lacunas em espécimes menores comprometia a validade dos resultados.

Rho, Ashman e Turner (1993) calcularam o módulo de elasticidade do osso cortical e medular humano obtidos da tíbia, através dos testes de tração e de ultrassonografias. Para as trabéculas ósseas o valor foi de $10,4 \pm 3,5$ e $14,8 \pm 1,4$ GPa, enquanto que os valores do osso cortical foram de $18,6 \pm 3,5$ e $20,7 \pm 1,9$ GPa,

respectivamente. Os autores justificaram os menores valores obtidos nos testes de tração à viscoelasticidade do tecido ósseo.

Mais tarde, a mesma equipe de pesquisadores (RHO; TSUI; PHARR, 1997) estudou as propriedades elásticas do osso cortical e medular através da nanoindentação, a partir de espécimes obtidos de vértebras torácicas (T-12) e de tíbias de cadáveres congelados. O osso trabecular das vértebras torácicas, testadas no sentido transversal, obtiveram um módulo de elasticidade de $13,5 \pm 2,0$ GPa, enquanto que na porção cortical das tíbias, testadas no sentido longitudinal, o módulo de elasticidade foi de $22,5 \pm 1,3$ GPa para os ósteons e $25,8 \pm 0,7$ GPa para as lamelas intersticiais ($p < 0.05$).

Lewandrowski, Bonnasar e Uhthoff (1998) avaliaram as mudanças relativas à rigidez flexural e à resistência compressiva da tíbia de 18 carneiros após as mesmas serem perfuradas a laser (Er:YAG-60J/cm²) e parcialmente desmineralizadas pela imersão em HCL (0,5N). O trabalho permitiu a criação de três grupos: G1- sem tratamento (controle); G2- perfuração a laser e G3- perfuração a laser e desmineralização. A rigidez flexural foi determinada através do ensaio de flexão de quatro pontos. Os resultados apresentados pelos grupos G1 ($0,980 \pm 0,0141$ GPa), G2 ($0,965 \pm 0,034$ GPa) e G3 ($0,595 \pm 0,006$ GPa) mostraram que o tratamento proposto para o G2 resultava em mínima redução enquanto que para o G3 essa redução era considerável (40,3%). Nos testes de compressão, a média do valor da carga compressiva máxima necessária para provocar a fratura dos espécimes no G1 foi de 10,82 kN, havendo uma redução significativa dessa resistência máxima no G2 (2,7%) e G3 (12,7%). Os autores concluíram que os tratamentos propostos podem ser utilizados com segurança com o objetivo de aumentar o potencial osteoindutor dos transplantes ósseos, ao mesmo tempo em que se espera uma redução das propriedades mecânicas da área reconstruída pela redução do volume ósseo inerente à perfuração e à desmineralização.

Turner et al. (1999) avaliaram o módulo de elasticidade do osso humano cortical e medular removidas do fêmur de um único doador, através de microscopia acústica e nanoindentação. O valor do módulo de elasticidade do osso cortical foi 40% maior no sentido longitudinal do que no sentido transversal ($p < 0.01$). Os valores do módulo de elasticidade do osso medular, com a técnica de microscopia acústica ($17,50 \pm 1,12$ GPa) e nanoindentação ($18,14 \pm 1,7$ GPa), foram ligeiramente superiores quando comparados com os resultados obtidos no osso cortical no

sentido transversal ($14,91 \pm 0,52$ GPa e $16,58 \pm 0,32$ GPa, respectivamente). Entretanto, quando essa carga era direcionada no sentido longitudinal dos espécimes de osso cortical, o módulo de elasticidade do osso medular foi estatisticamente inferior ($p < 0,01$). A média do módulo de elasticidade do osso cortical obtido com a microscopia acústica foi de 4-14% menor do que o obtido com a nanoidentação ($17,73 \pm 0,22$ GPa e $20,02 \pm 0,27$ GPa). Concluíram que o módulo de elasticidade do osso cortical é maior que o do osso medular, corroborando com a teoria de similaridade entre o comportamento elástico do osso trabecular e cortical, especialmente quando o último é analisado no sentido transversal.

A nanoidentação também foi o modelo experimental utilizado por Zysset et al. (1999). Foram obtidas amostras dos fêmures de oito doadores (quatro homens e quatro mulheres) com média de idade de $75,3 \pm 11,7$ anos. Para a realização do experimento, as peças foram divididas em duas regiões anatômicas diferentes (diáfise e cabeça femoral), descongeladas, preparadas, cortadas ($30 \mu\text{m}$) e hidratadas. O teste permitiu que cada peça sofresse uma média de 180 identações, com profundidade de 500nm em uma velocidade de 10 nm/s, totalizando 1440 identações. Destas, 39 falharam, provavelmente pela invasão de água na superfície do material, sendo atribuído um valor igual a zero. O módulo de elasticidade foi calculado através da curva de não carga, enquanto a dureza foi definida como a máxima força dividida pela área de contato. O módulo de elasticidade, nas amostras da diáfise femoral, variou entre $19,1 \pm 5,4$ GPa nos ósteons e $21,2 \pm 5,3$ GPa nas lamelas intersticiais, enquanto que para a região da cabeça do fêmur os valores variaram entre $15,8 \pm 5,3$ GPa nos ósteons, $17,5 \pm 5,3$ GPa nas lamelas e $11,4 \pm 5,6$ GPa nas trabéculas. Em relação à dureza, os valores variaram entre 0,234 e 0,760 GPa, com distribuição similar entre as diferentes submicroestruturas. A interação entre o tipo lamelar e o doador foi altamente significativa ($p < 10^{-6}$). Os autores concluíram que a nanoestrutura do tecido ósseo diferia substancialmente pelo tipo lamelar, região anatômica e entre indivíduos, de modo que a heterogeneidade tecidual interfere diretamente na adaptação e fragilidade óssea. Os autores observaram também que as propriedades mecânicas do osso medular, independentemente da região testada, são significativamente menores que as do osso cortical ($p < 0,05$).

Braidotti et al. (2000) determinaram o módulo de elasticidade e a resistência à tração de amostras obtidas da porção subcondral da cabeça do fêmur bovino

(camada fina de osso cortical em estreito contato com a cartilagem articular) através do ensaio mecânico de tração. Para determinação do módulo de elasticidade, as amostras foram submetidas várias vezes ao ensaio, respeitando-se o limite elástico do material. Para a determinação da resistência à tração, no entanto, fazia-se necessário extrapolar esse limite elástico, ocasionando a fratura das mesmas de maneira intencional. O módulo de elasticidade das amostras mantidas desidratadas ($n=9$) foi de $10,3\pm 2,5$ GPa e de $3,5\pm 1,2$ GPa para as amostras hidratadas em solução salina a 0,9% ($n=8$), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$), enquanto a resistência à tração foi de 36 ± 10 MPa e $30\pm 7,5$ MPa, respectivamente, não sendo estatisticamente significativa ($p=0,17$). Após os testes mecânicos, as amostras foram submetidas a análises à MEV que revelaram a presença de estruturas rudimentares com aparência de ósteons e a característica lamelar das superfícies ósseas com a presença de lamelas ósseas compostas por fibras colágenas calcificadas.

Bini et al. (2002) utilizaram testes micromecânicos de tração e compressão para determinar o módulo de elasticidade de trabéculas ósseas humanas. Segundo os pesquisadores, a opção pelo teste mecânico se deu pela maior simplicidade metodológica, visto que os testes de flexão são tecnicamente mais sensíveis. Vinte e seis trabéculas foram inicialmente preparadas, sendo somente três selecionadas para o estudo. A observação microscópica dos espécimes permitiu a medição da sua largura, espessura e comprimento. Os espécimes identificados pelos números 1 e 3 foram submetidos ao teste de compressão ($1,41\pm 0,28$ GPa e $1,48\pm 0,26$ GPa respectivamente) e o espécime de número 2, aos testes de tração ($1,89\pm 0,33$ GPa) e compressão ($1,51\pm 0,26$ GPa). Essas diferenças entre os valores de tração e compressão do espécime 2 foi atribuído a flexão sofrida pelo espécime durante a compressão, o que pode levar à uma subestimação de até 20% do módulo de elasticidade. Os autores consideraram que a metodologia empregada e os resultados do trabalho poderiam servir de referência para outros futuros que se propusessem a avaliar o módulo de elasticidade de trabéculas ósseas humanas.

Ramasamy e Akkus (2007) testaram a hipótese de que o comportamento mecânico do osso cortical diferia entre os quadrantes do fêmur pela variação do padrão funcional e de orientação das fibras colágenas, onde se esperava que o quadrante anterior apresentasse uma maior resistência à tração e o posterior à compressão. Foram utilizados 13 camundongos com nove semanas de vida, de

modo que os fêmures direito e esquerdo foram dissecados, limpos e congelados. Cinco fêmures foram seccionados, perpendicularmente ao longo eixo das suas diáfises, para determinação do padrão de orientação das fibras colágenas, enquanto que vinte fêmures foram microscopicamente analisados e posteriormente submetidos ao teste micromecânico, sendo divididos em quatro grupos teste: tração do quadrante anterior (n=5), tração do quadrante posterior (n=5), compressão do quadrante anterior (n=5) e compressão do quadrante posterior (n=5). Durante a realização dos testes mecânicos, os espécimes foram mantidos hidratados em um meio suplementado com cálcio. Os resultados mecânicos foram menores no quadrante posterior nos testes de tração ($p>0,05$), e similares para os testes de compressão ($0,05<p<0,1$), como se segue: (1) tração no quadrante anterior: módulo de elasticidade ($1,88\pm0,42$ GPa) e resistência à tração ($0,07\pm0,02$ GPa); (2) tração no quadrante posterior: módulo de elasticidade ($1,26\pm0,46$ GPa) e resistência à tração ($0,04\pm0,01$ GPa); (3) compressão no quadrante anterior: módulo de elasticidade ($3,25\pm0,49$ GPa) e resistência à tração ($0,09\pm0,02$ GPa); (4) compressão quadrante posterior: módulo de elasticidade ($3,11\pm1,17$ GPa) e resistência à tração ($0,08\pm0,02$ GPa). Em relação ao padrão de orientação das fibras colágenas, os resultados indicaram uma maior fração orientada no sentido do longo eixo do fêmur no quadrante anterior. Esses resultados foram explicados pelo fato do quadrante anterior ser submetido a uma demanda funcional de tração, em maior grau, enquanto o quadrante posterior é exigido quase que exclusivamente em compressão.

Sanada (2007) determinou o módulo de elasticidade e a resistência à tração do osso mineralizado e desmineralizado pelos testes de microtração. Foram utilizadas os dois ossos parietais de 24 ratos possibilitando a confecção de 48 espécimes alocados em dois grupos experimentais (mineralizado e desmineralizado) com seus respectivos subgrupos (resistência à tração e módulo de elasticidade). Os espécimes foram preparados e tiveram suas dimensões padronizadas com 10-12 mm de comprimento, 3-4 mm de largura e 1 mm de espessura, sendo que para a determinação do módulo de elasticidade, os mesmos tinham que sofrer um corte de padronização na sua porção central na forma de ângulos vivos, diminuindo a área a ser testada e a carga aplicada pela máquina de ensaio. Todos os espécimes foram posteriormente armazenados em água deionizada a 37°C. Os testes foram realizados com uma máquina de ensaio universal que possibilitava a fixação dos

espécimes na própria máquina através de um adesivo à base de cianocrilato. O ensaio de tração foi realizado a uma velocidade de 1 mm/min., de modo que a máquina revelava o valor de tensão máxima gerada para a fratura/rompimento do espécime em quilograma (Kg). Esse valor era multiplicado por uma constante universal (0,981) e dividido pela área do espécime (cm²), chegando a um valor de tensão máxima em MPa. Os testes de tração utilizados para a determinação da resistência à tração possibilitaram também a obtenção do módulo de elasticidade, visto que a máquina fornecia a informação do deslocamento do espécime até a sua fratura. A desmineralização foi realizada pela imersão dos espécimes em EDTA (0,5M). Com relação aos testes mecânicos, a única modificação foi a necessidade de submersão dos espécimes em água destilada pela necessidade de hidratação dos mesmos durante o ensaio. Os resultados mostraram uma resistência à tração de 129,814±34,922 MPa no grupo mineralizado e 18,547±3,682 MPa no grupo desmineralizado ($p<0,001$), enquanto as médias correspondentes ao módulo de elasticidade foram de 1.377,792±208,332 MPa no grupo mineralizado e 49,670±11,703 MPa no grupo desmineralizado ($p<0,001$). Como observado, as propriedades mecânicas nos espécimes mineralizados foram significativamente superiores aos espécimes desmineralizados. Os resultados permitiram sua utilização como referência máxima e mínima em relação ao comportamento mecânico do osso cortical, permitindo, ainda, uma futura comparação entre áreas enxertadas com diferentes biomateriais.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a avaliar quantitativamente, por meio de teste mecânico de microtração e análise de resistência à tração e módulo de elasticidade, a hipótese de que a desmineralização com EDTA das superfícies ósseas de contato de enxertos ósseos *onlay* influencia a resistência de união entre essas duas estruturas em comparação ao tratamento convencional (sem desmineralização).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 13/2007 (Anexo A).

4.1 AMOSTRA

Foram utilizados 29 coelhos machos adultos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) de aproximadamente 3,5 Kg, criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais e mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento. A alimentação foi composta de ração comercial sólida apropriada à idade e peso dos animais (Nutricoeelho[®], Purina do Brasil, Paulínia/SP) e água *ad libitum*.

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após anestesia por injeção intramuscular de cloridrato de xilasina (Anasedan[®], Vetbrands, Jacareí/SP) à dose de 0,1ml/Kg de peso corporal, seguido por cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Vetbrands, Jacareí/SP) à dose de 0,5 ml/Kg de peso corporal, foi feita a tricotomia interna da pata traseira direita de modo a abranger toda a região da metáfise proximal da tíbia (Figura 1A). Nesta região foi realizada antissepsia com digluconato de clorexidina a 2% (Chlorohex[®], Johnson Diversey, São Paulo) e realizada infiltração local de cloridrato de articaína 4% com adrenalina 1:100.000 (Septanest[®], Septodont Brasil LTDA, São Paulo/SP) com o objetivo de promover vasoconstrição prévia à incisão e, assim, diminuir o sangramento. Os animais foram cobertos com campos cirúrgicos estéreis descartáveis (Figura 1B) e a partir deste momento, todos os procedimentos foram realizados de forma a manter rigorosamente a cadeia asséptica. A incisão da região da metáfise proximal tibial foi realizada por planos, de modo que o tegumento recebeu incisão linear de aproximadamente 5,0cm com lâmina de bisturi nº15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda. Barueri/SP) (Figura 1C), seguida de incisão da camada muscular e do perióstio, até atingir a cortical externa da tíbia. A partir desta incisão, um retalho dermo-epidérmico-periosteal foi levantado com o auxílio de um

periótomo de Molt, para exposição da cortical óssea da tíbia (Figura 1D). Nesta, com uma broca trefina de 8,0mm de diâmetro externo, em baixa rotação e sob irrigação profusa com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 1E), foi realizada uma canaleta na superfície óssea (Figura 1F). Uma perfuração de 1,3mm de diâmetro foi realizada no centro do osso recortado ainda em posição (Figura 1G) para receber posteriormente, o parafuso de fixação do enxerto. Um cinzel de Wedelstaedt 3/4 foi introduzido nesta canaleta com movimento de alavanca, para que o osso recortado fosse destacado do seu sítio (Figura 1H). Foi obtido assim um disco ósseo puramente cortical que foi transplantado para uma área adjacente na forma de enxerto *onlay*. Na eventualidade da presença de osso medular no disco este era totalmente removido por raspagem com cinzel cirúrgico (Figura 1K). Antes do transplante, as superfícies ósseas que entrariam em contato (do leito hospedeiro e do enxerto) receberam um dos seguintes tratamentos:

- desmineralização com ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) pH neutro em forma de gel a 24% (PrefGel[®], Straumann, Waldenburg, Suíça) durante 3 minutos seguida por irrigação profusa com soro fisiológico (Figura 1I-K). Este tratamento foi realizado em 8 animais que constituíram o grupo G-EDTA;
- o mesmo procedimento do item anterior seguido por 4 perfurações com uma broca esférica carbide ¼ em baixa rotação e sob irrigação profusa com soro fisiológico (Figura 1L). Este tratamento foi realizado em 7 animais que constituíram o grupo G-EDTA-P;
- 4 perfurações na cortical da área receptora sem desmineralização das superfícies ósseas. Este tratamento foi realizado em 7 animais que constituíram o grupo G-P;
- nenhum tratamento antes da fixação do enxerto (Figura 1M). Este procedimento foi adotado em 7 animais que constituíram o grupo controle (G-C).

Os blocos ósseos transplantados foram fixados com parafusos de titânio de 1,5mm de diâmetro por 10 mm de comprimento (Titanium Fix, São José dos Campos/SP) (Figura 1N) posicionados no orifício central realizado previamente. Os retalhos foram posicionados sobre os enxertos e mantidos com sutura interrompida simples no tegumento, empregando-se fio de seda preta 4-0 (Ethicon[®], Johnson &

Johnson, São Paulo/SP) (Figura 1O). Imediatamente após o procedimento cirúrgico, os animais receberam por via parenteral (IM) uma dose única de penicilina benzatina (Pentabiótico Veterinário, Lab. Wyeth Ltda., São Bernardo do Campo/SP) na proporção de 16.000 UI e cetoprofeno (Ketoflex 1,0%, Mundo Animal Laboratório Veterinário Ltda., São Paulo/SP), na proporção de 1ml/10Kg de peso corporal, para o controle da dor. A sutura foi removida entre o 7º e o 10º dia após a cirurgia.

Figura 1 – Procedimento cirúrgico. **A:** região da metáfise proximal da tíbia direita tricotomizada de um animal usado no experimento; **B:** a mesma região coberta, após a antisepsia, por um campo estéril descartável fenestrado; **C:** incisão no tegumento de aproximadamente 5,0 cm; **D:** exposição da metáfise proximal tibial pelo descolamento de um retalho dermo-epidérmico-periostal; **E:** broca trefina posicionada para o início da remoção do enxerto; **F:** canaleta produzida com a trefina na superfície óssea; **G:** perfuração no centro do enxerto para transfixação do parafuso do enxerto; **H:** deslocamento do osso seccionado empregando um cinzel de Wedelstaedt 3/4; **I e J:** desmineralização com EDTA por 3 minutos da superfície interna do enxerto e da cortical externa da área receptora (G-EDTA); **K:** lavagem profusa com solução de cloreto de sódio do gel de EDTA; **L:** perfurações da cortical externa da área receptora (G-EDTA-P e G-P); **M:** ausência de tratamento da superfície óssea da área receptora no grupo controle (G-C); **N:** blocos ósseos transplantados e fixados com parafusos de titânio; **O:** sutura do retalho com fio de seda 4-0.

4.3 COLETA DO MATERIAL PARA O ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO

Noventa dias após as cirurgias, a morte dos animais foi induzida por sobredose intravenosa de barbitúrico (tiopental sódico) na concentração de 0,12 mg/Kg, associado à infiltração de cloreto de potássio diretamente no coração. Blocos de tecido ósseo contendo os enxertos e o osso hospedeiro foram removidos com o auxílio de um disco diamantado monoface picotado em baixa rotação e imediatamente imersos em solução de formalina a 10%, onde foram mantidos até o preparo final das peças para o ensaio mecânico (Figura 2A-C).

Figura 2 – Coleta das amostras ósseas para realização do ensaio mecânico. **A:** aspecto da região do enxerto e da área doadora 90 dias após o transplante; **B:** discos diamantados monoface liso e picotado usados para remoção dos blocos ósseos; **C:** bloco de tecido ósseo contendo o enxerto e o osso hospedeiro circundante.

4.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA O ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO

Após a coleta dos blocos ósseos, procedeu-se à eliminação do tecido mole remanescente, remoção do parafuso de fixação e à redução das suas dimensões, de forma a produzir espécimes para inclusão em blocos de resina composta (Filtek[®] Z250, 3M, Saint Paul, MN, EUA). Para este procedimento, foi empregada uma matriz de “nylon” cuboidal, com todas as faces medindo 10,0mm, especialmente desenhada e confeccionada para esta pesquisa (Figura 3A). Os espécimes receberam aplicação de agente adesivo (Adper[™] Single Bond 2, 3M ESPE, Saint Paul, MN, EUA) da mesma maneira como se procede ao tratamento dentinário quando da realização de restaurações com esse material, seguindo as recomendações do fabricante. O material adesivo selecionado faz parte da família dos sistemas adesivos “total-etch” de frasco único, que preconiza a utilização de

ácido fosfórico a 37% previamente à utilização do adesivo. Após a aplicação do ácido, os espécimes eram lavadas e o excesso de água removido com papel absorvente mantendo-os úmidos. Em seguida, aplicava-se o adesivo com ajuda de um micro-pincel e leve jato de ar durante 30 segundos para evaporação do solvente. O adesivo era então polimerizado por 20 segundos e uma nova camada aplicada. Após a aplicação do adesivo, realizava-se a inserção e condensação da resina composta com o auxílio de uma espátula de inserção e condensação de resina composta (M13[®], Hu-Friedy, Rio de Janeiro/RJ), compactando-a contra as paredes do dispositivo, de forma que sua espessura não ultrapassasse 2,0mm (Figura 3B). A inserção da resina por meio da técnica incremental era feita até atingir a metade da altura da matriz de “nylon”, onde era posicionado o espécime orientado de forma que a interface enxerto-leito ficasse paralela à base da matriz (Figura 3C). Novos incrementos de resina eram inseridos sobre o espécime até que o compósito atingisse o topo do dispositivo (Figura 3D). Cada incremento foi polimerizado com uma fonte de luz alógena (Ultralux[®], Dabi Atlante, Ribeirão Preto/SP) durante 40 segundos. Logo após o preenchimento da matriz com o conjunto resina - espécime - resina, o dispositivo de nylon era desmontado (Figura 3E) e o conjunto polimerizado por 60 segundos em cada face assegurando uma polimerização adequada da resina (Figura 3F).

Figura 3 – Preparo dos espécimes para realização do ensaio mecânico. **A:** dispositivo de nylon quadrangular especialmente desenhado e confeccionado para inclusão dos fragmentos ósseos em resina composta; **B:** vista superior do dispositivo com incremento de resina; **C:** posicionamento do espécime sobre os incrementos de resina na metade da altura do dispositivo; **D:** espécime completamente coberto pelo compósito; **E:** dispositivo desmontado; **F:** aspecto final do bloco resina/osso.

Os espécimes foram armazenados em água deionizada a 37°C até que fossem levados à máquina de cortes seriados (SBT - South Bay Technology Inc., Modelo 650, San Clemente, CA, EUA) para obtenção dos corpos de prova para o teste de microtração. Para isto, foram fixados com godiva de baixa fusão em um suporte de acrílico (Figura 6A) e cortados paralelamente ao seu longo eixo com um disco de diamante girando em baixa velocidade com constante irrigação (Figura 4B e C). As bordas laterais que continham apenas resina foram descartadas (Figura 4D), obtendo-se quatro corpos de prova por espécime (Figura 4E e F). Este procedimento, entretanto, levou a ruptura e o descarte de alguns corpos de prova, não sendo possível, assim, haver uma uniformidade entre o número de corpos de prova por grupo de estudo. Ao término do preparo, os corpos de prova foram agrupados de acordo com os respectivos tratamentos de interface e novamente armazenados em água deionizada a 37°C por 24 horas, até a realização do ensaio mecânico.

Figura 4 – Confeção dos corpos de prova para realização do ensaio mecânico. **A:** espécime fixado em um suporte de acrílico com godiva para adaptação na máquina de cortes seriados; **B:** corte com disco de diamante em baixa velocidade paralelamente ao longo eixo dos blocos de resina/osso; **C:** vista dos cortes realizados nas laterais; **D:** aspecto do espécime após descarte das laterais de resina; **E:** divisão e corte do espécime para obtenção dos corpos de prova; **F:** aspecto final dos corpos de prova.

4.5 ENSAIO MECÂNICO DE MICROTRAÇÃO

Previamente à realização do ensaio de microtração, cada corpo de prova foi devidamente medido na sua altura, largura e espessura, com auxílio de um paquímetro eletrônico digital (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda., São Paulo/SP), permitindo a obtenção da área da secção transversal em mm², de maneira individualizada (Figura 5A). Os corpos de prova foram individualmente fixados ao dispositivo de microtração, com um adesivo à base de cianocrilato (Loctite® - Super Bonder Flex Gel, Henkel Ltda., São Paulo/SP) nas suas extremidades (Figura 5B), e submetidos ao ensaio mecânico na máquina de ensaio universal (DL 2000/1000, EMIC - Equipamentos e sistemas de ensaio Ltda., São José dos Pinhais/PR) a uma velocidade de 0,5 mm/minuto, com uma célula de carga de 50N. Durante o ensaio de microtração, todo o evento foi monitorado por um programa de computador (Tesc, versão 3.04, EMIC - Equipamentos e sistemas de ensaio Ltda., São José dos Pinhais/PR) que apresentava na tela um gráfico representando a carga ou tensão em função do deslocamento ou deformação (N/mm). No momento da fratura (Figura 5C), o ensaio era imediatamente cessado e os dados coletados e salvos para posterior cálculo e análise dos valores da resistência à tração e do módulo de elasticidade.

Figura 5 – Ensaio mecânico de microtração. **A:** medição das dimensões do corpo de prova com paquímetro digital; **B:** corpo de prova fixado ao dispositivo ligado a máquina de ensaio universal com adesivo a base de cianocrilato; **C:** fratura do corpo de prova após a realização do ensaio de microtração.

A resistência à tração (RT) representa a tensão máxima aplicada sobre um determinado material até sua ruptura, calculada pelo valor máximo de tensão (Tmax.) gerado para fratura/rompimento do corpo de prova em Newtons (N), dividido pela área de secção transversal (mm²), obtida pela mensuração da largura multiplicada pela espessura da área central do corpo de prova, através da seguinte fórmula matemática:

$$RT \text{ (MPa)} = Tmax. \text{ (N)} / \text{Área (mm}^2\text{)}$$

O módulo de elasticidade (E) representa a taxa de deformação de um material em função de uma determinada tensão (rigidez do material), calculado pelo valor da resistência à tração (MPa) dividido pelo coeficiente de deformação (d) correspondente ao ponto de maior tensão gerado para fratura/rompimento do corpo de prova no gráfico de tensão versus deformação:

$$E \text{ (MPa)} = RT \text{ (MPa)} / d \text{ (mm)}$$

E = Módulo de elasticidade (MPa)

RT = Resistência à tração (MPa)

d = Coeficiente de deformação (mm)

O coeficiente de deformação, por sua vez, é expresso pelo comprimento inicial do corpo de prova dividido pela a deformação sofrida durante o ensaio:

$$d \text{ (mm)} = Li \text{ (mm)} / \text{deformação (mm)}$$

d = Coeficiente de deformação (mm)

Li = Comprimento inicial do corpo de prova (mm)

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após o teste de tração, os corpos de prova foram lavados com solução tampão de cacodilato de sódio e submetidos ao processamento de desidratação com banhos de solução de acetona em concentração crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após desidratação, os fragmentos foram acondicionados em um local limpo e livre de poeira por 12 horas, para serem então colados com esmalte de unha em um porta-amostras do microscópio (“Stub”) na forma de dispositivos metálicos de alumínio sobre uma mesa circular com aproximadamente 1 cm de diâmetro. Em seguida, os fragmentos foram metalizados no aparelho “Sputer Coating” (BAL-TEC-SCD 050, EUA) através da adição de partículas de ouro sobre as suas superfícies. O conjunto preparado foi levado ao microscópio eletrônico de varredura (JSM-T 220A, JEOL, Tóquio, Japão), regulado em 20 Kv, no aumento de 35X e no qual foram feitas as leituras e fotomicrografias com filmes ASA 100 (Fuji, Brasil). As fotografias foram posteriormente digitalizadas, permitindo as análises do local e desenho da fratura. Um espécime de cada grupo foi aleatoriamente selecionado para demonstrar o local onde ocorreu a fratura.

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores de resistência à tração e módulo de elasticidade obtidos nos ensaios de microtração foram submetidos aos testes estatísticos de análise de variância a um critério (ANOVA) e Tukey, no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 MICROTRAÇÃO

O preparo dos espécimes permitiu a obtenção de 116 corpos de prova, sendo que 21 foram desprezados porque se romperam durante o preparo na máquina de cortes e 8 classificados como *outliers* por apresentarem os resultados de resistência à tração e/ou do módulo de elasticidade classificados como fora do padrão dos espécimes. Dos 87 corpos de prova avaliados e submetidos à análise estatística, 19 pertenciam ao G-EDTA, 24 ao G-EDTA-P, 23 ao G-P e 21 ao G-C (Tabela 1).

Tabela 1 – Número total de corpos de prova obtidos, testados, classificados como outliers e desprezados* nos diferentes grupos experimentais e controle.

Grupos	Total	Testados	Outliers	Desprezados*
G-EDTA	32	22	3	10
G-EDTA-P	28	26	2	2
G-P	28	24	1	4
G-C	28	23	2	5
Somatória	116	95	8	21

* Rompidos durante o corte.

5.1.1 Resistência à tração

A média dos valores da resistência à tração e a carga ou tensão máxima necessários para extrapolar o limite elástico provocando a ruptura/fratura dos corpos de prova demonstraram a existência de um padrão de comportamento mecânico similar nos diferentes grupos. O G-C apresentou a maior resistência à tração ($2,086 \pm 1,200$ MPa), seguido do G-EDTA ($2,033 \pm 0,976$ MPa), G-EDTA-P ($1,977 \pm 0,795$ MPa) e G-P ($1,826 \pm 0,800$ MPa). Quando comparados pelo teste ANOVA a um critério, os valores médios encontrados para cada grupo não demonstraram diferença entre si ($p=0.819$) (Tabela 2 e Figuras 6 e 7). Os corpos de prova classificados como *outliers* não foram incluídos na análise estatística.

Tabela 2 – Valores médios obtidos para resistência à tração (RT) nos diferentes grupos estudados.

Grupos	Corpos de prova (n)	RT (MPa)
G-EDTA	19	2,033 ± 0,976 ^a
G-EDTA-P	24	1,977 ± 0,795 ^a
G-P	23	1,826 ± 0,800 ^a
G-C	21	2,086 ± 1,200 ^a

Letras iguais significam ausência de diferença estatística.

Figura 6 – Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão.

Figura 7 – Representação gráfica dos valores da resistência à tração por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Destaque para o corpo de prova com maior resistência à tração entre os grupos.

O desempenho individual dos corpos de prova deste teste encontram-se nas tabelas dos anexos B-E.

5.1.2 Módulo de elasticidade

A similaridade mecânica observada na análise da resistência à tração, não foi encontrada na análise do módulo de elasticidade. Assim como na análise da resistência à tração, o G-C também apresentou o maior módulo de elasticidade ($38,80 \pm 22,72$ MPa), seguido do G-EDTA-P ($26,24 \pm 14,17$ MPa), G-EDTA ($25,11 \pm 9,89$ MPa) e G-P ($17,51 \pm 7,94$ MPa). A comparação estatística, realizada pelo teste de ANOVA a um critério, revelou haver diferença significativa apenas entre os resultados do grupo controle (G-C) e os demais grupos experimentais ($p=0.0001$). O procedimento de comparação múltipla, segundo o método de Tukey, permitiu identificar que o módulo de elasticidade do G-C foi estatisticamente diferente do G-EDTA-P ($p=0.028$), do G-EDTA ($p=0.022$) e do G-P ($p=0.000$) (Tabela 3 e Figuras 8 e 9). Assim como na análise da resistência à tração, os corpos de prova classificados como *outliers* não foram incluídos na análise estatística.

Tabela 3 – Comparação entre o módulo de elasticidade médio (E) nos grupos estudados.

Grupos	Corpos de prova (n)	E (MPa)	p
G-EDTA	19	$25,11 \pm 9,89^a$	0,022
G-EDTA-P	24	$26,24 \pm 14,17^a$	0,028
G-P	23	$17,51 \pm 7,94^a$	0,000
G-C	21	$38,80 \pm 22,72^b$	

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$)

Figura 8 – Representação gráfica da média dos valores do módulo de elasticidade, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão.

Figura 9 – Representação gráfica dos valores do módulo de elasticidade por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Destaque para o corpo de prova com maior valor do módulo de elasticidade entre os grupos (G-C, CP18 - E = 88,82 MPa).

Com o objetivo de facilitar a leitura e análise do comportamento dos diferentes corpos de prova avaliados entre os grupos, os valores da resistência à tração (RT) e módulo de elasticidade (E) foram agrupados e apresentados na forma de gráficos nas figuras 10 e 11.

O desempenho individual dos corpos de prova deste teste encontram-se nas tabelas dos anexos F-I.

Figura 10 – Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração e módulo de elasticidade, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão.

Figura 11 – Representação gráfica da média dos valores de resistência à tração e módulo de elasticidade por dispersão, em MPa, para cada grupo. As barras dentro das colunas são representações do desvio padrão. Observar o maior desvio padrão e discrepância de resultados no G-C.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

5.2.1 G-EDTA

Embora a análise superficial não tenha permitido identificar o local exato e o desenho da fratura/rompimento do corpo de prova, observa-se que a mesma ocorreu ao nível das trabéculas ósseas formadas entre as superfícies corticais do enxerto e do leito receptor após 90 dias de reparo (Figura 12).

Figura 12 – **A:** Fotomicrografia de um corpo de prova do G-EDTA no qual se pode notar em visão panorâmica, no aumento de 35X, a região da fratura/rompimento ao nível das trabéculas ósseas formadas entre a face interna do enxerto ósseo (E) (seta preta) e a cortical externa do leito receptor (L) (seta branca). O destaque em vermelho é para a região da fratura/rompimento do espécime. **B** representa uma ampliação (aumento 100X) da interface enxerto-leito de um outro corpo de prova do G-EDTA rompida durante o ensaio micromecânico. **C** corresponde ao destaque em amarelo de **B**, no aumento de 350X, onde se observa o aspecto das trabéculas ósseas (setas amarelas) presentes na interface enxerto-leito. Letra R representa a resina composta no corpo de prova.

5.2.2 G-EDTA-P

Assim como no G-EDTA, não foi possível detectar o local exato e o desenho da fratura/rompimento do corpo de prova, muito embora a mesma também tenha ocorrido ao nível das trabéculas ósseas formadas na interface enxerto-leito.

Figura 13 – **A:** Fotomicrografia de um corpo de prova do G-EDTA-P submetido ao ensaio micromecânico. Observa-se a presença e a disposição das trabéculas ósseas na região da interface enxerto-leito (destaque em vermelho) no aumento de 75X. **B** corresponde ao destaque em vermelho de **A** no aumento de 200X, e possibilita a melhor observação dessas trabéculas ósseas (T). Seta branca representa a cortical interna do enxerto. Seta preta representa a cortical externa do leito receptor. Letra R representa a resina no corpo de prova.

5.2.3 G-P

Assim como no G-EDTA e G-EDTA-P, a análise superficial não permitiu identificar o local exato e o desenho da fratura do corpo de prova ao nível das trabéculas ósseas formadas entre as superfícies corticais interna do enxerto e externa do leito receptor (Figuras 14, 15 e 16).

Figura 14 – **A**: Representação de um corpo de prova do G-P, no aumento de 50X, submetido ao teste micromecânico. A área destacada em vermelho corresponde à região da interface enxerto-leito. Observa-se a impossibilidade de identificação do local e desenho da fratura/rompimento do corpo de prova. **B** corresponde ao aumento de 100X do destaque em amarelo de **A**. Seta preta representa a cortical interna do enxerto (E). Seta branca representa a cortical externa do leito receptor (L). Letra R representa a resina no corpo de prova.

Figura 15 – **A**: Representação do local da fratura/rompimento da interface enxerto-leito em um corpo de prova do G-P no aumento de 200X. Notar que a fratura, assim como no G-EDTA e G-EDTA-P, correu ao nível do osso medular formado entre o enxerto e o leito. **B** corresponde ao aumento de 350X de **A**.

Figura 16 – Fotomicrografia em visão de topo das superfícies fraturadas/rompidas no ensaio micromecânico de um corpo de prova do G-P. Diferentemente das figuras 12, 13, 14 e 15, as porções fragmentadas desse corpo de prova foram posicionadas verticalmente para a obtenção dessa imagem. Observa-se o conteúdo de osso medular e a disposição mais superficial das trabéculas ósseas (T) na interface enxerto-leito (destaque em verde), e as superfícies corticalizadas (C) do enxerto (à esquerda) e do leito (à direita) mais ao fundo. Setas brancas indicam a distribuição mais superficial das trabéculas ósseas. A presença de trabéculas ósseas em contato com a cortical interna do enxerto indica a invasão do conteúdo medular na interface enxerto-leito durante o reparo.

5.2.4 G-C

Embora a análise superficial, assim como observado nos demais grupos não tenha permitido identificar o local exato e o desenho da fratura/rompimento do corpo de prova, observa-se que a mesma ocorreu ao nível das trabéculas ósseas formadas entre as superfícies corticais do enxerto e do leito receptor após 90 dias de reparação (Figura 17).

Figura 17 – **A**: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um corpo de prova do G-C (destaque em vermelho) no aumento de 50X. Notar que a fratura apresenta o mesmo padrão observado nos grupos experimentais e ocorreu ao nível das trabéculas ósseas (T) formadas entre a cortical interna do enxerto (seta preta) e a cortical externa do leito receptor (seta branca). **B** corresponde ao aumento de 75X da área destacada em amarelo de **A**. **C** corresponde ao aumento de 100X da área destacada em verde de **B**. **D** representa a visão de topo da superfície interna do enxerto fraturada/rompida no ensaio micromecânico. Notar as projeções das trabéculas ósseas (T) advindas do leito em direção ao enxerto (setas brancas) e a presença da cortical interna do enxerto mais ao fundo.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Desde o aparecimento dos enxertos ósseos autógenos em bloco como um adjunto à implantodontia, diferentes técnicas e materiais têm sido estudados com o objetivo de reconstruir a arquitetura óssea normal dos rebordos maxilares atróficos. A possibilidade de combinação entre os diferentes procedimentos propostos produziu uma grande variabilidade de resultados, com inúmeras possibilidades de tratamento, os quais, se adequados, resultam em restabelecimento da forma e função. Entretanto, o prognóstico final dos procedimentos reconstrutivos ósseos empregando enxertos em bloco ainda é de difícil determinação, seja pela reabsorção de magnitude imprevisível, seja pela deficiência de incorporação ou consolidação do enxerto ao leito receptor.

Ao longo do tempo, variações técnicas na cirurgia de enxerto ósseo foram propostas para aumentar sua previsibilidade de sucesso, como modificações da interface enxerto-leito visando à otimização da consolidação, com destaque para a descorticalização do leito receptor por perfuração (Gordh et al., 1997; Faria et al., 2008) ou desgaste (Alberius; Gordh, 1998; De Carvalho; Vasconcelos; PI, 2000). A desmineralização do enxerto por agentes químicos e soluções ácidas (LEWANDROWSKI et al., 1997; Murugan; Ramakrishna; Rao, 2008; O'Donnell et al., 1996; Pietrzak, 2006; REZENDE, 2008) também alcançou resultados expressivos na geração de mecanismos de osteoindução e se impôs como parte do processo de produção de biomateriais, uma vez que matrizes ósseas desmineralizadas permitem a liberação de BMPs conferindo maior potencial osteogênico ao material de enxerto (Reddi; Wientroub; Muthukumaren, 1987; URIST, 1965; URIST et al., 1970 e 1983), além de induzirem a proliferação de MSCs (Wang; Glimcher, 1999). Mais recentemente, o aumento da capacidade de reparação por meio da incorporação de BMPs a partir de DBM alógena foi comprovado também em enxertos ósseos autógenos (Canter; Vargel; Mavili, 2007).

Embora o potencial osteoindutor da DBM já tenha sido comprovado, o aumento da disponibilidade das BMPs resultantes do processo de desmineralização ainda não é um evento completamente esclarecido. O conteúdo mineral do tecido ósseo inibe a função das proteínas presentes no interior da fase orgânica, ao passo que a desmineralização expõe uma série de proteínas e moléculas ósseas viáveis ao mesmo tempo em que produz porosidade superficial, requisitos estes

considerados ideais em um material osteoindutor (Murugan; Ramakrishna; Rao, 2008). Do mesmo modo, sabe-se que essas proteínas são dependentes de interação com a água para assumirem sua conformação tridimensional e desempenharem sua atividade biológica, sendo provável que o processo de desmineralização resulte em maior e mais completa hidratação da matriz óssea, modificando o microambiente local e permitindo a formação de um gradiente concentrado de BMPs (PIETRZAK, 2006).

Vários estudos em animais e em humanos comprovaram o sucesso no emprego de enxertos ósseos desmineralizados (DFDBA) de diferentes procedências e tipos de apresentação (blocos ou particulados) em defeitos craniofaciais, tendo como embasamento o conteúdo de BMPs e suas propriedades osteoindutoras (LEWANDROWSKI et al., 1997; O'DONNELL et al., 1996; RABIE; WONG; HAGG, 2000; WANG; GLIMCHER, 1999).

De maneira muito semelhante à hipótese central desta dissertação, O'Donnell et al. (1996) e Lewandowski et al. (1997) propuseram a combinação da perfuração a laser com a desmineralização como forma de tratamento de fragmentos ósseos que seriam posteriormente transplantados. Observaram que esse tratamento resultava em um maior estímulo à osteogênese com formação de novo osso inclusive dentro dos orifícios criados pela perfuração, sem, no entanto, alterar a resistência mecânica dos fragmentos. Todavia, a proposta desses autores, além de clinicamente inviável (desmineralização por HCl durante 3 horas), levava à perda de elementos celulares essenciais para formação de novo osso uma vez que o tecido transplantado era excessivamente exposto ao tratamento com ácido.

A hipótese levantada, porém, não comprovada por esta dissertação, foi a de que a desmineralização das superfícies ósseas de contato do enxerto e do leito receptor, quando da realização de enxertos autógenos em bloco do tipo *onlay*, aumentaria a resistência de união entre essas duas estruturas. Pelo menos no período de observação estudado (90 dias). Esta hipótese partiu da observação da fisiologia da remodelação óssea e do princípio de que o processo de desmineralização teria o potencial de promover a consolidação precoce desses enxertos, uma vez que a desmineralização pela produção local de ácidos é a primeira etapa da reabsorção e remodelação fisiológica do tecido ósseo (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; MELCHER, 1976; ROODMAN, 1999).

A reabsorção óssea é um evento que precede a neoformação e coordenado pela expressão de fatores osteoclastogênicos (RANKL, RANK e OPG) presentes na membrana citoplasmática que estimulam a diferenciação e a posterior ativação dessas células (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001; TEITELBAUM, 2000). Os osteoclastos iniciam a dissolução da matriz mineralizada pela liberação de substâncias ácidas (ácido láctico e cítrico) e do íon H^+ , que, subsequentemente, levam à ativação de enzimas específicas (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003), sendo que a acidificação do meio aumenta a atividade dos osteoclastos (KIM et al., 2001). Estas reabsorvem o tecido mineralizado, formando cavidades que vão sendo recobertas com osteopontina e outras proteínas produzidas pelos próprios osteoclastos (DODDS et al., 1995; EK-RYLANDER et al. 1994) que participam na migração e diferenciação de células osteoprogenitoras responsáveis pela deposição de novo osso (DODDS et al., 1995).

Estas informações forneceram base científica suficiente para supor que o potencial máximo de formação de novo osso seria alcançado sobre uma superfície capaz de reproduzir a topografia rugosa naturalmente gerada pela ação dos osteoclastos.

Recentemente, Rezende (2008) demonstrou que a antecipação intencional deste processo reabsortivo, por meio da desmineralização com ácido cítrico das superfícies contactantes de enxertos *onlay* em cobaias, promoveu maior densidade de osso neoformado na interface enxerto-leito e maior extensão de superfícies ósseas consolidadas nos espécimes desmineralizados. Esta iniciativa partiu da observação dos tradicionais e bem sucedidos resultados alcançados na cicatrização de feridas periodontais quando substâncias ácidas são empregadas para biomodificação de raízes dentais hipermineralizadas e contaminadas por produtos bacterianos oriundos do ambiente da bolsa periodontal (HERITIER, 1983; REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975). Como um dos principais efeitos da desmineralização radicular é a exposição do colágeno tipo I da matriz orgânica dentinária, para que este se una e dê ancoragem às fibras colágenas do retalho, os mesmos princípios seriam aplicáveis à superfície óssea a receber enxertos.

Nesta dissertação, a proposta de se promover a desmineralização com EDTA a 24% embasou-se na observação de ação equivalente desse agente a outras substâncias ácidas empregadas com os mesmos propósitos e objetivou a preservação dos tecidos por ser uma substância com pH neutro quelante de cálcio

(BLOMLÖF et al., 2000). O estudo piloto desta dissertação, no qual calvárias frescas de coelhos foram desmineralizadas por vários agentes (ácido cítrico em solução aquosa a 37% e 50%, ácido cítrico a 37% e tetraciclina e EDTA gel a 24%), comprovou à MEV que a característica superficial do osso condicionado era semelhante entre os agentes (Figura 18 A-D). Outros autores demonstraram capacidade de adesão e retenção de coágulo e fibrina (ainda que inferior ao ácido cítrico) quando fragmentos de dentina eram tratados com EDTA (BAKER; PAVLOW; WIKESJÖ, 2005). Ruggeri Jr et al. (2007) demonstraram, com metodologia de ponta, empregando marcação por nanopartículas, que a desmineralização de blocos dentinários com EDTA a 17% causou a exposição de fibrilas colágenas e proteoglicanas sem qualquer degradação das mesmas, produzindo uma superfície que representou substrato adequado para a inserção de fibroblastos.

Figura 18 – Estudo piloto em calvárias frescas de coelho - Fotomicrografias demonstrando o efeito do condicionamento ácido e a desmineralização (porosidade) da superfície cortical externa da calvária condicionadas por 3 minutos através de diferentes agentes químicos e soluções ácidas. **A:** gel de EDTA a 24% pH neutro; **B:** solução aquosa de ácido cítrico a 37%; **C:** solução aquosa de ácido cítrico a 50%; **D:** associação de ácido cítrico a 37% e tetraciclina na forma de gel.

As perfurações produzidas no leito almejavam a vascularização precoce do fragmento ósseo totalmente cortical por meio da exposição dos espaços medulares do leito (LEWANDORWSKI et al., 1997; O'DONNELL et al., 1996). Por ser um procedimento amplamente empregado e reconhecido por aumentar a consolidação dos enxertos (ALBERIUS; GORDH, 1998; De CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000; FARIA et al., 2008; GORDH et al., 1997; GORDH; ALBERIUS, 1999), foi incorporado à técnica neste estudo. Um grupo desmineralizado, mas sem perfurações foi introduzido (G-EDTA) para testar o efeito isolado do EDTA. Entretanto, a desmineralização por EDTA da cortical óssea receptora de enxertos em bloco com ou sem perfurações no leito receptor não produziu alterações significantes na resistência à tração da interface enxerto-leito, pelo menos nos moldes nos quais esta pesquisa foi realizada.

As fotomicrografias eletrônicas de varredura indicaram que a fratura/rompimento ocorreu na região trabecular entre o enxerto e o leito. A ocorrência da fratura/rompimento nesta posição e o período avançado de observação explicam, em parte, a semelhança de resultados observados para o teste de tração entre os grupos. Supõe-se que aos 90 dias de reparação as trabéculas ósseas formadas na interface enxerto-leito apresentam estágio de maturação equivalente, não havendo razão para se esperarem resultados diferentes quanto à resistência ao teste de tração. Especulativamente, aos 90 dias, a força de união das superfícies de consolidação entre o osso neoformado na interface e o leito receptor seria já superior à resistência das trabéculas ósseas recém-formadas na interface.

Em realidade, ao se analisarem os dados microscópicos do trabalho de Rezende (2008), verifica-se que a superioridade mais evidente da densidade óssea e da extensão de superfícies de consolidação em interfaces desmineralizadas em relação às não desmineralizadas ocorreu aos 30 dias de reparação, diminuindo essa diferença aos 90 dias. Este fato levanta a suspeita de que os testes mecânicos aqui empregados, se realizados mais precocemente (30 dias), poderiam ter gerado diferenças na avaliação.

Outra hipótese que emergiu deste estudo é que provavelmente, o teste de resistência à tração pode não ter representado o melhor método para avaliação do efeito da ação da desmineralização na situação clínica. Na maioria dos casos, o enxerto em bloco é realizado para receber a instalação de implantes, momento no

qual pode ocorrer o destacamento do bloco como resultado de uma força de impulsão e não de tração, do implante que penetra na interface. Assim, poderia ser sugerida a avaliação da frequência do destacamento do fragmento enxertado quando da inserção de implantes na interface com metodologia a ser desenvolvida.

A média dos valores de resistência à tração, ou seja, a carga ou tensão máxima necessária para extrapolar o limite elástico do osso provocando a fratura/ruptura dos corpos de prova, demonstrou um comportamento mecânico similar dos grupos de estudo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0.819$). O G-C apresentou a maior resistência à tração ($2,086 \pm 1,200$ MPa), seguido do G-EDTA ($2,033 \pm 0,976$ MPa), G-EDTA-P ($1,977 \pm 0,795$ MPa) e G-P ($1,826 \pm 0,800$ MPa). Na análise dos resultados da resistência à tração, observa-se que os valores aqui apresentados são muito baixos em comparação à maioria dos resultados presentes na literatura. Os mais próximos destes, foram os de Sanada (2007), no grupo onde os espécimes corticais haviam sido desmineralizados ($18,547 \pm 3,682$ MPa) e os de Ramasany e Akkus (2007), que utilizaram o mesmo modelo experimental para testar a resistência à tração no quadrante anterior ($0,07 \pm 0,02$ GPa) e posterior ($0,04 \pm 0,01$ GPa) e à compressão no quadrante anterior ($0,09 \pm 0,02$ GPa) e posterior ($0,08 \pm 0,02$ GPa) de fragmentos corticais obtidos do fêmur de camundongos.

O teste de microtração empregado, embora tenha sido primeiramente descrito para avaliação da resistência de união de materiais odontológicos (SANO et al., 1994), também foi aplicado anteriormente para testar as propriedades do esmalte (CARVALHO et al., 1996), da dentina (AKHTER; FAN; RHO, 2004; BOWEN; RODRIGUEZ, 1962; CARVALHO et al., 2001; SANO et al., 1994) e do osso (Braidotti et al., 2000; RHO, ASHMAN; TURNER, 1993; RYAN; WILLIAMS, 1989; SANADA, 2007). É um método que pode ser adaptado às necessidades de investigação de diferentes hipóteses experimentais, desde que as modificações não comprometam o princípio mecânico do teste. Fundamentalmente, o teste é usado para calcular a resistência à tração de um determinado material através da relação da tensão máxima necessária para provocar a fratura/rompimento do corpo de prova e sua área de secção transversal. Quando a máquina de ensaio universal e os programas específicos utilizados permitem mensurar o deslocamento ou a deformação sofrida pelo corpo de prova durante o ensaio, o módulo de elasticidade

pode ser obtido. A identificação do módulo de elasticidade do material é importante para determinar a deformação máxima que o mesmo consegue suportar dentro da sua fase elástica, ou seja, antes de sua fratura ou rompimento. De uma maneira generalista, significa dizer que materiais com maior módulo de elasticidade, necessitam de maior carga para induzir sua deformação, assim como quanto menor for a deformação sofrida pelo material maior será seu módulo de elasticidade (ANUSAVICE; 1999; OGAWA; TANAKA; KOYANO, 2000; UZUN; HERSEK; TINÇER, 1999). É importante destacar que o módulo de elasticidade é uma constante de proporcionalidade da tensão em função da deformação e, ao contrário da resistência flexional, não constitui uma medida de resistência do material.

A similaridade mecânica observada na análise da resistência à tração não foi encontrada na análise do módulo de elasticidade, de modo que os corpos de prova apresentaram diferentes padrões de comportamento e rigidez de acordo com o método de tratamento proposto para interface enxerto-leito. O G-C apresentou a maior média de módulo de elasticidade ($38,80 \pm 22,72$ MPa), seguido do G-EDTA-P ($26,24 \pm 14,17$ MPa), G-EDTA ($25,11 \pm 9,89$ MPa) e G-P ($17,51 \pm 7,94$ MPa). A análise estatística permitiu identificar diferenças significantes apenas entre o grupo controle (G-C) e os grupos G-EDTA-P ($p=0,028$), G-EDTA ($p=0,022$) e G-P ($p=0,000$). Como o módulo de elasticidade é uma constante de proporcionalidade da tensão em função da deformação, estes resultados traduzem que o G-C sofreu a menor deformação antes de ocorrer a fratura/rompimento. Durante o procedimento de instalação de implantes, o destacamento do enxerto pode ocorrer por deformação insuficiente das estruturas ósseas para comportar a penetração do implante. Neste sentido, parece lícito afirmar que os grupos que sofreram desmineralização e/ou perfurações foram os que apresentaram comportamento elástico mais adequado para os enxertos ósseos em bloco, representando talvez um resultado ainda mais importante que o teste de resistência à tração.

Os valores aqui encontrados para resistência à tração e módulo de elasticidade não encontraram similaridade na literatura (Tabela 4). Provavelmente isto se deva à complexidade estrutural do osso, classificado em cinco níveis por Bilezikian; Rasz e Rodan (2002). Além disso, conforme relatado por Lucchinetti et al. (2000), a análise das propriedades mecânicas do osso medular é difícil por serem diretamente influenciadas pela estrutura molecular, pela relação entre os componentes orgânicos e inorgânicos e, provavelmente, pela presença de lacunas

no seu interior. Soma-se, ainda, o fato deste trabalho ter sido o primeiro realizado com a proposta de avaliar a resistência de união entre as duas superfícies contactantes em um tecido recém-remodelado, não havendo parâmetros reais de resistência à tração e/ou módulo de elasticidade na literatura para fins de comparação (Tabela 4).

Tabela 4 – Revisão dos modelos experimentais propostos para avaliação da resistência à tração (RT) e módulo de elasticidade (E) do tecido ósseo desde o ano de 1974 até 2007.

Autor	Modelo experimental	RT e E (GPa)/qualidade óssea
Reilly; Burstein. 1974	Revisão	E= 15,0/Cortical
Townsend; Rose, 1975	Deformação	E= 14,10/Cortical
Ashman et al., 1984	Ultra-som (Longitudinal)	E= 21,0 Cortical
	Ultra-som (Transversal)	E= 13,0/Cortical
Kuhn et al., 1989	Flexão	E= 3,81/Medular
		E= 4,89/Cortical
Mente; Lewis, 1989	Flexão em cantilever	E= 6,20±1,8/Cortical
Ryan; Williams, 1989	Tração	E= 0,76±0,39/Cortical
Choi et al., 1990	Flexão	E= 5,44±1,3/Cortical
		E= 4,59±1,6/Medular
Rho; Ashman; Turner (1993)	Tração	E= 10,4±3,5/Medular
	Ultra-som	E= 18,6±3,5/Medular
		E= 14,8±1,4/Cortical
Van Rietbergen et al., 1995	Elemento finito	E= 20,7±1,9/Cortical
		E= 2,23/Medular
Rho; Tsui; Pharr, 1997	Nanoidentação (Transversal)	E= 13,5±2,0/Medular
	Nanoidentação (Longitudinal)	E= 22,5±1,3/Ósteons
		E= 25,8±0,7/Lamelas

Continua

Continuação

Turner et al., 1999	Microscopia Acústica	E= 17,5±1,1/Medular E= 14,9±0,5/Cortical
	Nanoidentação	E= 18,1±1,7/Medular E= 16,5±0,3/Cortical
Zysset et al., 1999	Nanoidentação (Diáfise Femoral)	E= 19,1±5,4/Ósteons E= 21,2±5,3/Lamelas
	Nanoidentação (Cabeça Femoral)	E= 15,8±5,3/Ósteons E= 17,5±5,3/Lamelas E= 11,4±5,6/Trabéculas
Braidotti et al., 2000	Tração (Hidratados)	E=3,5±1,2/Cortical RT= 0,03±0,007/Cortical
	Tração (Desidratados)	E=10,3±2,5/Cortical RT= 0,036±0,010/Cortical
Bini et al., 2002	Compressão	E= 1,46±0,2/Trabéculas
	Tração	E= 1,89±0,3/Trabéculas
Ramasany; Akkus, 2007	Microtração (Quadrante anterior)	RT= 0,07±0,02/Cortical E= 1,88±0,42/Cortical
	(Quadrante posterior)	RT= 0,04±0,01/Cortical E= 1,26 ±0,46/Cortical
	Compressão (Quadrante anterior)	RT= 0,09±0,02/Cortical E= 3,25±0,49/Cortical
	(Quadrante posterior)	RT= 0,08±0,02/Cortical E= 3,11±1,17/Cortical
Sanada, 2007	Microtração (Mineralizado)	RT= 0,13±0,035/Cortical E=1,317±0,208/Cortical
	Microtração (Desmineralizado)	RT= 0,018±0,003/Cortical E= 0,50±0,011/Cortical
Rodrigues, 2009	Microtração	RT=0,0021±0,0012/Trabéculas
	Enxerto em bloco <i>onlay</i>	E=0,0388±0,0227/Trabéculas

Os resultados aqui apresentados não foram capazes de demonstrar vantagem da desmineralização do leito receptor por EDTA previamente à fixação de enxertos ósseos autógenos em bloco em tíbia de coelhos quanto à resistência à tração. Investigações adicionais procurando analisar alterações estruturais talvez possam justificar as diferenças encontradas nos módulos de elasticidade.

É possível que a variação no modelo experimental, tipo de agente desmineralizante, tempo de aplicação e tipo de teste mecânico possa, em pesquisas futuras, confirmar ou desmentir estes achados. Pesquisas promissoras neste sentido parecem ser as análises histológicas e bioquímicas, através das quais seria possível avaliar a expressão de citocinas e proteínas ósseas liberadas pelo processo de desmineralização na interface enxerto-leito e assim, buscar embasamento para esta nova proposta de tratamento.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Dentro da metodologia utilizada e para a amostra empregada nesta pesquisa concluiu-se que:

- A desmineralização por EDTA das superfícies ósseas de contato em enxertos autógenos em bloco do tipo *onlay* não interfere na resistência à tração da interface independentemente da perfuração do leito receptor;
- A desmineralização das superfícies ósseas de contato em enxertos autógenos em bloco do tipo *onlay* e a perfuração do leito receptor aumentaram a deformação dos corpos de prova sugerindo um melhor comportamento elástico nesses grupos.

Referências

REFERÊNCIAS

Akhter MP, Fan Z, Rho JY. Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains. *Calcif Tissue Int.* 2004;75(5):416-20.

Alberius P, Gordh M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(12):1382-6.

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

Anusavice, K. *Materias Dentários.* Philips. São Paulo: Guanabara Koogan. 1999.

Ashman RB, Cowin SC, Van Buskirk WC, Rice JC. A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomech.* 1984;17(5):349-61.

Baker DL, Pavlow SA, Wiskejö UME. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with proteins constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005;32:561-6.

Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of Bone Biology* 2ed. San Diego: Academic Press, v.1. 2002.

Bini F, Marinozzi A, Marinozzi F, Patanè F. Microtensile measurements of single trabeculae stiffness in human femur. *J Biomech.* 2002; 35(11):1515-9.

Blomlöf LB, Jonsson BA, Blomlöf JP, Lindskog SF. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. Part II. Surgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000;20(6):567-73.

Bowen RL, Rodriguez MS. Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and restorative materials. *J Am Dent Assoc.* 1962;64:378-87.

Bowers G, Felton F, Middleton C, Glynn D, Sharp S, Mellonig J, et al. Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralized freeze - dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol.* 1991;62(11):690-702.

Bowman SM, Gibson LJ, Hayes WC, McMahon TA. Results from demineralized bone creep tests suggest that collagen is responsible for the creep behavior of bone. *J Biomech Eng.* 1999; 121(2):253-8.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.

Braidotti P, Bemporad E, D'Alessio T, Sciuto SA, Stagni L. Tensile experiments and SEM fractography on bovine subchondral bone. *J Biomech.* 2000; 33:1153-7.

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

Burstein AH, Wright TM. *Fundamentals of orthopedics biomechanics*: Williams & Wilkins. 1994.

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

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

Canter HI, Vargel I, Mavili ME. Reconstruction of mandibular defects using autografts combined with demineralized bone matrix and cancellous allograft. *J Craniofac Surg.* 2007;18(1):95-100.

Carvalho RM, Yoshiyama M, Brewer PD, Pashley DH. Dimensional changes of demineralized human dentine during preparation for scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):379-86.

Chen NT, Glowacki J, Bucky LP, Hong H-Z, Kim W-K, Yaremchuk MJ. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plast Reconstr Surg.* 1994;93(4):714-22.

Choi K, Kuhn JL, Ciarelli MJ, Goldstein SA. The elastic moduli of human subchondral, trabecular, and cortical bone tissue and the size-dependency of cortical bone modulus. *J Biomech.* 1990;23(11):1103-13.

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

Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, et al. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res*. 1995;10(11):1666-80.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorilation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclast tartarate-resistant acid-phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269(21):14853-6.

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

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

Finkelman RD, Eason AL, Rakijian DR, Tutundzhyan Y, Hardesty RA. Elevated IGF-II and TGF-beta concentrations in human calvarial bone: potential mechanisms for increased graft survival and resistance to osteoporosis. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(4):732-8.

Fugazzotto PA, Vlassis J. Long-term success of sinus augmentation using various surgical approaches and grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13(1):52-8.

Gordh M, Alberius P, Lindberg L, Johnell O. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;117(6):664-70.

Gordh M, Alberius P. Some basic factors essential to autogenic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. *Scand J Plastic Reconstruct Hand Surg*. 1999;33(2):129-46.

Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting. *Plast Reconstruct Surg*. 1999;103(7):1909-18.

Gottlow J, Nyman S, Karring T. Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. *J Periodontal Res.* 1984; 19(2):214-20.

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

Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation and embryonic origin. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85(1):5-14.

Heritier M. Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric acid application on human root dentin. *J Periodontol.* 1983; 54(9):515-21.

Ito H, Koefoed M, Tiapatanaputi P, Gromov K, Goater JJ, Carmouche J. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat Med.* 2005;11:291-7.

Jensen J, Simonsen EK, Sindet-Pedersen S. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with bone grafting and osseointegrated implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48(1):27-32.

Jensen J, Sindet-Pedersen S. Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(12):1277-87.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.

Keller E, Tolman D, Eckert S. Surgical-prosthetic reconstruction of advanced maxillary bone compromise with autogenous onlay block bone grafts and osseointegrated implants: a 12-year study of 32 consecutive patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(2):197-209.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5.

Kim H-M, Kim Y-S, Woo K-M, Park S-J, Rey C, Kim Yi. Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite. *J Biomed Mater Res.* 2001;56(2):250-6.

Kuhn JL, Goldstein SA, Choi K, London M, Feldkamp LA, Matthews LS. Comparison of the trabecular and cortical tissue moduli from human iliac crests. *J Orthop Res.* 1989;7(6):876-84.

Lewandrowski K-U; Bonnasar L; Uhthoff HK. Mechanical properties of perforated and partially demineralized bone grafts. *Clin Orthop.* 1998;353:238-46.

Lewandrowski K-U, Tomford WW, Schomacker KT, Deutsch TF, Mankin HJ. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. *J Orthop Res.* 1997b;15(5):748-56.

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

Lourenço EJV. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos. [tese] Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2002.

Lucchinetti E, Thoman D, Danuser G. Review. Micromechanical testing of bone trabeculae: potentials and limitations. *J Mater Sci.* 2000;35:6057-6064.

Melcher AH. Biological processes in resorption, deposition and regeneration of bone. In: Stahl SS, editor. *Periodontal surgery. Biologic basis and technique.* Springfield: Charles C Thomas; 1976. p. 99-120.

Mente PL, Lewis JL. Experimental method for the measurement of the elastic modulus of trabecular bone tissue. *J Orthop Res.* 1989;7(3):456-61.

Misch CM, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent.* 1995;4(4):261-7.

Miranda SR, Filho HN, Padovan LEM, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin Oral Impl Res.* 2006;17(6):694-9.

Morony S, Capparelli C, Lee R, Shimamoto G, Boone T, Lacey DL, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP, and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *J Bone Miner Res.* 1999;14(9):1478-85.

Murugan R, Ramakrishna S, Rao KP. Analysis of bovine-derived demineralized bone extracts. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:2423-26.

Nevins M, Mellonig JT. The advantages of localized ridge augmentation prior to implant placement: a staged event. 1994;14(2):96-111.

Nishibori M, Betts NJ, Salama H, Listgarten MA. Short-term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. *J Periodontol.* 1994;65(10):958-66.

O'Donnell RJ, Deutsch TF, Flotte TJ, Lorente CA, Tomford WW, Mankin HJ, et al. Effect of Er:YAG laser holes on osteoinduction in demineralized rat calvarial allografts. *J Onhop Res.* 1996;14(1):108-13.

Ogawa T, Tanaka M, Koyano K. Effect of water temperature during polymerization on strenght of autopolymerizing resin. *J Prosthet Dent.* 2000;84(2):222-4.

Orsini G, Bianchi AE, Vinci R, Piatelli A. Histologic evaluation of autogenous calvarial bone in maxillary onlay bone grafts: a report of 2 cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(4):594-8.

Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg.* 1990;85(6):891-7.

Pietrzak WS. The hydration characteristics of demineralized and nondemineralized allograft bone: scientific perspectives on graft function. *J Craniofac Surg.* 2006;17(1):120-30.

Rabie AB, Wong RW, Hagg U. Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38(5):565-70.

Ramasamy JG, Akkus O. Local variations in the micromechanical properties of mouse femur: the involvement of collagen fiber orientation and mineralization. *J Biomech.* 2007;40(4):910-8.

Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaren N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):207-12.

Register AA. Bone and cementum induction by dentin demineralized in situ. *J Periodontol.* 1973;44(1):49-54.

Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol.* 1975;46(11):646-55.

Reilly DT, Burstein AH. Review article. The mechanical properties of cortical bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1974;56(5):1001-22.

Rezende MLR. Efeito da desmineralização das superfícies ósseas de contato na consolidação de enxertos autógenos em cobaias. [livre-docência] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2008.

Reynolds M, Bowers G. Fate of demineralized freeze - dried bone allografts in human intrabony defects. *J Periodontol.* 1996;67(2):150-7.

Rho JY, Ashman RB, Turner CH. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *J Biomech.* 1993;26(2):111-9.

Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials.* 1997;18(20):1325-30.

Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999;27(8):1229-41.

Ruggeri Jr A, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposure root dentin: an Immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol.* 2007; 52:1-8.

Ryan SD, Williams JL. Tensile testing of rodlike trabeculae excised from bovine femoral bone. *J Biomech.* 1989;22(4):351-5.

Sanada JT. Avaliação da resistência e módulo de elasticidade de osso mineralizado e desmineralizado pelos testes de microtração. [dissertação] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Sano H, Sano T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength-evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994;10(4):236-40.

Sant'Ana E. Sobrevida a curto prazo de implantes osseointegrados instalados em rebordos alveolares reconstruídos com enxerto autógeno. [tese] Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 1997.

Seldin ED. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. *Acta Orthop Scand.* v.Supplementum 83. 1965.

Shimano M, Shimano AC, Volpon JB. Histérese de fêmures de ratas submetidos à ensaios de flexão, em diferentes faixas etárias. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica.* 2002;18(2):89-97.

Shulman J. A previously unreported surgical technique utilizing five different grafting materials to successfully achieve simultaneous alveolar regeneration and closure of a large oronasal defect. *J Oral Implantol.* 1998;24(4):206-13.

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

Soltan M, Smiler D, Prasard HS, Rhorer MD. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. *Implant Dent.* 2007;16(4):329-39.

Summers RB. Sinus floor elevation with osteotomes. *J Esthet Dent.* 1998;10(3):164-71.

Tatum H Jr. Maxillary and sinus implants reconstruction. *Dent Clin North Am.* 1986;30(2):207-29.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504-8.

Townsend PR, Rose RM, Radin EL. Buckling studies of single human trabeculae. *J Biomech.* 1975;8(3-4):199-201.

Turner CH, Chandran A, Pidaparti RM. The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications. *Bone.* 1995;17(1):85-9.

Turner CH, Rho J, Takano Y, Tsui TI, Pharr GM. The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J Biomech*. 1999;32(4):437-41.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(698):893-9.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman OAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*. 1983;220(4598):680-6.

Urist MR, Jurist JM, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop*. 1970;68:279-93.

Uzun G, Hersek N, Tinçer T. Effect of five woven fiber reinforcements on the impact and transverse strength of a denture base resin. *J Prosthet Dent*. 1999;81(5):616-20.

Van Den Bergh JP, Ten Bruggenkate CM, Krekeler G, Tuinzing DB. Maxillary sinus floor elevation and grafting with human demineralized freeze dried bone. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(5):487-93.

Van Rietbergen B, Weinans H, Huiskes R, Odgaard A. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite-element models. *J Biomech*. 1995;28(1):69-81.

Verhoeven JW. The combined use of endosteal implants and iliac crest onlay grafts in the severely atrophic mandible: a longitudinal study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997;26(5):351-7.

Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix induced osteogenesis in rat calvarial defects: part I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int*. 1999;65(2):156-65.

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

Zysset PK, Guo XE, Hoffler CE, Moore KE, Goldstein SA. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. *J Biomech*. 1999;32(10):1005-12.

Anexos

ANEXO A – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisas em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 13/2007

Bauru 19 de junho de 2007.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“Efeito da desmineralização ácida das superfícies de contato na resistência à tração de enxertos ósseos autógenos em tibia de coelhos. Análise mecânica e à microscopia eletrônica de varredura”**, de autoria de Marcus Gustavo Silva Rodrigues, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* nesta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Resende
Docente do Departamento de Prótese (Disciplina de Periodontia)

ANEXO B – Valores individuais dos corpos de prova do G-EDTA para área de seção transversal (A), tensão máxima (Tmax) e resistência à tração (RT)

Corpo de prova	A (mm ²)	Tmax (N)	RT (N/mm ² = MPa)
1*	5,20	9,45	1,820
2	6,89	14,78	2,145
3	5,92	7,45	1,258
4	5,64	7,40	1,313
5	5,37	13,19	2,455
6*	4,51	10,23	2,267
7	8,09	10,76	1,331
8	6,58	5,43	0,825
9	7,11	13,44	1,892
10	6,96	19,86	2,853
11	7,18	23,27	3,241
12	7,75	10,28	1,327
13	6,31	2,49	0,395
14	7,03	24,45	3,481
15	8,41	17,46	2,077
16	9,98	35,42	3,549
17	6,87	3,85	0,561
18	7,30	16,24	2,226
19*	4,02	15,70	3,905
20	4,62	15,10	3,268
21	4,92	13,03	2,649
22	4,42	7,91	1,788
Média e desvio padrão			2,119±0,990
Média e desvio padrão sem os outliers			2,033±0,976

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO C – Valores individuais dos corpos de prova do G-EDTA-P para área de seção transversal (A), tensão máxima (Tmax) e resistência à tração (RT)

Corpo de prova	A (mm ²)	Tmax (N)	RT (N/mm ² = MPa)
1*	5,47	13,967	2,552
2	4,25	10,063	2,364
3	4,28	10,08	2,353
4	7,66	15,748	2,056
5	7,59	24,794	3,266
6	9,64	21,043	2,184
7	6,44	9,7749	1,518
8	6,81	20,398	2,994
9	7,01	16,393	2,336
10	6,12	15,426	2,520
11	7,18	22,282	3,102
12	5,75	7,1275	1,238
13	7,13	9,3337	1,308
14*	5,69	24,692	4,337
15	10,78	13,746	1,274
16	9,95	19,77	1,987
17	11,20	18,973	1,693
18	11,93	20,517	1,719
19	7,24	1,2897	0,178
20	5,51	11,54	2,092
21	6,71	17,191	2,560
22	5,65	16,088	2,847
23	9,33	16,835	1,804
24	7,34	10,471	1,427
25	9,17	2,0025	0,218
26	7,89	18,956	2,402
Média e desvio padrão			2,090±0,897
Média e desvio padrão sem os outliers			1,977±0,795

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO D – Valores individuais dos corpos de prova do G-P para área de seção transversal (A), tensão máxima (Tmax) e resistência à tração (RT)

Corpo de prova	A (mm ²)	Tmax (N)	RT (N/mm ² = MPa)
1*	6,85	5,19	0,758
2	5,83	11,54	1,979
3	7,71	9,93	1,287
4	6,81	6,89	1,012
5	8,58	4,48	0,522
6	9,29	17,50	1,883
7	9,36	19,08	2,038
8	7,15	6,94	0,971
9	6,23	8,28	1,329
10	6,73	12,12	1,800
11	8,49	8,67	1,021
12	7,03	8,81	1,253
13	7,76	25,12	3,237
14	7,34	20,28	2,762
15	7,15	16,00	2,236
16	8,70	18,23	2,094
17	6,83	16,48	2,412
18	7,52	8,16	1,085
19	5,73	21,43	3,742
20	4,78	9,72	2,034
21	5,74	13,78	2,398
22	6,34	13,78	2,173
23	5,57	4,09	0,734
24	6,70	13,41	2,001
Média e desvio padrão			1,782±0,812
Média e desvio padrão sem os outliers			1,826±0,800

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO E – Valores individuais dos corpos de prova do G-C para área de seção transversal (A), tensão máxima (Tmax) e resistência à tração (RT)

Corpo de prova	A (mm ²)	Tmax (N)	RT (N/mm ² = MPa)
1	5,10	7,84	1,538
2	7,91	5,97	0,755
3	6,68	4,41	0,660
4	7,50	16,29	2,172
5	5,69	18,29	3,218
6	6,15	13,24	2,152
7	5,01	7,50	1,497
8	4,19	22,04	5,256
9	3,90	9,27	2,377
10	3,80	12,35	3,249
11	6,60	6,19	0,938
12	5,84	18,38	3,146
13	6,94	14,71	2,119
14	8,40	2,44	0,291
15*	6,00	11,44	1,907
16	5,19	16,00	3,086
17	6,05	5,97	0,987
18	7,15	13,85	1,936
19*	6,20	12,64	2,039
20	5,63	6,84	1,216
21	5,91	16,19	2,738
22	5,30	6,02	1,137
23	5,63	18,80	3,340
Média e desvio padrão			2,076±1,144
Média e desvio padrão sem os outliers			2,086±1,200

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO F – Valores individuais dos corpos de prova do G-EDTA para resistência à tração (RT), coeficiente de deformação (d) e módulo de elasticidade (E)

Corpo de prova	RT (MPa)	d (mm)	E(MPa)
1*	1,820	0,023	80,19
2	2,145	0,047	45,45
3	1,258	0,050	25,35
4	1,313	0,099	13,29
5	2,455	0,124	19,77
6*	2,267	0,037	61,22
7	1,331	0,067	19,83
8	0,825	0,070	11,86
9	1,892	0,153	12,35
10	2,853	0,116	24,57
11	3,241	0,114	28,37
12	1,327	0,058	22,76
13	0,395	0,019	21,04
14	3,481	0,100	34,78
15	2,077	0,065	31,78
16	3,549	0,094	37,77
17	0,561	0,046	12,24
18	2,226	0,080	27,97
19*	3,905	0,056	70,17
20	3,268	0,079	41,23
21	2,649	0,141	18,85
22	1,788	0,064	27,79
Média e desvio padrão			31,30±18,63
Média e desvio padrão sem os outliers			25,11±9,89

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO G – Valores individuais dos corpos de prova do G-EDTA-P para resistência à tração (RT), coeficiente de deformação (d) e módulo de elasticidade (E)

Corpo de prova	RT (MPa)	d (mm)	E (MPa)
1*	2,552	0,016	159,38
2	2,364	0,039	60,33
3	2,353	0,201	11,69
4	2,056	0,123	16,74
5	3,266	0,094	34,72
6	2,184	0,095	23,02
7	1,518	0,070	21,77
8	2,994	0,082	36,45
9	2,336	0,067	35,06
10	2,520	0,052	48,30
11	3,102	0,069	44,91
12	1,238	0,037	33,30
13	1,308	0,053	24,67
14*	4,337	0,065	66,24
15	1,274	0,037	34,05
16	1,987	0,117	17,00
17	1,693	0,149	11,38
18	1,719	0,090	19,12
19	0,178	0,044	4,09
20	2,092	0,074	28,37
21	2,560	0,088	29,07
22	2,847	0,067	42,43
23	1,804	0,097	18,63
24	1,427	0,121	11,84
25	0,218	0,049	4,42
26	2,402	0,130	18,47
Média e desvio padrão			32,90±30,20
Média e desvio padrão sem os outliers			26,24±14,17

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO H – Valores individuais dos corpos de prova do G-P para resistência à tração (RT), coeficiente de deformação (d) e módulo de elasticidade (E)

Corpo de prova	RT (MPa)	d (mm)	E(MPa)
1*	0,758	0,007	109,23
2	1,979	0,057	34,52
3	1,287	0,069	18,68
4	1,012	0,102	9,90
5	0,522	0,087	6,01
6	1,883	0,126	14,99
7	2,038	0,133	15,32
8	0,971	0,117	8,30
9	1,329	0,105	12,68
10	1,800	0,115	15,59
11	1,021	0,120	8,54
12	1,253	0,108	11,58
13	3,237	0,130	24,85
14	2,762	0,116	23,75
15	2,236	0,108	20,62
16	2,094	0,096	21,82
17	2,412	0,136	17,79
18	1,085	0,092	11,84
19	3,742	0,104	35,99
20	2,034	0,094	21,61
21	2,398	0,104	23,09
22	2,173	0,101	21,48
23	0,734	0,104	7,07
24	2,001	0,120	16,71
Média e desvio padrão			21,33±20,27
Média e desvio padrão sem os outliers			17,51±7,94

* Corpos de prova classificados como outliers.

ANEXO I – Valores individuais dos corpos de prova do G-C para resistência à tração (RT), coeficiente de deformação (d) e módulo de elasticidade (E)

Corpo de prova	RT (MPa)	d (mm)	E (MPa)
1	1,538	0,056	27,49
2	0,755	0,079	9,51
3	0,660	0,078	8,43
4	2,172	0,074	29,50
5	3,218	0,100	32,17
6	2,152	0,091	23,71
7	1,497	0,039	38,39
8	5,256	0,085	61,66
9	2,377	0,094	25,32
10	3,249	0,060	54,24
11	0,938	0,058	16,28
12	3,146	0,063	49,69
13	2,119	0,070	30,44
14	0,291	0,019	15,22
15*	1,907	0,017	112,16
16	3,086	0,037	83,23
17	0,987	0,053	18,69
18	1,936	0,022	88,62
19*	2,039	0,016	128,18
20	1,216	0,028	42,79
21	2,738	0,041	66,95
22	1,137	0,029	39,73
23	3,340	0,063	52,64
Média e desvio padrão			45,87±32,01
Média e desvio padrão sem os outliers			38,80±22,72

* Corpos de prova classificados como outliers.