UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ROBERTA SANTOS DOMINGUES

**EFEITO DA DESMINERALIZAÇÃO ÁCIDA DA INTERFACE
ENXERTO-LEITO NA CONSOLIDAÇÃO DE ENXERTOS
ÓSSEOS AUTÓGENOS EM BLOCO**

**BAURU
2013**

ROBERTA SANTOS DOMINGUES

**EFEITO DA DESMINERALIZAÇÃO ÁCIDA DA INTERFACE
ENXERTO-LEITO NA CONSOLIDAÇÃO DE ENXERTOS
ÓSSEOS AUTÓGENOS EM BLOCO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de DOUTORADO em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

**BAURU
2013**

Domingues, Roberta Santos

D713e Efeito da desmineralização ácida da interface
enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos
autógenos em bloco / Roberta Santos Domingues. – Bauru,
2013.

170 p.: il.; 30cm.

Tese. (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientador: Profa. Dra. 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 em Pesquisa em
Animais da FOB-USP

Número do processo: 001/2010

Data: 23 de março de 2010

DADOS CURRICULARES

Roberta Santos Domingues

06 de outubro de 1982

Nascimento - Rio de Janeiro – RJ

Filiação

Roberto Seabra Domingues
Dulcinalva Santos Domingues

2001 – 2005

Curso de graduação em Odontologia na
Universidade Gama Filho do Rio de Janeiro

2005 – 2007

Especialização em Periodontia pela Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo

2006 – 2007

Programa de Capacitação Profissional na
Disciplina de Periodontia da Faculdade de
Odontologia de Bauru / Universidade de São
Paulo

2007 - 2009

Mestrado em Odontologia, área de concentração -
Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia
na Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo

2009 – 2013

Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas,
Área de Concentração Reabilitação Oral, linha de
pesquisa Periodontia, pela Faculdade de
Odontologia de Bauru / Universidade de São
Paulo

Trabalho realizado na Disciplina de Periodontia, Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, em colaboração com o Laboratório de Patologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho àqueles que me ensinam
a viver e a acreditar no que sou e no que posso ser!*

*Sem eles não haveria sentido na minha vida!
Agradeço a paciência, o amor incondicional e os
inúmeros momentos juntos que me fazem
ter certeza da existência de um Deus maravilhoso!*

*A vocês, **mamis, papis, vovó e sis,**
a quem devo tudo que sou! Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, pois sem Ele não estaria aqui. Agradeço todos os dias pela vida que me deu, por todas as oportunidades que colocou em meu caminho e por ter me abençoado com a família que tenho!*

*Aos meus pais, **Roberto e Dulci**, pela longa espera e compreensão durante todos estes anos e por terem iluminado meu caminho com amor e dedicação para que o trilhasse sem medo. Tenho como meta encher vocês de orgulho, pois é o mínimo que posso fazer para retribuir um pouco de tudo que fazem por mim! Amo vocês demais!*

*À minha irmã, **Renata**, de quem tenho orgulho de chamar de minha sis e em quem posso confiar para absolutamente tudo! Agradeço a Deus por ter colocado a melhor irmã do mundo ao meu lado. Você é tudo para mim! Te amo!*

*Às minhas avós, **Nilzete e Dalva**, cujas preces inesgotáveis me dão força e proteção e a quem amo infinitamente! Obrigada por me amar, aconselhar, motivar, compreender e me aceitar por inteiro! Tenho sorte de ter vocês em minha vida!*

*Ao **Bubby Nicky Domingues Júnior**, que preencheu um vazio enorme e que enche a minha vida de alegria, obrigada por ser meu grande companheiro, Bubu!*

VOCÊS DÃO SENTIDO A TUDO QUE FAÇO!

*À **Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende**, meu sincero agradecimento por todos estes anos de pós-graduação, você é a responsável por eu ter decidido ficar em Bauru e tanto na especialização, estágio, mestrado e doutorado, você esteve muito presente! Sua orientação foi brilhante e inspiradora! Obrigada pela confiança em mim depositada!*

*Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, pela valiosa contribuição, pela paciência e prontidão em me ajudar a reproduzir de forma fiel os resultados obtidos nesta pesquisa. O senhor é uma inspiração para todos que o rodeiam!*

*Ao meu cunhado **Spin**, por ter participado de todas as etapas desta caminhada e por acreditar muito em mim!*

*Aos parentes, **Din, Bel, Pedro, Lucas, Jorginho e Angélica Domingues**, por todo o carinho e por torcerem pelo meu sucesso!*

Durante toda minha vida, muitas pessoas passaram por mim, dia após dia. Mas somente algumas dessas pessoas, ficarão para sempre em minha memória e em meu coração!

*À minha amiga **Mônica Lobo**, pelo seu apoio incondicional e por estar em minha vida independente da distância! Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas e tenho certeza absoluta que ainda vamos viver muitos mais! Conte sempre comigo!*

*À minha amiga **Thaíz Brandão**, que sei que posso contar a qualquer hora, que acompanhou minha trajetória e vibra com as minhas conquistas! Muito obrigada miga!*

*Aos meus irmãos postigos, **Mônica e Pedro Garcia Ribeiro**, com quem pude ser eu mesma e de quem recebi muito amor, carinho e amizade! Família é para sempre! Amo vocês!*

*Às minhas queridas amigas, **Fabiola Azevedo e Larissa Pessoa**, obrigada pelos momentos de desabafos, de alegria, de apoio, pela companhia e compreensão que traduzem como uma amizade de verdade deve ser! Quarteto fantástico para a vida toda!*

*À minha amiga **Tânia Hashizume**, por ter me mantido sã através da minha terapia diária, pelas conversas, pelas gargalhadas e por existir na minha vida! Vai ser muito difícil ficar longe, pois meu carinho por você é sem fim!*

*À minha amiga **Leslie Casas**, com quem divido minha “nuvem”, que sei que é sincera ao me chamar de amiga e quem tive o prazer de ter por perto durante todos estes anos!*

*Aos amigos, **Ludmila Pavan (Cabeça)**, **Adaiana Maistro**, **Felipe Ferreira (Fê)**, **Rafael Mansano Lara (Fininho)**, **Michelle Aride (Mixalot)**, **Camila Novarino (Comela)**, **Adriana Caetano (Dri)**, **Ana Paula Pereira (Perinha)**, **Eduardo Aleixo Figueira (Sapatinho)**, **Jefferson Kronbauer e Juliana Berchan (Xú)**, que mesmo de longe sei que desejam o melhor para mim! Vocês são muito especiais!*

*Aos meus colegas da Periodontia, **João Barros**, **Jorge Fiamengui**, **Bruna Ferraz**, **Adelina Mendes**, **Emília Caba**, **Jeffrey Rojas**, **Rafael Ferreira**, **Lucas Cambiaghi** e, em especial, às amigas, **Paula Karan (Paulinha)** e **Maria Alejandra Medina (Alê)**, por terem participado dessa etapa da minha vida, lhes desejo muito sucesso e vou vibrar com as conquistas que tenho certeza que irão alcançar!*

Aos amigos **Leonardo Cunha, Bruna Centurion, Otávio Pagin (Tequila), Carolina Ortigosa (Carol), Gabriel Bernini e Márcio Boso (Pituco)**, que de uma forma ou de outra me incentivaram e me brindaram com sua amizade e carinho!

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia:

Ivânia Komatsu, que inúmeras vezes estendeu a mão e me ajudou a passar por momentos difíceis! Agradeço sua amizade, carinho, atenção e presença em minha vida! Agradeço também o carinho de sua família. Obrigada **Dani, Leka e Heitor!**

Edilaine Torrecilha (Edi), por estar sempre por perto, pela amizade e carinho!

Denise Maria Regiani (Alegria), Marcos Antônio de Godoy (Marcão) e Cleide Vital Martins, por serem sempre amáveis e prestativos!

Aos professores da Periodontia, **Prof. Dr. Euloir Passanezi, Prof. Dr. Waldyr Janson, Prof^a Dr^a Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, Prof^a Dr^a Maria Lúcia Rubo de Rezende, Prof^a Dr^a Carla Andreotti Damante e Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi**, que foram fundamentais na minha formação, agradeço pela generosidade, pela competência e por compartilharem seu conhecimento! Tenho extrema admiração por cada um de vocês!

Aos professores da Reabilitação Oral, em especial ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, pela paciência, pela ajuda e pela colaboração com minhas pesquisas! Ao **Prof. Dr. Renato de Freitas, Prof. Dr. Accácio Lins do Valle, Prof. Dr. Pedro César Garcia de Oliveira e Prof. Dr. Paulo Martins Ferreira**, pela amabilidade e convivência na clínica!

Aos professores da Disciplina de Patologia do Departamento de Estomatologia, **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, Prof^a Dr^a Denise Tostes Oliveira e Prof^a Dr^a Vanessa Soares Lara** e aos pós-graduandos, em especial, **Adriana Caetano, Ana Regina Casaroto, Bruna Vilardi, Diego Calderón, Heliton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke e Taísa Vilardi**, que me receberam de braços abertos e tornaram nossa convivência extremamente agradável!

Às amigas, **Fátima Aparecida Silveira (Fatiminha) e Josieli Tripodi (Josi)**, por sempre terem me tratado com muito carinho e generosidade e por terem me apoiado nessa conquista! Vocês moram no meu coração!

*Às secretárias **Débora Blasca e Maria Cristina Carrara Felipe**, pela cortesia,
gentileza e atenção prestadas!*

*Ao Prof. Dr. **Heitor Marques Honório** e ao Dr. **Carlos Eduardo Repeke**, pela ajuda
com minha análise estatística!*

*Ao pessoal da pós-graduação, em especial à **Ana Letícia Palombo e Leila Regina da
Silva**, por sempre terem me tratado com carinho e atenção! Obrigada!*

*Ao pessoal do biotério, **Luís Carlos da Silva, Erasmo Gonçalves da Silva, Elias
Francisco Cresta e Richard Simões**, que sempre me trataram com muito respeito e educação
e por terem feito todo o possível pra me ajudar!*

*Aos amigos, Prof. Dr. **Daniel Romeu Benchimol de Resende (Manaus)** e Prof^a Dr^a.
Aline Franco Siqueira, que servem como inspiração para mim por serem profissionais
grandiosamente competentes e pessoas maravilhosas!*

*À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, por todos estes anos de aprendizado e de
conquistas!*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela
bolsa de estudos concedida.*

*À **Fundação de Amparo e Fomento à Pesquisa (FAPESP)**, pelo auxílio concedido à
esta pesquisa.*

*À empresa **Bionnovation**, por ter gentilmente cedido os parafusos de titânio e as
membranas de PTFE utilizados nesta pesquisa, muito obrigada!*

*Ao biotério da **Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu**, por terem fornecido
os animais utilizados nesta pesquisa!*

*À **Mônica Lobo do Nascimento, Ivânia Komatsu, Rafael Mansano Lara, Mônica
Garcia Ribeiro, Leonardo Cunha e Samira Salmeron**, pela ajuda prestada durante a etapa
cirúrgica desta pesquisa, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização
deste trabalho e ao longo do meu doutorado.*

*Meus sinceros agradecimentos, **Roberta Santos Domingues***

Nunca fique implorando por aquilo que
você tem o poder de obter.

Miguel de Cervantes

RESUMO

Para testar a hipótese de que a desmineralização “in situ” das superfícies de contato enxerto-leito, e a forma como o enxerto é estabilizado ao leito, podem influenciar os mecanismos envolvidos na consolidação do enxerto, fragmentos ósseos de 10 mm de diâmetro foram removidos das metáfises proximais tibiais de 36 coelhos (*Oryctolagus Cuniculus*) e transplantados para uma área adjacente. Na tíbia esquerda dos animais, as superfícies de contato do enxerto e do leito hospedeiro foram desmineralizadas com ácido cítrico pH 1,0 por 3 minutos antes dos enxertos serem fixados ao leito. Na tíbia direita, o transplante do bloco ósseo não foi precedido de desmineralização. Metade dos enxertos foi imobilizada sobre o leito pela superposição de uma membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno colada com cianoacrilato ao leito à distância da interface enxerto-leito. A outra metade dos enxertos foi fixada por um parafuso de titânio no centro do enxerto. Assim, foram formados 4 grupos de estudo: membrana (M), membrana + ácido (MA), parafuso (P) e parafuso + ácido (PA). Três animais de cada grupo forneceram espécimes para análise microscópica quantitativa e qualitativa aos 15, 30 e 45 dias de pós-operatório. A análise qualitativa demonstrou que não houve formação óssea na interface em nenhum espécime aos 15 dias e que nos demais períodos, em todos os grupos, a quantidade de tecido ósseo neoformado na interface e seu estágio de maturação aumentaram com o tempo. Ambos os métodos de fixação empregados foram eficientes em manter os enxertos em posição, porém a membrana promoveu menor reabsorção da estrutura do enxerto. A análise quantitativa computadorizada revelou que, aos 30 dias, os grupos MA e PA apresentaram maior área de formação óssea na interface ($71,34 \pm 12,03\%$; $56,74 \pm 2,15\%$ respectivamente) em relação aos grupos M e P ($51,75 \pm 11,02\%$; $43,95 \pm 4,05\%$ respectivamente) e superfícies de consolidação óssea mais extensas ($93,41 \pm 5,95\%$; $93,73 \pm 4,96\%$ respectivamente) do que os grupos sem tratamento ácido ($73,49 \pm 7,7\%$; $73,77 \pm 11,77\%$ respectivamente para M e P), sendo essas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Aos 45 dias de pós-operatório, os grupos MA e PA ($71,18 \pm 8,9\%$; $58,97 \pm 3,97\%$ respectivamente) apresentaram resultados superiores aos grupos M e P ($59,78 \pm 11,28\%$; $46,08 \pm 3,53\%$ respectivamente) em relação à área de neoformação óssea na interface, porém essa diferença não foi significativa.

Concluiu-se que a desmineralização ácida das superfícies contactantes nos enxertos ósseos autógenos em bloco na tíbia de coelhos promoveu a osteogênese na interface enxerto-leito e acelerou a consolidação dos enxertos. Além disso, quando o tratamento ácido foi associado ao uso de membrana como método de fixação, a consolidação e grau de reabsorção óssea foram otimizados.

Palavras-chave: Ácido cítrico. Desmineralização. Proteínas morfogenéticas ósseas. Reabsorção óssea. Transplante ósseo.

ABSTRACT

Influence of acid demineralization of contacting osseous surfaces on the consolidation of autogenous *onlay* bone grafts

In order to test the hypothesis that the demineralization "in situ" of contacting surfaces of bone graft/bone bed and the fixation method used for graft stabilization can influence the mechanisms involved in the consolidation of the graft, bone fragments of 10 mm in diameter were removed from the proximal tibial metaphysis of thirty-six male rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*) and transplanted to an adjacent area. In the left tibia of the animals, the contacting surfaces of the graft and host bed were demineralized with citric acid pH 1.0 for 3 minutes before the grafts were fixed to the receptor bed. In the right tibia, the bone block transplantation was not preceded by demineralization. Half of the grafts were immobilized on the bone bed by a non-resorbable polytetrafluoroethylene membrane glued with cyanoacrylate adhesive to the host bed distant from the bone graft-bone bed interface. The other half of the grafts were fixed by a titanium screw in the center of the graft. Thus, four groups were formed: membrane (M), membrane + acid (MA), screw (P) and screw + acid (PA). Three animals from each group provided specimens for quantitative and qualitative microscopic analysis at 15, 30 and 45 days postoperatively. Qualitative analysis showed no significant bone formation at the interface in any specimen of the groups at 15 days and on the other periods in all groups, the amount of newly formed bone at the interface as well as the stage of bone maturation increased with time. Both fixation methods were effective in maintaining the graft in position, but the membrane resulted in less resorption of the graft. Quantitative analysis, performed by means of a computer program for image analysis, showed that at day 30, groups MA and PA, showed greater area of bone formation at the interface ($71.34 \pm 12.03\%$; $56.74 \pm 2.15\%$) than groups M and P ($51.75 \pm 11.02\%$, $43.95 \pm 4.05\%$) and more osseointegrated bone surfaces ($93.41 \pm 5.95\%$, $93.73 \pm 4.96\%$) than those without acid treatment ($73.49 \pm 7.7\%$, $73.77 \pm 11.77\%$), and these differences were statistically significant. At 45 days postoperatively MA and PA groups ($71.18 \pm 8.9\%$, $58.97 \pm 3.97\%$) showed better results than the M and P groups ($59.78 \pm 11.28\%$, $46.08 \pm 3.53\%$) compared to the area of new bone formation at the interface and

osseointegrated surfaces, but these differences were not significant. It was concluded that the acid demineralization of contacting surfaces in autogenous *onlay* bone grafts in the tibia of rabbits promotes osteogenesis in bone graft-host bed interface and accelerates the consolidation of the grafts. Furthermore, the association of this surface treatment to the use of membrane/cyanoacrylate fixation method, optimizes the results regarding consolidation and degree of bone graft resorption.

Keywords: Citric acid. Demineralization. Bone morphogenetic proteins. Bone resorption. Bone transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Procedimento cirúrgico.....	67
Figura 2	- Representação esquemática das áreas de interesse na análise microscópica qualitativa dos grupos que foram fixados pelo uso de uma membrana fixada por adesivo à base de cianoacrilato (M e MA): 1 - interface enxerto-membrana; 2 - espaço triangular formado nas laterais do enxerto sob a membrana; 3 - interface enxerto-leito receptor; 4 - extremidade da membrana fixada com cianoacrilato. E= enxerto; L= leito receptor; M= membrana; on= osso neoformado (ilustração de Eduardo Aleixo Figueira).....	71
Figura 3	- Representação esquemática das áreas de interesse na análise microscópica qualitativa dos grupos que foram fixados através do uso de um parafuso de titânio (P e PA): 1 - interface enxerto-leito receptor; 2 - extremidades do enxerto (ilustração de Eduardo Aleixo Figueira e Juliana Berchan)	71
Figura 4	- Avaliação da densidade óssea na interface enxerto-leito receptor	75
Figura 5	- Avaliação das superfícies de consolidação óssea na interface enxerto-leito receptor.....	77
Figura 6	- Avaliação da variação da espessura do enxerto ao longo do tempo	79
Figura 7	- Espécime representativo do Grupo PA aos 15 dias.....	85
Figura 8	- Espécimes representativos do grupo P aos 15 dias	87
Figura 9	- Espécime representativo do grupo MA aos 15 dias	89
Figura 10	- Espécime representativo do grupo M aos 15 dias	91
Figura 11	- Espécime representativo do grupo PA aos 30 dias.....	95
Figura 12	- Espécime representativo do grupo P aos 30 dias	97

Figura 13 -	Espécime representativo do grupo MA aos 30 dias	99
Figura 14 -	Espécime representativo do grupo M aos 30 dias	101
Figura 15 -	Espécime representativo do grupo PA aos 45 dias.....	105
Figura 16 -	Outro espécime representativo do grupo PA aos 45 dias.....	107
Figura 17 -	Espécime representativo do grupo P aos 45 dias	109
Figura 18 -	Espécime representativo do grupo MA aos 45 dias	111
Figura 19 -	Outro espécime do grupo MA aos 45 dias	113
Figura 20 -	Espécime representativo do grupo M aos 45 dias	115
Figura 21 -	Quadro ilustrativo do comportamento dos espécimes durante o período de avaliação de 15, 30 e 45 dias. P = Grupo Parafuso; M = Grupo Membrana; PA = Grupo Parafuso + Ácido; MA = Grupo Membrana + Ácido	132

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Área média de tecido ósseo mineralizado neoformado na interface enxerto-leito (n=6)	117
TABELA 2 - Extensão média de superfícies ósseas do enxerto consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado (n=6)	118
TABELA 3 - Extensão média de superfícies ósseas do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado (n=6)	119
TABELA 4 - Extensão média de superfícies ósseas do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado (n=6)	119
TABELA 5 - Variação na espessura dos enxertos ósseos ao longo dos períodos de avaliação	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase	enzima adenosina trifosfatase
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
BMP-2	Proteína óssea morfogenética óssea 2
BMP-7	Proteína óssea morfogenética óssea 7
DBM	demineralized bone matrix (matriz óssea desmineralizada)
DFDBA	demineralized freeze dried bone allograft (aloenxerto ósseo desmineralizado congelado a seco)
E	Enxerto
eNOS	óxido nítrico syntase endotelial
e-PTFE	politetrafluoretileno expandido
FDBA	freeze dried bone allograft (aloenxerto ósseo congelado a seco)
HE	coloração por hematoxilina-eosina
IEL	Interface enxerto-leito
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
iNOS -	óxido nítrico syntase induzível
L	Leito
M	grupo membrana
MA	grupo membrana + ácido
MG63	linhagem de células oriundas de osteossarcoma humano
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NOS	óxido nítrico syntase
OC	Osteoclastos
on	Osso neoformado
P	grupo parafuso
PA	grupo parafuso + ácido
PCA	Cristais de apatita pobremente cristalinos
PRP	plasma rico em plaquetas
PGE2	prostaglandina E2
TCN	Tetraciclina
TGF	fator de crescimento transformador
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
TGF- β 1	fator de crescimento transformador beta - 1
TRAP	fosfatase ácida tartarato-resistente
VEGF	fator de crescimento endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	cálcio
cm	centímetro
H ⁺	hidrogênio trivalente, ou trítio
kg	quilograma
ml/kg	mililitro por quilograma
mm	milímetro
P	fósforo
μm	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	MECANISMO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA	30
2.2	DESMINERALIZAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS	31
2.3	CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS: O PAPEL DA REVASCULARIZAÇÃO PRECOCE	37
2.4	CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DADO À INTERFACE ENXERTO-LEITO HOSPEDEIRO.....	41
2.5	FIXAÇÃO RÍGIDA VERSUS FIXAÇÃO NÃO RÍGIDA DOS ENXERTOS.....	46
2.6	USO DE MEMBRANAS COMO MÉTODO DE FIXAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE VOLUME DE ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO.....	50
2.7	USO CIRÚRGICO DE ADESIVOS À BASE DE CIANOACRILATO	56
3	PROPOSIÇÃO	59
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1	Animais de experimentação	65
4.2	Procedimento cirúrgico	65
4.3	Eutanásia.....	69
4.4	Análise microscópica.....	69
4.4.1	Análise qualitativa.....	70
4.4.2	Análise quantitativa.....	71
4.4.2.1	Avaliação da neoformação óssea na interface enxerto-leito receptor	72
4.4.2.2	Avaliação das superfícies de consolidação óssea na interface enxerto-leito receptor	72

4.4.2.3	Avaliação da variação da espessura do enxerto ao longo do tempo.....	73
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
5	RESULTADOS	81
5.1	ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA	83
5.1.1	Análise aos 15 dias.....	83
5.1.2	Análise aos 30 dias.....	93
5.1.3	Análise aos 45 dias.....	103
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA	117
5.2.1	Área de Tecido Ósseo Mineralizado Neoformado na Interface Entre Enxerto Ósseo e Leito Receptor	117
5.2.2	Superfícies de consolidação do osso neoformado ao Leito e ao Enxerto	118
5.2.3	Variação na espessura do enxerto com o tempo	119
6	DISCUSSÃO	121
7	CONCLUSÕES	137
	REFERÊNCIAS	141
	ANEXOS	155
	APÊNDICES.....	159

1 INTRODUÇÃO

O processo de perda óssea alveolar resultante da extração dentária tende a ser irreversível e mais acentuado nos primeiros anos, progredindo de forma mais lenta ao longo da vida (GRUBER; SOLAR; ULM, 1996). A reabsorção contínua que se produz resulta em um volume ósseo deficiente, que dificulta ou até mesmo contraindica a reabilitação estética e funcional da área edêntula, o que também se espera de áreas onde ocorreu atrofia por agenesias dentárias e perda óssea traumática (MATSUMOTO, 1999).

Atualmente, a instalação de implantes é o procedimento de escolha como tratamento reabilitador de espaços edêntulos, mas requer a adoção de medidas para compensação da reabsorção óssea pós-exodontia. Com isso, técnicas de aumento ósseo têm sido empregadas, incluindo enxertos alógenos, xenógenos, aloplásticos e autógenos. O enxerto autógeno é considerado “padrão ouro” entre os enxertos, porque, ao contrário dos outros tipos de enxerto, além de ser osteocondutor e osteoindutor, também apresenta células viáveis com capacidade osteogênica (STEVENSON, 1999). Dentre as técnicas de aumento da altura e/ou largura óssea, o enxerto autógeno em bloco, principalmente obtido de sítios intra e/ou extrabuciais, pode ser executado previamente ou simultaneamente à instalação de implantes. Este tipo de enxerto, além de promover a osteogênese, também apresenta total biocompatibilidade, induz reparação tecidual mais rápida e elimina a possibilidade de transmissão de doenças (MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009).

A experiência clínica tem mostrado, entretanto, que a união do enxerto em bloco com o leito receptor nem sempre oferece a resistência adequada para manter a sua integridade quando do preparo das lojas cirúrgicas e/ou instalação dos implantes, cedendo às forças de cisalhamento produzidas (MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009 ; ROCCUZZO et al., 2007 ; RODRIGUES et al., 2012), podendo assim levar ao destacamento do bloco ósseo enxertado. Além disso, o enxerto também pode sofrer reabsorção excessiva durante o período necessário para sua consolidação ao leito, inviabilizando a reabilitação da

área com implantes (MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009 ; SBORDONE et al., 2011).

O osso é um tecido composto constituído de uma fase mineral e uma orgânica cuja matriz mineralizada é osteocondutiva, mas não osteogênica e possui pouco ou nenhum potencial osteoindutor, já que os fatores osteoindutores contidos dentro da fase orgânica estão impedidos de agir pela matriz mineralizada (RODRIGUES et al., 2012 ; URIST et al., 1968). Urist et al. (1968) identificaram substâncias ósseas morfogenéticas em extratos solúveis de osso desmineralizado, o que levantou a consideração de que o processo de desmineralização liberaria proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) da matriz óssea, permitindo que essas proteínas induzissem células indiferenciadas dos tecidos adjacentes a se diferenciarem em osteoblastos. A base científica fornecida por esses trabalhos levou ao desenvolvimento e aplicação clínica de preparados comerciais de osso alógeno liofilizado desmineralizado e não desmineralizado de diversas origens, usados isoladamente ou como adjuntos aos enxertos ósseos autógenos (BOWERS et al., 1989 ; REGISTER, 1973).

A desmineralização faz parte do processo biológico de remodelação do tecido ósseo no qual células clásticas lançam ácidos sobre a matriz mineralizada, formando cavidades superficiais e expondo a matriz orgânica com seu conteúdo osteoindutor, o qual atrai e estimula células mesenquimais indiferenciadas a se transformarem em osteoblastos (MELCHER, 1976). A observação desse efeito benéfico da desmineralização ácida natural de tecidos mineralizados e de resultados favoráveis alcançados com o uso de desmineralização radicular e óssea em procedimentos de regeneração de defeitos periodontais (COLE et al., 1980 ; CRIGGER et al., 1978 ; CRIGGER; RENVERT; BOGLE, 1983) motivou o desenvolvimento de outros experimentos que confirmaram ação favorável da desmineralização ácida superficial do osso sobre o comportamento de pré-osteoblastos (COESTA, 2011) e na consolidação de enxertos ósseos (REZENDE, 2008 ; RODRIGUES et al., 2012).

A desmineralização ácida do osso também resulta na liberação de enzimas proteolíticas, denominadas como metaloproteinases da matriz (MMPs), das quais dependem a osteogênese e a remodelação óssea, já que tanto osteoblastos como osteoclastos expressam MMPs. Alguns estudos atribuíram função importante às MMP-2 e MMP-9 nos processos de formação e remodelação óssea, relatando que as MMPs-2 e -9, nas formas ativa ou inativa, são expressas por células osteogênicas

e do tecido conjuntivo durante as diferentes etapas da regeneração óssea alveolar, como a substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo, durante a formação, maturação e remodelação de novo osso (ACCORSI-MENDONCA et al., 2008 ; ENGSIG et al., 2000 ; HEATH et al., 1984 ; LORENZO et al., 1992).

As superfícies de contato entre enxerto ósseo em bloco e leito receptor têm sido referenciadas nas publicações, enfatizando principalmente a importância da adaptação congruente do enxerto ao leito e ao tratamento dado à interface para otimizar a consolidação do tecido enxertado (ALBERIUS et al., 1996 ; ALBERIUS et al., 1996 ; BUSER et al., 1993 ; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000). Assim, a exposição da medula óssea pela perfuração da cortical do leito e/ou enxerto (ALBERIUS et al., 1996 ; BUSER et al., 1993) ou pela remoção por desgaste da camada cortical do osso receptor (ALBERIUS et al., 1996 ; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000 ; GORDH et al., 1998), além da aplicação na interface enxerto-leito de plasma rico em plaquetas (PRP) (MIRANDA et al., 2006), proteínas ósseas morfogenéticas (GORDH et al., 1999) e laser de baixa potência (O'DONNELL et al., 1996), têm sido os procedimentos adotados para produzir estímulos à atividade celular que resultem em maior deposição óssea. Entretanto, foi verificado que ocorre perda de volume por reabsorção do leito quando a cortical do leito é perfurada ou desgastada (ALBERIUS; GORDH, 1998 ; ALBERIUS et al., 1996) e que o recobrimento dos enxertos por membranas osteopromotoras poderia prevenir essa perda volumétrica com o tempo. (ALBERIUS; DAHLIN; LINDE, 1992 ; GORDH et al., 1998 ; GORDH et al., 1999).

O método padrão de fixação dos enxertos ósseos em bloco ao leito emprega imobilização rígida por parafusos de aço inoxidável ou titânio (BARRADAS et al., 2011), mas a fixação não rígida também é aceita em experimentações com animais, em função da fragilidade de certas áreas ósseas eleitas para os estudos (ALBERIUS; GORDH, 1998 ; BUCHMAN; OZAKI, 1999 ; GORDH et al., 1997 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005 ; KUSIAK; ZINS; WHITAKER, 1985).

Uma nova forma de fixação do enxerto em calvárias de animais de pequeno porte, nos quais a fixação de enxertos por parafusos seria letal, foi proposta por Rezende (2008), onde uma membrana reabsorvível de colágeno bovino foi fixada com adesivo de cianoacrilato sobre o bloco ósseo enxertado na calvária de cobaias. Este método se comprovou eficaz já que não houve deslocamento dos blocos ósseos e a formação de osso na interface se processou de forma não perturbada.

Os resultados encontrados em estudos prévios, nos quais a desmineralização óssea superficial antes da fixação de enxertos por parafusos (RODRIGUES et al., 2012) ou por membranas (REZENDE, 2008) promoveu e antecipou a consolidação e neoformação óssea, mostram que, além de melhorar suas propriedades mecânicas, estimularam o desenvolvimento desta tese que levantou a hipótese de que o tratamento ácido da interface enxerto-leito, associado ao uso de membranas como método de fixação, resultaria em padrão de reparação, diferente daquele que ocorre quando o enxerto é fixado com parafuso e sem qualquer tratamento da interface.

Assim, este trabalho se propôs a avaliar, histomorfometricamente em tibia de coelhos, se existe influência do método de fixação do enxerto ao leito e da desmineralização da interface leito receptor-enxerto ósseo por ácido cítrico, no grau de neoformação óssea na interface enxerto-leito e na consolidação do fragmento ósseo enxertado. Com isto, procurou-se alcançar subsídios para confirmar ou refutar a tese de que a introdução desses procedimentos pode otimizar a consolidação e o reparo dos enxertos com vistas à antecipar a instalação de implantes e melhorar o prognóstico desse tipo de abordagem terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão ouro” dentre os materiais disponíveis para procedimentos que visam ao ganho de volume ósseo e, por isso, são largamente empregados nas mais variadas técnicas de reconstrução devido à biocompatibilidade e presença de células ósseas viáveis com capacidade osteogênica, sendo inúmeras as opções de áreas doadoras (WILTFANG et al., 2004). Porém, quando utilizados na forma de bloco, esses enxertos podem apresentar consolidação insuficiente e/ou reabsorção excessiva inviabilizando a reabilitação da área enxertada por implantes (KOERDT et al., 2013).

De grande influência na cicatrização dos enxertos ósseos em bloco é sua estabilização rígida ao leito receptor (BURGER; MESHKINI; LINDEBOOM, 2011), que pode também, influenciar a manutenção do volume ósseo adquirido imediatamente após sua realização (ALMEIDA, 1999 ; LEKNES et al., 2008; MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009; REZENDE, 2008).

Com o intuito de favorecer a consolidação dos enxertos ósseos ao leito receptor e de tentar reduzir a reabsorção destes enxertos, tratamentos de superfície vêm sendo utilizados (DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000 ; PEDROSA et al., 2009), porém estas complicações ainda são observadas, sendo coerente a busca por novas estratégias que possam otimizar os resultados dos procedimentos de reconstruções ósseas maxilomandibulares.

Como a hipótese levantada neste estudo baseia-se na desmineralização ácida do osso, a qual representa um fenômeno biológico próprio da fisiologia óssea, serão ponderados inicialmente alguns aspectos do mecanismo de remodelação óssea e, em seguida, serão mencionados estudos que justificam o uso de agentes desmineralizantes em dentina e osso, objetivando o reparo de tecidos duros e moles em feridas periodontais e maxilomandibulares. Em sequência, serão abordados os métodos e fenômenos envolvidos na consolidação e manutenção do volume de enxertos ósseos.

2.1 MECANISMO DE REMODELAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica. A matriz inorgânica é composta, em sua maior parte, por cristais de hidroxiapatita constituindo a superfície mineralizada do tecido ósseo que reveste a matriz orgânica. O conteúdo da matriz orgânica, por sua vez, apresenta 95% de fibras colágenas tipo I, proteínas não colágenas e proteoglicanas, as quais conferem capacidade osteoindutora ao tecido ósseo (BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006).

Sendo um tecido dinâmico, o osso sofre remodelação fisiológica ao longo da vida, fenômeno do qual participam osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras (BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006). Os osteoblastos são células mesenquimais pluripotentes com capacidade de se diferenciar em osteoblastos maduros ativos, os quais promovem formação óssea por secretarem colágeno tipo I, proteínas não colágenas como a osteopontina e osteocalcina, citocinas e fatores de crescimento em regiões que sofreram reabsorção óssea. Os osteócitos são osteoblastos maduros aprisionados na matriz óssea e são responsáveis por sua manutenção. Os osteoclastos são células hematopoiéticas multinucleadas derivadas de células tronco, encontradas nas lacunas de Howship, responsáveis pelo mecanismo de reabsorção óssea. Tal mecanismo ocorre através da acidificação do conteúdo mineral do osso, que acarreta em sua dissolução, e através da degradação enzimática da matriz óssea extracelular desmineralizada.

O pH do meio tem efeito significativo na dissolução mineral de forma que é necessária a produção de ácidos pelos osteoclastos, provavelmente ácido láctico e cítrico, para promover mobilização dos cristais minerais a serem desalojados e então, fagocitados (MELCHER, 1976). Estes eventos foram comprovados em meio de cultura onde foram utilizados finos filmes artificiais de cristais de apatita pobremente cristalinos (PCA) que apresentavam alta semelhança aos do osso (KIM et al., 2001). Ao ser avaliada a dissolução mineral desses filmes, foi observada crescente atividade osteoclástica em pH menor ou igual a 6,5 e total dissolução dos cristais de apatita em pH abaixo de 4,0. Em contrapartida, em pH fisiológico, entre 7,15 e 7,4, não foi evidenciada alteração no comportamento dos osteoclastos. Portanto, foi concluído que a acidez no meio possibilita e aumenta a reabsorção

óssea pelos osteoclastos, enquanto que a alcalinidade leve bloqueia totalmente esse processo (KIM et al., 2001).

A acidificação osteoclástica é mediada pela ação da enzima anidrase carbônica II sobre o dióxido de carbono, resultando na secreção de prótons H^+ por ação das ATPases vacuolares no espaço extracelular entre a célula e a matriz calcificada nas lacunas de Howship (BISKOBING et al., 1997). Conforme os osteoclastos vão dissolvendo a matriz mineralizada, vai sendo exposto o conteúdo da matriz orgânica do osso que, em conjunto com proteínas produzidas pelos próprios osteoclastos, promovem quimiotaxia e migração de células osteoprogenitoras para esta região. Estas células aderem-se à superfície em reabsorção e diferenciam-se em osteoblastos, por meio da mediação de citocinas e fatores de crescimento liberados no local para que, então, se dê início à deposição de novo osso, estabelecendo equilíbrio entre os fenômenos de reabsorção e formação óssea, que caracterizam o processo fisiológico de remodelação óssea.

2.2 DESMINERALIZAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS

Em Periodontia, a desmineralização das superfícies radiculares expostas à doença periodontal e previamente a cirurgias plásticas de recobrimento radicular vem sendo empregada com o intuito de promover adesão celular e consequente inserção de fibras colágenas dos tecidos periodontais a essas raízes (COLE et al., 1980 ; SELVIG; HALS, 1977 ; SELVIG; ZANDER, 1962).

Selvig e Zander (1962) e Selvig e Hals (1977) identificaram a hipermineralização do cimento exposto à doença periodontal como razão básica para a desmineralização da superfície radicular na terapia periodontal, a qual, mais tarde, mostrou produzir textura de superfície capaz de acelerar o processo de formação e manutenção de coágulo, estruturando a migração de fibroblastos e inserção de fibras colágenas sobre a raiz (REGISTER, 1973).

Register e Burdick (1975) avaliaram diversos ácidos em diferentes pHs e em diferentes tempos de aplicação em superfícies dentinárias e verificaram que o ácido cítrico em pH 1,0, aplicado durante 3 minutos, resultou em melhores efeitos de remoção mineral sem prejudicar o potencial indutivo da matriz orgânica, resultando em completa regeneração evidenciada pela formação de novo cimento e pela

reinserção perpendicular das fibras colágenas a superfícies radiculares sobre as quais foi aplicado.

A partir de então, o ácido cítrico passou a ser amplamente empregado e estudado em diferentes concentrações, tempos e formas de aplicação, apresentando resultados excelentes em relação a vários outros agentes desmineralizantes quanto à remoção de smear layer após raspagem e desobliteração de túbulos dentinários (AMARAL et al., 2011 ; CAVASSIM et al., 2012; SHIMOHARA et al., 2012).

Além de promover a reinserção de tecidos moles, a desmineralização ácida de superfícies dentinárias também influencia a condrogênese e a osteogênese através da exposição das fibras colágenas, indução de síntese de matriz extracelular e promoção da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos (SOMERMAN et al., 1987). Foi demonstrado *in vitro*, que a dentina desmineralizada incubada com células mesenquimais indiferenciadas extraídas de músculo de embriões de ratos, é capaz de estimular a diferenciação de células não condrogênicas em condroblastos. Foi argumentado que essa capacidade indutora se deve à liberação e/ou ativação de fatores estimulantes da resposta osteogênica dos osteoblastos durante o processo de desmineralização (INOUE; DEPORTER; MELCHER, 1986).

Existe comprovação de que a desmineralização também resulta em alteração da composição química e da topografia superficial do tecido duro submetido a este processo, sendo que estas modificações influenciam o comportamento de osteoblastos em comparação a superfícies não desmineralizadas. Essas alterações superficiais foram avaliadas por Schwartz et al. (2000), cuja hipótese se baseou no fato de que no processo fisiológico de remodelação óssea, a ação dos osteoclastos resulta na formação de cavidades de reabsorção que tornam essa superfície mais irregular e rugosa. Considerando que as células osteoprogenitoras migram e sofrem diferenciação osteoblástica sobre a superfície modificada, os autores avaliaram se alterações superficiais resultantes da desmineralização pela tetraciclina ácida influenciariam a formação óssea. O estudo envolveu três grupos: 1 – superfícies dentinárias polidas; 2- superfícies dentinárias tratadas com tetraciclina (TCN) e 3- superfícies expostas à ação de osteoclastos de camundongos (OC). Os espécimes foram então cultivados com células osteoblásticas humanas MG63. Através de perfilometria foi observado que o grupo OC apresentava rugosidade superficial

levemente superior à dos outros grupos, os quais apresentaram valores de rugosidade superficial média comparáveis entre si. A análise realizada por espectroscopia eletrônica de raios-X mostrou que o grupo TCN apresentou maior redução do conteúdo de Ca e P, seguido do grupo OC que promoveu dissolução em menor extensão. Ao avaliar a proliferação de células osteoblásticas MG63 sobre as superfícies, foi evidenciado um aumento de 75% de proliferação celular no grupo tratado pela tetraciclina. O grupo OC também mostrou um aumento na proliferação das células, porém este foi significativamente inferior ao do grupo TCN. Também foi avaliado o efeito da desmineralização sobre a atividade enzimática da fosfatase alcalina, sobre a expressão da prostaglandina E2 (PGE2), sobre o fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) e sobre a osteocalcina. Os autores evidenciaram que o grupo tratado pela tetraciclina mostrou efeitos significativamente mais intensos em todos os fatores estudados, os quais estão relacionados com a diferenciação osteoblástica. Desta forma, os autores concluíram que o comportamento das células cultivadas sobre superfícies que sofreram atividade osteoclástica é semelhante ao observado em superfícies submetidas à desmineralização ácida devido a este tratamento mimetizar a topografia física e composição química causada pela atividade osteoclástica.

O princípio da desmineralização ácida de raízes dentais também foi testado em tecido ósseo com o objetivo de modificar as propriedades de blocos de enxertos ósseos corticais, expondo as proteínas e outros elementos presentes na fase orgânica da matriz óssea, favorecendo assim a capacidade de osteoindução na tentativa de evitar ou pelo menos reduzir a ocorrência de falhas nestes procedimentos. Esta associação foi sugerida devido aos casos de consolidação insuficiente, incorporação lenta do enxerto ao leito e de reabsorção excessiva que prejudicam ou até mesmo impedem a finalização de reconstruções ósseas craniofaciais. O primeiro estudo que avaliou o potencial indutor da matriz óssea desmineralizada (DBM) foi realizado através da implantação de DBM em tecidos muscular e subcutâneo de ratos, onde foi observada capacidade de indução de osteogênese ectópica (URIST, 1965). O desenvolvimento de estudos subsequentes atribuiu a capacidade indutora de DBMs à liberação, resultante da desmineralização, de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e fatores de crescimento derivados da matriz orgânica óssea (RILEY et al., 1996 ; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983). Esses fatores, presentes exclusivamente na matriz orgânica do tecido ósseo, são

fatores de crescimento próprios desse tecido, pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador (TGF) (KHOJASTEH et al., 2012 ; RIPAMONTI; REDDI, 1992).

Dentre as BMPs que participam da reparação óssea, destacam-se a BMP-2 e a BMP-7, capazes de formar osso heterotópicamente em músculo de ratos e camundongos, regenerar fraturas segmentais de ossos longos, reparar vários tipos de defeitos ósseos e diferenciar irreversivelmente, *in vitro*, células mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras (COOK; RUEGER, 1996 ; COOK et al., 1995 ; RILEY et al., 1996). Somam-se a essas propriedades, a de induzir a expressão de fatores angiogênicos contribuindo na formação de vasos sanguíneos (RAMOSHEBI; RIPAMONTI, 2000 ; YEH; LEE, 1999).

De fato, a propriedade das BMPs promoverem a formação óssea tem diversas comprovações, entre as quais se pode citar o trabalho de Lourenço (2002) que analisou a formação óssea em defeitos de 8 mm criados em calvárias de coelhos, preenchidos por BMPs extraídas de ossos longos de renas, e levadas ao sítio por meio de um carreador de carbonato de cálcio-colágeno na forma de bloco ou granular. Após 4, 6 e 10 semanas o autor observou osteogênese semelhante à obtida quando os defeitos foram preenchidos com osso autógeno e superior aos controles onde foram preenchidos com o carreador e coágulo sanguíneo apenas. No mesmo estudo, em alvéolos cirúrgicos preenchidos com o material teste antes da instalação de implantes de titânio, foi observado maior percentual de contato linear e maior volume percentual de osso no interior das roscas dos implantes do que nos espécimes nos quais os alvéolos não receberam esse preenchimento. Esses resultados levaram o autor a confirmar a hipótese de que as proteínas ósseas morfogenéticas poderia aumentar a qualidade da interface osso-implante e possivelmente sua aplicação clínica pode aumentar a longevidade ou abreviar o período de espera para aplicação de cargas oclusais sobre os implantes.

A partir do conceito de desmineralização de matrizes ósseas, e com o intuito de avaliar se a desmineralização ácida de enxertos ósseos alógenos (DFDBA) favoreceria o processo de formação óssea em relação ao enxerto não desmineralizado (FDBA), Wood e Mealey (2012) avaliaram e compararam histologicamente a cicatrização de alvéolos preenchidos com DFDBA ou FDBA quanto à preservação do rebordo alveolar em humanos. Após 20 semanas o DFDBA resultou em porcentagem significativamente maior de osso vital e menor de

partículas residuais do enxerto em comparação ao FDDBA, o que os levou a concluir que a desmineralização ácida resulta em maior formação óssea. Atribuíram este resultado à provável alteração da composição química e à liberação de componentes com capacidade osteoindutora da matriz orgânica.

Em contrapartida, um estudo semelhante realizado 18 anos antes já havia questionado o uso de enxertos ósseos alógenos desmineralizados no preenchimento de alvéolos de extração humanos (BECKER; BECKER; CAFFESSE, 1994). Esse estudo verificou clinicamente que os alvéolos preenchidos com DFDBA apresentaram aspecto semelhante ao tecido ósseo adjacente, ainda que partículas do material pudessem ser facilmente observadas e delimitadas em algumas áreas. Histologicamente, os espécimes contendo DFDBA apresentavam bordas irregulares, ausência de osteócitos nos osteoplastos e ausência de atividade osteoblástica e osteoclástica, além de negatividade ao teste para presença de material calcificado. Os espécimes contendo osso autógeno, por outro lado, apresentaram-se mais densos, rígidos e resistentes no momento de obtenção da biópsia, em comparação aos contendo DFDBA. Além disso, o osso autógeno revelou presença de osteócitos em seus osteoplastos, vasos sanguíneos e formação de tecido ósseo maduro (lamelar) e em processo de reabsorção e substituição por novo osso positivo ao teste para presença de material calcificado. Estes resultados levaram os autores à conclusão de que o DFDBA não apresenta capacidade osteoindutora, podendo até mesmo retardar a formação óssea por serem reabsorvidos muito lentamente.

A resultados contrários, entretanto, chegaram Ho et al. (2010) em seios maxilares de coelhos que, ao serem preenchidos com DBM ou gel de poloxâmero associados a BMPs, mostraram maior neoformação óssea do que quando materiais sem essa associação foram usados para o mesmo fim. A quantidade de osso neoformado foi comparável à alcançada com osso autógeno às 8 semanas. Esta evidência de capacidade osteoindutiva foi atribuída à DBM no período de avaliação de 2 semanas pela presença de formação de novo osso diretamente em contato com partículas do material. Estes resultados levaram os autores a concluir que enxertos contendo BMPs aceleram a formação de novo osso permitindo que seja realizada a instalação de implantes de forma mais precoce.

Outra importante família de enzimas proteolíticas que também compõe a matriz óssea são as denominadas metaloproteinases da matriz ou MMPs. Estas moléculas são expressas por osteoblastos e osteoclastos (HEATH et al., 1984 ;

LORENZO et al., 1992 ; MEIKLE et al., 1992) e são capazes de processar e degradar diversas proteínas peri e extracelulares, além de todos os demais componentes da matriz, e participam da angiogênese fisiológica e patológica óssea (NGUYEN; ARKELL; JACKSON, 2001). A expressão da maioria das MMPs é baixa em tecidos normais e intensamente expressa quando a remodelação da matriz extracelular é necessária (WESTERMARCK; KAHARI, 1999). Accorsi-Mendonça et al. (2008), estudando a regeneração de alvéolos de extração em ratos, verificaram que osteoblastos apresentaram intensa imunomarcação para MMP-2 e MMP-9 durante os eventos de formação de novo osso, degradação, remodelação e maturação óssea, demonstrando a participação dessas MMPs durante as diferentes etapas da regeneração óssea alveolar, como a substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo, durante a formação, maturação e remodelação de novo osso.

Embora os estudos citados atestem suficiente plausibilidade biológica para o princípio de que a exposição da matriz orgânica óssea produzida por meio da desmineralização ácida libere fatores responsáveis pela síntese de novo osso, a desmineralização das superfícies de contato enxerto-leito *in situ* não tem sido citada como método para melhorar ou antecipar a consolidação dos enxertos ósseos autógenos frescos em bloco ou particulados. 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 a associação de tetraciclina e ácido cítrico pH 1,0 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. 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.

Os achados de Rezende (2008) motivaram o estudo de outros protocolos de desmineralização com o mesmo objetivo para comprovar seus resultados. Rodrigues et al. (2012) avaliaram a influência da desmineralização da interface enxerto-leito com gel de EDTA a 24% sobre as propriedades mecânicas de enxertos ósseos *onlay* e encontraram que a desmineralização resultou em maior deformação da

interface, sugerindo melhor comportamento elástico para instalação de implantes. Os testes de microtração realizados levaram a módulos de elasticidade maiores nos espécimes desmineralizados em relação aos não desmineralizados, o que os levou a considerar que esse efeito poderia ser diminuído com a desmineralização, já que o destacamento do tecido enxertado por vezes observado em procedimentos clínicos de instalação de implantes pode ocorrer não só devido à falta de consolidação, mas também devido à deformação insuficiente das estruturas ósseas no momento em que o implante é introduzido.

A influência da desmineralização superficial do osso vital com ácido cítrico a 50% em pH 1 foi avaliada em outro estudo, no qual o comportamento de pré-osteoblastos MC3T3 em cultura sobre essas superfícies foi observado em diferentes tempos de aplicação, variando de 15 a 180 segundos (COESTA, 2011). Nesse estudo, a desmineralização ácida, independente dos tempos de aplicação estudados, mostrou ser um adjunto vantajoso nos procedimentos que visam ao reparo ósseo. Isto porque a desmineralização ácida além de não ter interferido na vitalidade das células, acelerou a diferenciação dos pré-osteoblastos em comparação às superfícies sem tratamento e resultou em área de recobrimento celular significativamente maior nas superfícies tratadas com ácido cítrico, com resultados melhores quando o tempo de aplicação ficou entre 15 e 30 segundos.

2.3 CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS: O PAPEL DA REVASCULARIZAÇÃO PRECOCE

Considerando que o objetivo do tratamento de rebordos atróficos através da execução de enxertos ósseos em bloco é reestabelecer volume ósseo adequado para a reabilitação por meio de implantes, torna-se necessário o conhecimento dos mecanismos envolvidos tanto na consolidação, quanto na manutenção do volume destes enxertos para garantir sua previsibilidade. Por isso, a literatura é repleta de estudos que abordam os fatores que podem influenciar estes mecanismos, como a origem embriológica do sítio doador. Acredita-se que a relevância da origem do sítio doador está relacionada à velocidade de revascularização do enxerto, que tem relação direta com a imprevisibilidade da perda óssea volumétrica frequentemente observada em enxertos ósseos em bloco. Porém, os dados existentes sobre a

importância da revascularização precoce na manutenção do volume dos enxertos são conflitantes.

Tem sido observado que os enxertos de origem intramembranosa apresentam menor perda volumétrica do que os de origem endocondral (SITTITAVORNWONG; GUTTA, 2010) levantando a hipótese de que isto se deva à ocorrência de uma revascularização mais rápida nestes enxertos (KUSIAK; ZINS; WHITAKER, 1985). Chen et al. (1994) compararam em coelhos o comportamento de enxertos autógenos unicorticais provenientes da calvária (intramembranoso) com enxertos da crista ilíaca (endocondral) fixados rigidamente com microparafusos em relação ao grau de reabsorção, revascularização e atividade osteoclástica. Aos 10 dias pós-operatórios foi evidenciada atividade osteoclástica e revascularização significativamente maiores na porção medular dos enxertos intramembranosos em relação aos enxertos endocondrais e, após 70 dias, foram observados 72% de manutenção do volume dos enxertos provenientes da calvária enquanto os enxertos da crista ilíaca apresentaram 32% de manutenção volumétrica. A reabsorção e a atividade osteoclástica concentraram-se principalmente nas bordas laterais dos enxertos onde o osso medular foi exposto aos brotos vasculares invasores. Como a cortical ocupa grande parte do osso da calvária, os autores creditaram a este fato a maior manutenção do volume ósseo. Verificaram ainda que, embora a literatura aponte que a fixação rígida dos enxertos favorece a revascularização por imobilizar o enxerto ao leito, a firme união da superfície inferior do enxerto ao leito dificulta ou até mesmo impede a penetração vascular, de forma que a perda de volume dos enxertos se concentrou nas laterais onde a revascularização não foi impedida. Estes resultados levaram os autores à conclusão de que a fixação rígida favorece a manutenção de volume por limitação da penetração vascular.

Ainda a respeito da relação entre vascularização e reabsorção, mais tarde Alberius et al. (1996) também verificaram que o osso cortical manifestou revitalização lenta e, conseqüentemente, menos reabsorção (localizada mais periféricamente) do que a porção medular do enxerto.

Não apenas a origem embriológica, mas também a microestrutura de enxertos ósseos em bloco, foi estudada como possível fator de interferência sobre o padrão de reabsorção destes enxertos (CANTER; VARGEL; MAVILI, 2007 ; OZAKI et al., 1999). Um estudo empregando métodos histoquímicos e microtomografias computadorizadas verificou que a taxa de reabsorção é significativamente mais

acentuada para os enxertos endocondrais medulares do que para os enxertos corticais, tanto membranosos quanto endocondrais (OZAKI et al., 1999). Foi concluído que os enxertos de conteúdo medular sofrem revascularização precocemente tornando estes enxertos mais susceptíveis à atividade osteoclástica em toda sua extensão, o que resulta em maior taxa de reabsorção.

Porém, é necessário que ocorra revascularização inicialmente no processo de cicatrização de enxertos ósseos, pois nem reabsorção e nem osteogênese irão ocorrer sem que vasos sanguíneos tenham invadido a região do enxerto (ALBREKTSSON, 1980). Células provenientes destes vasos, como monócitos que se diferenciam em osteoclastos irão reabsorver material do enxerto para que os vasos cresçam dentro dessa estrutura óssea e forneçam células osteoprogenitoras que, por sua vez, irão se diferenciar em osteoblastos e promover deposição de novo osso (ALBREKTSSON, 1980). Portanto, pode-se especular que a lenta revascularização de um enxerto ósseo em bloco pode dificultar sua reabsorção. Por outro lado, o leito vascularizado é mais vulnerável à pressão e estresse local sofrendo reabsorção maior que o enxerto.

A influência da vascularização do enxerto e do contato com o leito receptor na manutenção do volume foi também investigada por Gosain et al. (1996) que estudaram, em coelhos, o comportamento de enxertos ósseos *onlay* e *inlay*, cuja vascularização era garantida por um pedículo do músculo auricular unido aos fragmentos ósseos transplantados da calvária para os arcos zigomáticos. Os enxertos *onlay* foram posicionados em contato total com o leito receptor, por meio da fixação rígida com fios de aço ou parcial, somente com a justaposição do enxerto ao leito. Após um ano, os enxertos posicionados em contato total com o leito apresentaram manutenção e aumento significativos de sua estrutura, enquanto os enxertos em contato parcial sofreram remodelação no espaço entre o enxerto e o leito, evidenciado pela formação de espículas ósseas provenientes de ambas as superfícies. Também foi observado que nas áreas de contato enxerto-leito ocorreu conversão de toda a espessura, tanto do enxerto como do leito, de uma arquitetura cortical em trabecular. Foi concluído que a orientação dos ósteons do leito em relação aos do enxerto, pode interferir no padrão de remodelação que estas superfícies sofrem. A fixação rígida dos enxertos *onlay* possibilitou que a orientação dos ósteons do enxerto coincidissem com as do leito, o que foi benéfico para a cicatrização destes enxertos. Os autores ressaltaram a necessidade de considerar a

influência que as alterações observadas na arquitetura óssea do leito receptor e do enxerto, de cortical para trabecular, podem exercer sobre o resultado final dos procedimentos de enxertia.

Seguindo essa linha de raciocínio, alguns autores testaram a hipótese de que a conversão da arquitetura óssea de cortical para trabecular resulte em alterações biomecânicas no leito receptor do enxerto ósseo em bloco (GOSAIN et al., 1998). Os resultados obtidos através de análise histológica e teste de resistência à fratura confirmaram a conversão da microarquitetura óssea de cortical para trabecular na área abaixo dos enxertos ósseos, acompanhada de redução significativa da densidade óssea e na força biomecânica do leito receptor, sendo esta redução mais significativa quando os enxertos *onlay* são removidos, deslocados ou se o enxerto for totalmente reabsorvido deixando um leito enfraquecido como resultado. Essas alterações ocorreram mesmo quando o enxerto ósseo foi mantido em posição, porém a resistência mecânica não sofreu redução significativa, principalmente na região central da área enxertada.

Em contrapartida, resultados diferentes foram obtidos em outros estudos avaliando o efeito das alterações da microestrutura óssea sobre as propriedades mecânicas do leito receptor e do enxerto ósseo. Buchman e Ozaki (1999) partiram da hipótese que as forças de remodelação e reabsorção sobre enxertos ósseos trabeculares podiam resultar no desenvolvimento de uma microestrutura mecanicamente mais estável. Através de análise por microtomografia computadorizada, análise histológica e histomorfométrica, a hipótese desses autores foi confirmada quando observaram que 16 semanas após enxertos ósseos *onlay* medulares de íliaco serem realizados em calvária de coelhos sem qualquer tipo de fixação adicional ao recobrimento pelo retalho, desenvolveu-se fração de volume ósseo maior, estrutura mais densa e menos trabecular, interconectada e mais organizada ao longo do tempo. Isto devido à ocorrência dos fenômenos de revascularização e remodelação óssea internamente levando à formação de osso compacto nos espaços medulares do enxerto e na interface como, resultado da incorporação gradativa ao leito, e à capacidade adaptativa dos tecidos às exigências funcionais da área.

2.4 CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DADO À INTERFACE ENXERTO-LEITO HOSPEDEIRO

Por mais que haja controvérsia a respeito do papel da revascularização precoce na cicatrização de enxertos ósseos autógenos *onlay*, a angiogênese é essencial para que os vasos sanguíneos forneçam oxigênio e nutrição suficiente para que o enxerto mantenha as células transplantadas com vitalidade (ALBREKTSSON, 1980). A cortical do osso receptor contém quantidade reduzida de arteríolas, enquanto que o osso esponjoso ou medular possui uma intensa rede vascular (GERRESSEN et al., 2009 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005). Por esta razão, modificações na superfície óssea têm sido sugeridas com o objetivo de favorecer o acesso vascular aos enxertos autógenos em bloco. O método mais empregado para esse fim é a realização de perfurações do leito com brocas para expor espaços medulares e possibilitar a invasão dos vasos sanguíneos na região do enxerto. Entretanto, outros métodos também são citados como será visto a seguir.

Um estudo em que enxertos ósseos bicorticais foram realizados em calotas cranianas de ratos comparou o efeito da perfuração tanto da cortical interna dos enxertos quanto da cortical do leito receptor (grupo experimental) com a perfuração do leito receptor (grupo controle) (ALBERIUS et al., 1996). Após 4 semanas, o grupo experimental já apresentava revascularização e remodelação óssea significativamente superiores em comparação ao grupo controle. O mesmo se repetiu após 20 semanas, momento no qual o grupo experimental apresentou consolidação quase total com a presença de osso lamelar, enquanto o grupo controle apresentava integração significativamente menos avançada. Além disso, a manutenção do volume do enxerto foi significativamente mais pronunciada no grupo experimental em relação ao grupo controle.

Entretanto, mais tarde, outro estudo feito em mandíbulas de ovelhas não confirmou efeito positivo da realização de tratamentos de superfície no leito receptor de enxertos ósseos (ADEYEMO et al., 2008). Nesse estudo, enxertos ósseos autógenos córtico-medulares, provenientes da crista ilíaca dos animais com ou sem perfurações do leito, apresentaram reabsorção pronunciada durante a cicatrização. Os autores atribuíram a reabsorção dos enxertos cujo leito sofreu perfurações à revascularização mais rápida produzida, apesar de não terem sido encontradas

diferenças significativas entre grupos perfurados e sem perfurações. Observaram ainda que, quando o periósteo é mantido intacto sobre o enxerto, a interposição por tecido conjuntivo da interface enxerto-leito é evitada, reforçando não só a importância da capacidade osteogênica e angiogênica do periósteo, como também sua provável função como barreira, impedindo a invasão da interface por células não osteogênicas. Os autores concluíram que o íntimo contato entre enxerto e leito receptor e fixação rígida são fatores mais importantes na incorporação do enxerto ao leito do que a realização de perfurações na superfície receptora.

Faria et al. (2008) também questionaram a influência do procedimento de perfuração do leito receptor nos mecanismos intrínsecos envolvidos no processo de remodelação óssea e na manutenção do volume dos enxertos ósseos de crista ilíaca realizados em mandíbulas de coelhos. A análise por tomografia computadorizada permitiu observar que enxertos realizados sem perfurações no leito (controle) apresentaram redução de volume significativamente maior aos 5 e 7 dias, em relação ao volume inicial, do que enxertos fixados após o leito sofrer perfurações (teste). O volume e densidade dos enxertos controle foram significativamente menores em comparação ao grupo teste no período mais tardio de observação (60 dias). A análise imunohistoquímica revelou a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) aos 3 dias para o grupo teste e somente nos períodos mais tardios para o grupo controle. Considerando que o VEGF está diretamente relacionado com a angiogênese, este resultado indica que as perfurações do leito receptor promoveram revascularização do enxerto de forma mais precoce do que o grupo que não recebeu este tratamento. Foi evidenciado na análise histológica, que o processo de deposição óssea iniciou-se na periferia da interface enxerto-leito para ambos os grupos, sendo que no grupo teste, o processo de remodelação ocorreu também próximo às perfurações. O grupo controle apresentou reabsorção do leito receptor até 20 dias depois da fixação dos enxertos, o que os autores atribuíram à revascularização mais lenta evidenciada neste grupo. Foi concluído que o tratamento do leito receptor por perfurações promove exposição de fatores de crescimento que aceleram a revascularização do enxerto e favorecem a formação de osso mais denso. Porém, como a perda de volume do enxerto ocorreu em ambos os grupos, concluiu-se que as perfurações do leito receptor não impediram a perda de volume do enxerto ósseo.

Por outro lado, em um estudo subsequente da mesma equipe, Pedrosa et al. (2009) repetiram a metodologia anterior substituindo o sítio doador do enxerto pela calvária dos coelhos (origem intramembranosa), da qual fragmentos cortico-medulares foram transplantados para a mandíbula. Após 60 dias, todos os enxertos estavam consolidados, mas o volume dos enxertos aumentou no grupo com perfurações do leito no período de 7 a 20 dias quando comparado com o grupo sem esse tratamento que, inclusive, diminuiu após 60 dias em comparação ao grupo teste. A análise histológica evidenciou maior deposição de novo osso na interface enxerto-leito do grupo teste, principalmente ao redor das perfurações em períodos precoces de cicatrização. Este achado foi acompanhado por aumento na expressão da fosfatase alcalina e da osteopontina no período de avaliação de 7 dias e 20 dias. Considerando que a fosfatase alcalina é expressa por osteoblastos e participa na mineralização da matriz óssea e a osteopontina é uma proteína não-colágena da matriz orgânica do osso que além de participar do processo de angiogênese, também promove quimiotaxia de osteoblastos para áreas que sofreram reabsorção osteoclástica, os autores sugeriram que o aumento na expressão destes fatores possa ter sido responsável pelo ganho de volume observado no grupo teste durante esse período. A análise imunohistoquímica também revelou uma expressão constante do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) em ambos os grupos sendo que no grupo teste apresentaram picos de expressão significativamente superiores aos 10 e aos 60 dias. Considerando que o VEGF está diretamente relacionado com o processo de angiogênese e que o TRAP é um indicador de remodelação óssea, os autores concluíram que a perfuração do leito receptor manteve a vascularização em nível constante durante o estudo, garantindo uma taxa de remodelação óssea (TRAP) na mesma escala. Diferente do estudo anterior, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na densidade óssea, tendo ambos os grupos apresentado aumento significativo neste parâmetro ao longo dos períodos de avaliação. Os autores ressaltaram que aos 60 dias, o grupo teste apresentou neoformação óssea com aspecto trabecular na área da interface enxerto-leito e manutenção do volume ósseo, permitindo afirmar que o tratamento da superfície do leito receptor por perfurações influencia positivamente os processos de revascularização e osteogênese de enxertos ósseos autógenos em bloco.

Em contrapartida, em estudo histológico avaliando o efeito da perfuração do leito receptor sobre a consolidação de enxertos ósseos autógenos *onlay*, Barbosa et al. (2009) não obtiveram resultados que reforçassem o efeito positivo deste tratamento de superfície. Enxertos ósseos foram removidos da calvária de coelhos e fixados em sítio adjacente ao doador perfurado ou não previamente à fixação por parafusos de titânio. Após 28 dias a análise histológica revelou que ambos os grupos apresentaram consolidação ao leito, sem diferença significativa para qualquer dos parâmetros avaliados, o que levou à conclusão de que perfurações do leito receptor não favorecem a neoformação óssea de enxertos ósseos em bloco. Entretanto, os autores especularam que estes resultados podem estar relacionados à presença de forames ósseos naturais da calvária de coelhos, que podem ter possibilitado o contato do enxerto com a medular do leito além da estrutura bicortical do enxerto, que pode ter dificultado a revascularização. Contudo, sugeriram que a realização de perfurações é desnecessária em leitos receptores medulares, sem descartar a possível significância deste procedimento quando realizado em leitos corticais.

Outro método amplamente utilizado com o mesmo objetivo das perfurações é a remoção da camada cortical do leito receptor por desgaste. O efeito exercido por este tratamento foi comparado à perfuração do leito por De Carvalho, Vasconcellos e Pi (2000) em enxertos autógenos cortico-medulares de origem intramembranosa fixados com parafusos na mandíbula de cães. A avaliação histológica aos 45 e 90 dias pós-operatórios evidenciou melhor integração do enxerto à área receptora quando os leitos foram perfurados ou decorticalizados do que quando nenhum tratamento foi dado ao leito. Aos 45 dias, os espécimes que não receberam tratamento apresentaram áreas de integração do enxerto ao leito, mas também foi evidenciada interposição de tecido conjuntivo em áreas da interface. Neste mesmo período, em todos os espécimes que receberam tratamento de superfície, foram encontradas áreas de total integração na interface enxerto-leito por meio de osso neoformado imaturo com espaços medulares amplos e em algumas áreas por tecido de granulação maduro. O padrão de integração observado aos 45 dias foi mantido no período de 90 dias para o grupo perfurado e o grupo decorticalizado. Além disso, esses grupos resultaram em menor reabsorção da estrutura do enxerto e do leito aos 90 dias, provavelmente relacionada a uma revascularização mais rápida destes espécimes. Os autores relataram a ocorrência de interposição de tecido conjuntivo

entre o enxerto e o leito em algumas regiões de alguns espécimes nos grupos que receberam tratamento e atribuíram esta observação à adaptação inadequada do enxerto ao leito receptor. Segundo os resultados deste estudo, não houve diferença significativa no grau de incorporação dos enxertos ósseos ao leito receptor tratado por perfurações em relação ao grupo tratado por decorticalização, porém uma diferença significativa foi observada quando comparados ao grupo em que a cortical foi mantida intacta.

Esses resultados contraditórios foram discutidos em uma revisão de literatura realizada por Greenstein et al. (2009) com o objetivo de analisar se o tratamento de superfície do leito receptor, através de perfurações ou decorticalização apresenta embasamento suficiente para que sua aplicação seja considerada necessária. Os autores mencionaram diversos estudos que concluíram que esses tratamentos de superfície favorecem a revascularização e consolidação de enxertos ósseos *onlay*. Porém, foram mencionados diversos outros artigos que não encontraram diferença estatisticamente significativa ao comparar o reparo de enxertos ósseos utilizando ou não perfuração ou decorticalização do leito receptor. Concluiu-se que estudos adicionais são necessários para determinar de forma definitiva a influência destes tratamentos no processo de consolidação de enxertos ósseos em bloco, ressaltando que as características tanto do enxerto quanto do leito receptor influenciam diretamente no efeito destes tratamentos de superfície.

A hipótese levantada por Adeyemo et al. (2008) sobre a importância de um íntimo contato do enxerto com o leito é apoiada por alguns pesquisadores que defendem que tão importante quanto o preparo do leito receptor é a tentativa de reduzir o espaço gerado na interface para permitir o máximo contato entre as superfícies ósseas. Por esta razão, tem sido aconselhada a escultura do enxerto e/ou leito receptor e o preenchimento desse espaço com osso autógeno particulado, biomateriais contendo fatores de crescimento, tecido autógeno contendo células tronco ou coágulo apenas.

Neste sentido, o uso de plasma rico em plaquetas (PRP) entre o leito receptor e o enxerto foi investigado por Miranda et al. (2006) com a intenção de melhorar o processo de incorporação. O uso do PRP foi fundamentado no fato que fatores de crescimento com capacidade mitogênica e angiogênica estão presentes no PRP, fatores estes usualmente encontrados no processo de reparação óssea, como PDGF, TGF- β e IGF. Enxertos ósseos em bloco removidos da calvária de coelhos

foram transplantados para áreas adjacentes em três diferentes relações enxerto-leito: 1- contato direto entre o enxerto e o leito receptor; 2- osso autógeno particulado interposto entre enxerto e leito; 3- PRP interposto entre enxerto e leito. Após 30 dias, a análise microscópica demonstrou que todos os espécimes apresentavam incorporação dos enxertos, com formação óssea levemente mais evidente no grupo PRP aos 7 dias e maturação mais precoce do osso aos 60 dias, embora sem diferenças estatisticamente significantes. Foi concluído que a adição de PRP ao leito receptor não favoreceu de forma significativa a neoformação óssea nem a reparação em calvária de coelhos.

2.5 FIXAÇÃO RÍGIDA VERSUS FIXAÇÃO NÃO RÍGIDA DOS ENXERTOS

A consolidação incompleta do enxerto ósseo ao leito receptor é uma complicação que pode ocorrer como consequência de diversos fatores, como a adaptação e/ou fixação inadequada do enxerto às variações de características do próprio enxerto de acordo com a área doadora, pela interposição de tecido conjuntivo na interface ou por uma revascularização inadequada, conforme demonstra a revisão apresentada nos itens anteriores desta tese. Esta complicação impede a instalação de implantes na área, geralmente por promover destacamento do enxerto no momento da instalação do implante (MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009 ; ROCCUZZO et al., 2007 ; RODRIGUES et al., 2012).

Embora esteja bem estabelecido que uma fixação adequada seja crucial para promover estabilidade do enxerto ao leito evitando movimentações que possam interferir nos processos biológicos envolvidos na consolidação, não são encontrados muitos estudos comparativos considerando a taxa de sucesso e a influência que o método de fixação exerce nesses eventos ou na manutenção do volume dos enxertos.

Em 1989, foi realizado um dos primeiros estudos investigando de que forma o tipo de fixação e a origem embriológica do enxerto interfeririam na incorporação, manutenção volumétrica e densidade de enxertos ósseos *onlay* em cães (LA TRENTA et al., 1989). Para isso, enxertos ósseos de origem intramembranosa e de origem endocondral receberam fixação rígida com parafusos ou fixação não rígida

por meio de fios metálicos. Após 16 semanas, tanto a origem embriológica quanto o método de fixação influenciaram a manutenção do volume dos enxertos, tendo a origem intramembranosa e a fixação rígida resultado em manutenção significativamente maior do volume ósseo. Além disso, a fixação rígida promoveu união óssea na interface enxerto-leito enquanto enxertos fixados de forma não rígida apresentaram união fibrosa nessa interface.

Também Lin et al. (1999) realizaram enxertos ósseos intramembranosos e endocondrais fixados de forma rígida (parafusos) ou não rígida (sutura) a leitos receptores localizados em regiões de muita movimentação (fêmur) ou pouca movimentação (focinho) em coelhos. Os animais receberam injeções de fluorocromos para verificar os padrões de deposição e reabsorção óssea dentro do osso receptor e do enxerto. Mais uma vez, os enxertos intramembranosos evidenciaram resultados superiores para todos os parâmetros avaliados. A fixação rígida resultou em melhora na sobrevivência de enxertos instalados em sítios de alta movimentação, porém em regiões de pouca movimentação, não foram encontradas diferenças significativas relacionadas ao volume e incorporação do enxerto em função do método de fixação. A análise histológica não mostrou diferenças significativas entre os métodos de fixação estudados sendo encontrados padrões de revascularização similares para ambos. Os autores concluíram que o efeito da fixação rígida é mais pronunciado nos estágios iniciais de reparação do enxerto e que este tipo de fixação deve ser o de escolha em todas as circunstâncias em que o enxerto ósseo em bloco seja submetido à movimentação ou a forças de torção e cisalhamento.

Phillips e Rahn (1990) também observaram que fatores biomecânicos e estruturais influenciam mais os resultados do que a fixação em si. Foram realizados enxertos ósseos de origem intramembranosa (calvária) e de origem endocondral (costela), fixados ou não, rigidamente, por parafusos na mandíbula de carneiros. Após duas semanas os enxertos intramembranosos fixados rigidamente apresentaram maior revascularização, sendo que o oposto foi observado para os enxertos endocondrais, que quando fixados de forma não rígida resultaram em maior revascularização. Após 20 semanas foi evidenciada total revascularização para todos os enxertos. Devido às inconsistências encontradas nos resultados do período inicial do estudo (2 semanas), os autores concluíram que por mais que a revascularização seja um pré-requisito para a reabsorção e formação óssea, a

microestrutura dos enxertos e o fator biomecânico exerceram maior influência na manutenção do volume ósseo. Porém, ressaltaram que a estabilização adequada do enxerto ao leito receptor é crucial para os eventos iniciais da reparação, pois movimentação entre enxerto e leito receptor acarreta em maior reabsorção óssea e consequentemente maior perda no volume do enxerto.

Resultados similares foram obtidos em estudo de Boyd e Mulholland (1993) que, ao avaliarem 134 enxertos ósseos, metade destes fixados por parafuso (fixação rígida) e metade por fios metálicos (fixação não rígida), obtiveram 94% e 96,3% de consolidação óssea, respectivamente, concluindo que o método de fixação não influenciou de forma significativa a integração do enxerto ao leito receptor.

Já no estudo de Jardini, de Marco e Lima (2005) enxertos obtidos de calota craniana de ratos foram estabilizados ao leito na lateral da mandíbula dos animais somente por meio de uma sutura apertada e este método de fixação mostrou-se efetivo em promover integração do enxerto ao leito após 45 dias, embora os autores não defendam o método de fixação não rígida para procedimentos de enxertia. Entretanto o leito receptor desse estudo não estava sujeito às forças da mastigação, motivo ao qual os autores creditaram a eficácia deste método de fixação em evitar micromovimentações do enxerto, permitindo assim a união óssea ao leito receptor.

Por outro lado, uma questão foi levantada em relação ao uso de parafusos de titânio para estabilização rígida de enxertos ósseos em bloco que é a necessidade de remoção do parafuso antes da instalação de implantes (CHACON et al., 2004 ; QUERESHY et al., 2010), o que pode gerar estresse mecânico na área enxertada e envolver risco de fratura do parafuso que muitas vezes se encontra osseointegrado. Assim, foi sugerido o uso de parafusos reabsorvíveis que manteriam as vantagens da fixação rígida e contornariam esses riscos. Foi demonstrado que a comparação dos parafusos de titânio com os parafusos reabsorvíveis resultou em integração e taxa de sucesso de 100% independente do método de fixação tanto em animais quanto em humanos. Além disso, os parafusos reabsorvíveis promoveram perda óssea inferior quando comparados aos parafusos de titânio, ainda que sem diferença significativa. Somente foi encontrada diferença significativa quando estes métodos foram comparados à fixação não rígida, que obteve resultados inferiores em relação à integração do enxerto ao leito receptor e em relação à preservação de volume ósseo. Desta forma, foi considerado que por mais que os parafusos reabsorvíveis não promovam efeito negativo no processo de reparo e que sofram

degradação gradual eliminando a necessidade de sua remoção previamente a instalação de implantes, este método não apresenta vantagem significativa sobre os parafusos de titânio.

A quantidade de parafusos necessários para fixar rigidamente o enxerto também tem sido discutida. Burger, Meshkini e Lindeboom (2011) compararam em humanos, a fixação de enxertos por meio de um ou de dois parafusos de titânio sobre a revascularização que precede os processos de incorporação e remodelação óssea, alegando que não existe um consenso sobre o número ideal de parafusos na estabilização de enxertos ósseos. Além disso, os autores recobriram os enxertos com uma membrana reabsorvível com o intuito de preservar tecido ósseo. Após 4 meses, todos os enxertos apresentavam-se incorporados ao leito com pouca ou nenhuma reabsorção, o que os autores atribuíram ao uso da membrana. Em relação ao volume ósseo foi encontrada uma variação de 35,8% a 72,4% para o grupo fixado por um parafuso e de 28,7% a 56,6% para o grupo com dois parafusos de fixação, enquanto a neoformação óssea variou de 0 a 2% no grupo de um parafuso e de 0 a 8,9% no de dois parafusos, sendo que essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Considerando que a instalação de implantes foi possível em todas as áreas enxertadas, os autores concluíram que dentro do estudo empregado, tipo e tamanho de enxerto utilizado, a fixação por um parafuso de titânio foi suficiente para promover o contato necessário deste ao leito, além de ter evitado a movimentação do enxerto e ter promovido integração adequada ao leito receptor.

Alguns autores relataram que embora a capacidade de estabilização pela fixação rígida por parafusos seja eficaz, este método está associado a uma taxa de reabsorção considerável, principalmente nos períodos iniciais de reparo de enxertos ósseos em bloco (DASMAH et al., 2012 ; KOERDT et al., 2013 ; SCHMITT et al., 2012 ; WIDMARK et al., 1998 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Foi verificado que essa reabsorção em espessura pode ser de 25% depois de 4 meses e de 60% depois de 6 a 8 meses (WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Embora esta reabsorção não tenha inviabilizado a instalação de implantes, foi considerada excessiva e imprevisível (WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997).

Um novo método de fixação de enxertos em bloco em calvária de cobaias foi proposto por Rezende (2008) para contornar o risco que o emprego de parafusos nessa região traria para a sobrevivência dos animais. O método consistiu na cobertura dos enxertos por uma membrana reabsorvível de colágeno de osso bovino

que foi aderida ao leito receptor com adesivo à base de cianoacrilato à distância da interface enxerto-leito exercendo mínima pressão sobre o bloco ósseo, mas o suficiente para mantê-lo imóvel no leito. Este método de fixação mostrou-se eficiente por ter promovido imobilização e adaptação adequadas do enxerto ao leito, viabilizando o reparo ósseo na interface e preservando o volume dos enxertos ao longo do experimento.

2.6 USO DE MEMBRANAS COMO MÉTODO DE FIXAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE VOLUME DE ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO

Conforme estabelecido no item anterior, o método de fixação deve promover não só estabilidade, mas também o contato adequado da superfície do enxerto à superfície do leito para favorecer a revascularização proveniente do leito receptor e processos de reabsorção/formação óssea, de forma equilibrada, para que o volume do enxerto seja mantido o mais próximo possível do inicial (MOHAMMADI et al., 2000). Já foi dito que o uso de parafusos como método de fixação é eficiente, porém, tende a apresentar uma perda óssea significativa (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005 ; KOERDT et al., 2013 ; SCHMITT et al., 2012 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Assim sendo, a colocação de membranas recobrimdo enxertos *onlay* tem sido sugerida para ajudar a prevenir a perda de volume (DE SANTIS et al., 2012), ainda que as opiniões a respeito de seu uso sejam muito divergentes.

Enquanto Buser et al. (1993) estabeleceram que a reabsorção de enxertos autógenos em bloco não é previsível sem a cobertura por membrana, podendo haver cerca de 30% a 60% de reabsorção com a reparação, Widmark, Andersson e Ivanoff (1997) conseguiram volume ósseo suficiente para a inserção de implantes usando enxertos *onlay* sem membranas. Além disso, alguns autores afirmam que seu uso não é desejável porque pode causar complicações, como exposição ao meio bucal com consequente infecção, que levaram à perda de metade do volume do enxerto em um paciente e à perda total do volume em outro paciente tratados por Von Arx, Hardt e Wallkamm (1996), ao utilizarem uma malha de titânio como membrana recobrimdo as áreas enxertadas.

Também Dongieux et al. (1998), em estudo realizado em cães, não encontraram diferenças significantes no volume após a reparação de enxertos *onlay* sem membrana ou recobertos por membranas reabsorvíveis de colágeno e não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). O contrário foi observado por Alberius, Dahlin e Lindhe (1992) ao estudarem o papel da osteopromoção com o uso de membranas em enxertos unicorticais realizados no crânio de ratos, nos quais verificaram maior conservação de volume nos enxertos recobertos por membranas do que nos cobertos por periósteo e outros tipos de tecido mole. Esses autores removeram discos ósseos da mandíbula e os transplantaram para o osso parietal e frontal dos animais recobertos ou não por membrana de e-PTFE e, de forma geral, observaram substancial reabsorção dos enxertos depois de 12 semanas. Esta, porém, foi menor nos enxertos que foram recobertos por membrana, o que os levou a sugerirem que quando se emprega reparação óssea guiada, a quantidade de osso necessária para o transplante pode ser reduzida. A integração dos enxertos ao leito também foi maior nos espécimes recobertos por membrana.

Resultados semelhantes foram alcançados em cães por Jensen et al. (1995), que concluíram que se um enxerto autógeno colocado simultaneamente com implantes é coberto por membranas durante a reparação, a reabsorção é insignificante e o grau de contato enxerto-implante é melhorado nas áreas tratadas com membranas em comparação a áreas controle não cobertas por membranas. Este estudo definiu que o uso da membrana em associação a enxertos ósseos, seja autógeno ou alógeno, deve ser sempre considerado, já que promove maior incorporação do enxerto ao leito receptor, aumenta a área de contato das superfícies do enxerto e do leito e promove preservação de pelo menos 70% do volume ósseo.

De acordo com esses resultados também estão os de Rasmusson et al. (1999), que enxertaram discos ósseos colhidos da calvária de coelhos na metáfise proximal tibial dos animais, recobrindo-os com membranas de e-PTFE em um grupo e deixando-os descobertos em outro. Em alguns animais as membranas foram removidas depois de 8 semanas e a cicatrização foi acompanhada por um período adicional de 6 semanas. Os resultados mostraram um aumento de volume dos enxertos que permaneceram recobertos pelas membranas, ao passo que naqueles em que a membrana foi removida, a taxa de reabsorção foi maior do que a dos enxertos que não receberam membrana desde o início.

A resultados semelhantes chegaram Gordh et al. (1998) que avaliaram, em enxertos *onlay* unicorticais realizados em calvária de ratos, o efeito da permanência de uma membrana de e-PTFE até o final da reparação (20 semanas) e compararam com o efeito da remoção dessa membrana no 12º dia. O leito receptor foi levemente desgastado para expor sua medula e os enxertos foram posicionados com a face medular voltada para o leito. Não observaram diferenças significantes em volume em 12 semanas de reparação, mas às 20 semanas, a integração dos enxertos estava mais completa no lado com membrana. A manutenção de altura foi ainda maior quando a membrana não era removida no 12º dia, ou seja, permanecia até o fim da reparação. Empregando marcadores imunohistoquímicos, verificaram remodelamento ósseo mais intenso nos enxertos com membrana e assumiram que a colocação de uma membrana permeável inerte, além de proporcionar livre difusão de nutrientes tissulares, simultaneamente previne a penetração do tecido conjuntivo adjacente para a interface, criando, presumivelmente um ambiente para o qual células com potencial osteogênico possam migrar a partir do osso circundante, permitindo que a osteogênese ocorra sem impedimentos.

Os próprios Von Arx et al. (2001) que em 1996 foram contrários à utilização da membrana (VON ARX; HARDT; WALLKAMM, 1996), mudaram de opinião 5 anos mais tarde ao avaliarem o efeito do recobrimento com membranas de e-PTFE de enxertos autógenos, alógenos e aloplásticos realizados para aumento lateral de rebordo alveolar de cães. Depois do período de reparação de 6 meses, as áreas enxertadas com osso autógeno em bloco e cobertas por membranas mostraram excelentes resultados com perfil do rebordo bem preservado, inclusive com a formação de nova cortical imediatamente abaixo da membrana. Por outro lado, os blocos não protegidos por membranas sofreram reabsorção vestíbulo-crestal, limitando claramente o resultado do tratamento. Os outros materiais de preenchimento apresentaram resultados inconsistentes, às vezes com encapsulação das partículas por tecido conjuntivo, o que levou à redução da largura da crista óssea.

A maior manutenção do volume de enxertos recobertos por membrana foi atribuída por Salata, Rasmusson e Kahnberg (2002) à remodelação retardada, provavelmente como consequência de um processo prejudicado de revascularização do enxerto a partir dos tecidos vizinhos, provocado pela presença da membrana. O enxerto passaria então a depender da reabsorção prévia do leito hospedeiro para se

tornar revascularizado e se remodelar. Esses autores chegaram a esta conclusão depois de enxertarem fragmentos de rádio na borda inferior da mandíbula de coelhos os quais fixaram com parafusos de titânio. Não realizaram nenhum tipo de exposição da área medular do leito, mantendo a cortical intacta. No lado experimental os enxertos foram cobertos por uma membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) e no lado controle os enxertos foram deixados descobertos. Oito animais do grupo experimental e seis do controle foram sacrificados 6 e 24 semanas após a cirurgia respectivamente para análise microscópica e histomorfométrica. Os enxertos mostraram mais reabsorção depois de 24 semanas do que às 6 semanas, independentemente do tratamento, embora a quantidade de novo osso tenha sido maior às 24 semanas nas áreas cobertas por membrana. Segundo a opinião dos autores, a barreira mecânica atrapalharia a vascularização do enxerto em curto prazo, atrasando assim, o processo de remodelação e reabsorção óssea, o que em última análise, favoreceu a manutenção do seu volume. A fonte para a revascularização dos enxertos cobertos por membrana pareceu ser os vasos sanguíneos originados do osso receptor após exposição da medula óssea pela reabsorção. Outra observação importante deste estudo foi a osteopromoção ocorrida abaixo da membrana, com a presença de fibrilas colágenas, medula óssea e novo osso trabecular espalhados no espaço sob a membrana, tanto às 6 como às 24 semanas. Explicaram este evento afirmando que o processo de reabsorção do enxerto supre a área com elementos que apresentam propriedades osteoindutoras e osteocondutoras e a membrana funciona como barreira contra a dispersão dos fatores osteogênicos, criando as condições para a deposição óssea.

Esses resultados foram corroborados por Donos, Kostopoulos e Karring (2002) em enxertos realizados em mandíbulas de ratos e cobertos por membranas de e-PTFE, que observaram que os enxertos ósseos sob a membrana inicialmente apresentaram reabsorção superficial, mas subsequentemente, o espaço que foi criado pela membrana gradualmente se tornou preenchido por osso. Depois de 180 dias, a área sob a membrana estava completamente preenchida por osso e foi impossível distinguir entre osso enxertado e neoformado. De forma geral, os enxertos que não foram recobertos por membrana estavam caracterizados por reabsorção gradual durante todo o período experimental. Poucos mantiveram sua altura e houve frequentemente perda de continuidade entre o osso enxertado e o subjacente. Também assumiram que este resultado ocorreu provavelmente devido à

função de barreira da membrana, que agiu prevenindo a invasão de células não formadoras de osso dos tecidos moles circundantes para dentro do enxerto ósseo e para o espaço da interface entre o enxerto e o leito durante a reparação.

O aumento do volume do enxerto em relação ao seu volume inicial quando do uso de membranas não foi um achado comum, mas o trabalho de Jardini, de Marco e Lima (2005) demonstrou ser possível essa ocorrência. Estes pesquisadores analisaram quantitativamente e qualitativamente o padrão de reparo inicial de enxertos autógenos em bloco em calvária de ratos, cobertos ou não por membranas de e-PTFE. Aos 21 dias, foram evidenciadas áreas de consolidação do enxerto ao leito receptor para ambos os grupos, porém, os enxertos sem membrana apresentaram reabsorção extensa principalmente nas laterais e na superfície externa. Por outro lado, o grupo recoberto por membrana apresentou áreas de reabsorção nas laterais do enxerto associadas a linhas reversas e deposição de osso lamelar se estendendo além dos limites laterais do enxerto, resultando em 55% de ganho de volume ósseo em comparação a 24% de perda óssea do grupo sem membrana. Aos 45 dias, ainda foram observadas áreas de reabsorção e de neoformação óssea no leito do grupo que não recebeu recobrimento por membrana, entretanto, com progressão da reabsorção nas laterais do enxerto evidenciada no período de avaliação anterior, dando um aspecto arredondado às bordas do enxerto. Outros eventos observados também atestaram a superioridade do uso da membrana, como por exemplo, a maior quantidade de espaços medulares, maior quantidade de osso neoformado tanto na interface quanto ao longo dos limites do enxerto e ausência de reabsorção das bordas laterais em ambos os períodos de avaliação.

Mesmo com todos os resultados favoráveis alcançados com o uso de membranas recobrindo enxertos e o reduzido número de publicações atestando o contrário, uma revisão sistemática realizada por Gielkens et al. (2007) não encontrou evidências de que o uso de membranas previne a reabsorção em enxertos ósseos autólogos durante o período de reparação. A pesquisa coletou 182 artigos, dos quais 32 foram considerados relevantes metodologicamente, abrangendo 14 estudos controlados. Os artigos incluíram experimentos em animais e em humanos com objetivos heterogêneos e resultados variáveis. Embora a maioria dos autores tenha encontrado efeito protetor da membrana sobre a reabsorção dos enxertos, a revisão considerou que a evidência disponível é muito fraca para suportar essa afirmativa.

Justificaram sua conclusão afirmando que a maioria dos estudos foi realizada com amostras pequenas em animais, tornando difícil a transferência dos resultados para humanos. Além disso, ambiguidade e falta de significância foram encontrados em muitos estudos, além de limitações como área da implantação, desenhos não adequados e métodos variáveis de medidas de resultados.

Ainda assim, a adoção do recobrimento de enxertos por membrana levou a resultados surpreendentes por De Santis et al. (2012) que avaliaram a integração de implantes instalados 3 meses após enxertos em bloco autógenos e xenógenos serem realizados na mandíbula de cães. Nesse estudo, os autores realizaram perfurações nos leitos, fixaram os enxertos com dois parafusos de fixação e recobriram todos os enxertos com uma membrana reabsorvível para minimizar a perda de volume. Observaram que, enquanto os enxertos autógenos estavam integrados ao leito hospedeiro e ricamente celularizados e vascularizados, os enxertos xenógenos pareciam estar embebidos no tecido conjuntivo com pequena formação óssea no interior dos enxertos, além de não apresentarem osseointegração aos implantes. Entretanto, observaram que, após 3 meses, houve uma redução média muito pequena na espessura dos enxertos, sendo aproximadamente 0,1mm para o enxerto autógeno e 0,3mm para o xenógeno, sem diferença estatística entre eles.

Em estudo recente, foi avaliada a influência do uso de uma membrana no processo de reparo de enxertos ósseos em bloco fixados por parafuso sobre a expressão de fatores de crescimento diretamente relacionados com a consolidação destes enxertos: a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e óxido nítrico sintases, endotelial e induzível (eNOS e iNOS). A expressão da BMP-2 aumentou de forma significativa ao longo do experimento no grupo que recebeu recobrimento por membrana, enquanto esta expressão se manteve estável para o grupo sem membrana. A expressão do VEGF também aumentou no grupo com membrana sendo este aumento mais significativo no período de avaliação mais avançado (16 semanas) sugerindo que o recobrimento pela membrana retardou a revascularização do enxerto enquanto a expressão deste fator de crescimento sofreu redução ao longo do experimento no grupo sem membrana. A expressão de NOS também apresentou aumento significativo no grupo com membrana reforçando a expansão vascular que este grupo sofreu ao longo do estudo e, em conjunto com os outros resultados descritos, representa o processo de

remodelação óssea que ocorreu de forma mais exacerbada no grupo com membrana. Além disso, este grupo também apresentou volume ósseo significativamente maior em comparação ao grupo sem membrana (KOERDT et al., 2013).

2.7 USO CIRÚRGICO DE ADESIVOS À BASE DE CIANOACRILATO

Os adesivos à base de cianoacrilato têm sido utilizados na Medicina e na Odontologia há algum tempo. Nos anos 60 identificam-se diversos estudos que procuraram buscar segurança para as possíveis aplicações desses adesivos. Inicialmente foi testada sua ação no reparo de nervos (KLINE; HAYES, 1963) e vasos sanguíneos (YASHON et al., 1966) e depois, seu uso foi estendido para feridas de pele, enxertos de osso e cartilagem, cirurgias de córnea e pálpebra, para oclusão de varizes esofagianas, vazamentos de fluido cérebro-espinhal e embolização de malformações arteriovenosas (BRADLEY et al., 1999 ; PENOFF, 1999).

Diversas formas de aplicação dos cianoacrilatos também já foram sugeridas na Odontologia, dentre elas: como substituto de sutura, capeamento pulpar e como material de obturação endodôntica. Dentre as propriedades destes adesivos, já foram citadas capacidade hemostática, antiinflamatória, ação bacteriostática e capacidade de adesão em sítios úmidos (HEROD, 1990).

Ainda existem questionamentos sobre um possível potencial citotóxico destes adesivos, porém diversos estudos já demonstraram que certos derivados dos cianoacrilatos não oferecem prejuízos significativos aos tecidos, resultando apenas na formação de granulomas do tipo corpo estranho (FORSETH; O'GRADY; TORIUMI, 1992 ; TORIUMI et al., 1990).

Os cortes microscópicos das extremidades da membrana colada com cianoacrilato apresentados por Rezende (2008) evidenciaram a formação de granulomas discretos do tipo corpo estranho, constituídos principalmente por macrófagos e células gigantes multinucleadas, algumas das quais evidenciavam partículas do adesivo em seu citoplasma, confirmando tratar-se de material

biodegradável. Em nenhum dos espécimes foram vistas células inflamatórias polimorfonucleares que pudessem indicar resposta inflamatória aguda ao material.

A biocompatibilidade de adesivos à base de cianoacrilato também foi evidenciada no estudo de De Azevedo, Marques e Nombana (2003), que testaram o efeito citotóxico de três adesivos, n-butyl-2-cianoacrylate (Histoacryl) e outros dois homólogos etilcianoacrilatos: Super-Bonder (Loctite Brasil, São Paulo, SP, Brazil) e Ultrabond (Garin Cia. Ltda., São Paulo, SP, Brazil) em cultura de fibroblastos, empregando ensaios de viabilidade pela exclusão de células coradas pelo azul de Trypan após 0, 6, 12 e 24 horas (resposta celular imediata - curto prazo) e 1, 3, 5 e 7 dias (sobrevivência celular – longo prazo). O Ultrabond apresentou porcentagens significativamente menores de viabilidade celular do que os outros dois grupos. Em longo prazo, o Super Bonder resultou em menor porcentagem de viabilidade celular, porém este foi o único grupo que promoveu proliferação celular progressiva e contínua. Os três cianoacrilatos testados resultaram em mais de 82% de células viáveis nas primeiras 24 horas. Portanto, foi concluído que tanto o Histoacryl quanto o Super Bonder e o Ultrabond são biocompatíveis *in vitro*, podendo ser empregados para finalidades biológicas.

O uso de N-butil-2-cianoacrilato como substituto da sutura de retalhos periodontais foi avaliado no estudo de Kulkarni, Dodwad e Chava (2007) em comparação ao fio de seda 3-0 e observaram que, aos 7 dias, o cianoacrilato resultou em menor acúmulo de placa, menor índice de sangramento gengival e sinais inflamatórios microscópicos mais leves em comparação ao fio de sutura. Por outro lado, a presença do fio de seda favoreceu a retenção de placa, o que esteve diretamente relacionado com o sangramento gengival que regrediu juntamente com a intensidade do processo inflamatório após a remoção da sutura.

Um dos poucos estudos encontrados na literatura que utilizam o cianoacrilato como método de fixação de enxertos ósseos *onlay* é o de Saska et al. (2009) que compararam a fixação por cianoacrilato com a fixação por parafusos de titânio em enxertos realizados em calvária de coelhos. Foi evidenciado que o adesivo à base de cianoacrilato promoveu estabilidade e adaptação adequadas entre o enxerto e o leito receptor, além de ter promovido maior preservação do volume ósseo. A presença do adesivo retardou o processo de incorporação e remodelação óssea nas extremidades da interface enxerto-leito, ao passo que o grupo fixado por parafusos revelou remodelação óssea mais intensa aos 15 dias, porém com reabsorção óssea

significativa do enxerto, a qual os autores sugeriram ter ocorrido como resultado da pressão interna negativa gerada pela compressão exercida pelo parafuso. Os autores concluíram que o adesivo foi eficiente como método de fixação de enxertos ósseos em bloco por não ter causado resposta inflamatória, por imobilizar o enxerto e promover o contato necessário deste com o leito e por ter preservado volume ósseo. Ressaltaram que, para que ocorra total incorporação do enxerto ao leito, seria necessário um período mais longo de cicatrização, já que a degradação do adesivo é necessária para completa cicatrização e consolidação óssea.

Os resultados de Saska et al. (2009) estão de acordo com os de De Oliveira Neto et al. (2012). Entretanto, estes últimos verificaram que a presença do adesivo estava sempre relacionada com danos ao periósteo em contato com o material, mas sem causar prejuízo à incorporação do enxerto ao leito receptor. Estes autores também observaram que a presença do adesivo retarda os processos envolvidos na cicatrização de enxertos ósseos, embora aos 42 dias pós-cirúrgicos, já não era possível identificar remanescentes do adesivo, o que os levou a concluir ser este um método de fixação tão eficiente quanto o uso de parafusos, além de resultar em maior preservação do volume ósseo.

Em estudo recente, o uso do cianoacrilato como método de fixação de enxertos ósseos *onlay* resultou em reação de corpo estranho e por mais que o adesivo tenha promovido estabilidade apropriada do enxerto, a presença do cianoacrilato impediu a neoformação óssea na interface enxerto-leito receptor (BAŞ et al., 2012). No entanto, cabe ressaltar, que este estudo utilizou enxertos ósseos de origem endocondral (tíbia de coelhos) e o adesivo foi aplicado em toda a superfície de contato entre o enxerto e o leito, o que pode ter influenciado os resultados.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs verificar, em tibia de coelhos, se a desmineralização ácida, tanto da superfície óssea a receber o enxerto em bloco como do próprio bloco ósseo autógeno que entra em contato com o leito ósseo hospedeiro, exerce efeito sobre a incorporação do enxerto ao leito em comparação à técnica convencional (sem aplicação do ácido). Além disso, procurou-se analisar se o método de fixação, utilizando um parafuso de titânio ou uma membrana não reabsorvível fixada com adesivo de cianocrilato, influencia o grau de reabsorção e consolidação do enxerto ósseo em bloco ao leito receptor.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (ANEXO A).

Foram utilizados 36 coelhos brancos (New Zealand), machos, de aproximadamente 3,5 kg, entre 9 e 12 meses de idade criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Os animais foram submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais, sob a supervisão de um médico veterinário. A alimentação consistiu em ração comercial sólida apropriada à idade e peso dos animais e água “ad libitum”. Os animais foram avaliados e supervisionados pela veterinária Dra. Luciana Fernandes de Oliveira (clínica privada).

4.2 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado com base no protocolo descrito por Ueda, Francischone e Ramalho (2007). Os procedimentos experimentais foram realizados sob condições rigorosas de esterilização e assepsia. Os animais foram submetidos à anestesia com pré-anestésico cloridrato de xilasina (Rompum, Bayer, São Paulo/SP) a 0,1ml/Kg de peso corporal, seguido de cloridrato de cetamina (Ketalar, Achê Laboratórios Farmacêuticos S.A., Guarulhos/SP) a 0,5 ml/Kg de peso corporal, produzindo anestesia dissociativa e cataléptica. Após a realização de tricotomia na região interna das patas traseiras, abrangendo a região da metáfise proximal tibial, foi realizada infiltração local de cloridrato de lidocaína (Xilocaína, Merrel Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda, Guarulhos/SP) para fins de vasoconstrição e isquemia local, a fim de diminuir o sangramento. A antisepsia da pele foi realizada com digluconato de clorexidina a 2% (Chlorohex, Johnson Diversey/SP), seguido de isolamento da área com campos cirúrgicos descartáveis estéreis. Incisão linear de 5 cm de extensão com lâmina de bisturi n.15 (Lamedid

Comercial e Serviços Ltda., Barueri/SP), foi realizada sobre a pele envolvendo o perióstio da porção proximal da tíbia desses animais. Após o levantamento do retalho total com periótomo de Molt e exposição da cortical óssea, fragmentos ósseos em bloco de 10x10 mm, foram removidos com broca trefina de 10 mm, em baixa velocidade controlada pelo uso de um equipamento de instalação de implantes (Surgic XT Plus, Olsen Indústria e Comércio S.A., Palhoça/SC), sob profusa irrigação com soro fisiológico estéril e cinzéis, e transplantados para uma área adjacente (Figura 1).

Nesta etapa, os animais foram divididos em quatro grupos de 3 animais por período de avaliação (15, 30 e 45 dias):

- **Grupo PA:** a superfície cortical do leito receptor e a face interna do enxerto de osso autógeno em bloco (interface enxerto-leito) foram desmineralizadas pela aplicação de gel de ácido cítrico a 50% em pH 1,0 por 3 minutos, produzido pela Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP). Após este período, o gel foi lavado com soro fisiológico estéril e o bloco ósseo foi imediatamente fixado em posição com auxílio de um parafuso central de fixação de titânio de 1,4 mm de diâmetro e 10 mm de altura (Bionnovation biomedical, Bauru, São Paulo, Brasil). A pele do animal foi suturada com fio de seda preta 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, SP) (Figuras 1 A-D, F, H e I);
 - **Grupo P:** neste grupo, considerado como controle do grupo PA, não houve tratamento da interface antes da fixação do enxerto ao leito com o parafuso de titânio (Figura 1 A-D, H e I);
 - **Grupo MA:** a interface enxerto-leito foi tratada da mesma forma que o grupo PA antes do recobrimento do enxerto por uma membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno (Bionnovation Biomedical, Bauru, São Paulo, Brasil) fixada ao leito pelas extremidades, à distância da interface enxerto-leito, com adesivo de cianocrilato (Loctite – Super Bonder Flex Gel, Henkel Ltda, São Paulo, Brasil), com o intuito de manter o enxerto imobilizado durante o período de reparação (Figura 1 A, B, E, G e I);
 - **Grupo M:** neste grupo, considerado como controle do grupo MA, não houve tratamento da interface enxerto-leito antes da fixação do enxerto pela colagem da membrana (Figura 1 A, B, G e I).
-

Os animais receberam uma dose única de penicilina benzatina (Pentabiótico Veterinário, Lab. Wyeth Ltda. São Bernardo do Campo/SP) na proporção de 16.000 UI por via intraperitoneal, logo após a cirurgia. O controle de dor pós-operatória foi realizado pela administração de analgésicos nos primeiros dois dias de pós-operatório (paracetamol - gotas, via oral, na dose de 1 gota por quilo de peso), e a sutura foi removida entre o 7º e 10º dias.

Figura 1 – Procedimento cirúrgico – **A**- Incisão de aproximadamente 5 cm e descolamento de um retalho dermo-epidérmico-periosteal para exposição da metáfise proximal tibial; **B** – Canaleta produzida com broca trefina na superfície óssea; **C** – Perfuração no centro do enxerto para possibilitar fixação com parafuso e na área adjacente onde o mesmo foi fixado (grupos P e PA); **D** – Deslocamento do enxerto com o auxílio de lâmina de bisturi; **E** - Desmineralização ácida simultânea da superfície interna do enxerto e da cortical óssea da área receptora do grupo MA; **F** – Desmineralização ácida simultânea da superfície interna do enxerto e da cortical óssea da área receptora do grupo PA antes do aperto final do parafuso; **G** – Enxerto ósseo transplantado e recoberto por membrana não-reabsorvível fixada com adesivo de cianocrilato nas extremidades; **H** – Enxerto ósseo transplantado e fixado com parafuso de titânio; **I** – sutura do retalho com fio de sutura 3-0

4.3 Eutanásia

Após 15, 30 e 45 dias da cirurgia, 12 animais (3 por período em cada grupo) foram anestesiados, pelo mesmo método já descrito e sofreram eutanásia com uma overdose intravenosa de barbitúricos (Tiopental na concentração de 0,12 mg/Kg), para obtenção das biópsias. Estas foram removidas como auxílio de disco diamantado monoface picotado em baixa rotação, sob abundante irrigação com solução salina, de modo a compreender o material enxertado e parte do leito receptor (Figuras 1 R e S). O material removido (espécimes) foi imediatamente imerso em solução de formalina a 10% por aproximadamente 24 horas e, em seguida, os espécimes foram submetidos a processamento histotécnico para a coloração por hematoxilina-eosina (HE), com cortes semi-seriados de 4-5µm de espessura.

4.4 Análise microscópica

Após a remoção dos parafusos de fixação, os espécimes foram desmineralizados em solução de MORSE (ácido láctico e citrato de sódio), trocada semanalmente durante 2 meses. O tempo necessário de desmineralização foi determinado através de tomadas radiográficas dos espécimes até que a radiografia não revelasse imagem alguma. Após sua total desmineralização os espécimes sofreram processamento histológico com desidratação em soluções crescentes de etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), diafanização em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha KGaA, Darmstadt, Alemanha) e inclusão em Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) fundida em estufa. Cortes semi-seriados foram realizados em micrótomo Leica com 3 a 5 µm de espessura, de acordo com o protocolo utilizado pelo laboratório de Patologia do departamento de Estomatologia da FOB/USP, sendo os cortes resultantes colocados sobre lâminas convencionais (Dako Cytomation North America Inc, Carpinteria, CA, EUA), os quais foram, respectivamente, corados pela técnica da hematoxilina-eosina.

4.4.1 Análise qualitativa

Os cortes teciduais foram analisados qualitativamente por um patologista experiente (Prof. Dr. Alberto Consolaro, professor titular da Disciplina de Patologia da FOB/USP) e cego ao experimento. Os objetos de análise foram (Figuras 2 e 3):

- Interface entre o enxerto e o leito receptor, onde foram avaliados: a presença ou não de remanescentes do periósteo; presença ou não de tecido de granulação; áreas de reabsorção ou preservação dos limites inferiores do enxerto; áreas de reabsorção ou preservação dos limites do leito receptor; osteogênese a partir do enxerto e do leito; incorporação do enxerto ao leito e tipo de infiltrado inflamatório predominante, quando presente.
- Interface formada nas extremidades do enxerto entre a face lateral do enxerto e o leito receptor, que delimitavam um ambiente em forma triangular. Nesta localização foram avaliados: a presença ou não de remanescentes do periósteo; presença ou não de tecido de granulação; continuidade ou não da membrana; possibilidade de delimitação das margens do leito e do enxerto; presença de osteogênese a partir do enxerto e do leito; presença ou não de incorporação de osso neoformado ao enxerto, leito e membrana; tipo de infiltrado inflamatório predominante, quando presente;
- Extremidade da membrana que foi fixada com cianoacrilato, onde foram observadas: a presença ou não de resíduos do adesivo; presença ou não de reação tipo corpo estranho ao cianoacrilato; presença ou não de osteogênese associada ao cianoacrilato; presença ou não de reabsorção óssea associada ao cianoacrilato.

Figura 2 – Representação esquemática das áreas de interesse na análise microscópica qualitativa dos grupos que foram fixados pelo uso de uma membrana fixada por adesivo à base de cianoacrilato (M e MA): 1 - interface enxerto-membrana; 2 - espaço triangular formado nas laterais do enxerto sob a membrana; 3 - interface enxerto-leito receptor; 4 - extremidade da membrana fixada com cianoacrilato. E= enxerto; L= leito receptor; M= membrana; on = osso neoformado (ilustração de Eduardo Aleixo Figueira)

Figura 3 – Representação esquemática das áreas de interesse na análise microscópica qualitativa dos grupos que foram fixados através do uso de um parafuso de titânio (P e PA): 1 - interface enxerto-leito receptor; 2 - extremidades do enxerto (ilustração de Eduardo Aleixo Figueira e Juliana Berchan)

4.4.2 Análise quantitativa

Imagens digitais parciais dos cortes teciduais capturadas com objetivas 4x, 10x, 20x, 40x e 100x em microscópio óptico (Olympus – CX2, Olympus Imaging America Inc.) foram transferidas para um microcomputador. Empregando o programa Adobe Photoshop CS, versão 8.0.1 (1990-2003 Adobe Systems Incorporated, USA), foram compostas imagens dos espécimes completos (Figura 4). Nestas imagens foram avaliadas a densidade de osso neoformado na interface enxerto-leito receptor e a proporção linear de superfícies desta interface consolidadas ao osso neoformado. Para isto, um único avaliador treinado e cego ao experimento realizou medições nas imagens empregando o programa de domínio

público analisador de imagens Image J 1.38x (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>).

4.4.2.1 Avaliação da neoformação óssea na interface enxerto-leito receptor

Empregando a ferramenta *Analyse / Set Measurements*, foi ativada a função *Area*. Foi escolhido o botão *Poligon selections* da barra de ferramentas, para delimitar com o *mouse* a área correspondente à interface enxerto-leito. Em seguida, foi empregada a ferramenta *Analyse / Measure* para medir esta área em pixels (Figura 4). A mesma sequência de procedimentos foi adotada para delimitar e medir a área de osso neoformado dentro da área correspondente à interface. Cada uma dessas medidas foi realizada três vezes pelo mesmo examinador, com intervalo de 3 dias entre as medições. Foi considerada a média aritmética entre essas medidas. Os dados colhidos foram transferidos para uma planilha do programa Excel (Microsoft Office 2007, Windows XP), onde foi calculada a porcentagem da área da interface ocupada por osso neoformado em cada espécime.

4.4.2.2 Avaliação das superfícies de consolidação óssea na interface enxerto-leito receptor

Para a avaliação linear das superfícies de consolidação do osso neoformado ao osso hospedeiro e ao enxerto, a função *Area* foi desativada. O botão *Segmented Lines* da barra de ferramentas do programa Image J foi escolhido para delimitar as superfícies do enxerto e do leito voltadas para a interface. Com a ferramenta *Analyse/Measure*, foi determinado o comprimento em pixels dessas superfícies delimitadas (Figura 5). O mesmo procedimento foi adotado para delimitar e medir as superfícies de consolidação entre enxerto e osso neoformado e entre leito receptor e osso neoformado. Da mesma forma descrita para a medida de área, cada uma dessas medidas foi realizada três vezes, com intervalo de 3 dias entre elas e a média entre as três foi considerada. Este conjunto de dados foi transferido para uma planilha do programa Excel (Microsoft Office 2007, Windows XP), para o cálculo da porcentagem de superfícies da interface consolidadas ao osso neoformado em cada espécime.

4.4.2.3 Avaliação da variação da espessura do enxerto ao longo do tempo

A provável diminuição da espessura do enxerto ao longo do tempo de reparação não foi possível de ser avaliada de forma direta nos espécimes deste estudo, já que não foram acompanhados os mesmos espécimes longitudinalmente. Assim, esta avaliação foi feita de forma indireta, pela comparação da espessura média dos blocos ósseos antes do início da reabsorção (aos 15 dias) e a espessura média encontrada aos 30 e 45 dias nos grupos de estudo.

Dos 19 espécimes que, aos 15 dias permitiram sua avaliação integral nos cortes histológicos, o programa Image J foi empregado para mensuração da espessura do enxerto como descrito a seguir. A função *Segmented Lines* foi desativada e foi escolhida a função *Straight line* da barra de ferramentas do programa Image J para delimitar 3 pontos da estrutura do enxerto (extremidade esquerda, centro e extremidade direita), os quais foram medidos verticalmente (Figura 6). Com a ferramenta *Analyse/Measure*, foi determinado o comprimento em pixels das medidas delimitadas, posteriormente convertidas em micrometros (μm). Da mesma forma descrita anteriormente, cada uma dessas medidas foi realizada três vezes, com intervalo de 3 dias entre elas e a média entre as três foi considerada para cada espécime. Este conjunto de dados foi transferido para uma planilha do programa Excel (Microsoft Office 2007, Windows XP). A média dos 19 espécimes de 15 dias foi considerada como espessura média do bloco do enxerto. O mesmo procedimento foi repetido para os espécimes de 30 e 45 dias, cujas médias foram consideradas para concluir, ainda que parcialmente, sobre a reabsorção sofrida pelos enxertos, já que nenhuma análise estatística é aplicável para esta comparação (análise não longitudinal). Os dados de 30 e 45 dias, todavia, foram estatisticamente comparados entre os grupos.

Figura 4 - Avaliação da densidade óssea na interface enxerto-leito receptor. A: Imagem de um corte tecidual contendo o enxerto (E), leito receptor (L) e interface enxerto-leito (IEL), com osso neoformado (on) aberta pelo programa analisador de imagens (Image J). B: Delimitação (linha em amarelo) da área de interface entre o enxerto (E) e o leito receptor (L) empregando a ferramenta *Polígono selection* (seta); o número no canto superior esquerdo representa a medida de área (em pixels) à qual a delimitação corresponde. C: Delimitação (linhas em amarelo) das áreas correspondentes a tecido mineralizado ocorrendo dentro da área delimitada em B, empregando a mesma ferramenta (seta); o número abaixo da medida anterior no canto superior esquerdo corresponde à soma das áreas delimitadas (em pixels) empregada no cálculo da porcentagem de tecido mineralizado formado na interface

Figura 5 - Avaliação das superfícies de consolidação óssea na interface enxerto-leito receptor.

A: Imagem do corte tecidual contendo enxerto (E), leito receptor (L) e interface enxerto-leito aberta pelo programa analisador de imagens (Image J) no qual as superfícies de contato do enxerto e do leito foram delimitadas (linhas amarelas) empregando a ferramenta *Segmented Lines* (seta); os números no canto superior esquerdo representam as medidas (em pixels) das superfícies do enxerto (1) e do leito (2), que foram somadas para obtenção da medida total das superfícies que compõem a interface. B: Delimitação (linhas interrompidas em amarelo) das superfícies do enxerto (E) e do leito receptor (L) que estão consolidadas ao osso neoformado na interface empregando a mesma ferramenta do programa (seta); os números no canto superior esquerdo correspondem à medida (em pixels) de cada uma dessas linhas e que foram somadas para o cálculo da porcentagem de superfícies consolidadas ao osso neoformado

Figura 6 - Avaliação da variação da espessura do enxerto ao longo do tempo. Imagem do corte tecidual contendo enxerto (E), e leito receptor (L) aberta pelo programa analisador de imagens (Image J) na qual três medidas foram realizadas no enxerto (linhas amarelas) empregando a ferramenta *Straight Line* (seta); os números no canto superior esquerdo representam as medidas (em pixels) da extremidade esquerda (1), centro (2) e extremidade direita (3), que foram somadas para obtenção da medida total da espessura do enxerto

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância a 3 critérios: 1- fator fixação a dois níveis, membrana e parafuso; 2- fator tratamento de superfície a dois níveis, com ou sem ácido; 3- fator tempo a três níveis, 15, 30 e 45 dias. Estas análises foram seguidas pelo teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados através dos programas Statistica 12.0 e Prism5 (GraphPad, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

As informações colhidas de cada espécime a respeito de cada parâmetro avaliado referente à análise qualitativa que deram fundamento para a análise descritiva encontram-se nas tabelas 1 a 9 (APÊNDICE A).

5.1.1 Análise aos 15 dias

5.1.1.1 Grupo PA

Dois espécimes deste grupo (n=6) evidenciaram osteogênese na interface enxerto-leito receptor. Nos demais espécimes, foi observado tecido de granulação maduro na interface, mas sem formação óssea. O mesmo fenômeno foi visto nas extremidades do enxerto. Na área correspondente à periferia do parafuso foi evidenciada presença homogênea de osso imaturo ou primário. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 7.

5.1.1.2 Grupo P

Os espécimes deste grupo evidenciaram a presença de tecido de granulação maduro na interface enxerto-leito com fibrosamento moderado, discreta presença de vasos neoformados e áreas focais com infiltração de leucócitos. Nas superfícies corticais dessa interface foram observadas predominantemente áreas de reabsorção óssea. Em dois espécimes (n=6) observou-se neoformação óssea ora leve, ora intensa na interface. Nas extremidades do enxerto foi encontrada discreta atividade osteogênica. Nas áreas delimitadas pelas espiras do parafuso notou-se osso imaturo e homogeneamente distribuído. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 8.

5.1.1.3 Grupo MA

A membrana sobre o enxerto e leito receptor apresentou-se acinzentada aos cortes histológicos, birrefringente, e com estruturas cristalóides minúsculas e múltiplas. Nos espécimes deste grupo foi evidenciada presença de muitas células infiltrando a estrutura dos espaços vazios do politetrafluoretileno. Na interface enxerto-leito foi encontrada presença tênue e irregular de fibrina com algumas hemácias e leucócitos. Esta organização se continuava com as extremidades. Não houve qualquer sinal de osteogênese nos espécimes correspondentes a este grupo. A resposta inflamatória e a reparatória apresentaram-se imaturas e incipientes, inclusive ao redor do cianoacrilato presente nas extremidades da membrana. Nesta região observou-se periostite ossificante. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 9.

5.1.1.4 Grupo M

As membranas nos espécimes deste grupo apresentaram-se infiltradas como as do grupo MA. Na interface membrana/tecido conjuntivo fibroso externo, houve formação de granulomas de corpo estranho caracterizado por uma faixa de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias. Entre a superfície externa do enxerto e a membrana, foi observado tecido conjuntivo fibroso membranoso semelhante ao perióstio. Na interface enxerto-leito, foi evidenciado tecido de granulação jovem, ainda com áreas de coágulo sanguíneo e fibrina, mantendo essas características nas extremidades do enxerto. Também neste grupo foi evidenciada periostite ossificante relacionada às extremidades da membrana. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 10.

Figura 7 – Espécime representativo do Grupo PA aos 15 dias. **A** – Vista panorâmica do corte microscópico contendo enxerto (E), leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (IEL); **B** – Região da interface destacada em preto contínuo de A, onde se verifica osteogênese dentro do destaque em amarelo em meio a tecido de granulação maduro (seta); **C** – Destaque em amarelo de B em maior aumento evidenciando o osso em neoformação (on); **D** – Destaque em azul de A em maior aumento, onde se verifica a relação da extremidade do enxerto (E) com o leito (L) e com a interface (IEL) em cujo destaque vermelho se observa tecido de granulação maduro (tg) sem tecido mineralizado; **E** – Área destacada em vermelho de D em maior aumento; **F** – Destaque em verde de A, correspondente à extremidade oposta do enxerto (E) e sua relação com o leito (L) e com a interface (IEL), onde se verifica presença de tecido de granulação maduro (tg) e de uma esquirola de osso maduro (om) provavelmente liberada durante o procedimento cirúrgico; **G** – Destaque em preto segmentado de A, correspondente à região onde se encontrava o parafuso de fixação do enxerto (P) onde é possível a identificação de osso imaturo (oi) perifericamente à área onde se encontrava o parafuso

Figura 8 – Espécimes representativos do grupo P aos 15 dias. **A** – Visão panorâmica de um dos espécimes deste grupo, onde se verifica a presença simultânea do enxerto (E), interface (IEL) e leito (L), além de osso imaturo (oi) na região correspondente à periferia do parafuso de fixação; **B** – Destaque em preto de A, correspondente ao tecido de granulação maduro (tg) formado na interface com a presença de vasos neoformados e congestos (setas amarelas); **C** – Destaque em amarelo de A correspondente a uma das extremidades do enxerto onde se percebe a presença de tecido de granulação maduro (tg); **D** – Área da interface enxerto-leito (IEL) de outro espécime do grupo P onde se evidencia a presença de áreas de reabsorção óssea (seta preta) e remodelação (seta vermelha) no leito (L); **E** – Área destacada em preto de D correspondente à intensa neoformação óssea (on) com a presença de tecido em fase de mineralização ricamente celularizado

Figura 9 – Espécime representativo do grupo MA aos 15 dias. **A** – Visão panorâmica do espécime contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface (IEL) e membrana não reabsorvível (M), destacando a ocorrência de periostite ossificante perifericamente à extremidade da membrana; **B** – Destaque em amarelo de A, correspondente à membrana de PTFE cujos espaços vazios foram infiltrados por células (setas). Notar a ausência de inflamação aguda perifericamente à membrana; **C** – Destaque em preto de A correspondente à interface enxerto-leito onde há presença tênue e irregular de fibrina (f); **D** – Destaque em preto segmentado da fibrina vista em C, onde se percebem as presenças de leucócitos (setas pretas) e hemácias (setas vermelhas); **E** – Área destacada em verde de A, correspondente a uma das extremidades do enxerto (E) e sua relação com a membrana (M), onde os mesmos eventos de D se repetem em relação à presença de fibrina (f) na interface (IEL); **F** – Área destacada em vermelho de A, correspondente à periostite ossificante (po) relacionada à extremidade da membrana (M), onde também é possível identificar remanescentes do adesivo de cianoacrilato (ca); **G** – Área destacada em F correspondente à periostite ossificante (po) e à extremidade da membrana (M) colada com cianoacrilato (ca) em que remanescentes do adesivo podem ser vistos circundados por células gigantes multinucleadas (seta) contendo partículas do adesivo em seu citoplasma

Figura 10 – Espécime representativo do grupo M aos 15 dias. **A** – Vista panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), membrana (M) e interface enxerto-leito (IEL); **B** – Destaque em azul de A correspondente à interface enxerto-leito (IEL) onde está presente um tecido de granulação jovem (tg) sem a presença de neoformação óssea; **C** - Destaque em preto de A, correspondente à membrana de PTFE (M) infiltrada por células em seus espaços vazios (setas azuis). Nesta imagem é possível perceber a presença de tecido de granulação fibroso (tf) externamente à membrana no qual ocorre uma faixa de macrófagos e células gigantes multinucleadas (setas pretas), caracterizando a formação de granuloma do tipo corpo estranho. Nota-se também, entre a membrana (M) e o enxerto (E), a presença de um tecido fibroso (tf) semelhante ao periósteo, com áreas de neoformação óssea (on); **D** - Extremidade do enxerto (E) destacada em vermelho em A, relacionado a um tecido de granulação jovem (tg), sem áreas de neoformação óssea; **E** - Extremidade da membrana (M) correspondente ao destaque em verde de A, onde resíduos de cianoacrilato birrefringentes (ca) estão circundados por tecido de granulação (tg) cujas células gigantes multinucleadas (setas) contendo resíduos da cola em seu citoplasma caracterizam o granuloma do tipo corpo estranho

5.1.2 Análise aos 30 dias

5.1.2.1. Grupo PA

Neste grupo foi observada integração estrutural entre o enxerto e o leito receptor, em cuja interface havia formação de trabéculas bem constituídas ricamente celularizadas, com amplos espaços medulares onde se observava ainda tecido de granulação maduro em franca osteogênese. Em algumas áreas, tanto nos leitos como nos enxertos, observou-se um início de remodelação óssea ainda localizada. Nas extremidades do enxerto, o tecido de granulação também revelava franca osteogênese. Os limites corticais do enxerto e do leito ainda estavam presentes, com remodelação estrutural óssea inicial de ambas as estruturas. Na área correspondente à periferia do parafuso, observou-se osso maduro. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 11.

5.1.2.2 Grupo P

Neste grupo notou-se uma integração estrutural entre o enxerto e a cortical óssea do leito receptor. Na região da interface, notou-se grande quantidade de trabéculas e espaços medulares, denotando que o tecido de granulação deu origem a um novo osso. Morfologicamente, ainda pôde ser identificada maior parte da estrutura antiga da cortical óssea e do enxerto, mas com trabéculas e espaços medulares imbricando-se por entre estas duas estruturas na interface. Em continuidade, nas extremidades do enxerto, os mesmos fenômenos foram observados através da neoformação óssea em continuidade lateral. Na interface parafuso-osso-medula havia presença de osso maduro. Os eventos deste grupo podem ser observados na figura 12.

5.1.2.3 Grupo MA

Este grupo apresentou formação de osso organizado na maior parte da interface enxerto-leito receptor, com evidente remodelação das estruturas, de forma que os limites anteriores do enxerto e da cortical eram dificilmente identificados. Nas extremidades do enxerto havia tecido conjuntivo maduro com osteogênese

moderada em quase todos os espécimes e em continuidade com o tecido da interface. Não foi observada reação inflamatória neutrofílica que indicasse uma irritação local de natureza bacteriana secundária ou química induzida quer pelo ácido utilizado ou pelo cianoacrilato aplicado. A ocorrência de periostite ossificante relacionada à membrana pode ser observada na maioria dos espécimes que envolvem o uso deste material. Os eventos descritos para grupo podem ser observados na figura 13.

5.1.2.4 Grupo M

Nos espécimes deste grupo foi observado tecido conjuntivo periosteal organizado como um tecido conjuntivo fibroso maduro na interface membrana e superfície externa do enxerto. Em continuidade, na superfície óssea desta região, constantemente se observou periostite ossificante, mas não relacionada diretamente com a membrana ou com o cianoacrilato. Na interface enxerto-leito receptor, foi evidenciado tecido de granulação maduro com áreas de osteogênese e trabéculas interligando o enxerto com a cortical, sendo que a maior parte do espaço ainda se encontrava ocupado por tecido de granulação maduro com pouca osteogênese. Nas extremidades e em continuidade com a interface enxerto-leito, o tecido de granulação apresentava-se maduro com osteogênese incipiente. Os eventos descritos podem ser observados na figura 14.

Figura 11 – Espécime representativo do grupo PA aos 30 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L) e interface enxerto-leito (IEL); **B** – Destaque em preto de A correspondente a uma das extremidades do enxerto na qual se revela osteogênese intensa integrando enxerto (E) e leito (L); Em **C**, se observa a área em preto segmentado, destacada em B, onde o osso neoformado (on) demonstra características ora imaturas (setas pretas segmentadas), ora em estágios mais avançados de remodelação (setas pretas contínuas) e linhas de reversão onde o osso neoformado se integra ao osso original maduro do enxerto (E) e do leito (L) cujas delimitações ainda estão bem definidas (setas amarelas); **D** – Destaque em amarelo de A correspondente à interface enxerto-leito (IEL) evidenciando a integração estrutural entre o enxerto (E) e o leito (L); **E** – Ampliação da área em azul, destacada em D, onde se nota a presença de trabéculas de osso neoformado bem constituídas (tr) e ricamente celularizadas com amplos espaços medulares (em) onde se encontra tecido de granulação maduro (tg) em franca osteogênese. As trabéculas são vistas integrando o tecido maduro do enxerto e do leito (setas amarelas); **F** – Destaque em vermelho de A, correspondente à região do parafuso de fixação do enxerto (P), onde se observa que o osso medular da tíbia condensou-se formando uma camada de osso cortical (oc) ao redor do parafuso; **G** – Área em verde, destacada em F, correspondente ao osso que se formou no interior de uma das roscas do parafuso de fixação, mostrando aspectos de organização, com formação de sistemas Havers (setas)

Figura 12 – Espécime representativo do grupo P aos 30 dias, contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L) e interface enxerto-leito (IEL) onde é possível observar integração estrutural entre o enxerto e o leito receptor e arredondamento das bordas do enxerto, além da migração do tecido ósseo da cortical do leito em direção à medula óssea, acompanhando o perfil das roscas do parafuso de fixação; **B** – Destaque em preto de A, correspondente a uma das extremidades do enxerto onde o osso neoformado (on) integra as estruturas do enxerto (E) e do leito (L) em continuidade com a interface enxerto-leito (IEL); Em **C**, a extremidade oposta do enxerto (E), em verde, ainda bem delimitada encontra-se integrada ao osso neoformado (seta) o qual apresenta espaços medulares (em) preenchidos por tecido de granulação (tg); **D** – Destaque amarelo de A correspondente à interface enxerto-leito (IEL) evidenciando a integração estrutural entre osso neoformado e osso maduro do enxerto (E) e do leito (L) através de trabéculas bem constituídas (tr); **E** – Destaque em preto segmentado de D, onde uma das trabéculas é vista em maior aumento imbricando enxerto (E) e leito (L) inclusive evidenciando áreas de remodelação, com osso neoformado imaturo (setas contínuas) e em estágio mais avançado de maturação (seta segmentada); **F** - Área destacada em vermelho de A, correspondente ao osso periférico ao parafuso de fixação do enxerto que encontra-se ampliado em G; **G** – Observa-se nesta região correspondente à área em azul, destacada de F, que o osso ao redor do parafuso de titânio apresenta estágio de maturação mais avançado e mais organizado do que o osso da interface, inclusive com a formação de sistemas Havers (setas)

Figura 13 – Espécime representativo do grupo MA aos 30 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface enxerto-leito (IEL) e membrana (M); **B** – Destaque em preto de A, onde é possível observar formação organizada de tecido ósseo (on) na interface (IEL) entre o enxerto (E) e o leito receptor (L). Devido ao evidente remodelação óssea das estruturas é difícil a identificação dos limites do enxerto (E) e do leito receptor (L) na interface (IEL) (setas pretas); **C** – Destaque em amarelo de A, mostrando outra área da interface (IEL) com evidente remodelação óssea das estruturas; **D** – Destaque em azul de A, correspondente à área triangular formada pela membrana na extremidade onde foi evidenciada a presença de tecido de granulação (tg) e osteogênese moderada (on); **E** – Destaque verde de A onde pode ser visto imbricamento do enxerto (E) ao leito (L) por meio de uma trabécula bem constituída (tr) e a presença de linhas de consolidação (setas amarelas) do osso neoformado em ambas as estruturas, enxerto (E) e leito receptor (L); **F** – Destaque vermelho de A, correspondente à borda da membrana (M) onde foi aplicado o cianoacrilato (ca) evidenciando a presença de resíduos do adesivo circundados por células gigantes multinucleadas caracterizando granulomas do tipo corpo estranho (setas pretas); **G** - Área destacada em preto segmentado de A, revelando a ocorrência de periostite ossificante (po) relacionada à membrana (M), onde também pode ser identificado remanescentes do cianoacrilato (ca)

Figura 14 – Espécime representativo do grupo M aos 30 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface enxerto-leito (IEL) e membrana (M); **B** – Destaque em preto de A, correspondente à área triangular formada na extremidade entre membrana (M), enxerto (E) e leito receptor (L), onde foi evidenciado tecido conjuntivo periosteal organizado como um tecido conjuntivo fibroso maduro na interface membrana e superfície externa do enxerto (seta preta); **C** – Destaque em vermelho de B, mostrando a presença de tecido de granulação maduro (tg) com áreas de osteogênese (on); **D** – Destaque amarelo de A, mostrando que os limites das estruturas, enxerto (E) e leito receptor (L), ainda eram facilmente identificáveis (setas pretas); **E** – Destaque em verde de D, revelando imbricamento do enxerto (E) ao leito receptor (L) (setas pretas) por meio de trabéculas bem constituídas (tr) em partes da interface enxerto-leito (IEL); **F** – Destaque em azul de A, mostrando características similares às descritas para as extremidades em relação à presença de tecido de granulação maduro com pouca osteogênese; **G** – Destaque em preto segmentado de F, revelando em maior aumento o tecido de granulação (tg) e o osso neoformado (on) incipiente que preenchem grande parte da interface enxerto-leito (IEL)

5.1.3 Análise aos 45 dias

5.1.3.1 Grupo PA

Na interface enxerto-leito receptor foi evidenciada ampla remodelação óssea, dificultando a identificação dos limites originais do enxerto e da cortical receptora. O mesmo fenômeno pôde ser observado nas extremidades dos enxertos, e em algumas áreas da superfície externa do enxerto. Na área correspondente à periferia dos parafusos, o osso neoformado apresentava-se mais espesso e maduro do que nas áreas mais distantes. Os eventos descritos para grupo podem ser observados nas figuras 15 e 16.

5.1.3.2 Grupo P

O processo de remodelação óssea neste período de avaliação neste grupo envolveu a estrutura cortical e do enxerto, dificultando a identificação de seus limites originais. Houve integração estrutural entre o enxerto e o osso receptor, sendo que a principal diferença morfológica com os espécimes do período de 30 dias foi o imbricamento do osso neoformado na interface, nas laterais do enxerto e na superfície externa do enxerto. Porém, ainda foram evidenciadas áreas da interface preenchidas por tecido de granulação maduro. Os eventos descritos para grupo podem ser observados na figura 17.

5.1.3.3 Grupo MA

Neste grupo, o enxerto e o leito receptor apresentavam-se completamente imbricados sem qualquer interface observável em função da remodelação óssea. Nas extremidades, em continuidade observou-se osteogênese completando a região triangular abaixo da membrana (representada na figura 2) em quase todos os espécimes, embora pudesse ser observado um tecido de granulação maduro ainda com osteogênese incipiente em algumas regiões. Entre a superfície externa do enxerto e a membrana foi observado tecido conjuntivo fibroso capsular de aspecto periosteal. Na interface com os tecidos moles externos a membrana manteve a reação inflamatória granulomatosa do tipo corpo estranho iniciada aos 15 dias. Nas

extremidades do enxerto, eventuais atrasos na maturação do tecido de granulação e na osteogênese, quando presentes, estavam relacionados com a proximidade do cianoacrilato utilizado para fixação da membrana. Os eventos descritos para grupo podem ser observados nas figuras 18 e 19.

5.1.3.4 Grupo M

Em parte dos espécimes deste grupo havia discreta neoformação óssea na interface enxerto-leito receptor, mas em outra parte, as trabéculas ósseas e os espaços medulares já se apresentavam em remodelação óssea, dificultando a identificação dos limites originais das duas estruturas. Neste grupo também foi verificada a manutenção da reação granulomatosa do tipo corpo estranho, mas na interface que a membrana fazia com o tecido, continuamente houve a formação de um tecido conjuntivo fibroso bem organizado, aspecto capsular, tal qual o periósteo. Nas extremidades do enxerto, onde a membrana delimitava uma área triangular, havia tecido de granulação maduro ou neoformação óssea. Os eventos descritos para grupo podem ser observados na figura 20.

Figura 15 – Espécime representativo do grupo PA aos 45 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L) e interface enxerto-leito (IEL), onde é possível observar integração estrutural entre o enxerto e o leito receptor, porém com amplos espaços medulares (em); **B** - Destaque em preto de A, evidenciando ampla remodelação do leito (L) (setas amarelas) e arredondamento do enxerto (E) (setas pretas); **C** – Destaque em amarelo de A, mostrando a extremidade oposta revelando arredondamento do enxerto (E) (setas pretas), ampla remodelação óssea do leito (L) (seta amarela), e neoformação óssea (on); **D** – Destaque em vermelho segmentado de A, mostrando o amplo espaço medular com pouco tecido mineralizado (em) compondo a interface enxerto-leito (IEL); **E** – Destaque em preto segmentado de D, revelando o tecido de granulação maduro (tg) preenchendo o espaço medular na interface (IEL). O osso neoformado apresenta-se consolidado ao osso original (setas pretas); **F** – Destaque em verde de A, revelando características similares às descritas para E em relação ao amplo espaço medular (em) na interface enxerto-leito (IEL) no lado oposto e a ampliação do destaque azul de F em **G** do tecido de granulação maduro (tg) sem tecido mineralizado preenchendo o espaço medular

Figura 16 – Outro espécime do grupo PA aos 45 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L) e interface enxerto-leito (IEL); **B** – Destaque em preto de A, evidenciando arredondamento do enxerto onde se observa intensa atividade osteoclástica (setas pretas) e neoformação óssea (on) consolidando o enxerto ao leito; **C** – Destaque em amarelo de A, onde se observam os mesmos eventos de B (setas pretas), com osso neoformado consolidado (on) ao osso original integrando o enxerto (E) ao leito (L) e amplo espaço medular (em) compondo a interface enxerto-leito (IEL) preenchido por tecido de granulação maduro (tg); **D** – Destaque em vermelho de A, onde se verifica a presença de trabéculas bem constituídas (tr) promovendo consolidação na interface enxerto-leito (IEL). Devido à remodelação óssea, os limites destas estruturas não são bem definidos, mas estão consolidadas ao osso neoformado (setas amarelas); **E** – Destaque em verde de A, mostrando a área do parafuso (P) com osso cortical maduro circundante (om) com vários sistemas Haversianos (setas pretas); **F** – Área oposta do parafuso mostrando as mesmas características descritas em E; **G** – Ampliação da área correspondente ao parafuso mostrando osso cortical organizado e em estágio avançado de maturação com a formação de sistema de Havers (setas pretas)

Figura 17 – Espécime representativo do grupo P aos 45 dias. A – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L) e interface enxerto-leito (IEL); B – Destaque em preto de A, evidenciando o arredondamento (seta preta) da extremidade do enxerto (E), devido à atividade osteoclástica intensa, e a presença de osso neoformado (on) consolidando o enxerto (E) ao leito receptor (L); C – Destaque em amarelo de A, mostrando remodelação óssea de ambas as estruturas (setas pretas) e presença de tecido de granulação maduro (tg) na interface enxerto-leito (IEL); D – Destaque em preto segmentado de C, evidenciando a consolidação do osso neoformado (on) ao osso original do enxerto (E) (setas pretas). Nesta área também pode ser evidenciada uma trabécula (tr) integrando o enxerto (E) ao leito; E – Destaque em vermelho de A, mostrando a presença de trabéculas (tr) na interface enxerto-leito (IEL) promovendo a união entre enxerto (E) e leito (L). Devido à maturação avançada do osso neoformado torna-se difícil identificar os limites do enxerto (E) e do leito (L) em algumas áreas desta interface; F – Destaque em azul de E, revelando a integração estrutural (setas amarelas) e os limites anteriores do enxerto (E) e do leito (L) promovida pelo osso neoformado e pela presença de uma trabécula bem constituída (tr); G – Destaque em vermelho segmentado de A, revelando outra área da interface enxerto-leito (IEL) preenchida por tecido de granulação maduro (tg). Também pode ser vista remodelação óssea do enxerto identificada pela seta preta

Figura 18 – Espécime representativo do grupo MA aos 45 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface enxerto-leito (IEL) e membrana (M); **B** – Destaque em preto de A, referente à área triangular formada pela membrana (M), enxerto (E) e leito (L) que, ampliada em **C**, encontra-se ocupada por tecido de granulação maduro (tg) e osteogênese incipiente (on). O enxerto apresenta remodelação óssea, apresentando consolidação do novo osso ao osso original (setas amarelas); **D** – Extremidade oposta apresentando preenchimento da área triangular formada pela membrana (M) por osso neoformado consolidado ao enxerto (seta amarela) e promovendo consolidação do enxerto ao leito receptor (seta preta); **E** – Destaque em preto segmentado em D, mostrando osso neoformado (on) integrando o enxerto (E) ao leito receptor (L) por meio de trabéculas (tr). Linha de consolidação identificada pelas setas amarelas; **F** – Destaque em vermelho de A, onde pode ser observado que o osso neoformado (on) na interface (IEL) apresenta total consolidação ao enxerto (E) e ao leito receptor (L) em função da remodelação óssea destas estruturas; **G** – Destaque em verde de F, mostrando em maior aumento o imbricamento do enxerto (E) ao leito (L) através de trabéculas bem constituídas (tr) estando o tecido ósseo em estágio avançado de maturação. Linha de consolidação delimitada pelas setas amarelas

Figura 19 – Outro espécime do grupo MA aos 45 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface enxerto-leito (IEL) e membrana (M); **B** – Destaque em amarelo de A, referente à interface enxerto-leito (IEL) que mostra total integração estrutural e ampla remodelação óssea das estruturas, de forma que os limites do enxerto (E) e do leito (L) apresentam-se dificilmente detectáveis; **C** – Ampliação do destaque em preto segmentado de B, possibilitando a visualização de trabécula bem constituída (tr), presença de espaços medulares e total consolidação do osso neoformado (setas amarelas); **D** – Destaque em vermelho de A, correspondente à extremidade do enxerto na área triangular criada pela membrana (M). Observa-se continuidade entre o osso neoformado (on) e o enxerto (E) (setas amarelas) e ao leito (L) (seta preta); Em **E**, destaque preto de A, pode ser evidenciado o tecido conjuntivo fibroso capsular de aspecto periosteal (seta preta), celularizado, vascularizado e sem sinais de inflamação, recobrendo a membrana (M); **F** – Destaque em azul de A, referente à extremidade da membrana (M) onde podem ser observados remanescentes do cianoacrilato (ca) e células gigantes multinucleadas (setas vermelhas) relacionadas à presença do adesivo; **G** – Destaque em verde de A, mostrando a periostite ossificante (po) em íntimo contato com a membrana (M)

Figura 20 – Espécime representativo do grupo M aos 45 dias. **A** – Visão panorâmica contendo simultaneamente enxerto (E), leito (L), interface enxerto-leito (IEL) e membrana (M); **B** – Destaque em preto de A, onde pode ser observada a presença de tecido conjuntivo fibroso bem organizado, de aspecto capsular, tipo periosteal na interface membrana (M) e tecido conjuntivo externo (seta preta). Já na interface da membrana (M) com o enxerto (E), pode ser evidenciada a presença de tecido de granulação maduro (tg) e a ocorrência de neoformação óssea (seta amarela); **C** – Destaque em amarelo de A, onde pode ser vista integração do enxerto (E) ao leito (L) por meio de uma trabécula (tr) e osso neoformado consolidado (on) a estas estruturas; **D** mostra o destaque em azul de C, mostra o imbricamento do novo osso (on) ao osso original tanto no enxerto (E) quanto no leito (L) (setas amarelas) e a presença de espaços medulares (em) revestidos por osteoblastos (setas pretas); **E** – Destaque em vermelho de A, mostrando ampla remodelação óssea do enxerto (E) e do leito (L); **F** – Destaque em preto segmentado de F, referente à intensa remodelação óssea evidenciada no enxerto (E) identificada por setas amarelas que apontam as linhas de reversão; **G** – Destaque em verde de A, mostrando osso neoformado (on) na interface enxerto-leito (IEL) consolidado aos limites originais do enxerto (E) e do leito (L) (setas amarelas)

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA

As tabelas referentes às informações estatísticas detalhadas de todos os dados colhidos encontram-se no APÊNDICE B (Tabelas de 1 a 5).

5.2.1 Área de Tecido Ósseo Mineralizado Neoformado na Interface Entre Enxerto Ósseo e Leito Receptor

Os valores médios da área de tecido ósseo mineralizado neoformado encontrado na interface entre enxerto ósseo e leito receptor estão descritos na tabela 1. Aos 15 dias, não foi observada formação óssea na interface em qualquer dos espécimes independentemente do grupo de estudo. Aos 30 dias, o grupo MA foi o que apresentou maior área de neoformação óssea comparativamente aos demais grupos ($p < 0,015$). Ainda aos 30 dias, o valor numérico da área de osso neoformado diminuiu gradativamente para os grupos PA, M e P, mas a diferença entre estes três grupos não foi estatisticamente significativa ($p > 0,056$). Aos 45 dias, houve maior formação óssea no grupo M em relação ao grupo P ($p = 0,0001$), sendo que o grupo MA apresentou o maior valor de área de osso neoformado em relação aos demais grupos, entretanto com diferença estatística apenas em relação ao grupo P ($p = 0,0001$).

TABELA 1 - Área média de tecido ósseo mineralizado neoformado na interface enxerto-leito ($n=6$)

Período de avaliação	Área de tecido ósseo mineralizado neoformado (%)			
	Grupo M	Grupo P	Grupo MA	Grupo PA
30 dias	51,75 ± 11,02aA	43,95 ± 4,05aA	71,34 ± 12,03bA	56,74 ± 2,15aA
45 dias	59,78 ± 11,28acA	46,08 ± 3,53bA	71,18 ± 8,9cA	58,97 ± 3,97bcA

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou letras maiúsculas iguais na mesma coluna do mesmo grupo significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

M- Grupo Membrana; MA- Grupo Membrana+Ácido; P- Grupo Parafuso; PA- Grupo Parafuso + Ácido

5.2.2 Superfícies de consolidação do osso neoformado ao Leito e ao Enxerto

As Tabelas 2, 3 e 4 demonstram os resultados médios obtidos para a análise das superfícies de consolidação do osso neoformado ao leito e ao enxerto isoladamente e em associação. Como não foi observada neoformação óssea aos 15 dias, esta análise se deu apenas aos 30 e 45 dias. Na tabela 2, que mostra os resultados referentes à consolidação do enxerto ao osso neoformado, verifica-se que, aos 30 dias, os grupos P e M não apresentaram diferença estatística entre si quanto às superfícies do enxerto consolidadas ao novo osso ($p=1$). Porém, os grupos PA e MA, também não estatisticamente diferentes entre si ($p=1$), demonstraram superfícies de consolidação maiores do que P e M ($p<0,0007$). Aos 45 dias de observação, não houve diferença estatística entre os grupos para este parâmetro de avaliação ($p>0,518$). Numericamente, as superfícies de consolidação do enxerto ao leito aumentaram com o tempo em todos os grupos, porém, sem diferença estatística entre 30 e 45 dias em nenhum deles ($p>0,192$).

TABELA 2 – Extensão média de superfícies ósseas do enxerto consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado ($n=6$)

Período de avaliação	Extensão superficial do enxerto consolidada ao osso neoformado (%)			
	Grupo M	Grupo P	Grupo MA	Grupo PA
30 dias	68,64 ± 13,44aA	72,2 ± 11,69aA	89,68 ± 9,89bA	95,18 ± 5,82Ba
45 dias	82,25 ± 12,4aA	81,1 ± 11,24aA	91,93 ± 7,59aA	89,37 ± 6,56Aa

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou letras maiúsculas iguais na mesma coluna do mesmo grupo significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

M- Grupo Membrana; MA- Grupo Membrana+Ácido; P- Grupo Parafuso; PA- Grupo Parafuso + Ácido

O mesmo padrão de consolidação do enxerto ao osso neoformado foi verificado em relação ao leito receptor (tabela 3), não havendo, aos 30 dias, diferenças entre os grupos P e M ($p=1$), mas seus resultados foram significativamente inferiores aos dos grupos PA e MA ($p<0,009$). Estes dois últimos grupos também não diferiram entre si ($p=1$). Também em relação ao leito receptor, não foi verificada alteração significativa na superfície de consolidação ao longo do tempo em nenhum dos grupos ($p>0,163$).

TABELA 3 – Extensão média de superfícies ósseas do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado (n=6)

Período de avaliação	Extensão superficial do leito consolidada ao osso neoformado (%)			
	Grupo M	Grupo P	Grupo MA	Grupo PA
30 dias	78,13 ± 10,29aA	75,34 ± 13,92aA	97,14 ± 3,56bA	92,3 ± 9,01Ba
45 dias	89,33 ± 6,67aA	87,66 ± 9,55aA	92,49 ± 9,21aA	88,54 ± 5,51aA

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou letras maiúsculas iguais na mesma coluna do mesmo grupo significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

M- Grupo Membrana; MA- Grupo Membrana+Ácido; P- Grupo Parafuso; PA- Grupo Parafuso + Ácido

Quando as duas superfícies (enxerto e leito receptor) foram avaliadas como um todo (tabela 4), o comportamento isolado das superfícies se repetiu. Assim, os grupos P e M mantiveram ausência de diferença estatística entre si ($p=1$), bem como os grupos PA e MA ($p=1$), estes, porém superiores a P e M ($p < 0,002$).

TABELA 4 – Extensão média de superfícies ósseas do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo mineralizado neoformado (n=6)

Período de avaliação	Extensão superficial do enxerto e do leito consolidada ao osso neoformado (%)			
	Grupo M	Grupo P	Grupo MA	Grupo PA
30 dias	73,49 ± 7,7aA	73,77 ± 11,77aA	93,41 ± 5,95bA	93,73 ± 4,96bA
45 dias	85,77 ± 8,89aA	84,32 ± 5,63aA	89,3 ± 9,42aA	85,71 ± 6,14Aa

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou letras maiúsculas iguais na mesma coluna do mesmo grupo significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

M- Grupo Membrana; MA- Grupo Membrana+Ácido; P- Grupo Parafuso; PA- Grupo Parafuso + Ácido

5.2.3 Variação na espessura do enxerto com o tempo

A espessura média dos blocos ósseos enxertados foi de $522,88 \pm 83,31 \mu\text{m}$ (0,52 mm). A tabela 5 demonstra as espessuras médias encontradas aos 30 e 45 dias nos espécimes teste. Aos 30 dias, todos os grupos de estudo apresentaram redução na espessura média do enxerto em relação à média inicial: redução de 5,16% para o grupo M; de 10,7% para o grupo MA; de 26,58% para o grupo PA e de

37,19% para o grupo P. Os enxertos dos grupos P e PA (não diferentes entre si; $p=1$) apresentaram espessura média significativamente menor ($p<0,0001$) do que os dos grupos M e MA (não diferentes entre si; $p=1$). Nenhum grupo sofreu redução significativa de 30 para 45 dias ($p>0,181$). Entretanto, os grupos M e MA (não diferentes entre si; $p=1$) mantiveram espessura significativamente maior ($p<0,004$) do que o grupo P, que não diferiu significativamente do grupo PA ($p=1$). O grupo M apresentou espessura numericamente maior do que o grupo PA, porém sem diferença estatística ($p=0,742$). Os grupos P e PA alcançaram, portanto, no máximo 74,56% da espessura do grupo MA, que apresentou a maior espessura média aos 45 dias, representando uma redução de apenas 5,16% da espessura média inicial.

TABELA 5 – Variação na espessura dos enxertos ósseos ao longo dos períodos de avaliação

Período de avaliação	Espessura do enxerto ao longo dos períodos de avaliação (μm)							
	Grupo M (n=6)		Grupo P (n=6)		Grupo MA (n=6)		Grupo PA (n=6)	
	Mm	%	Mm	%	Mm	%	Mm	%
30 dias	496,29 $\pm$ 6,39a	5,36	328,47 $\pm$ 56,24b	59,19	467,48 $\pm$ 38,09ac	11,85	383,86 $\pm$ 28,42b	36,22
45 dias	453,06 $\pm$ 17,96ac	15,41	317,18 $\pm$ 48,75b	64,85	497,21 $\pm$ 0,18a	5,16	370,72 $\pm$ 38,44bc	41,04

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou letras maiúsculas iguais na mesma coluna do mesmo grupo significam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

M- Grupo Membrana; MA- Grupo Membrana+Ácido; P- Grupo Parafuso; PA- Grupo Parafuso + Ácido
 μm – espessura média do grupo

% - porcentagem de redução em relação à espessura inicial de $522,88\pm 83,31\mu\text{m}$

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a associação entre desmineralização ácida das superfícies de contato enxerto-leito receptor e recobrimento do enxerto por uma barreira biológica do tipo membrana pode melhorar o resultado dos enxertos no que se refere à antecipação da neoformação óssea na interface, no aumento das superfícies de consolidação e na manutenção da espessura dos enxertos ósseos em bloco.

Considerando que o processo fisiológico de remodelação óssea é iniciado pela liberação de ácidos pelos osteoclastos, como o ácido láctico e o ácido cítrico, que promovem dissolução da matriz inorgânica (BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006 ; MELCHER, 1976), era esperado que o tratamento das superfícies de contato do enxerto ósseo e do leito receptor por desmineralização ácida resultasse em antecipação dos eventos envolvidos no processo de consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco, o que foi confirmado neste estudo.

O pH tem efeito significativo na dissolução mineral que se inicia com a mobilização dos cristais minerais os quais, ao serem desalojados, logo são fagocitados (BISKOBING et al., 1997 ; MELCHER, 1976). Foi evidenciado que ocorre crescente atividade osteoclástica em pH menor ou igual a 6,5 e total dissolução dos cristais de apatita em pH abaixo de 4,0 (KIM et al., 2001). O pH do ácido cítrico empregado neste estudo é igual a 1,0, podendo ser especulado que tenha promovido acidificação do espaço correspondente à interface enxerto-leito receptor, antecipando assim, um dos efeitos da atividade osteoclástica. Assim, pode-se presumir que a aplicação do ácido cítrico promoveu exposição precoce do conteúdo osteoindutor da matriz orgânica do osso, acelerando os fenômenos de reabsorção e formação óssea que são mediados pela rede de moléculas de sinalização presentes na matriz orgânica (BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006 ; WOOD; MEALEY, 2012).

A atividade osteoclástica resulta ainda, em modificações da topografia superficial, traduzida em cavitações, que logo são preenchidas por proteínas responsáveis pela quimiotaxia e diferenciação de células osteoprogenitoras em

osteoblastos (SCHWARTZ et al., 2000 ; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983). As mesmas alterações topográficas são produzidas pela aplicação do ácido cítrico sobre a superfície óssea que pode ter se tornado irregular e porosa (COESTA 2011 ; SCHWARTZ et al., 2000), sendo provavelmente esta uma das razões da verificação da antecipação da neoformação óssea na interface e nas superfícies de consolidação dos enxertos realizados nesta tese.

Essa suposição está de acordo com os resultados obtidos por Schwartz et al. (2000), que avaliaram o comportamento de osteoblastos em superfícies tratadas pela tetraciclina e observaram 75% de proliferação celular, aumento na atividade enzimática da fosfatase alcalina e na expressão de fatores envolvidos na diferenciação osteoblástica sobre as superfícies desmineralizadas. Está também de acordo com os achados de Coesta (2011) que verificaram maior migração celular e características morfológicas de estágios mais avançados de diferenciação de pré-osteoblastos sobre superfícies desmineralizadas em relação às superfícies ósseas não desmineralizadas.

A desmineralização ácida tem sido amplamente empregada em superfícies radiculares para neutralizar as alterações superficiais produzidas após exposição das raízes dentais à cavidade bucal e/ou ambiente da bolsa periodontal, as quais dificultam ou até mesmo impedem o reparo tecidual (SELVIG; HALS, 1977 ; SELVIG; ZANDER, 1962). O emprego de agentes desmineralizantes sobre superfícies radiculares assim alteradas não apenas promove a reinserção tecidual às raízes como também induz os processos de cementogênese (COLE et al., 1980 ; CRIGGER; RENVERT; BOGLE, 1983 ; REGISTER, 1973 ; REGISTER; BURDICK, 1975), condrogênese e osteogênese (SOMERMAN et al., 1987). Para esta finalidade, o ácido cítrico em pH 1,0, aplicado durante 3 minutos, foi associado a resultados superiores a outros agentes desmineralizantes quanto à capacidade de remoção mineral sem prejuízo do potencial indutivo da matriz orgânica e da completa regeneração evidenciada pela formação de novo cemento e reinserção perpendicular das fibras colágenas (REGISTER; BURDICK, 1975). A partir daí várias publicações têm fornecido bases para o emprego desse agente desmineralizante em superfícies radiculares (AMARAL et al., 2011 ; CAVASSIM et al., 2012 ; SHIMOHARA et al., 2012).

O efeito favorável da desmineralização radicular motivou a investigação da ação de ácidos sobre o tecido ósseo, a qual resultou em descobertas importantes,

como o sucesso no emprego de enxertos ósseos desmineralizados (DFDBA) de diferentes procedências e tipos de apresentação (blocos ou particulados) em defeitos craniofaciais (BECKER; BECKER; CAFFESSE, 1994 ; WOOD; MEALEY, 2012). A racionalização do uso do DFDBA baseia-se na exposição do conteúdo osteoindutor da matriz orgânica do osso que inclui BMPs, MMPs e proteínas não-colágenas, como a sialoproteína óssea e a osteocalcina (BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006 ; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983 ; WOOD; MEALEY, 2012).

Os resultados significativamente superiores obtidos neste estudo para os espécimes que foram desmineralizados podem encontrar ressonância nesta mesma exposição de moléculas osteopromotoras da matriz orgânica do osso (URIST et al., 1968). As BMPs estão diretamente relacionadas com a formação óssea por induzirem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras (COOK; RUEGER, 1996 ; COOK et al., 1995 ; RILEY et al., 1996 ; SOMERMAN et al., 1987 ; URIST, 1965 ; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983 ; URIST et al., 1968), além de induzirem a expressão de fatores angiogênicos importantes para a revascularização dos enxertos ósseos em bloco (ALBREKTSSON, 1980 ; RAMOSHEBI; RIPAMONTI, 2000 ; YEH; LEE, 1999) e aumento da capacidade de formação óssea quando enxertos autógenos e DBM são associados à BMPs, permitindo a instalação mais precoce de implantes (HO et al., 2010). O mesmo pode ter ocorrido neste estudo, onde a dissolução de cristais de apatita pela desmineralização ácida das superfícies ósseas pode ter resultado na liberação de fatores osteoindutores contidos na matriz orgânica, como as BMPs, que por sua vez, aceleraram a neoformação óssea desejada na interface enxerto-leito receptor.

Estudos atuais têm destacado que, dentre as BMPs, a BMP-2 apresenta especial participação nos eventos de reparo ósseo, sendo por isto, mais estudada. Entretanto, uma frequente limitação para a difusão ampla de seu uso clínico é a dificuldade em se manter uma concentração específica e por tempo suficiente para garantir sua liberação local sem que sofra reabsorção antes de instituir seu efeito osteogênico, sendo necessária a associação de um carreador adequado em preparados comerciais de BMP-2 (CANTER; VARGEL; MAVILI, 2007 ; KHOJASTEH et al., 2012). Se o emprego da desmineralização ácida superficial como proposto

nesta tese continuar se confirmando como método de exposição de BMPs, o carreador seria desnecessário.

A membrana não reabsorvível de politetrafluoretileno empregada neste estudo demonstrou biocompatibilidade pela presença de múltiplas células infiltrando a estrutura dos espaços vazios do material e pelo fato de não ter suscitado inflamação aguda já aos 15 dias (figuras 7-10). Ao contrário, apenas granulomas do tipo corpo estranho foram encontrados entre a membrana e o tecido circundante (figuras 9 e 10). Estes resultados estão de acordo com diversos estudos que utilizaram membrana, reabsorvível ou não, e não evidenciaram sinais de inflamação ou irritação produzidos pela presença deste material (GORDH et al., 1998 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005 ; REZENDE, 2008 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Embora a membrana empregada não seja osteoindutora ou osteocondutora (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002), atuou como barreira física impedindo a invasão da interface enxerto-leito por tecido conjuntivo e possibilitando a migração de células osteogênicas (SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002). Em vários cortes foi vista formação de tecido ósseo sobreposto ao leito na área relacionada às extremidades da membrana. Esta ocorrência foi interpretada como periostite ossificante adaptativa, um fenômeno caracterizado pela formação periférica de osso reacional em resposta à irritação ou infecção de baixa intensidade. Como não houve infecção em nenhum dos espécimes, a periostite ossificante observada foi atribuída à suave irritação provocada pela borda rígida da membrana nos tecidos e ao cianoacrilato (REZENDE, 2008).

Os estágios iniciais do reparo de enxerto ósseos em bloco estão diretamente relacionados com a invasão de vasos sanguíneos provenientes do leito receptor em direção ao enxerto, que darão início ao processo de revascularização do enxerto ósseo (ALBREKTSSON, 1980). A revascularização é influenciada por diversos fatores, como a fixação e adaptação adequadas do enxerto ao leito (ADEYEMO et al., 2008 ; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000) e à origem embriológica e microestrutura do enxerto (ALBERIUS et al., 1996 ; CHEN et al., 1994 ; OZAKI et al., 1999). Neste estudo foi utilizado enxerto ósseo autógeno em bloco proveniente da metáfise proximal tibial de coelhos, de forma que este foi de origem endocondral de microestrutura predominantemente cortical. Tanto os enxertos de origem endocondral quanto os enxertos corticais, estão associados a uma revascularização mais lenta, acarretando geralmente em resultados inferiores aos obtidos para

enxertos ósseos intramembranosos cortico-medulares (ALBERIUS et al., 1996 ; BARBOSA et al., 2009 ; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000 ; KUSIAK; ZINS; WHITAKER, 1985).

Com base em tais informações e considerando os resultados significativamente superiores dos grupos MA e PA neste estudo, pode-se sugerir que se a desmineralização ácida antecipou e intensificou a neoformação óssea. A influência deste tratamento pode ser ainda mais significativa quando realizada em enxertos ósseos intramembranosos cortico-medulares, conforme foi observado no estudo de Rezende (2008) em calvária de cobaias, onde a desmineralização ácida produziu resultados superiores sobre o processo de reparo e consolidação na interface enxerto-leito em relação a controles não desmineralizados.

O leito receptor apresenta participação importante no reparo de enxertos ósseos em bloco visto que a revascularização do enxerto depende inicialmente desta estrutura. Geralmente os leitos receptores são bicorticais com porção medular entre as camadas corticais. Os fatores de crescimento envolvidos no processo de angiogênese, como o VEGF, encontram-se nessa porção medular do leito receptor e, com o intuito de acelerar ou pelo menos facilitar a chegada destes fatores ao ambiente da interface enxerto-leito, é comum o emprego de procedimentos que viabilizem acesso do conteúdo dos espaços medulares à região em processo de reparação, como as perfurações por brocas e a decorticalização por desgaste (FARIA et al., 2008 ; PEDROSA et al., 2009). Entretanto, os relatos sobre o efeito desses tratamentos não são definitivos ou totalmente conclusivos (ADEYEMO et al., 2008 ; BARBOSA et al., 2009 ; GREENSTEIN et al., 2009), ainda que já tenham sido associados a aumento significativo de neoformação óssea e maior consolidação do enxerto ao leito, o que sugere que a exposição da porção medular por meio destes tratamentos de superfície acelera o processo de revascularização e reabsorção/formação óssea (ALBERIUS et al., 1996 ; BARRÈRE; VAN BLITTERSWIJK; DE GROOT, 2006 ; DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000 ; PEDROSA et al., 2009).

Devido ao fato que procedimentos como perfuração e desgaste implicam em remoção de parte da estrutura óssea em reconstrução, que já se encontra diminuída, a desmineralização seria uma alternativa vantajosa em relação a esses procedimentos, mantendo o mesmo efeito, uma vez que não implica em nenhuma perda adicional de substância óssea.

Neste estudo, aos 15 dias, a análise descritiva não foi capaz de evidenciar diferenças notáveis entre os grupos, o que provavelmente se deve ao estágio precoce da reparação (Figuras 7-10). Aos 30 dias, apesar da semelhança entre os grupos no que se refere à osteogênese na interface, os espécimes tratados com ácido evidenciaram um estágio mais avançado de maturação já que em alguns deles era possível observar remodelação. Os grupos contendo membranas diferenciaram-se dos grupos contendo parafuso pela presença de osteogênese mais intensa nas extremidades dos enxertos (Figuras 11-14). Estes resultados concordam com outros estudos nos quais o mesmo evento foi observado quando enxertos onlay foram recobertos com membranas de diferentes tipos (DONGIEUX et al., 1998 ; DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002 ; GORDH et al., 1998 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005 ; RASMUSSEN et al., 1999 ; REZENDE, 2008 ; SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002).

Aos 45 dias de observação, a análise descritiva mostrou uniformidade de resultados entre os grupos (Figuras 15-20). As principais diferenças se referiram à maior quantidade de osso compacto ao redor dos parafusos de fixação nos grupos P e PA e à formação de osso nas extremidades dos enxertos que ocorreu nos grupos M e MA. Essas diferenças provavelmente são inerentes às propriedades do titânio que induz a formação de osso mais compacto com o tempo em suas proximidades (BARRADAS et al., 2011; REZENDE; JOHANSSON, 1993) e à formação de uma área triangular adicional nas extremidades do enxerto delimitada pela membrana que termina por ampliar a área de neoformação óssea (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005).

Conforme esperado em vista da análise qualitativa, também na análise quantitativa não foi observada formação óssea aos 15 dias. Porém, já aos 30 dias o grupo MA foi o que demonstrou maior área de neoformação óssea na interface ($71,34 \pm 12,03\%$) mantendo diferença estatística com os demais grupos ($p < 0,015$). Curiosamente, o valor de área óssea encontrada para o grupo MA aos 30 dias, foi superior até mesmo ao dos espécimes de 45 dias dos demais grupos, porém com diferença estatística apenas com o grupo P ($p = 0,0001$). Não houve alteração significativa no volume de área óssea na interface com o passar do tempo, independentemente do tratamento dado às superfícies ósseas.

Neste ponto da avaliação poder-se-ia especular que o ácido e/ou a membrana poderiam ter influenciado a maior formação óssea na interface. O ácido, pelo

provável potencial osteogênico desencadeado pela exposição de BMPs consequente à desmineralização (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983) e a membrana, por não induzir pressão do enxerto ao leito, o que poderia favorecer a reabsorção, como é mais provável que ocorra com a fixação do enxerto por meio de parafusos (CHEN et al., 1994 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005). Aos 30 dias, quando comparados os dois grupos que utilizaram membrana, o tratamento ácido da interface aumentou significativamente a área de neoformação óssea ($p=0,0003$). Por outro lado, quando comparados os grupos que utilizaram parafusos aos 30 dias, a área de neoformação óssea foi numericamente superior para o grupo PA ($56,74 \pm 2,15\%$) em comparação ao grupo P ($43,95 \pm 4,05\%$), porém sem diferença estatisticamente significante ($p=0,056$), o que não confirmaria a ação favorável do ácido na formação óssea nos grupos com parafuso. Mais uma vez, pode-se especular que a pressão sobre o leito exercida pela fixação por parafuso, possa haver-se contraposto à ação do ácido, diminuindo a área de neoformação óssea verificada. Observe-se, entretanto, que quando o ácido é excluído da comparação entre os dois métodos de fixação aos 30 dias, não houve diferença estatística entre eles ($p=0,659$), ainda que o grupo M ($51,75 \pm 11,02\%$) tenha apresentado maiores valores numéricos de área de osso neoformado do que o grupo P ($43,95 \pm 4,05\%$). Esta observação, portanto, torna inconclusivos os resultados a respeito da influência da ação do ácido sobre a área de osso neoformado na interface nesse período de análise.

Já aos 45 dias, a área de osso neoformado verificada para o grupo M ($59,78 \pm 11,28\%$) foi significativamente maior ($p=0,0001$) do que a do grupo P ($46,08 \pm 3,53\%$) que apresentou o menor valor neste período, porém sem diferença estatística em relação ao grupo PA ($58,97 \pm 3,97\%$). O valor de área para o grupo MA aos 45 dias ($71,18 \pm 8,9\%$), entretanto, destaca-se na avaliação por manter-se equiparável ao resultado obtido para este grupo aos 30 dias, o que pode sugerir que a associação do ácido à membrana antecipou o tempo de neoformação óssea na interface enxerto-leito.

O parafuso de titânio é o método de fixação mais empregado para estabilização de enxertos ósseos autógenos *onlay* (BURGER; MESHKINI; LINDEBOOM, 2011 ; CHACON et al., 2004 ; LATRENTA et al., 1989 ; LIN et al., 1990 ; PHILLIPS; RAHN, 1990 ; QUERESHY et al., 2010). No entanto, o seu uso tem sido associado à reabsorção excessiva do enxerto, principalmente nas

proximidades, resultando em arredondamento das bordas laterais (CHACON et al., 2004 ; DASMAH et al., 2012 ; KOERDT et al., 2013 ; QUERESHY et al., 2010 ; SCHMITT et al., 2012 ; WIDMARK et al., 1998 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Esta reabsorção excessiva tem sido atribuída à pressão interna negativa gerada pela compressão exercida pelo parafuso (SASKA et al., 2009). Consequentemente, alguns autores sugeriram a utilização de uma membrana, seja reabsorvível ou não, em associação ao uso do parafuso de fixação, para tentar impedir ou pelo menos reduzir a taxa de reabsorção do enxerto ósseo (ALBERIUS; DAHLIN; LINDE, 1992 ; DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002 ; GIELKENS et al., 2007 ; GORDH et al., 1998 ; JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005 ; JENSEN et al., 1995 ; KOERDT et al., 2013 ; SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002 ; VON ARX et al., 2001 ; VON ARX; HARDT; WALLKAMM, 1996 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). A membrana, além de apresentar biocompatibilidade, mostra-se eficaz na preservação do volume do enxerto na maioria dos estudos, reduzindo, quase que inteiramente, a perda de volume ósseo comumente associado aos procedimentos envolvendo enxertos ósseos em bloco. O mesmo foi observado neste estudo onde os grupos que receberam fixação pela membrana (M e MA) resultaram em preservação significativa da espessura dos enxertos em relação aos grupos fixados pelo parafuso de titânio. Estes mostraram, ao longo dos períodos de avaliação, reabsorção gradual, principalmente nas extremidades, resultando em arredondamento das bordas laterais, o que está de acordo com os resultados descritos por Chen et al (CHEN et al., 1994) e por Jardim, De Marco e Lima (JARDINI; DE MARCO; LIMA, 2005).

Não era objetivo inicial de esta pesquisa avaliar a variação na espessura dos blocos enxertados ao longo do tempo, o que demandaria o emprego de um método de avaliação longitudinal dos espécimes individuais. A verificação empírica, através do exame microscópico, de que os espécimes cobertos com membrana terminavam o período de reparação mantendo a estrutura de forma diferente do que os espécimes fixados por parafuso suscitou o interesse pela medição da espessura dos enxertos. Assim, a espessura dos blocos ósseos enxertados foram medidas nos cortes histológicos de 15 dias, considerando que a este ponto ainda não houve reabsorção óssea significativa. Nesta análise verificou-se que a espessura da metáfise proximal tibial dos coelhos empregados nesta pesquisa era em média de $522,88 \pm 83,31 \mu\text{m}$ (0,52 mm). Como os mesmos blocos não puderam ser

acompanhados longitudinalmente devido ao delineamento do método, as espessuras médias aos 30 e aos 45 dias dos grupos teste foram estatisticamente comparadas entre si e, subjetivamente, à espessura média inicial. Conforme esperado, aos 30 dias já era possível observar espessura reduzida dos enxertos em todos os grupos, o que se deve ao processo natural de reabsorção inerente ao reparo ósseo. É importante observar que a maior reabsorção se deu dos 15 para os 30 dias em todos os grupos e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O grupo que apresentou maior redução em relação à espessura inicial foi o grupo P (59,19%), seguido pelos grupos PA (36,22%), MA (11,85%) e M (5,36%). Estes dados também são comparáveis aos de outros estudos, nos quais foi verificada reabsorção em espessura entre 25% a 60% quando os enxertos não são recobertos por membranas (WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997) ; (BUSER et al., 1993) e até melhores do que alguns que encontraram preservação de 70% do volume inicial quando os enxertos são recobertos por membranas (JENSEN et al., 1995). De Santis et al (2012) encontraram mínima reabsorção de enxertos autógenos e xenógenos recobertos por membranas.

A observação de que os grupos cujos enxertos ósseos foram fixados por parafusos (P e PA) apresentaram espessura significativamente menor do que os grupos em que se usou membrana (M e MA) sugere que a membrana é um importante aliado na manutenção da espessura dos enxertos. Observe-se que a espessura média dos enxertos do grupo P ($328,47 \pm 56,24 \mu\text{m}$) representou 66,18% da do grupo M ($496,29 \pm 6,39 \mu\text{m}$) e a espessura média do grupo PA ($383,86 \pm 28,42 \mu\text{m}$) representou 82,11% da do grupo MA ($467,48 \pm 38,09 \mu\text{m}$), o que pode significar que, independentemente da ação do ácido, a membrana influenciou positivamente os resultados. O mesmo não pode ser afirmado em relação ao ácido isoladamente, já que ao se compararem os grupos M com MA e P com PA, não houve diferença estatisticamente significativa na espessura média dos enxertos.

De 30 para 45 dias, ocorreu redução numérica na espessura dos enxertos em quase todos os grupos (com exceção do grupo MA, no qual a espessura média foi maior aos 45 do que aos 30 dias), porém sem diferença estatística ($p=1$). Estes resultados concordam com diversos trabalhos que também constataram que a maior reabsorção dos enxertos em bloco ocorre nas fases iniciais da reparação (DASMAH et al., 2012 ; KOERDT et al., 2013 ; SCHMITT et al., 2012 ; WIDMARK et al., 1998 ; WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997). Também neste período de análise, os

grupos cujos enxertos foram fixados por membrana apresentaram espessura média superior à dos enxertos fixados por parafuso. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos M e PA ($p=0,742$) e entre P e PA ($p=1$). Em contrapartida, a espessura média do grupo MA foi a maior observada entre os grupos. Não foi possível atribuir uma razão à maior espessura média dos enxertos do grupo MA de 45 dias do que a dos enxertos do grupo MA de 30 dias, uma vez que a membrana empregada não apresenta propriedades osseointodutoras. Por esta razão, creditou-se esse resultado a uma eventualidade. Os resultados de 45 dias, portanto, confirmam os de 30 dias para o parâmetro espessura dos enxertos ósseos. Cabe ressaltar que achados da literatura atestam que os enxertos endocondrais tendem a sofrer reabsorção de até 60% durante o período necessário para que ocorra a consolidação ao leito receptor (BUSER et al., 1993), o que reforça a indicação da membrana para preservação do volume quando o osso de origem endocondral é usado como enxerto.

A figura 21 fornece um panorama do comportamento que os grupos de estudo apresentaram, no qual um espécime representativo de cada grupo serve para compará-los entre si, dando uma visão geral do que foi discutido acima.

Figura 21 – Quadro ilustrativo do comportamento dos espécimes durante o período de avaliação de 15, 30 e 45 dias. P = Grupo Parafuso; M = Grupo Membrana; PA = Grupo Parafuso + Ácido; MA = Grupo Membrana + Ácido

Um aspecto desfavorável relacionado ao uso do parafuso de titânio como método de fixação de enxertos é a necessidade de sua remoção que pode envolver risco de fratura do parafuso quando este se encontra osseointegrado. Com a intenção de eliminar esta etapa, foram testados parafusos reabsorvíveis que se

mostraram eficazes, porém não foram obtidos resultados significativamente superiores aos parafusos de titânio (CHACON et al., 2004 ; QUERESHY et al., 2010).

Ainda em busca de métodos de fixação alternativos ao parafuso de titânio, foi avaliado o uso de adesivos, a base de cianoacrilato, diretamente na interface enxerto-leito. Diversos estudos têm demonstrado que certos cianoacrilatos não oferecem prejuízos significativos aos tecidos, resultando apenas na formação de granulomas de corpo estranho (BAŞ et al., 2012 ; FORSETH; O'GRADY; TORIUMI, 1992 ; REZENDE, 2008 ; TORIUMI et al., 1990). São poucos os estudos que fizeram uso do cianoacrilato como método de fixação de enxertos ósseos em bloco e, segundo os resultados destes trabalhos, ainda que o adesivo promova estabilidade, adaptação adequada do enxerto ao leito receptor e resulte em menor perda de volume ósseo, em contato direto com a interface enxerto ósseo-leito receptor, este retarda o processo de consolidação óssea devido à sua lenta degradação (DE OLIVEIRA NETO et al., 2012 ; SASKA et al., 2009).

A utilização do cianoacrilato em associação à membrana foi sugerida por Rezende (2008), tendo a membrana o intuito de preservar o volume ósseo e o cianoacrilato, o de fixar a membrana ao leito à distância da interface, de forma a promover estabilidade e evitar micromovimentações na interface enxerto ósseo-leito receptor. Os resultados favoráveis de Rezende (2008) inspiraram a comparação efetuada nesta tese entre fixação por membrana e parafuso. Os resultados aqui apresentados confirmaram a efetividade da fixação dos enxertos ósseos com esse método mesmo em tíbia de coelhos, local de maior movimentação muscular do que a calota craniana de cobaias. Presume-se que o uso da membrana fixada pelo adesivo à base de cianoacrilato tenha eliminado a pressão negativa gerada pelo parafuso e o risco de fratura envolvido em sua remoção, com a vantagem da preservação do volume ósseo e sem a interferência do adesivo na consolidação da interface enxerto-leito. Além disso, a membrana fixada pelo cianoacrilato promoveu contato íntimo do enxerto ósseo ao leito receptor, fator de extrema importância na consolidação destas estruturas (ADEYEMO et al., 2008 ; MIRANDA et al., 2006 ; MOHAMMADI et al., 2000 ; SASKA et al., 2009).

A extensão das superfícies de consolidação do enxerto e do leito ao osso neoformado é um parâmetro importante de avaliação porque não apenas é necessário que haja neoformação óssea na interface, como também que o osso

neoformado esteja imbricado ao osso maduro do enxerto e do leito para que não ocorra o destacamento do bloco ósseo durante a instalação de implantes osseointegrados nessa interface (MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009 ; ROCCUZZO et al., 2007 ; RODRIGUES et al., 2012). Em relação a esse parâmetro de avaliação não houve diferença significativa entre a extensão de consolidação das superfícies do enxerto e do leito em nenhum dos períodos de avaliação (tabelas 2 e 3). Por esta razão, foi feita a opção pela discussão das duas superfícies em associação.

Aos 30 dias, o método de fixação do enxerto não interferiu significativamente nas superfícies de consolidação, já que os grupos M e P não apresentaram diferença estatística entre si ($p=1$), o mesmo ocorrendo entre os grupos MA e PA ($p=1$) e isto se manteve aos 45 dias ($p=1$ para ambos). Por outro lado, os grupos que empregaram tratamento ácido das superfícies de contato enxerto-leito, apresentaram superfícies de consolidação do osso neoformado cerca de 20% mais extensas do que os grupos sem tratamento ácido, diferença esta, estatisticamente significativa ($p<0,0002$). Quando comparados entre si, os grupos MA e PA, quer aos 30, quer aos 45 dias, não apresentaram diferença estatística entre si ($p=1$ para ambas as comparações). Estes resultados apontam para um efeito favorável do ácido na determinação da melhora na consolidação dos enxertos. Provavelmente, a desmineralização ácida produziu, além da exposição de proteínas osseointductoras que anteciparam os eventos de reparação, uma modificação da textura superficial do tecido mineralizado, gerando microporosidades que podem ter aumentado o efeito de imbricação entre osso neoformado e o osso maduro (BISKOBING et al., 1997 ; SCHWARTZ et al., 2000).

A análise dos resultados aqui apresentados direciona a inferir que a associação da desmineralização das superfícies de contato do enxerto e do leito receptor com o recobrimento dos enxertos por uma barreira biológica, como a membrana aqui empregada, pode ser uma estratégia de abordagem favorável na técnica dos enxertos ósseos autógenos em bloco; a desmineralização ácida, por ampliar as superfícies de consolidação e antecipar os eventos de mineralização do osso neoformado na interface; e a membrana, por auxiliar na manutenção da espessura do tecido enxertado com o tempo.

Muito embora não existam estudos em humanos quanto à fixação de enxertos ósseos por membranas fixadas por cianoacrilato, este método comprovou-se eficaz

em animais cuja estrutura óssea não é suficientemente robusta ou implicaria em risco de vida para os animais, caso a fixação fosse feita por parafuso, como é o caso da calota craniana de animais de pequeno porte (REZENDE, 2008). Nesta tese, as membranas foram empregadas em metáfise proximal tibial de coelhos nas quais, ainda que representem áreas de intensa movimentação, não foi observado deslocamento dos blocos durante os períodos de reparação. Desejavelmente, estudos subsequentes em cães, macacos ou outros animais de maior porte, possam contribuir para que resultados semelhantes aos aqui apresentados venham a ser extrapolados para humanos. Os benefícios seriam a simplificação e otimização do procedimento mantendo a segurança, já que nenhum efeito adverso foi observado pelo emprego do cianoacrilato ou da membrana neste estudo e no de Rezende (2008).

Outra aplicação para os prováveis benefícios da desmineralização óssea *in situ* pode ser estudada no reparo de defeitos periodontais a receberem técnicas regenerativas, nos quais a cortical do defeito é difícil de ser perfurada para dar acesso às fontes de células osteogênicas dos espaços medulares. Para lograr encontrar respostas a esta e outras questões que possam vir a sustentar o uso da desmineralização óssea em procedimentos regenerativos periodontais e maxilomandibulares, pesquisas adicionais estão sendo desenvolvidas na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, para investigar: em nível molecular, os eventos que ocorrem na superfície óssea frente a diferentes protocolos de desmineralização; em defeitos críticos, para verificar a capacidade regenerativa de enxertos particulados desmineralizados; e clinicamente, em defeitos periodontais preenchidos por osso desmineralizado sobre leito tratado da mesma forma.

A antecipação dos eventos de reparação óssea dos enxertos em bloco é um objetivo a ser almejado visando o encurtamento do tempo de espera para instalação de implantes e, conseqüentemente, do tempo de tratamento como um todo. Os dados deste estudo em relação à desmineralização ácida da interface enxerto-leito vieram a confirmar e complementar estudos prévios (COESTA, 2011 ; REZENDE, 2008 ; RODRIGUES et al., 2012) que atestaram antecipação e intensificação da neoformação óssea, aumento das superfícies de consolidação e interferência favorável na morfologia celular osteoblástica, os quais motivaram os esforços para o aprofundamento dos estudos a respeito desta nova abordagem terapêutica.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos critérios metodológicos usados e da amostra empregada neste estudo, a análise qualitativa e quantitativa de cortes microscópicos de enxertos ósseos *onlay* realizados na metáfise proximal tibial de coelhos demonstrou que:

- A desmineralização ácida das superfícies ósseas de contato do bloco ósseo autógeno e do leito receptor promove e acelera a neoformação óssea na interface em comparação à técnica convencional (sem desmineralização);
 - A desmineralização das superfícies do enxerto e do leito aumenta a sua consolidação ao osso neoformado.
 - O uso da membrana fixada por adesivo à base de cianoacrilato mostrou ser eficaz como método de fixação de enxertos ósseos em bloco por promover estabilidade e adaptação adequadas do enxerto ao leito receptor. Além disso, este método de fixação resulta em maior preservação da espessura do enxerto quando comparado ao método convencional (parafuso de titânio).
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

1. Accorsi-Mendonca T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol*. 2008;39(2):201-8.
 2. Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, et al. Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep. *Oral Maxillofac Surg*. 2008;12(1):19-28.
 3. Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992;50(8):829-34.
 4. Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat skull. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(5-6):554-61.
 5. Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Onlay bone graft behaviour after marrow exposure of the recipient rat skull bone. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1996;30(4):257-66.
 6. 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.
 7. Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1980;14(1):1-12.
 8. Almeida M. Análise do volume da neoformação de tecido ósseo na superfície de implantes de titânio cp em coelhos utilizando calceína e alizarina como marcadores em microscopia confocal a laser. Bauru: Universidade de São Paulo; 1999.
 9. Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant'ana AC, Gregghi SL, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(5):469-75.
 10. Barbosa DZ, de Assis WF, Shirato FB, Moura CC, Silva CJ, Dechichi P. Autogenous bone graft with or without perforation of the receptor bed: histologic study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(3):463-8.
-

11. Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater.* 2011;21:407-29; discussion 29.
 12. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):317-32.
 13. Baş B, Ozden B, Bekçioğlu B, Sanal KO, Gülbahar MY, Kabak YB. Screw fixation is superior to N-butyl-2-cyanoacrylate in onlay grafting procedure: a histomorphologic study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(4):537-43.
 14. Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol.* 1994;65(12):1128-33.
 15. Biskobing DM, Fan D, Fan X, Rubin J. Induction of carbonic anhydrase II expression in osteoclast progenitors requires physical contact with stromal cells. *Endocrinology.* 1997;138(11):4852-7.
 16. Bowers GM, Chadroff B, Carnevale R, Mellonig J, Corio R, Emerson J, et al. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. *J Periodontol.* 1989;60(12):683-93.
 17. Boyd JB, Mulholland RS. Fixation of the vascularized bone graft in mandibular reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(2):274-82.
 18. Bradley JP, Zide BM, Berenstein A, Longaker MT. Large arteriovenous malformations of the face: aesthetic results with recurrence control. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103(2):351-61.
 19. Buchman SR, Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg.* 1999;43(1):49-56.
 20. Burger EA, Meshkini H, Lindeboom JA. One versus two titanium screw fixation of autologous onlay bone grafts in the anterior maxilla: a randomised histological pilot study. *Eur J Oral Implantol.* 2011;4(3):219-25.
 21. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993;13(1):29-45.
-

22. 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; discussion 1-3.
 23. Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Rached RS, Sampaio JE. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(3):376-83.
 24. Chacon GE, Ellis JP, Kalmar JR, McGlumphy EA. Using resorbable screws for fixation of cortical onlay bone grafts: an in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(11):1396-402.
 25. Chen NT, Glowacki J, Bucky LP, Hong HZ, Kim WK, 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; discussion 23-4.
 26. Coesta P. Efeito da desmineralização óssea superficial na migração, adesão e diferenciação de pré-osteoblastos. Faculdade de Odontologia de Bauru: Universidade de São Paulo; 2011.
 27. Cole RT, Crigger M, Bogle G, Egelberg J, Selvig KA. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J Periodontal Res*. 1980;15(1):1-9.
 28. Cook SD, Rueger DC. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1996(324):29-38.
 29. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77(5):734-50.
 30. Crigger M, Bogle G, Nilvéus R, Egelberg J, Selvig KA. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. *J Periodontal Res*. 1978;13(6):538-49.
 31. Crigger M, Renvert S, Bogle G. The effect of topical citric acid application on surgically exposed periodontal attachment. *J Periodontal Res*. 1983;18(3):303-5.
 32. Dasmah A, Thor A, Ekestubbe A, Sennerby L, Rasmusson L. Particulate vs. block bone grafts: three-dimensional changes in graft volume after reconstruction of the atrophic maxilla, a 2-year radiographic follow-up. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):654-9.
-

33. de Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(2):113-8.
 34. 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.
 35. de Oliveira Neto PJ, Cricchio G, Hawthorne AC, Okamoto R, Sennerby L, Lungren S, et al. Tomographic, histological, and immunohistochemical evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrilate for onlay graft fixation in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(6):861-71.
 36. De Santis E, Lang NP, Scala A, Viganò P, Salata LA, Botticelli D. Healing outcomes at implants installed in grafted sites: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(3):340-50.
 37. Dongieux JW, Block MS, Morris G, Gardiner D, Dean K. The effect of different membranes on onlay bone graft success in the dog mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;86(2):145-51.
 38. Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the mandible with GTR and onlay cortical bone grafting. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(2):175-84.
 39. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol.* 2000;151(4):879-89.
 40. Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(4):393-401.
 41. Forseth M, O'Grady K, Toriumi DM. The current status of cyanoacrylate and fibrin tissue adhesives. *J Long Term Eff Med Implants.* 1992;2(4):221-33.
 42. Gerressen M, Hermanns-Sachweh B, Riediger D, Hilgers RD, Spiekermann H, Ghassemi A. Purely cancellous vs. corticocancellous bone in sinus floor augmentation with autogenous iliac crest: a prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):109-15.
 43. Gielkens PF, Bos RR, Raghoobar GM, Stegenga B. Is there evidence that barrier membranes prevent bone resorption in autologous bone grafts during
-

- the healing period? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(3):390-8.
44. Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(7):1909-18.
45. Gordh M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27(1):67-73.
46. 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.
47. Gosain AK, McCarthy JG, Staffenberg D, Glat PM, Simmons DJ. The histomorphologic changes in vascularized bone transfer and their interrelationship with the recipient sites: a 1-year study. *Plast Reconstr Surg*. 1996;97(5):1001-13.
48. Gosain AK, Song L, Capel CC, Corrao MA, Lim TH. Biomechanical and histologic alteration of facial recipient bone after reconstruction with autogenous bone grafts and alloplastic implants: a 1-year study. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(6):1561-71.
49. Greenstein G, Greenstein B, Cavallaro J, Tarnow D. The role of bone decortication in enhancing the results of guided bone regeneration: a literature review. *J Periodontol*. 2009;80(2):175-89.
50. Gruber H, Solar P, Ulm M C. Maxillo-mandibular anatomy and resorption pattern during atrophy. In: WATZEK G, editor. *Endosseous implants: scientific and clinical aspects*. Chicago: Quintessence Books; 1996. p. 29-62.
51. Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1984;802(1):151-4.
52. Herod EL. Cyanoacrylates in dentistry: a review of the literature. *J Can Dent Assoc*. 1990;56(4):331-4.
53. Ho SK, Peel SA, Hu ZM, Sándor GK, Clokie CM. Augmentation of the maxillary sinus: comparison of bioimplants containing bone morphogenetic protein and autogenous bone in a rabbit model. *J Can Dent Assoc*. 2010;76:a108.
-

54. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res*. 1986;65(1):12-22.
 55. Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(6):666-73.
 56. Jensen OT, Greer RO, Jr., Johnson L, Kassebaum D. Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(3):335-44.
 57. Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N, Esmaeelinejad M, Alikhassy Z, Stevens M. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012.
 58. Kim HM, Kim YS, Woo KM, Park SJ, Rey C, Kim Y, et al. Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite. *J Biomed Mater Res*. 2001;56(2):250-6.
 59. Kline DG, Hayes GJ. An experimental evaluation of the effect of a plastic adhesive, methyl 2-cyanoacrylate, on neural tissue. *J Neurosurg*. 1963;20:647-54.
 60. Koerdt S, Ristow O, Wannhoff A, Kübler AC, Reuther T. Expression of growth factors during the healing process of alveolar ridge augmentation procedures using autogenous bone grafts in combination with GTR and an anorganic bovine bone substitute : An immunohistochemical study in the sheep. *Clin Oral Investig*. 2013.
 61. Kulkarni S, Dodwad V, Chava V. Healing of periodontal flaps when closed with silk sutures and N-butyl cyanoacrylate: a clinical and histological study. *Indian J Dent Res*. 2007;18(2):72-7.
 62. Kusiak JF, Zins JE, Whitaker LA. The early revascularization of membranous bone. *Plast Reconstr Surg*. 1985;76(4):510-6.
 63. LaTrenta GS, McCarthy JG, Breitbart AS, May M, Sissons HA. The role of rigid skeletal fixation in bone-graft augmentation of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(4):578-88.
 64. Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UM. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7/rhOP-1): radiographic observations. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):914-9.
-

65. 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.
 66. Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, Hibbs MS. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. *Matrix*. 1992;12(4):282-90.
 67. Lourenço EJV. Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo; 2002.
 68. Maestre-Ferrín L, Boronat-López A, Peñarrocha-Diago M. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14(8):e402-7.
 69. Matsumoto MA. Análise microscópica de rebordos alveolares maxilares reconstruídos com enxertos autógenos de crista ilíaca e região mentoniana. Bauru: University of São Paulo; 1999.
 70. Meikle MC, Bord S, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci*. 1992;103 (Pt 4):1093-9.
 71. Melcher AH. Biological processes in resorption, deposition and regeneration of bone. In: SS S, editor. *Periodontal surgery Biologic basis and technique*. Springfield: Charles C Thomas; 1976. p. 99-120.
 72. Miranda SR, Nary Filho H, Padovan LE, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(6):694-9.
 73. Mohammadi S, Rasmusson L, Göransson L, Sennerby L, Thomsen P, Kahnberg KE. Healing of titanium implants in onlay bone grafts: an experimental rabbit model. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11(2):83-9.
 74. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):960-70.
 75. O'Donnell RJ, Deutsch TF, Flotte RJ, Lorente CA, Tomford WW, Mankin HJ, et al. Effect of Er:YAG laser holes on osteoinduction in demineralized rat calvarial allografts. *J Orthop Res*. 1996;14(1):108-13.
-

76. Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(1):139-47.
 77. Pedrosa WF, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(11):1254-64.
 78. Penoff J. Skin closures using cyanoacrylate tissue adhesives. Plastic Surgery Educational Foundation DATA Committee. Device and Technique Assessment. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(2):730-1.
 79. 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.
 80. Quereshey FA, Dhaliwal HS, El SA, Horan MP, Dhaliwal SS. Resorbable screw fixation for cortical onlay bone grafting: a pilot study with preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(10):2497-502.
 81. Ramoshebi LN, Ripamonti U. Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein, induces angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and synergizes with basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1. *Anat Rec*. 2000;259(1):97-107.
 82. Rasmusson L, Meredith N, Kahnberg KE, Sennerby L. Effects of barrier membranes on bone resorption and implant stability in onlay bone grafts. An experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10(4):267-77.
 83. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol*. 1975;46(11):646-55.
 84. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. *J Periodontol*. 1973;44(1):49-54.
 85. Rezende MLR. Efeito da desmineralização das superfícies ósseas de contato na consolidação de enxertos autógenos em cobaias. Bauru: Bauru School of Dentistry - University of São Paulo; 2008.
 86. Rezende MLR, Johansson CB. Quantitative bone tissue responses to commercially pure titanium. *Journal of Materials Science. Mat Med*. 1993;4:233-39.
-

87. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1996(324):39-46.
 88. Ripamonti U, Reddi AH. Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992;3(1-2):1-14.
 89. Roccuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: a controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):286-94.
 90. Rodrigues M, Rezende M, Sant'Ana A, Greggi S, Domingues R, Damante C, et al. Biochemical and SEM studies on the demineralization of onlay bone grafts: implications on mechanical properties. *ImplantNews*. 2012;9(3):329-36.
 91. Salata LZ, Rasmusson L, Kahnberg KE. Effects of a mechanical barrier on the integration of cortical onlay bone grafts placed simultaneously with endosseous implant. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2002;4(2):60-8.
 92. Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capela MV, Gabrielli MA. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(2):180-6.
 93. Sbordone C, Sbordone L, Toti P, Martuscelli R, Califano L, Guidetti F. Volume changes of grafted autogenous bone in sinus augmentation procedure. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(6):1633-41.
 94. Schmitt C, Karasholi T, Lutz R, Wiltfang J, Neukam FW, Schlegel KA. Long-term changes in graft height after maxillary sinus augmentation, onlay bone grafting, and combination of both techniques: a long-term retrospective cohort study. *Clin Oral Implants Res*. 2012.
 95. Schwartz Z, Lohmann CH, Wieland M, Cochran DL, Dean DD, Textor M, et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. *J Periodontol*. 2000;71(4):586-97.
 96. Selvig KA, Hals E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. *J Periodontal Res*. 1977;12(6):419-29.
-

97. Selvig KA, Zander HA. Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*. 1962;33:303.
 98. Shimohara L, Rezende MLR, Domingues RS, Sant'Ana ACP, Gregghi SLA, Damante CA, et al. Efeito da contaminação por saliva no condicionamento ácido radicular: estudo microscópico em ratos. *PerioNews*. 2012;6:303-11.
 99. Sittitavornwong S, Gutta R. Bone graft harvesting from regional sites. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010;22(3):317-30, v-vi.
 100. Somerman MJ, Nathanson MA, Sauk JJ, Manson B. Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res*. 1987;66(10):1551-8.
 101. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):543-52.
 102. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990;116(5):546-50.
 103. Ueda JK, Francischone CE, Ramalho JS. Estudo comparativo da substituição óssea frente a enxerto de osso autógeno e proteína morfogenética óssea ao lado de implantes de titânio. *Rev Dental Press Periodontia Implantol*. 2007;1(1):76-84.
 104. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*. 1983;220(4598):680-6.
 105. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop Relat Res*. 1968;59:59-96.
 106. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
 107. von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(3):260-9.
 108. von Arx T, Hardt N, Wallkamm B. The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(3):387-94.
-

109. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J*. 1999;13(8):781-92.
 110. Widmark G, Andersson B, Andrup B, Carlsson GE, Ivanoff CJ, Lindvall AM. Rehabilitation of patients with severely resorbed maxillae by means of implants with or without bone grafts. A 1-year follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13(4):474-82.
 111. Widmark G, Andersson B, Ivanoff CJ. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997;26(2):106-9.
 112. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(2):187-93.
 113. Wood RA, Mealey BL. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol*. 2012;83(3):329-36.
 114. Yashon D, Jane JA, Gordon MC, Hubbard JL, Sugar O. Effects of methyl 2-cyanoacrylate adhesives on the somatic vessels and the central nervous system of animals. *J Neurosurg*. 1966;24(5):883-8.
 115. Yeh LC, Lee JC. Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;153(1-2):113-24.
-

ANEXO A

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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 001/2010

Bauru, 23 de março de 2010.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais **"Efeito da desmineralização ácida da interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco"** de autoria de Roberta Santos Domingues foi novamente analisado e considerado **APROVADO "ad referendum"** deste Colegiado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende

Docente do Departamento de Prótese

Tabela 4 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 30 dias em relação à interface lateral enxerto-leito (P e PA) e interface lateral enxerto-membrana-leito (M e MA)

	INTERFACE LATERAL ENXERTO X LEITO																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	0	N/A	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	0	N/A	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0
Tecido de Granulação	5	5	N/A	5	5	N/A	5	5	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5	0	0	N/A	0	0	0
Neoformação óssea	9	9	N/A	9	9	N/A	9	9	9	9	9	9	0	6	6	6	6	6	7	7	N/A	7	7	7

Tabela 5 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 30 dias em relação à interface enxerto-periósteo (P e PA) e interface enxerto-membrana

	INTERFACE ENXERTO-PERÍÓSTEO / ENXERTO-MEMBRANA																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	N/A	N/A	0	N/A	N/A	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	N/A	N/A	0	N/A	N/A	0	0	0	0	0	N/A	2	2	2	2	2	2	2	N/A	2	2	2	2
Tecido de Granulação	5	N/A	N/A	5	N/A	N/A	5	5	5	5	5	N/A	3	5	5	5	5	5	5	N/A	5	5	5	5
Neoformação óssea	0	N/A	N/A	0	N/A	N/A	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0	0

Tabela 6 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 30 dias em relação à interface enxerto-leito

	INTERFACE ENXERTO-LEITO																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	0	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N/A	0	0	0
Tecido de Granulação	5	5	N/A	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	0	0	N/A	0	0	0
Neoformação óssea	9	9	N/A	9	9	9	9	9	9	9	9	9	7	9	7	7	7	7	9	9	N/A	9	9	9

Tabela 7 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 45 dias em relação à interface lateral enxerto-leito (P e PA) e interface lateral enxerto-membrana-leito (M e MA)

	INTERFACE LATERAL ENXERTO X LEITO																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tecido de Granulação	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5	3	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Neoformação óssea	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	7	0	9	0	0	8	8	8	8	8	8

Tabela 8 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 45 dias em relação à interface enxerto-periósteo (P e PA) e interface enxerto-membrana

	INTERFACE ENXERTO-PERÍÓSTEO / ENXERTO-MEMBRANA																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tecido de Granulação	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Neoformação óssea	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 9 – Dados coletados da análise microscópica dos espécimes de 45 dias em relação à interface enxerto-leito

	INTERFACE ENXERTO-LEITO																							
	P						PA						M						MA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuloma de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tecido de Granulação	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neoformação óssea	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	9	7	7	9	9	9	9	9	9

APÊNDICE B – Tabelas contendo os valores de p obtidos pela análise estatística empregada neste estudo

Tabela 1 – Valores obtidos para nível de significância ao comparar os grupos em relação à espessura do enxerto ósseo utilizando o teste estatístico ANOVA a três critérios e pós teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ significativo

	Fixação	ácido	Tempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	membrana	sem	15		0,999155	0,763987	0,999999	0,920050	0,999461	1,000000	0,001086	0,000400	0,999838	0,039385	0,016622
2	membrana	sem	30	0,999155		0,996959	0,999999	0,999934	1,000000	0,999999	0,016253	0,005430	1,000000	0,292840	0,159084
3	membrana	sem	45	0,763987	0,996959		0,948853	1,000000	0,995692	0,956508	0,206076	0,091623	0,998231	0,896820	0,741982
4	membrana	com	15	0,999999	0,999999	0,948853		0,993071	1,000000	1,000000	0,004319	0,001366	1,000000	0,118520	0,055857
5	membrana	com	30	0,920050	0,999934	1,000000	0,993071		0,999881	0,993962	0,097985	0,038712	0,999953	0,723725	0,518334
6	membrana	com	45	0,999461	1,000000	0,995692	1,000000	0,999881		1,000000	0,014390	0,004778	1,000000	0,271413	0,145270
7	parafuso	sem	15	1,000000	0,999999	0,956508	1,000000	0,993962	1,000000		0,007160	0,002456	1,000000	0,151442	0,076378
8	parafuso	sem	30	0,001086	0,016253	0,206076	0,004319	0,097985	0,014390	0,007160		1,000000	0,043905	0,987740	0,999086
9	parafuso	sem	45	0,000400	0,005430	0,091623	0,001366	0,038712	0,004778	0,002456	1,000000		0,017696	0,918051	0,982291
10	parafuso	com	15	0,999838	1,000000	0,998231	1,000000	0,999953	1,000000	1,000000	0,043905	0,017696		0,427860	0,269556
11	parafuso	com	30	0,039385	0,292840	0,896820	0,118520	0,723725	0,271413	0,151442	0,987740	0,918051	0,427860		1,000000
12	parafuso	com	45	0,016622	0,159084	0,741982	0,055857	0,518334	0,145270	0,076378	0,999086	0,982291	0,269556	1,000000	

Tabela 2 – Valores obtidos para nível de significância ao comparar os grupos em relação à neoformação óssea na interface enxerto ósseo/leito receptor utilizando o teste estatístico ANOVA a três critérios e pós teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ significante

	Fixação	ácido	tempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	membrana	Sem	15		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
2	membrana	Sem	30	0,000123		0,617410	0,000123	0,000290	0,000319	0,000123	0,659147	0,938141	0,000123	0,974625	0,756195
3	membrana	Sem	45	0,000123	0,617410		0,000123	0,123759	0,136327	0,000123	0,005452	0,029069	0,000123	0,999642	1,000000
4	membrana	com	15	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
5	membrana	com	30	0,000123	0,000290	0,123759	0,000123		1,000000	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,014639	0,073931
6	membrana	com	45	0,000123	0,000319	0,136327	0,000123	1,000000		0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,016598	0,082185
7	Parafuso	Sem	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
8	Parafuso	Sem	30	0,000123	0,659147	0,005452	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123		0,999989	0,000123	0,055780	0,010525
9	Parafuso	Sem	45	0,000123	0,938141	0,029069	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,999989		0,000123	0,207152	0,052068
10	Parafuso	com	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123
11	Parafuso	com	30	0,000123	0,974625	0,999642	0,000123	0,014639	0,016598	0,000123	0,055780	0,207152	0,000123		0,999983
12	Parafuso	com	45	0,000123	0,756195	1,000000	0,000123	0,073931	0,082185	0,000123	0,010525	0,052068	0,000123	0,999983	

Tabela 3 – Valores obtidos para nível de significância ao comparar os grupos em relação à extensão de osso consolidado ao enxerto ósseo utilizando o teste estatístico ANOVA a três critérios e pós teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ significante

	Fixação	Ácido	tempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	membrana	Sem	15		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
2	membrana	Sem	30	0,000123		0,192232	0,000123	0,002720	0,000631	0,000123	0,999828	0,305405	0,000123	0,000159	0,003329
3	membrana	Sem	45	0,000123	0,192232		0,000123	0,920611	0,681166	0,000123	0,629554	1,000000	0,000123	0,255071	0,939578
4	membrana	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
5	membrana	Com	30	0,000123	0,002720	0,920611	0,000123		0,999998	0,000123	0,025887	0,818750	0,000123	0,991050	1,000000
6	membrana	Com	45	0,000123	0,000631	0,681166	0,000123	0,999998		0,000123	0,006388	0,518491	0,000123	0,999929	0,999994
7	parafuso	Sem	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
8	parafuso	Sem	30	0,000123	0,999828	0,629554	0,000123	0,025887	0,006388	0,000123		0,781705	0,000123	0,000760	0,031015
9	parafuso	Sem	45	0,000123	0,305405	1,000000	0,000123	0,818750	0,518491	0,000123	0,781705		0,000123	0,156102	0,850856
10	parafuso	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123
11	parafuso	Com	30	0,000123	0,000159	0,255071	0,000123	0,991050	0,999929	0,000123	0,000760	0,156102	0,000123		0,986145
12	parafuso	Com	45	0,000123	0,003329	0,939578	0,000123	1,000000	0,999994	0,000123	0,031015	0,850856	0,000123	0,986145	

Tabela 4 – Valores obtidos para nível de significância ao comparar os grupos em relação à extensão de osso consolidado ao leito receptor utilizando o teste estatístico ANOVA a três critérios e pós teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ significativa

	Fixação	Ácido	tempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	membrana	Sem	15		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
2	membrana	Sem	30	0,000123		0,277500	0,000123	0,001910	0,050802	0,000123	0,999946	0,520286	0,000123	0,057043	0,383562
3	membrana	Sem	45	0,000123	0,277500		0,000123	0,786414	0,999817	0,000123	0,063868	1,000000	0,000123	0,999899	1,000000
4	membrana	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
5	membrana	Com	30	0,000123	0,001910	0,786414	0,000123		0,993658	0,000123	0,000286	0,527817	0,000123	0,991225	0,670099
6	membrana	Com	45	0,000123	0,050802	0,999817	0,000123	0,993658		0,000123	0,007584	0,991274	0,000123	1,000000	0,998490
7	parafuso	Sem	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
8	parafuso	Sem	30	0,000123	0,999946	0,063868	0,000123	0,000286	0,007584	0,000123		0,163504	0,000123	0,008683	0,101552
9	parafuso	Sem	45	0,000123	0,520286	1,000000	0,000123	0,527817	0,991274	0,000123	0,163504		0,000123	0,993696	1,000000
10	parafuso	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123
11	parafuso	Com	30	0,000123	0,057043	0,999899	0,000123	0,991225	1,000000	0,000123	0,008683	0,993696	0,000123		0,999036
12	parafuso	Com	45	0,000123	0,383562	1,000000	0,000123	0,670099	0,998490	0,000123	0,101552	1,000000	0,000123	0,999036	

Tabela 5 – Valores obtidos para nível de significância ao comparar os grupos em relação à extensão de osso consolidado ao enxerto ósseo e ao leito receptor utilizando o teste estatístico ANOVA a três critérios e pós teste de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ significante

	Fixação	Ácido	tempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	membrana	Sem	15		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
2	membrana	Sem	30	0,000123		0,063044	0,000123	0,000191	0,003956	0,000123	1,000000	0,160020	0,000123	0,000170	0,065863
3	membrana	Sem	45	0,000123	0,063044		0,000123	0,653129	0,998225	0,000123	0,076093	1,000000	0,000123	0,592288	1,000000
4	membrana	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
5	membrana	Com	30	0,000123	0,000191	0,653129	0,000123		0,993243	0,000123	0,000214	0,391074	0,000123	1,000000	0,641629
6	membrana	Com	45	0,000123	0,003956	0,998225	0,000123	0,993243		0,000123	0,004987	0,969819	0,000123	0,987300	0,997911
7	parafuso	Sem	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123
8	parafuso	Sem	30	0,000123	1,000000	0,076093	0,000123	0,000214	0,004987	0,000123		0,187469	0,000123	0,000187	0,079403
9	parafuso	Sem	45	0,000123	0,160020	1,000000	0,000123	0,391074	0,969819	0,000123	0,187469		0,000123	0,337437	1,000000
10	parafuso	Com	15	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123	1,000000	0,000123	0,000123		0,000123	0,000123
11	parafuso	Com	30	0,000123	0,000170	0,592288	0,000123	1,000000	0,987300	0,000123	0,000187	0,337437	0,000123		0,580560
12	parafuso	Com	45	0,000123	0,065863	1,000000	0,000123	0,641629	0,997911	0,000123	0,079403	1,000000	0,000123	0,580560	