UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ÉRIKA BEATRIZ SPADA DE CARVALHO

**Efeito da desmineralização óssea superficial na
consolidação de enxertos ósseos autógenos. Estudo
histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária
de ratos**

BAURU

2017

ÉRIKA BEATRIZ SPADA DE CARVALHO

Efeito da desmineralização óssea superficial na consolidação de enxertos ósseos autógenos. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária de ratos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Versão corrigida

BAURU

2017

C253e Spada de Carvalho, Érika Beatriz

Efeito da desmineralização óssea superficial na consolidação de enxertos ósseos autógenos. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária de ratos / Érika Beatriz Spada de Carvalho. – Bauru, 2017.
179 p. : il. ; 31cm.

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

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais da FOB-USP
Protocolo nº: 015/2015
Data: 28/10/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ter me dado saúde, sabedoria e dedicação para a realização dessa pesquisa.

E aos meus **pais, Edson Rodrigues de Carvalho e Sandra Aparecida Spada de Carvalho**, por sempre me apoiarem na minha vida acadêmica, por não medirem esforços para que eu continue caminhando na minha jornada científica, por tudo o que representam para mim, por serem exemplos de honestidade, humildade e bom caráter e por serem a minha base. Ainda assim, por mais que eu possa listar todas as razões para justificar a dedicatória deste trabalho, ainda me faltarão palavras para descrever todo o amor que sinto por vocês e tudo o que são para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela minha vida e a de minha família, por guiar os meus passos nessa jornada, por me conceder sabedoria, por me acalmar nos momentos difíceis e por sempre estar presente em minha vida.

Agradeço de maneira única e especial a minha **família**, meu pai, **Edson Rodrigues de Carvalho**, minha mãe **Sandra Aparecida Spada de Carvalho**, minha irmã **Débora Cristina Spada de Carvalho**, meu cunhado **Renato Fresneda Delmori**, meu sobrinho **Matheus Carvalho Delmori** e meu namorado **Almir Aparecido Perin Junior** por todo o suporte que me deram ao longo desses anos longe de casa. Obrigada pelos conselhos, orientações, por saber que eu tenho vocês ao meu lado sempre, pelo amor incondicional que vocês me oferecem, fazendo eu me sentir protegida e amparada a todo momento. Simplesmente as palavras somem quando penso em vocês, pois é difícil traduzir em palavras todo o amor e gratidão que sinto por cada um. Vocês são o meu TUDO!

Agradeço a minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende** por depositar em mim a confiança e conhecimentos necessários para que eu conduzisse a pesquisa com dedicação e interesse. Por toda orientação nas diversas atividades realizadas durante o mestrado, como seminários e clínicas, pela paciência para transmitir seu conhecimento para mim durante as reuniões que tivemos ao longo desses anos, por sempre me guiar em cada etapa da pesquisa, transferindo um pouco de suas experiências. Pelo exemplo de profissional, dedicada em tudo o que faz e pelo exemplo de mulher, determinada, forte e íntegra em todos os seus atos. Obrigada por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional, desde o início da minha graduação até a pós-graduação, por ser a minha orientadora na apresentação do meu primeiro trabalho em um Congresso Odontológico, no qual fui premiada, o que me motivou a ir em busca de mais trabalhos, iniciando ali a minha jornada em um mundo completamente novo e desconhecido para mim que era o mundo acadêmico, por onde me apaixonei e que posteriormente, ao término da minha graduação, decidi ingressar no mestrado para iniciar a construção da minha carreira no ensino e pesquisa, para que um dia eu possa viver à docência.

Agradeço a **Pós Doutoranda Samira Salmeron** pelo suporte e ensinamentos para a execução da pesquisa que foram essenciais para a correta conduta de todo o trabalho.

Agradeço de maneira especial a **Pós-Graduanda Giovana Fuzeto Veronesi** que foi de extrema importância para a pesquisa, com suas ótimas ideias e também me auxiliando em todas as cirurgias nos animais, que dividiu comigo inúmeras vezes o peso de carregar os materiais no percurso que fazíamos do departamento de Periodontia ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, por compartilhar comigo momentos de alegria e também de medo, sempre me encorajando e me dando forças para trabalhar com os ratos. Obrigada pelas conversas, risadas e histórias que me contava e que fizeram o tempo passar mais rápido.

Agradeço ao **Pós-Graduando Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi** por me ensinar a trabalhar com os animais, pela paciência que teve para me orientar nos primeiros dias das cirurgias, onde tudo para mim era algo novo, me ajudando a lutar contra os meus medos e inseguranças, que deu o sangue em nome da pesquisa. Obrigada por sua amizade de sempre.

Agradeço ao **Pós-Graduando Rafael Ferreira** por toda ajuda durante as eutanásias dos animais. Obrigada pela companhia, pelas conversas e por sua amizade.

Agradeço imensamente aos **funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru**, em especial ao senhor **Luiz Carlos da Silva** e ao senhor **Erasmão Gonçalves da Silva**, pelo suporte e cuidado com os animais, pelas orientações que me passaram para o correto manuseio dos ratos, por estarem sempre dispostos a me auxiliar nos momentos que eu mais precisava. Obrigada por todo o carinho com que cuidaram dos animais da pesquisa e que foram imprescindíveis para que eu realizasse o meu trabalho da melhor maneira possível.

Agradeço ao **Prof. Dr. José Burgos Ponce** por preparar toda a quantidade necessária de formol tamponado para o armazenamento dos espécimes da pesquisa. Obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo desde a graduação, me auxiliando nos laboratórios de Patologia e por sua colaboração durante a execução da pesquisa.

Agradeço ao **técnico do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, André Luis da Silva**, por toda a agilidade no preparo da solução Morse para a descalcificação dos espécimes. Obrigada também por

transmitir para mim suas experiências sobre o processamento histotécnico das lâminas que foram muito importantes para o andamento deste trabalho.

Agradeço de maneira muito especial à **técnica do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Fátima Aparecida Silveira**, conhecida carinhosamente por todos como Fatiminha, por toda orientação dada para o preparo do material histológico da pesquisa. A senhora foi fundamental para que essa pesquisa se realizasse. Agradeço imensamente por ter me orientado em cada etapa do processamento histotécnico, de forma atenciosa e paciente, sempre disponível para responder os meus questionamentos e demonstrando o amor e a felicidade que tem em seu trabalho. Todo esse amor pela profissão se reflete na imagem que a senhora passa para mim: uma mulher dedicada e guerreira. Obrigada por todo o companheirismo nas inúmeras horas que passei no laboratório, pelas histórias e experiências de vida e pela amizade que se iniciou em virtude da pesquisa. Obrigada por tudo Fatiminha!

Agradeço a todos os **funcionários e professores da Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru** pela colaboração e gentileza ao ceder o Microscópio Óptico para a realização das fotomicrografias.

Agradeço ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro** pela disposição que sempre teve para colaborar com os diversos trabalhos dessa linha de pesquisa, com uma visão crítica que foi imprescindível para a interpretação e análise dos resultados desse trabalho. Obrigada pelo cuidado que teve na leitura de todas as fotomicrografias, no auxílio para o aprimoramento da qualidade das imagens e por toda orientação.

Agradeço a **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara** por me instruir em relação aos aspectos técnicos para a execução da análise imunohistoquímica da pesquisa.

Agradeço a todos os **funcionários e professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru** pela presteza com que me auxiliaram em tudo o que eu precisava. Obrigada pelos bons momentos compartilhados que tornaram meu trabalho mais prazeroso.

Agradeço a **Pós-Graduanda Karen Henriette Pinke** que me ajudou na seleção e escolha dos materiais para a realização da técnica de imunohistoquímica.

Agradeço a **técnica do laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Danielle Santi Ceolin**, pela colaboração e agilidade com que confeccionou as lâminas da pesquisa para a análise imunohistoquímica.

Agradeço de maneira especial a todos os **professores do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, **Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi**, **Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana**, **Profa. Dra. Carla Andreotti Damante**, **Profa. Dra. Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando** e novamente a **Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende** que foram essenciais para o meu desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos passados nas salas de aula e fora delas também, por transmitirem humildemente suas experiências e histórias de vida, por me proporcionarem um excelente aprendizado de Periodontia, pelas orientações em todas as atividades do Mestrado, garantindo a oportunidade de crescer cada vez mais. E obrigada sobretudo por transformarem o Departamento de Periodontia em minha segunda casa.

Agradeço também a todos os **funcionários do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, **Edilaine Lúcio Rodrigues Torrecilha**, **Ivânia Komatsu da Costa Arruda**, **Marcela Maria Pereira**, **Marcos Antonio de Godoy** e **Asascleide Vital**, por todo o suporte durante as clínicas, por responderem as minhas dúvidas sempre de maneira tão cuidadosa e atenciosa, pelas conversas cotidianas e pelos conselhos que me passaram durante todos esses anos e que levarei para o resto da vida.

Agradeço imensamente aos meus **amigos da Pós-Graduação do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru**, **Matheus Völz Cardoso**, **Ísis de Fátima Balderrama**, **Giovana Fuzeto Veronesi**, **Andreia Pereira de Sousa**, **Vitor de Toledo Stuaní**, **Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi**, **Raphaella Coelho Michel**, **Luisa Andrade Valle**, **Adriana dos Santos Caetano**, **Bruna Ferraz**, **Paula Stephania Brandao Hage Karam**, **Paula de Oliveira Cunha**, **Rafael Ferreira** e **Jefrey Elias Rojas Paulus** com quem estive em contato desde o início do Mestrado. Obrigada por compartilharem comigo ótimos momentos, risadas, conversas e companheirismo, por sermos uma família, onde dividimos nossas angústias e multiplicamos nossas alegrias e pela construção dessa amizade sólida e verdadeira.

Agradeço carinhosamente aos **graduandos da Turma LII e LIII da Faculdade de Odontologia de Bauru** que foram as turmas que eu mais convivi nas salas de aula e nas clínicas e onde eu mais aprendi do que ensinei a eles um pouco do que sei durante as clínicas. Vocês foram essenciais ao meu crescimento.

Agradeço a todos os meus **pacientes** desde a graduação até a pós-graduação, por me permitirem atendê-los e confiarem no meu trabalho e por me capacitarem ao desenvolvimento de uma excelente Odontologia.

Agradeço a **Faculdade de Odontologia de Bauru**, em nome de seus dirigentes a diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** e ao vice-diretor **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, por todo o apoio para a execução da pesquisa e pela maravilhosa infraestrutura disponibilizada.

Agradeço a agência de fomento **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por conceder inicialmente a bolsa de treinamento técnico (Processo 2015/00951-0) vinculada ao Auxílio à Pesquisa (Processo 2014/15136-8) que foi de extrema importância para o desenvolvimento da pesquisa.

E agradeço também a agência de fomento **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por conceder minha bolsa de Mestrado.

“Que dentro de nós existam 3 coisas fundamentais, a força, a fé e Deus: a força para viver e lutar pelos sonhos e vitórias, a fé para fazer tudo tornar possível e Deus para estar no controle de todas as coisas e fazendo o melhor.”

Yla Fernandes

RESUMO

Dados recentes apontam que a desmineralização óssea pode promover a consolidação de enxertos e a proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos, mas os mecanismos biológicos envolvidos nesse processo precisam ser esclarecidos. Neste estudo foram investigados, em calvária de 126 ratos Wistar, os efeitos da desmineralização óssea sobre o reparo de enxertos ósseos em bloco cujas superfícies de contato foram desmineralizadas por tetraciclina hidrocloreto (TCN) na concentração de 50mg/ml ou ácido cítrico (AC) a 10% (pH=1) por 15, 30 ou 60 segundos (n=6). Enxertos controle foram realizados sem desmineralização. Após 7, 30 e 60 dias, blocos teciduais contendo os enxertos foram removidos dos animais e processados histotecnica para coloração com hematoxilina e eosina. Os espécimes de 30 dias de pós-operatório também forneceram amostras para avaliação imunohistoquímica para osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida tartrato resistente (TRAP), marcadores de formação e reabsorção óssea respectivamente. A análise qualitativa demonstrou estágios mais avançados no processo de reparo ósseo desde os 7 dias nos grupos desmineralizados em relação ao controle, com consolidação ocorrendo a partir dos 30 dias de pós-operatório, em especial nos espécimes desmineralizados com TCN por 60 segundos. A análise quantitativa demonstrou aumento significativo da área de osso neoformado e de superfícies de consolidação óssea com o tempo (ANOVA a dois critérios, $p < 0,05$). Maior porcentagem de área de osso neoformado ocorreu nos grupos AC15 e TCN60 quando comparados ao grupo controle em todos os períodos avaliados ($p = 0,02$). Aos 30 dias, o grupo C apresentou menor porcentagem de extensão de superfícies consolidadas em relação aos grupos TCN60, TCN30 e AC15 ($p = 0,0015$). Aos 60 dias, o grupo AC60 apresentou a totalidade das superfícies ósseas do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado na interface com diferença em relação ao grupo controle ($p = 0,0015$), que também apresentou menores resultados em relação aos grupos AC15, TCN15 e TCN60. A análise imunohistoquímica foi inconclusiva para explicar os achados histomorfométricos. A relação OCN/TRAP foi maior nos grupos controle, AC30, TCN30 e TCN60, mas a localização da imunomarcagem margeando as superfícies do osso neoformado e no interior dos espaços medulares sugere que a observação revela fenômenos de remodelação óssea normal, sem distinção entre os grupos. Concluiu-se que a desmineralização das superfícies

ósseas de contato entre o enxerto ósseo e o leito receptor com AC ou TCN durante 15, 30 ou 60 segundos promoveu maior área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito do que a não desmineralização, principalmente nos períodos mais precoces de reparação. A consolidação do osso neoformado ao enxerto e ao leito receptor também foi maior em todos os grupos desmineralizados em relação ao controle. Os melhores resultados, entretanto foram apresentados pelos grupos AC15 e TCN60.

Palavras-chave: Ácido Cítrico. Desmineralização. Imuno-Histoquímica. Tetraciclina.

ABSTRACT

Effect of superficial bone demineralization on the consolidation of autogenous bone grafts. Histomorphometric and immunohistochemical study in calvaria of rats

Recent data suggest that bone demineralization may promote graft consolidation and proliferation as well as differentiation of pre-osteoblasts, but the biological mechanisms involved in this process need to be clarified. In this study, the effects of bone demineralization were studied on the repair of onlay bone grafts whose contact surfaces were demineralized by tetracycline hydrochloride (TCN) at a concentration of 50mg / ml or citric acid (AC) a 10% (pH = 1) for 15, 30 or 60 seconds (n = 6). Control grafts were performed without demineralization. After 7, 30 and 60 days, tissue blocks containing the grafts were removed from the animals and processed histotechnically for hematoxylin and eosin staining. The 30-day post-operative specimens also provided samples for immunohistochemical evaluation for osteocalcin (OCN) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), markers of formation and bone resorption respectively. The qualitative analysis demonstrated more advanced stages of bone repair early in the 7 days evaluation in the demineralized groups in relation to the control. The quantitative analysis showed a significant increase in the area of newly formed bone and bone consolidation with time (two way ANOVA, $p < 0.05$). A higher percentage area of newly formed bone occurred in the AC15 and TCN60 groups when compared to the control group in all the evaluated periods ($p = 0.02$). At 30 days, group C had lower percentage of consolidated surfaces than groups TCN60, TCN30 and AC15 ($p = 0.0015$). At 60 days, the AC60 group presented bone surfaces totally consolidated to the newly formed bone at the interface with difference in relation to the control group ($p = 0.0015$), which also presented lower results in relation to the AC15, TCN15 and TCN60. The immunohistochemical analysis was inconclusive to explain the histomorphometric findings. The OCN / TRAP ratio was higher in the control, AC30, TCN30 and TCN60 groups, but the localization of the immunostaining, lining the surfaces of the newly formed bone and within the medullary spaces, suggests that the observation reveals normal bone remodeling phenomena. It was concluded that the demineralization of the bone surfaces of contact between The bone graft and the

receptor bed with AC or TCN for 15, 30 or 60 seconds promoted a greater area of newly formed bone tissue at the graft-bed interface than non-demineralization, especially in the earlier periods of healing. The consolidation of the newly formed bone to the graft and to the recipient bed was also higher in all the demineralized groups in relation to the control. The best results, however, were presented by groups AC15 and TCN60.

Keywords: Citric Acid. Demineralization. Immunohistochemistry. Tetracycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Procedimento cirúrgico.....	51
Figura 2 - Representação esquemática do espécime para análise microscópica qualitativa e quantitativa, identificando o objeto de análise: ① Interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor.....	54
Figura 3 - Imagens dos cortes teciduais para união no Software Adobe Photoshop.....	55
Figura 4 - Imagem completa do espécime imunomarcado para OCN após a união dos cortes teciduais parciais no Software Adobe Photoshop.....	55
Figura 5 - Imagens dos cortes teciduais corados com HE para união no Software Adobe Photoshop.....	56
Figura 6 - Imagem completa do espécime corado com HE após a união dos cortes teciduais parciais no Software Adobe Photoshop.....	57
Figura 7 - Avaliação da área na interface enxerto-leito receptor.....	58
Figura 8 - Avaliação da extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface.....	60
Figura 9 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 7 dias.....	67
Figura10 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 7 dias.....	69
Figura11 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 7 dias.....	71
Figura12 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 7 dias.....	73
Figura13 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 7 dias.....	75
Figura14 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 7 dias.....	77
Figura15 - Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo	

TCN60 aos 7 dias dias.....	78
Figura16- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 30 dias.....	80
Figura17- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 30 dias.....	82
Figura18- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 30 dias.....	84
Figura19- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 30 dias.....	86
Figura20- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 30 dias.....	88
Figura21- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 30 dias.....	90
Figura22- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN60 aos 30 dias.....	92
Figura23- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 60 dias.....	94
Figura24- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 60 dias.....	96
Figura25- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 60 dias.....	98
Figura26- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 60 dias.....	100
Figura27- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 60 dias.....	102
Figura28- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 60 dias.....	104
Figura29- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN60 aos 60 dias.....	106
Figura30- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo controle imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	110
Figura31- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC15 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	112

Figura32-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC30 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	114
Figura33-	Fotomicrografia do espécime representativo do grupo AC60 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	115
Figura34-	Fotomicrografia do espécime representativo do grupo TCN15 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	116
Figura35-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN30 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	118
Figura36-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN60 imunomarcado para OCN aos 30 dias.....	119
Figura37-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo controle imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	120
Figura38-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC15 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	121
Figura39-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC30 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	122
Figura40-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC60 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	124
Figura41-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN15 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	125
Figura42-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN30 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	126
Figura43-	Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN60 imunomarcado para TRAP aos 30 dias.....	127
Figura44-	Gráfico da porcentagem média de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.....	130
Figura45-	Gráfico da porcentagem média de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Imunomarcacão para osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) nos espécimes analisados aos 30 dias de p�s-operatório.....	108
Tabela 2 - Porcentagem média de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de p�s-operatório.....	129
Tabela 3 - Porcentagem média de extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de p�s-operatório.....	132

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AC	Ácido cítrico
AC15	Desmineralização com ácido cítrico a 10%, por 15 segundos
AC30	Desmineralização com ácido cítrico a 10%, por 30 segundos
AC60	Desmineralização com ácido cítrico a 10%, por 60 segundos
ANOVA	Teste de análise de variância
Anti-IgG	Anti-immunoglobulin G (anticorpo anti-imunoglobulina G)
Anti-OCN	Anti-osteocalcin (anticorpo anti-osteocalcina)
Anti-TRAP	Anti-tartrate-resistant acid phosphatase (anticorpo anti-fosfatase ácida tartarato-resistente)
BMPs	Bone morphogenetic proteins (proteínas ósseas morfogenéticas)
C	Grupo controle (sem desmineralização)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEPa	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
DAB	Cromógeno diaminobenzidina
Dr(a).	Doutor(a)
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
et al.	E outros; Colaboradores
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru-Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
MMPs	Matrix metalloproteinases (metaloproteinases da matriz)
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2 (metaloproteinase da matriz-2)
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9 (metaloproteinase da matriz-9)
OCN	Osteocalcin (osteocalcina)
PBS	Phosphate buffered saline (solução fosfato tamponada)
PRP	Plasma rico em plaquetas
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kb ligand (receptor ativador do fator nuclear-k ligante)
rhBMP-2	Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (proteína óssea morfogenética humana recombinante-2)

TCN	Tetraciclina hidroclorada
TCN15	Desmineralização com tetraciclina hidroclorada, a 50mg/ml, por 15 segundos
TCN30	Desmineralização com tetraciclina hidroclorada, a 50mg/ml, por 30 segundos
TCN60	Desmineralização com tetraciclina hidroclorada, a 50mg/ml, por 60 segundos
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase (fosfatase ácida tartarato-resistente)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
dp	desvio padrão
$\bar{x}$	média
mg	miligrama
g	grama
kg	kilograma
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
°C	grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 MÉTODOS PARA MELHORAR A CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO	32
2.2 AGENTES DESMINERALIZANTES UTILIZADOS COMO PROMOTORES DO REPARO ÓSSEO	39
3 PROPOSIÇÃO	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	49
4.2 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	49
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	49
4.4 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO.....	52
4.5 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO	52
4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA.....	53
4.6.1 Análise histológica.....	53
4.6.2 Análise imunohistoquímica.....	54
4.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA	56
4.7.1 Análise histomorfométrica	56
4.7.1.1 Avaliação da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório	57
4.7.1.2 Avaliação da porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório ...	59
4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS	61
5 RESULTADOS.....	65

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA	65
5.1.1 Análise histológica	65
5.1.1.1 Análise aos 7 dias	65
5.1.1.2 Análise aos 30 dias	79
5.1.1.3 Análise aos 60 dias	93
5.1.2 Análise imunohistoquímica	107
5.1.2.1 Análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para OCN	109
5.1.2.2 Análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para TRAP	120
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUANTITATIVA	128
5.2.1 Análise histomorfométrica	128
5.2.1.1 Avaliação da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório	128
5.2.1.2 Avaliação da porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório	130
6 DISCUSSÃO	137
7 CONCLUSÕES	151
7.1 CONCLUSÃO GERAL	151
7.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	151
REFERÊNCIAS	155
APÊNDICES	165
ANEXOS	179

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O processo de reparação óssea inicia-se pela produção local de ácidos por células clásticas, expondo o conteúdo ósseo proteico e levando à fase de deposição de novo tecido (POLSON; PROYE, 1983; HEATH et al., 1984; LORENZO et al., 1992; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003). A matriz óssea desmineralizada apresenta proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) responsáveis pela indução da osteogênese (URIST, 1965). A osteogênese e a remodelação óssea também são dependentes da liberação de metaloproteinases da matriz (MMPs) proporcionadas pela desmineralização ácida (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008). Além das MMP-2 e MMP-9 expressas durante a reparação óssea (COOK et al., 1995; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008), são importantes a osteopontina (HU; TANG; HE, 2013), a proteína da anquilose progressiva (KIM et al., 2010), a sialoproteína óssea (BIANCO et al., 1991; GANSS; KIM; SODEK, 1999; OGATA, 2008), a osteocalcina (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; FLORENCIO-SILVA et al., 2015) e a fosfatase ácida tartarato-resistente (TEITELBAUM, 2000; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Com base nesse mecanismo fisiológico da reparação óssea com produção natural de ácidos pelos osteoclastos, pesquisadores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) suscitaram a hipótese de que a desmineralização óssea artificial, com substâncias ácidas em procedimentos cirúrgicos de enxertia óssea, poderia antecipar o fenômeno de reabsorção, que é um dos mecanismos envolvidos na remodelação óssea e, como consequência, acelerar o processo de reparo, propiciando melhora na consolidação de enxertos ósseos ao leito receptor.

Essa hipótese foi confirmada em calvária de cobaias por Rezende et al. (2014) e em tíbia de coelhos por Domingues (2013) em espécimes desmineralizados durante 3 minutos por ácido cítrico a 50%, pH 1. Adicionalmente, um estudo biomecânico demonstrou que o módulo de elasticidade da interface enxerto/leito após desmineralização por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é maior, sugerindo que a inserção de implantes nesta interface pode ocorrer com menor risco de destacamento do enxerto devido à maior deformação da interface (RODRIGUES et al., 2012). Recentemente, dados publicados por essa equipe de pesquisadores

indicaram que quando o ácido cítrico é aplicado sobre superfícies ósseas na concentração de 10% e durante 15 a 30 segundos, pré-osteoblastos cultivados sobre essas superfícies apresentaram maior espalhamento, área de cobertura superficial mais extensa e com morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação em comparação a pré-osteoblastos cultivados sobre superfícies tratadas com ácido cítrico na concentração de 50% (DE REZENDE et al., 2015). Esses resultados levaram à opção pela concentração de 10% do ácido cítrico nesse estudo.

Com a divulgação dos primeiros resultados sobre a desmineralização óssea com ácido cítrico, alguns clínicos começaram a questionar se o emprego de outros agentes desmineralizantes, como a tetraciclina hidrociorada, poderiam suscitar os mesmos efeitos, em especial, as especialidades médicas e odontológicas que realizam cirurgias em ambiente hospitalar onde o emprego do ácido cítrico pode enfrentar imposições protocolares, o que não ocorre com a tetraciclina pelo fato de se apresentar em cápsulas estéreis.

Tendo em conta que a tetraciclina hidrociorada vem sendo amplamente empregada em periodontia como agente biomodificador radicular em procedimentos regenerativos (LABAHN et al., 1992; SCHWARTZ et al., 2000; MITTAL et al., 2014), é provável que, à semelhança do que ocorreu com o ácido cítrico, também a tetraciclina venha a apresentar resultados positivos em osso. Em apenas dois trabalhos realizados por pesquisadores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) foram investigados os efeitos da tetraciclina sobre a superfície óssea (ROJAS-PAULUS, 2016; MANFREDI, 2016).

A avaliação por microscopia óptica convencional é o método mais amplamente empregado para o estudo da consolidação de enxertos ósseos. Entretanto, o estudo de alguns marcadores da remodelação óssea é um importante meio para complementar e aumentar a credibilidade da avaliação.

A fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) é uma enzima encontrada em células osteoclásticas e eritrócitos liberada durante a reabsorção, sendo considerada importante marcador da atividade osteoclástica (TEITELBAUM, 2000; FLORENCIO-SILVA et al., 2015). A osteocalcina (OCN) é uma proteína não colágena, sintetizada predominantemente por osteoblastos e também está presente na matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteoide, melhor representando

o processo de formação óssea (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Assim, a avaliação da expressão desses marcadores em áreas de reparo ósseo pode ser importante para a compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre a consolidação dos enxertos ósseos.

A fim de contribuir para solucionar esses questionamentos, este estudo se propôs a comparar histomorfometricamente e por análise imunohistoquímica, o efeito da desmineralização óssea da calvária de ratos e da superfície de contato do enxerto ósseo em bloco ao leito receptor com tetraciclina hidrocloreata e ácido cítrico em diferentes tempos de aplicação (15, 30 ou 60 segundos) na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco, buscando contribuir para a melhora do protocolo atualmente vigente para a realização de enxertos ósseos autógenos, introduzindo na técnica, um procedimento simples, rápido e não oneroso que é a desmineralização, o qual poderá, inclusive, substituir com vantagens outros procedimentos empregados para melhorar o reparo ósseo como perfurações e desgaste do leito receptor e de enxertos e adição de fatores de crescimento na interface enxerto-leito.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A desmineralização óssea artificial, com substâncias ácidas, baseia-se no estudo do processo de remodelação óssea fisiológica cujo estágio inicial, de acordo com o estudo de Melcher (1976), é a mobilização e dissolução dos cristais minerais através da produção de ácidos, provavelmente ácido cítrico e láctico, pelos osteoclastos, seguida pela destruição da matriz orgânica por enzimas produzidas por essas células. Conforme os osteoclastos reabsorvem a matriz óssea, vão sendo formadas cavidades que rapidamente serão preenchidas com osteopontina (DODDS et al., 1995) e outras proteínas (EKRYLANDER et al., 1994) produzidas pelos próprios osteoclastos e que atuam como substrato para a migração, adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos que realizarão a deposição de novo osso no local (POLSON; PROYE, 1983; HEATH et al., 1984; LORENZO et al., 1992; DODDS et al., 1995; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003).

A osteogênese e a remodelação óssea fisiológicas também são dependentes da liberação de metaloproteinases da matriz (MMPs) como as MMP-2 e MMP-9 (COOK et al., 1995; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008). Além das MMPs, também são importantes a osteocalcina (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; FLORENCIO-SILVA et al., 2015) e a fosfatase ácida tartarato-resistente (TEITELBAUM, 2000; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Segundo o estudo de Urist (1965), a matriz óssea desmineralizada com ácido clorídrico 0,6N possui a capacidade de induzir a formação de osso em defeitos ósseos e em áreas ectópicas, como o tecido muscular de ratos e camundongos. Além disso, em outro estudo de Urist et al. (1970), foi sugerido que a desmineralização ácida promove a liberação de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) da matriz óssea que são responsáveis pela diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos.

A partir do conhecimento do mecanismo fisiológico da remodelação óssea descrito inicialmente, com produção natural de ácidos pelos osteoclastos, pesquisadores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) suscitaram a hipótese de que a desmineralização óssea artificial, com substâncias ácidas em procedimentos cirúrgicos de enxertia óssea, poderia

antecipar o fenômeno de reabsorção, que é um dos mecanismos envolvidos na remodelação.

Koerdt et al. (2014) relataram que os enxertos ósseos autógenos utilizados na forma de blocos podem apresentar consolidação insuficiente e/ou reabsorção excessiva, inviabilizando a reabilitação da área enxertada. Dessa maneira, com o objetivo de favorecer a consolidação desses enxertos ao leito receptor e reduzir a reabsorção do enxerto, tratamentos de superfície estão sendo empregados (DE CARVALHO; VASCONCELLOS, PI, 2000; PEDROSA et al., 2009) e serão descritos a seguir.

2.1 MÉTODOS PARA MELHORAR A CONSOLIDAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS EM BLOCO

Para que haja consolidação do enxerto ósseo em bloco ao leito receptor é necessário íntimo contato entre enxerto e leito e imobilização do enxerto, a fim de que possa haver nutrição e revascularização do tecido enxertado para sua remodelação (TRIPLETT; SCHOW, 1996). Contudo, além da imobilização, outros tratamentos de superfície estão sendo empregados com a finalidade de promover a revascularização do enxerto e melhora do processo de incorporação, como a realização de perfurações e desgastes na cortical óssea do leito receptor (BUSER et al., 1993; MAZZONETTO, 2008; GORDH et al., 1997; ALBERIUS; GORDH, 1998; CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000; FARIA et al., 2008), aplicação de plasma rico em plaquetas (PRP) entre o enxerto e o leito (MIRANDA et al., 2006), aplicação de BMPs (GORDH et al., 1999; KRISHNAN et al., 2015), laser de baixa potência (O'DONNELL et al., 1996; OBRADOVIC; KESIC; PESEVSKA, 2009; VALIATI et al., 2012) e desmineralização óssea artificial das superfícies de contato do enxerto e do leito receptor (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012).

O método de perfuração da cortical do leito tornou-se o mais aceito e utilizado por clínicos para expor os espaços medulares do leito, por onde migrariam vasos sanguíneos e células em direção ao enxerto, permitindo sua revascularização. Um dos primeiros trabalhos que relatou a perfuração do leito como variável metodológica foi o de Gordh et al. (1997) que observaram, em ratos Lewis, os efeitos da exposição do conteúdo medular na incorporação e preservação do volume inicial do enxerto,

além de avaliar as consequências da orientação do enxerto (porção medular ou cortical voltada para o leito perfurado ou não) no processo de incorporação, através de análises histológicas e imunohistoquímicas. Os animais receberam dois enxertos na porção anterior das tíbias direita e esquerda, sendo que no grupo experimental (lado direito) a cortical externa do leito foi perfurada, obtendo-se de 7 a 10 perfurações de 0,25mm de diâmetro, enquanto que no grupo controle (lado esquerdo), o leito foi mantido intacto. Em relação à orientação, metade dos enxertos foram posicionados com a superfície cortical voltada para o leito e a outra metade, com a superfície medular voltada para o leito. Os espécimes foram avaliados após 4 e 20 semanas. Foi observado na 4^a semana que nos espécimes com a superfície medular do enxerto voltada para o leito houve incorporação parcial do enxerto, com resultados mais relevantes no grupo onde o leito foi perfurado. Nos espécimes com a superfície cortical do enxerto voltada para o leito foi verificada atividade mais avançada de incorporação e osteogênese no grupo tratado com perfurações. Ainda na 4^a semana, foi verificado que no leito receptor perfurado houve reabsorção, ao passo que no lado não tratado, o leito permaneceu inalterado. Na 20^a semana foi verificada maior atividade de remodelação no leito perfurado. Concluiu-se que nos enxertos posicionados sobre o leito perfurado houve maior incorporação e osteogênese e que as perfurações induziram a migração da medula óssea do leito em direção ao enxerto.

Entretanto, em um estudo recente com enxertos em bloco fixados com parafusos em mandíbula de porcos, Dayangac et al. (2016) observaram que maior espessura dos enxertos resultou quando não foram feitas perfurações no leito em comparação a enxertos onde o leito receptor recebeu perfurações. Os autores atribuíram a redução na espessura do enxerto quando o leito foi perfurado ao aumento da tendência de reabsorção precoce da área perfurada, além da perfuração também poder atuar como um trauma cirúrgico adicional ao osso cortical. A análise radiográfica da densidade óssea não evidenciou diferença entre perfuração e não perfuração. Os autores concluíram que o método de perfuração da cortical do leito não contribui de maneira significativa para a cicatrização óssea dentro de 12 semanas.

O mesmo tipo de estudo já havia sido realizado em calvária de coelhos por Barbosa et al. (2009) que encontraram resultados semelhantes. Após 28 dias da realização de enxertos em bloco com e sem perfuração do leito, foi realizada a

análise histomorfométrica de área total ocupada pelo enxerto e porcentagem de tecido duro encontrado no enxerto, na interface enxerto-leito e no leito receptor. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo perfurado e sem perfuração em relação a todos os parâmetros analisados, sem correlação entre os valores médios da área total ocupada pelo enxerto em comparação com os valores médios das mensurações das demais variáveis (enxerto, interface e leito). Os autores também concluíram que as perfurações na cortical do osso receptor não melhoraram a reparação dos enxertos ósseos e não aumentaram a quantidade de matriz óssea na área enxertada final e atribuíram seus achados à presença de forames naturais no leito receptor que podem ter influenciado a nutrição do enxerto. Como os enxertos em bloco eram bicorticais, a interface enxerto-leito foi formada por duas corticais, o que pode ter diminuído qualquer possível influência das perfurações, dificultando a passagem de células e nutrientes pela cortical do enxerto.

Faria et al. (2008) também sugeriram que a presença de uma camada bicortical na interface enxerto-leito poderia retardar a revascularização precoce do enxerto. Os autores analisaram em coelhos os efeitos da perfuração do leito (mandíbula) na manutenção do volume e densidade dos enxertos de crista ilíaca através da avaliação quantitativa de imagens tomográficas, no tempo para a revascularização do enxerto e na presença de proteínas de remodelação óssea (osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I e fator de crescimento endotelial vascular) liberadas no enxerto por meio de análise imunohistoquímica. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo perfurado e não perfurado em relação ao volume ósseo medido nas tomografias. A análise imunohistoquímica revelou uma tendência para a revascularização precoce dos enxertos que foram posicionados sobre o leito perfurado, através dos valores obtidos para o VEGF e essa revascularização acelerou a remodelação óssea, comprovada pela expressão de osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I, resultando em maior deposição óssea no décimo dia de avaliação. Contudo, a remodelação óssea acelerada não impediu a perda de volume ósseo no grupo perfurado nos estágios posteriores. A marcação para osteocalcina foi identificada em cada tempo experimental em ambos os grupos, mas predominantemente aos 60 dias de pós-operatório no grupo não perfurado. Os autores concluíram que a perfuração do leito promove exposição de fatores de crescimento que aceleram a revascularização do

enxerto e propiciam a formação de osso mais denso, entretanto não impediram a perda de volume do enxerto que ocorreu em ambos os grupos.

Outro tratamento de superfície empregado com a mesma finalidade das perfurações é a descorticalização do leito receptor por desgaste. Alberius e Gordh em 1998 realizaram enxertos ósseos bicorticais posicionados abaixo do músculo temporal e sobre o osso parietal, em ratos Lewis, com o leito receptor mantido intacto ou descorticalizado. Após 4 ou 20 semanas os animais foram eutanasiados e os resultados foram avaliados por análise histológica e imunohistoquímica para 2 proteínas da matriz óssea: osteopontina e sialoproteína óssea, que estão envolvidas na reabsorção e formação ósseas, respectivamente. Os autores observaram aumento da reabsorção do leito receptor com imunomarcagem concentrada abaixo da superfície do leito, no grupo descorticalizado após 4 semanas. Não foi verificada imunomarcagem na superfície do enxerto. Concluíram que a perda sucessiva do contorno esquelético após o enxerto ósseo, em muitos casos, pode largamente resultar de falhas no leito receptor ao invés da redução do tamanho do enxerto.

Bem mais tarde, a descorticalização do leito foi comparada às perfurações por Carvalho, Vasconcelos, Pi (2000). Os autores avaliaram em mandíbula de cães, o comportamento de enxertos ósseos autógenos em bloco obtidos da região posterior da mandíbula e fixados com parafuso de titânio em uma região mais anterior da mandíbula sobre o leito preparado de 3 maneiras distintas: cortical intacta, perfuração com broca ou desgaste da cortical. Após 45 e 90 dias os animais foram eutanasiados e observou-se que os enxertos ósseos apresentavam melhor integração ao leito nos grupos perfurado e descorticalizado, com resultados mais pobres no grupo onde a cortical foi mantida intacta. Aos 45 dias, no grupo sem tratamento da cortical do leito foram verificadas áreas de integração do enxerto ao leito, entretanto em algumas áreas havia tecido conjuntivo interposto na interface. Clinicamente foi observada reabsorção do enxerto. No grupo perfurado, foram verificadas áreas de integração com o enxerto e o leito, presença de tecido ósseo imaturo com amplos espaços trabeculares e áreas de tecido conjuntivo interposto entre o enxerto e o tecido ósseo neoformado. No grupo descorticalizado, foi vista total integração do enxerto ao leito. Aos 90 dias, o grupo com a cortical intacta e o grupo perfurado apresentaram o mesmo padrão observado aos 45 dias. No grupo descorticalizado, foi verificada integração e vitalidade do enxerto ósseo. Os autores concluíram que nos espécimes com a cortical do leito intacta, a interposição do

tecido conjuntivo e a reabsorção parcial dos enxertos ocorreram mais frequentemente e que quando o leito receptor foi preparado com perfuração ou descorticalização, houve integração do enxerto ósseo e manutenção do volume do enxerto.

Pedrosa et al. (2009) realizaram um estudo imunohistoquímico, tomográfico e histológico em enxertos ósseos removidos da calvária e transplantados para a mandíbula de coelhos com o leito mantido intacto ou perfurado. O objetivo do estudo foi analisar o padrão morfológico dos enxertos ósseos em bloco obtidos da calvária e compará-los com os eventos biológicos através de análise imunohistoquímica, além de estabelecer os efeitos das perfurações sobre a manutenção do volume e densidade óssea do leito receptor, por meio de tomografia computadorizada. Após 5, 7, 10, 20 e 60 dias os animais foram eutanasiados e preparados para análise histológica e imunohistoquímica das proteínas osteoprotegerina, do receptor ativador do fator nuclear- κ ligante (RANKL), fosfatase alcalina, osteopontina, fator de crescimento endotelial vascular, TRAP, colágeno tipo I e OCN. A determinação dos níveis de marcação para cada anticorpo foi realizada semi-quantitativamente, usando escores de 1 a 4 (1= ausente e 4= intenso). Os achados histológicos revelaram que as perfurações contribuíram para uma maior deposição óssea na interface enxerto-leito durante os estágios iniciais, acelerando o processo de incorporação do enxerto. Os resultados da tomografia computadorizada apresentaram menor reabsorção para o grupo perfurado, e ambos os grupos apresentaram altas taxas de densidade óssea aos 60 dias. Estes achados estavam de acordo com os resultados imunohistoquímicos, que demonstraram que as proteínas associadas à revascularização e osteogênese (fator de crescimento endotelial vascular, osteopontina, TRAP e fosfatase alcalina) foram encontradas em níveis mais altos no grupo perfurado. Os autores concluíram que o volume ósseo dos enxertos removidos da calvária de coelhos é melhor mantido quando o leito é perfurado, provavelmente resultante de uma revascularização do enxerto mais efetiva e maior deposição óssea. O processo de reabsorção óssea atingiu o pico entre 20 e 60 dias pós-operatórios em ambos os grupos, embora significativamente menor no grupo perfurado.

Hawthorne et al. (2013), pertencentes ao mesmo grupo de pesquisa do trabalho anteriormente descrito, realizaram enxertos ósseos em bloco autógenos e alógenos removidos da calvária e transplantados para a mandíbula de coelhos

bilateralmente, com o objetivo de comparar o enxerto alógeno (grupo experimental) com o autógeno (grupo controle) utilizando análise histológica, imunohistoquímica e tomográfica. Os animais foram eutanasiados após 3, 5, 7, 10, 20 e 60 dias e preparados para análise histológica e imunohistoquímica das proteínas osteoprotegerina, do receptor ativador do fator nuclear-k ligante (RANKL), fosfatase alcalina, osteopontina, fator de crescimento endotelial vascular, TRAP, colágeno tipo I e OCN. A densidade e o volume dos enxertos foram avaliados em tomografias obtidas no momento da cirurgia e no sacrifício. Ambos os grupos apresentaram padrões de densidade e volume ósseos semelhantes. Foi verificada incorporação mais eficiente do enxerto autógeno ao leito receptor quando comparado ao enxerto alógeno. A proteína osteoprotegerina, envolvida na regulação da indução de osteoclastogênese, mostrou aumento significativo no grupo controle quando comparado com o grupo experimental nos dias 10 e 20. A TRAP, que é uma enzima específica presente em grandes quantidades em osteoclastos e que expressa reabsorção óssea, mostrou diferença estatisticamente significativa no dia 7 em ambos os grupos, mais intensamente para o grupo experimental. Os autores concluíram que os padrões de volume e densidade ósseas não diferiram entre os grupos. Pela análise histológica, houve melhor incorporação enxerto-leito no grupo controle e os resultados da imunohistoquímica demonstraram padrão semelhante para ambos os grupos, exceto para uma atividade de reabsorção aumentada no grupo experimental mediada pela TRAP e no grupo controle pela maior marcação para osteoprotegerina. No entanto, esta última observação não pareceu influenciar os resultados clínicos.

A aplicação de plasma rico em plaquetas (PRP) para preencher o espaço da interface enxerto-leito também foi relatada na literatura como outro método para melhorar a incorporação do enxerto ao leito receptor. Miranda et al. (2006) avaliaram, por meio de análise histológica e morfométrica, enxertos ósseos autógenos em bloco removidos da calvária de coelhos e transplantados para áreas adjacentes sem qualquer tratamento dado ao leito receptor (grupo controle), enxerto interposto por osso autógeno particulado e enxerto interposto por PRP. Após 7, 15, 30 e 60 dias os animais foram eutanasiados. Foi observada incorporação do enxerto em todos os grupos após 30 dias e formação óssea mais perceptível no grupo com o enxerto interposto por PRP aos 7 dias. Houve precoce maturação óssea aos 60 dias, porém sem diferença estatisticamente significativa. Concluiu-se que o uso de

material adicional entre o enxerto ósseo em bloco e o leito receptor deve ser considerado com cautela, levando em consideração o tamanho da reconstrução e da relação custo-benefício. Concluiu-se também que a adição de PRP na interface não favoreceu, de maneira significativa, em calvária de coelhos, a neoformação e reparação ósseas.

A aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) para preenchimento do espaço da interface também foi relatada na literatura como outro método para melhorar a incorporação enxerto-leito. No estudo de Gordh et al. (1999), enxertos unicorticais removidos da tíbia e fêmur de ratos Lewis foram posicionados em bolsas criadas abaixo do músculo temporal e tratados de diversas maneiras com rhBMP-2 (proteína óssea morfogenética humana recombinante-2) em baixa ou alta dosagem em um carreador de colágeno, combinada ou não a uma membrana de politetrafluoretileno expandido para avaliação da incorporação enxerto-leito e manutenção do volume do enxerto. Como controles, membrana e carreador, sozinhos ou em combinação, e enxertos ósseos em bloco foram utilizados. Após 4 e 20 semanas os resultados foram avaliados por análise histológica e imunohistoquímica. Os enxertos tratados com rhBMP-2 após 4 semanas mostraram incorporação completa enquanto para os controles, apenas o grupo com a membrana sozinha apresentou incorporação após 20 semanas. O grupo tratado com alta dosagem de rhBMP-2 associada a membrana demonstrou maior formação óssea e menor reabsorção do enxerto, resultando em manutenção ou aumento do tamanho do enxerto, quando comparado com os demais grupos de rhBMP-2. Esse resultado foi observado após 4 semanas e se manteve na 20ª semana. O grupo tratado com alta dosagem de rhBMP-2 sem a membrana, em contrapartida, apresentou extensa reabsorção e redução do tamanho do enxerto após 20 semanas. A análise imunohistoquímica para sialoproteína óssea e osteopontina mostraram marcação no tecido ósseo em geral, com marcação mais intensa nos grupos tratados com rhBMP-2 após 4 semanas. Os autores concluíram que a associação de alta dose de rhBMP-2 e membrana resulta em uma incorporação completa e rápida do enxerto com manutenção do seu tamanho e que na ausência de uma membrana de politetrafluoretileno expandido, a rhBMP-2 parece acelerar a remodelação do enxerto.

Outro método descrito na literatura com o objetivo de melhorar a consolidação de enxertos ósseos em bloco é a aplicação de laser de baixa potência

na interface enxerto-leito. Valiati et al. (2012) avaliaram o efeito da terapia com laser de baixa potência na incorporação de enxertos alógenos em bloco em coelhos através de análise histológica e microscopia eletrônica de varredura. O tecido ósseo foi removido de 2 coelhos (6 enxertos em bloco removidos da calvária de cada animal) e enxertado na calvária de 12 animais, distribuídos aleatoriamente nos grupos experimental e controle. Os animais do grupo experimental foram irradiados com laser de diodo de arsênio, gálio e alumínio (AlGaAs, comprimento de onda de 830nm, 4 J/cm²), aplicado em 4 locais da calvária com uma dose de 16 J/cm² por sessão e uma dose total de tratamento de 128 J/cm² após 8 sessões e os do grupo controle não receberam irradiação. Um enxerto ósseo autógeno foi posicionado no lado oposto ao experimental na calvária de cada animal, servindo como um controle positivo para a incorporação óssea. Os animais foram eutanasiados após 35 e 70 dias. Foi observado que nos espécimes do grupo experimental irradiado houve incorporação na interface enxerto-leito, remodelação óssea moderada, menor infiltrado inflamatório no pós-operatório precoce e maior deposição de colágeno do que no grupo controle aos 35 dias. Os autores concluíram que o enxerto alógeno associado à terapia com laser de baixa potência é uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos devido ao laser estimular a proliferação osteoblástica, a deposição de colágeno e a nova formação óssea.

Já o estudo de agentes desmineralizantes, como o ácido cítrico, a tetraciclina hidrocloreata e o EDTA, com o propósito de melhorar a neoformação óssea e a consolidação óssea na interface enxerto-leito é recente. Poucos trabalhos na literatura se preocuparam com o estudo desse aspecto e serão descritos a seguir.

2.2 AGENTES DESMINERALIZANTES UTILIZADOS COMO PROMOTORES DO REPARO ÓSSEO

A desmineralização óssea artificial com a capacidade de induzir a formação de osso em áreas ectópicas, como o tecido muscular de ratos e camundongos, foi primeiramente descrita por Urist em 1965, utilizando para isso, ácido clorídrico. Além desse estudo, outros trabalhos desenvolvidos por esse mesmo autor (URIST, 1965; URIST; DOWELL, 1968; URIST et al., 1968; URIST et al., 1970) demonstraram em animais, a capacidade de indução óssea intramuscular de diferentes substratos após serem desmineralizados *in vitro*, através da diferenciação de células

osteoprogenitoras promovida pela desmineralização. Contudo, o trabalho de Rezende et al. (2014) foi o primeiro a relatar o efeito da desmineralização óssea *in situ* no reparo ósseo com a hipótese de que a desmineralização da interface entre o enxerto ósseo em bloco e o leito receptor beneficiaria a incorporação enxerto-leito. Os autores se basearam nos inúmeros estudos com resultados favoráveis sobre desmineralização em dentina utilizando agentes químicos desmineralizantes, como ácido cítrico, tetraciclina e EDTA (BLOMLOF, BLOMLOF, LINDSKOG, 1996; SCHWARTZ et al., 2000; KASSAB et al., 2006; SANT'ANA et al., 2007; ABED et al., 2013; CABA-PAULINO, 2014) e aplicaram seus conhecimentos na desmineralização de superfícies ósseas.

Assim, Rezende et al. (2014) realizaram enxertos ósseos autógenos em bloco removidos da calvária de cobaias e transplantados para uma área adjacente com ou sem desmineralização das superfícies de contato com gel de ácido cítrico e tetraciclina a 50% (pH 1,0) durante 3 minutos. A análise histomorfométrica evidenciou que não houve atividade de osteogênese na interface aos 7 dias. Após 30 e 90 dias, os espécimes que sofreram desmineralização apresentaram maior área da interface preenchida com tecido mineralizado quando comparado aos que não sofreram desmineralização nos 2 tempos de avaliação, especialmente aos 30 dias, quando a neoformação óssea e consolidação dos enxertos desmineralizados equipararam-se à dos enxertos não desmineralizados aos 90 dias, evidenciando uma antecipação dos eventos de reparo ósseo. Além disso, houve maior consolidação e densidade do osso neoformado quando a interface enxerto-leito foi desmineralizada. Os autores concluíram que a desmineralização das superfícies de contato entre enxerto ósseo autógeno e leito receptor favoreceu a neoformação e consolidação ósseas e que seria uma alternativa à perfuração ou desgaste da cortical do leito como método para favorecer a consolidação dos enxertos, por minimizar o risco de reabsorção e preservar a estrutura óssea já fragilizada pela reabsorção natural.

No estudo de Domingues (2013) também foram observados resultados similares com a desmineralização da interface enxerto-leito por gel de ácido cítrico a 50% (pH 1,0) durante 3 minutos em tibia de coelhos. Foi verificado, através de análise histomorfométrica, que após 30 e 45 dias os espécimes desmineralizados apresentaram maior área de neoformação óssea e maior extensão das superfícies ósseas do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface,

principalmente aos 30 dias. Foi concluído que a desmineralização da interface enxerto-leito promoveu a osteogênese e acelerou a consolidação dos enxertos.

Rodrigues et al. (2012) também verificaram que a desmineralização melhorou o comportamento elástico de enxertos ósseos autógenos em bloco em tibia de coelhos. Os autores removeram enxertos ósseos em bloco da tibia de coelhos e os transplantaram em uma área adjacente após a realização de um dos seguintes tratamentos: desmineralização da interface enxerto-leito com gel de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 24%, pH neutro, durante 3 minutos; desmineralização com EDTA associada a perfuração do leito receptor; somente perfuração do leito; e o grupo controle, onde não houve tratamento da interface. Após 90 dias os animais foram eutanasiados e observou-se, através de ensaio mecânico que o módulo de elasticidade da interface enxerto-leito desmineralizada foi maior do que nos espécimes não desmineralizados, sugerindo que a inserção de implantes nesta interface pode ocorrer com menor risco de destacamento do enxerto.

3 Proposição

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação foi comparar histomorfometricamente e por análise imunohistoquímica em enxertos em bloco realizados em calvária de ratos, o efeito da desmineralização da interface enxerto-leito receptor com tetraciclina hidrociorada (50 mg/ml) e ácido cítrico (10%, pH=1) em diferentes tempos de aplicação (15, 30 ou 60 segundos) sobre a área de neoformação óssea na interface, bem como sobre a extensão de superfícies consolidadas desses enxertos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Comparar qualitativamente os eventos histológicos envolvidos no processo de reparo ósseo na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor, nos grupos desmineralizados com ácido cítrico e tetraciclina durante 15, 30 ou 60 segundos e o grupo controle (sem desmineralização), aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório;
- b) Comparar quantitativamente, por meio de análise histomorfométrica, a porcentagem de área de osso neoformado na interface enxerto-leito e a extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao novo osso, nos grupos descritos conforme o item “a”;
- c) Avaliar, por meio de análise imunohistoquímica, a expressão dos marcadores de formação e reabsorção óssea (osteocalcina e fosfatase ácida tartarato-resistente, respectivamente) na interface enxerto-leito, nos grupos descritos conforme o item “a”.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP) com protocolo nº015/2015 (ANEXO A).

4.2 Seleção e obtenção da amostra

Foram utilizados 126 ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* – Var. *albinus rodentia mammalia*), sendo 54 machos e 72 fêmeas, pesando cerca de 400 gramas, com aproximadamente 4 meses de vida, criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Os animais receberam dieta constituída de ração e água fornecidos à vontade e foram distribuídos nos grupos de estudo de forma aleatória.

4.3 Procedimento cirúrgico

Após anestesia intramuscular na porção interna da coxa direita traseira dos animais com seringa de insulina com cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí/SP, Brasil) à dose de 10mg/kg de peso corporal na concentração de 0,23g/10ml (relaxante muscular) e cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí/SP, Brasil) à dose de 80mg/Kg de peso na concentração de 1,16g/10ml administradas juntas na mesma seringa, foi feita a tricotomia na região frontoparietal dos animais com lâmina de barbear (Gillete – P&G do Brasil, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 1A) e antissepsia com digluconato de clorexidina a 2% (Riohex - Rioquímica Indústria Farmacêutica, São Paulo/SP, Brasil). Os animais foram cobertos com campos cirúrgicos estéreis descartáveis para manutenção da cadeia asséptica (Figura 1B). Após exposição da cortical óssea da calvária com a realização de uma incisão no formato da letra “U” com lâmina de bisturi nº15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda, Barueri/SP, Brasil) (Figura 1C) até atingir o perióstio e levantamento do retalho total (Figura 1D e E), foram obtidos blocos ósseos bicorticais com o uso de uma broca trefina (Neodent, Curitiba/PR, Brasil) de 5,0 mm de diâmetro interno

em baixa rotação sob irrigação profusa com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (um bloco por animal). Em 18 animais, o bloco foi transplantado para uma área adjacente sem nenhum tratamento das superfícies de contato enxerto-leito receptor (grupo controle-C). Em 54 animais, as superfícies de contato entre o leito receptor (Figura 1F) e o enxerto ósseo (Figura 1G) foram desmineralizados com tetraciclina hidroclorete (Teuto/Pfizer, Anápolis/GO, Brasil) em solução, obtida pela diluição de uma cápsula de 500mg de tetraciclina hidroclorete (TCN) em 10 ml de soro fisiológico, em uma cuba de aço, utilizando-se o sobrenadante, na concentração de 50mg/ml, de forma a constituírem três grupos experimentais (n=18):

- TCN15: desmineralização por TCN durante 15 segundos;
- TCN30: desmineralização por TCN durante 30 segundos;
- TCN60: desmineralização por TCN durante 60 segundos.

Nos 54 animais restantes, a desmineralização das superfícies de contato entre o leito receptor (Figura 1H) e o enxerto ósseo (Figura 1I) foi realizada com ácido cítrico (Bauru Fórmulas – Farmácia de Manipulação, Bauru/SP, Brasil), a 10% (pH=1), em gel, nos mesmos tempos de duração que a TCN, de forma a se constituírem os seguintes grupos de estudo (n=18):

- AC15: desmineralização por ácido cítrico durante 15 segundos;
- AC30: desmineralização por ácido cítrico durante 30 segundos;
- AC60: desmineralização por ácido cítrico durante 60 segundos.

Após o tempo de desmineralização, o agente desmineralizante foi removido por lavagem profusa com soro fisiológico. O bloco ósseo foi mantido em posição pela aplicação de uma membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (Gen Derm – Baumer, São Paulo/SP, Brasil) recortada de forma a ultrapassar os limites do enxerto (Figura 1J) e colada pelas extremidades com gel de etil-cianoacrilato (Loctite – Super Bonder Flex Gel, Henkel Ltda, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 1K). Após esse procedimento, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda 4-0 (Shalon, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 1L).

Figura 1- Procedimento cirúrgico. **A:** animal após anestesia e tricotomia da região frontoparietal. **B:** após antisepsia, a região da calvária foi coberta por um campo cirúrgico estéril descartável fenestrado. **C:** incisão no formato da letra “U” com lâmina de bisturi nº15. **D:** descolamento do retalho total. **E:** exposição da calvária após remoção do periósteo. **F:** leito receptor sendo desmineralizado com tetraciclina hidrocloreada em solução, na concentração de 50mg/ml. **G:** superfície interna do enxerto ósseo sendo desmineralizado com tetraciclina hidrocloreada em solução, na concentração de 50mg/ml. **H:** leito receptor sendo desmineralizado com ácido cítrico a 10% (pH=1), em gel. **I:** superfície interna do enxerto ósseo sendo desmineralizado com ácido cítrico a 10% (pH=1), em gel. **J:** membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (Gen Derm) utilizada para fixação do enxerto ao leito. **K:** membrana posicionada sobre o enxerto ósseo e colada pelas extremidades com gel de etil-cianoacrilato. **L:** retalho reposicionado e suturado com fio de seda 4-0.

Os animais receberam uma dose única de penicilina benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Lab. Zoetis Brasil Ltda., Campinas/SP, Brasil) na proporção de 16.000 UI (0,024 ml) por via intramuscular profunda logo após a cirurgia. O controle de dor pós-operatória foi realizado pela administração do analgésico Profenid (cetoprofeno – gotas, intramuscular, na dose de 5 mg/kg de peso logo após a cirurgia e durante 2 dias).

Nos primeiros 4 dias os animais foram mantidos isolados em gaiolas e depois, permaneceram 4 animais por gaiola, seguindo as condições padrão de alimentação e hidratação realizadas pelos funcionários do Biotério da FOB-USP.

Após 7, 30 e 60 dias de pós-operatório, seis animais de cada grupo tiveram morte induzida pela dose de 150mg/Kg do barbitúrico tiopental sódico 2,5% associado com anestésico local cloridrato de lidocaína na dose de 10mg/Kg via intraperitoneal. Blocos de tecido ósseo contendo o enxerto e o leito receptor foram removidos com o auxílio de uma broca trefina de 10mm de diâmetro, em baixa rotação, sob irrigação profusa com soro fisiológico e imediatamente imersos em solução de formalina tamponada a 10%, onde foram mantidos até o término das eutanásias de todos os animais.

4.4 Processamento histotécnico

Os espécimes de tecido ósseo contendo os blocos enxertados foram descalcificados empregando a solução de Morse (ácido fórmico e citrato de sódio) trocada duas vezes por semana durante aproximadamente 40 dias. Após a descalcificação, os espécimes foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, na seguinte sequência: álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto I, II, III e IV, xilol I, II, III e IV. Em seguida, os espécimes foram incluídos em parafina com a face lateral voltada para baixo, permitindo a realização de cortes transversais de 5µm de espessura com o Micrótomo Leica RM2045, pertencente ao Laboratório de Patologia da FOB-USP, no centro de cada espécime, abrangendo leito receptor, enxerto ósseo e membrana e foram processados histoteticamente para coloração por Hematoxilina e Eosina - HE (APÊNDICE A).

4.5 Processamento imunohistoquímico

A marcação imunohistoquímica dos cortes histológicos de 4µm de espessura colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) (Dakocytomation Carpinteria, CA, EUA) referentes aos 7 grupos experimentais (AC15, AC30, AC60, TCN15, TCN30, TCN60 e C) no período de 30 dias de pós-operatório foi realizada utilizando-se o método de detecção por imunoperoxidase com os seguintes anticorpos primários: anti-OCN (sc 30044, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA) e anti-TRAP (ab 185716, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como polímero foi utilizado o N-Histofine (H1602, Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão) e o cromógeno foi o diaminobenzidina – DAB (EP-12-20541, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) que confere uma coloração acastanhada nas células-alvo estudadas.

Foram obtidos dois cortes de animais diferentes do mesmo grupo experimental em cada lâmina de vidro silanizada, totalizando 42 amostras para imunomarcação com anti-OCN e anti-TRAP. A análise imunohistoquímica dos cortes histológicos foi feita de forma qualitativa, identificando-se a presença ou ausência de marcação no tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito para ambos os anticorpos primários. A técnica de imunohistoquímica foi descrita no Apêndice B.

4.6 Análise microscópica qualitativa

4.6.1 Análise histológica

Os cortes teciduais foram analisados por um patologista experiente e cego ao experimento utilizando um microscópio óptico (Leica DMLS, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) com objetivas de 2,5, 5, 10, 40 e 100x quanto aos eventos envolvidos no processo de reparo ósseo dos enxertos. O objeto de análise foi a interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor (Figura 2).

Na interface enxerto-leito foram avaliados a presença ou ausência de remanescentes do periósteo, a presença ou ausência de tecido de granulação, a preservação dos limites inferiores do enxerto, a preservação dos limites do leito receptor, a osteogênese a partir do leito, a osteogênese a partir do enxerto, a incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor e o tipo de infiltrado inflamatório predominante, quando presente.

Figura 2- Representação esquemática do espécime para análise microscópica qualitativa e quantitativa, identificando o objeto de análise: ①Interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor. M: membrana; E: enxerto; L: leito receptor; I: interface enxerto-leito receptor; on: osso neoformado. (Ilustração adaptada de Rezende, 2008, p.125)

4.6.2 Análise imunohistoquímica

Para avaliar a expressão dos marcadores de neoformação óssea e reabsorção óssea (OCN e TRAP, respectivamente) na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor dos 7 grupos experimentais (AC15, AC30, AC60, TCN15, TCN30, TCN60 e C) no período de 30 dias de pós-operatório, as imagens digitais parciais dos cortes teciduais imunomarcados capturadas em microscópio óptico (Olympus BX50F4, Olympus Optical Co., Ltd., Japão) com objetiva de 10x e captura de imagens por Câmera Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e software DP Controller (2002-2006 Olympus Corporation) foram transferidas para um microcomputador e empregando-se o software Adobe Photoshop CS5, versão 12.0 (1990-2010 Adobe Systems Incorporated, EUA), foram feitas as uniões das imagens parciais conforme Figura 3.

Figura 3- Imagens dos cortes teciduais para união no Software Adobe Photoshop.

Após a união das imagens parciais, foram obtidas as imagens completas dos cortes teciduais imunomarcados (Figura 4).

Figura 4- Imagem completa do espécime imunomarcado para OCN após a união dos cortes teciduais parciais no Software Adobe Photoshop.

As imagens completas dos espécimes imunomarcados para OCN e TRAP foram analisadas por um patologista experiente e cego ao experimento identificando-se a presença (sinal +) ou ausência (sinal –) de marcação e a localização predominante desses marcadores na interface enxerto-leito receptor.

4.7 Análise microscópica quantitativa

4.7.1 Análise histomorfométrica

Para realizar as medições de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito e de extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo neoformado de todos os espécimes aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório, da mesma forma que para a análise imunohistoquímica, as imagens digitais parciais dos cortes teciduais corados com HE capturadas em microscópio óptico (Olympus BX50F4, Olympus Optical Co., Ltd., Japão) com objetiva de 10x e captura de imagens por Câmera Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e software DP Controller (2002-2006 Olympus Corporation) foram transferidas para um microcomputador e empregando-se o software Adobe Photoshop CS5, versão 12.0 (1990-2010 Adobe Systems Incorporated, EUA), foram feitas as uniões das imagens parciais conforme Figura 5.

Figura 5- Imagens dos cortes teciduais corados com HE para união no Software Adobe Photoshop.

Após a união das imagens parciais, foram obtidas as imagens completas dos cortes teciduais corados com HE (Figura 6).

Figura 6- Imagem completa do espécime corado com HE após a união dos cortes teciduais parciais no Software Adobe Photoshop.

As imagens completas dos espécimes corados com HE foram mensuradas por um único avaliador calibrado identificando-se a área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito e a extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo neoformado empregando-se o programa de domínio público analisador de imagens Image J 1.50i (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

4.7.1.1 Avaliação da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Utilizando-se o programa Image J 1.50i, com a ferramenta *Analyze* → *Set Measurements*, foi ativada a função *Area* (Figura 7A). Com a ferramenta *Polygon selections* delimitou-se a área total correspondente à interface enxerto-leito. Em seguida, foi empregada a ferramenta *Analyze* → *Measure* para medir esta área em μm^2 . Com a ferramenta *Edit* → *Draw* a linha preta foi desenhada sobre a imagem, correspondendo a delimitação da área total (Figura 7B). A mesma sequência de procedimentos foi adotada para delimitar e medir a área de tecido ósseo neoformado dentro da área total correspondente à interface (Figura 7C). Os dados colhidos foram transferidos para uma planilha do programa Excel (Microsoft Office 2013, Windows 10), onde foi calculada através de regra de três simples a porcentagem de área da interface enxerto-leito ocupada por osso neoformado em cada espécime.

Figura 7- Avaliação da área na interface enxerto-leito receptor. **A:** Imagem de um corte tecidual contendo o enxerto (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I), com osso neoformado (ON) aberta pelo programa analisador de imagens (Image J). **B:** Delimitação (linha preta) da área total da interface entre o enxerto (E) e o leito receptor (L) empregando a ferramenta *Polygon selections* (seta); o número no canto superior esquerdo representa a medida de área (em μm^2) à qual a delimitação corresponde. **C:** Delimitação (linhas em laranja) das áreas correspondentes ao tecido ósseo neoformado ocorrendo dentro da área delimitada em **B**, empregando a mesma ferramenta (seta); os números abaixo da medida anterior no canto superior esquerdo correspondem as áreas de tecido ósseo neoformado (em μm^2) que foram somadas e empregadas no cálculo da porcentagem de tecido ósseo neoformado na interface.

4.7.1.2 Avaliação da porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Utilizando-se o programa Image J 1.50i, a função *Area* foi desativada (Figura 8A). Com a ferramenta *Segmented Line* delimitou-se as superfícies do enxerto e do leito voltadas para a interface. Em seguida, foi empregada a ferramenta *Analyze* → *Measure* para medir o comprimento em μm dessas superfícies delimitadas. Com a ferramenta *Edit* → *Draw* as linhas pretas foram desenhadas sobre a imagem, correspondendo a delimitação das superfícies do enxerto e do leito voltadas para a interface. (Figura 8B). A mesma sequência de procedimentos foi adotada para delimitar e medir as superfícies do enxerto e do leito receptor que estavam consolidadas ao osso neoformado (Figura 8C). Os dados colhidos foram transferidos para uma planilha do programa Excel (Microsoft Office 2013, Windows 10), onde foi calculada através de regra de três simples a porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface em cada espécime.

Figura 8- Avaliação da extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface. **A:** Imagem de um corte tecidual contendo o enxerto (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I), com osso neoformado (ON) aberta pelo programa analisador de imagens (Image J). **B:** Delimitação (linhas pretas) das superfícies do enxerto (E) e do leito (L) voltadas para a interface empregando a ferramenta *Segmented Line* (seta); os números no canto superior esquerdo representam as medidas (em μm) das superfícies do enxerto (1) e do leito (2), que foram somadas para obtenção da medida total das superfícies que compõem a interface. **C:** Delimitação (linhas em azul) das superfícies do enxerto (E) e do leito receptor (L) consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface, empregando a mesma ferramenta (seta); os números abaixo das duas medidas anteriores no canto superior esquerdo correspondem ao comprimento (em μm) de cada uma dessas linhas e que foram somadas para o cálculo da porcentagem de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface.

4.8 Análise dos resultados

Na análise quantitativa de área de tecido ósseo neoformado na interface e de extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao novo osso, os grupos foram comparados entre os diferentes tempos de aplicação dos agentes desmineralizantes e entre os diferentes tempos de avaliação (7, 30 e 60 dias) por análise de variância a dois critérios (ANOVA a 2 critérios) seguido pelo teste de Fisher, quando ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, adotando-se nível de significância de 5%. Foi empregado o software Statistica 10.0 (StatSoft South America, São Paulo, Brasil) para realização de todas as análises estatísticas.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Dos 126 ratos empregados, 10 vieram a óbito por complicações pós-cirúrgicas de causa desconhecida, totalizando 116 animais, sendo 49 machos e 67 fêmeas, distribuídos nos seguintes grupos:

- TCN15: desmineralização por TCN durante 15 segundos (n=15);
- TCN30: desmineralização por TCN durante 30 segundos (n=17);
- TCN60: desmineralização por TCN durante 60 segundos (n=18);
- AC15: desmineralização por ácido cítrico durante 15 segundos (n=16);
- AC30: desmineralização por ácido cítrico durante 30 segundos (n=16);
- AC60: desmineralização por ácido cítrico durante 60 segundos (n=17);
- C: sem desmineralização (n=17).

5.1 Análise microscópica qualitativa

5.1.1 Análise histológica

Em cada espécime, as informações colhidas a partir da interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor sobre cada parâmetro avaliado encontram-se nas tabelas de 1 a 7 do APÊNDICE C e deram o fundamento para a análise microscópica qualitativa desta pesquisa.

5.1.1.1 Análise aos 7 dias

Grupo controle:

Nos espécimes do grupo controle, aos sete dias de pós-operatório, o enxerto ósseo encontrava-se delimitado superiormente pela membrana reabsorvível de cortical óssea bovina. Em nenhum espécime do grupo foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito receptor. Ao invés disso, havia tecido de granulação em seu estágio inicial, imaturo, em pontos focais, com poucos vasos sanguíneos neoformados, poucos fibroblastos e com a presença de coágulo em algumas áreas, formado por rede de fibrina, hemácias e células

inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. O tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares (neutrófilos) de forma moderada e os mononucleares (macrófagos e linfócitos) eram discretos. Não foram observadas, aos sete dias de pós-operatório, atividades de osteogênese e osteoclasia na interface enxerto-leito receptor nos espécimes analisados. Os limites inferiores do enxerto e os limites do osso receptor estavam totalmente preservados, sem áreas de reabsorção óssea. Na estrutura interna do enxerto, a maioria dos osteoplastos apresentavam em seu interior osteócitos viáveis morfologicamente, responsáveis pelo comando de todo o metabolismo ósseo através de sua comunicação com os demais osteócitos, via prolongamentos. Em nenhum dos espécimes foi observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor. A figura 9 ilustra os eventos observados para o grupo controle aos 7 dias.

Figura 9- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 7 dias no qual se pode observar em **A**, o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana (M), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). Não há sinais de osteogênese e/ou osteoclasia ocorrendo na interface. **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica uma extensa rede de fibrina (RF) ancorando hemácias. **C**: corresponde a uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B** onde é possível observar a presença de rede de fibrina e tecido de granulação imaturo (TG) na interface enxerto-leito. **D**: representa uma ampliação da área delimitada em azul de **C** onde se verifica a presença de tecido de granulação imaturo na interface, com vasos sanguíneos começando a se formar e leucócitos (setas azuis). Na estrutura interna do enxerto e do leito é possível observar osteoplastos com osteócitos viáveis morfologicamente em seu interior (setas marrons), responsáveis pelo comando de todo o metabolismo ósseo (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC15:

Aos sete dias de pós-operatório, nos espécimes do grupo AC15 não foram observados remanescentes do periósteo na interface. Todos os enxertos ósseos apresentavam-se delimitados superiormente pela membrana. A interface enxerto-leito estava preenchida por uma delicada rede de fibrina colonizada por células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, com a presença de um tecido de granulação imaturo em pontos focais. O tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares e mononucleares, discretos. Os limites inferiores do enxerto e os limites do osso receptor, em todos os espécimes do grupo, estavam totalmente preservados e não foram observadas atividades de osteogênese a partir do leito e do enxerto. Em nenhum espécime foi encontrada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor. A figura 10 ilustra um espécime representativo do grupo onde se observam os fenômenos que foram descritos para esse grupo.

Figura 10- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 7 dias. Em **A**, apresenta-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto (E), leito receptor (L), membrana reabsorvível (M) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface enxerto-leito receptor preenchida por uma delicada rede de fibrina. Não há atividades de osteogênese. É possível identificar osteoplastos com osteócitos viáveis em seu interior no enxerto e no leito (setas marrons), regulando o metabolismo ósseo. O destaque em vermelho de **B** está ampliado em **C** e demonstra a rede de fibrina colonizada por leucócitos (setas azuis), como macrófagos e neutrófilos (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC30:

Em nenhum dos espécimes do grupo AC30 foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito aos 7 dias. Os enxertos ósseos apresentavam-se delimitados superiormente pela membrana reabsorvível. A interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor foi preenchida por uma delicada rede de fibrina pobremente colonizada por leucócitos e com a presença de um tecido de granulação imaturo. O tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares discretos e mononucleares, também discretos, em menor número. Os limites inferiores do enxerto e do osso receptor encontravam-se totalmente preservados, sem a presença de osteogênese a partir do leito e do enxerto. Em nenhum espécime foi observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor. Na figura 11 os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados.

Figura 11- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 7 dias. Em **A**, observa-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto ósseo (E), leito receptor (L), membrana reabsorvível (M) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor preenchida por uma delicada rede de fibrina (RF) pobremente colonizada por leucócitos (setas marrons). Não há atividades de osteogênese e os limites inferiores do enxerto e do leito encontram-se totalmente preservados. É possível identificar osteoplastos com osteócitos viáveis em seu interior no enxerto (setas azuis), regulando o metabolismo ósseo. O destaque em vermelho de **A** está ampliado em **C** e demonstra a rede de fibrina colonizada por leucócitos (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC60:

No grupo AC60 aos 7 dias, os enxertos ósseos estavam delimitados superiormente pela membrana reabsorvível e não foram observados remanescentes do periósteo na interface de nenhum dos enxertos. O tecido de granulação presente na interface enxerto-leito apresentava-se imaturo e havia a presença de uma delicada rede de fibrina ricamente celularizada. O tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares e mononucleares discretos, estes em menor número. Os limites inferiores do enxerto e do leito receptor estavam totalmente preservados, sem atividade osteogênica a partir do leito e do enxerto. Não foi observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor nos espécimes analisados. Os fenômenos relativos a esse grupo podem ser observados na figura 12.

Figura 12- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 7 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana (M), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde não há sinais de osteogênese e/ou osteoclasia. A área delimitada em vermelho de **B** está ampliada em **C**, onde se verifica uma extensa rede de fibrina (RF) ancorando leucócitos (setas azuis) e hemácias (setas vermelhas). **D**: corresponde a uma ampliação da área delimitada em azul de **B** onde é possível observar a presença da rede de fibrina na interface, em maior aumento, ricamente celularizada por leucócitos (setas azuis) (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN15:

Nos espécimes do grupo TCN15 aos 7 dias não foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito e os enxertos ósseos apresentavam-se delimitados superiormente pela membrana reabsorvível de cortical óssea bovina. O tecido de granulação era bem organizado com a presença de uma delicada rede de fibrina rica em células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares e mononucleares discretos em menor número. Em todos os espécimes, os limites inferiores do enxerto ósseo e do leito receptor estavam totalmente preservados, sem osteogênese a partir do leito e do enxerto. Não houve incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor nos espécimes analisados. Esses fenômenos podem ser observados na figura 13.

Figura 13- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 7 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (M), leito receptor (L) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor preenchida por uma delicada rede de fibrina (RF) rica em células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Não há atividades de osteogênese e os limites inferiores do enxerto e do leito encontram-se totalmente preservados. Em **C**, que representa a área delimitada em vermelho de **B**, é possível identificar osteoplastos com osteócitos viáveis em seu interior no enxerto (setas azuis), regulando o metabolismo ósseo e a rede de fibrina na interface, ricamente colonizada por leucócitos (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN30:

Os enxertos ósseos dos espécimes do grupo TCN30 apresentavam-se delimitados superiormente pela membrana reabsorvível e não foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação estava bem organizado e o infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares e mononucleares discretos, em menor número. Os limites inferiores do enxerto e do leito receptor estavam totalmente preservados, sem atividade osteogênica a partir do leito e do enxerto. Não houve incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor nos espécimes analisados. Os eventos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 14.

Figura 14- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 7 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana reabsorvível (M), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor preenchida por um tecido de granulação (TG) bem organizado, rico em células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Não há atividades de osteogênese ocorrendo a partir do leito e do enxerto e os limites inferiores do enxerto e do leito encontram-se totalmente preservados. Em **C**, que representa a área delimitada em vermelho de **B**, é possível identificar osteoplastos com osteócitos viáveis em seu interior no enxerto (setas azuis) e o tecido de granulação na interface, ricamente colonizado por leucócitos (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN60:

Os espécimes do grupo TCN60 não apresentavam remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação era bem organizado e o infiltrado inflamatório predominante foi de polimorfonucleares e mononucleares discretos, em menor número. Os limites inferiores e superiores do enxerto e do leito receptor estavam totalmente preservados, sem osteogênese a partir do leito e do enxerto e não houve incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor em todos os espécimes analisados. Na figura 15 podem ser observados os fenômenos que foram descritos para esse grupo.

Figura 15- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN60 aos 7 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor preenchida por um tecido de granulação (TG) bem organizado, ricamente celularizado. Não há atividades de osteogênese ocorrendo a partir do leito e do enxerto e os limites inferiores do enxerto e do leito encontram-se totalmente preservados. Em **C**, que representa a área delimitada em vermelho de **B**, é possível identificar o tecido de granulação na interface, ricamente colonizado por leucócitos (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

5.1.1.2 Análise aos 30 dias

Grupo controle:

Aos trinta dias de pós-operatório, nos espécimes do grupo controle, o enxerto ósseo manteve-se delimitado superiormente pela membrana. Não foram encontrados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito receptor. O tecido de granulação presente caracterizava-se por um grau de maturidade mais avançado quando comparado aos espécimes do grupo controle de sete dias, classificando-se como um tecido de granulação maduro, com uma rica fonte de células osteoprogenitoras e de vasos sanguíneos. O infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares de forma leve, discreta. Em todos os espécimes, os limites inferiores do enxerto mantiveram-se totalmente preservados, no entanto, em relação aos limites do osso receptor foram observados em dois espécimes uma incipiente preservação parcial desses limites. Na interface enxerto-leito receptor também puderam ser observadas atividades de osteogênese (com camadas de osteoblastos bem definidas) a partir do leito receptor em todos os espécimes, classificando-se de forma incipiente em um espécime, leve em dois, moderada em um e intensa em dois espécimes. Em relação à osteogênese a partir do enxerto, em um espécime não foi observado esse evento, em três espécimes a osteogênese foi classificada como leve e em dois espécimes como intensa. O tecido ósseo formado na interface era somente osso primário ou imaturo, ricamente celularizado, pouco mineralizado e depositado de maneira aleatória. As superfícies do enxerto e do leito ainda permaneciam identificáveis. Na figura 16 podem ser observados os fenômenos que foram descritos para esse grupo.

Figura 16- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 30 dias. Em **A**, tem-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto (E), leito receptor (L), membrana reabsorvível (M) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface enxerto-leito receptor, com presença de tecido de granulação maduro (TG) e atividades de osteogênese. O destaque em azul de **C** está ampliado em **D** e demonstra na interface um tecido de granulação com uma rica fonte de células osteoprogenitoras (setas azuis) e de vasos sanguíneos (setas marrons). É possível identificar atividades de osteogênese, com camadas de osteoblastos bem definidas (setas amarelas) a partir do leito e do enxerto. O tecido ósseo formado na interface ainda apresenta característica embrionária, ricamente celularizado e pouco mineralizado (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC15:

Nos espécimes do grupo AC15 aos 30 dias, não foram observados remanescentes do periósteo em nenhum espécime. O tecido de granulação presente na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor foi classificado como maduro, ricamente celularizado e vascularizado. O infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em todos os espécimes desse grupo experimental, os limites do enxerto e do leito encontravam-se totalmente preservados. A osteogênese observada a partir do enxerto e a partir do leito receptor era de moderada a intensa, com a presença de trabéculas de osso imaturo depositadas de maneira irregular na interface, promovendo uma união estrutural entre as superfícies de contato do enxerto ósseo e do leito receptor. Todos esses fenômenos podem ser observados na figura 17.

Figura 17- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica a presença de osso neoformado (ON). O destaque em vermelho de **B** está ampliado em **C** onde é possível observar intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito, com presença de trabéculas de osso imaturo depositadas de maneira irregular na interface e espaços medulares preenchidos por medula óssea (setas azuis), promovendo uma união estrutural entre as superfícies de contato do enxerto ósseo e do leito receptor. Os limites do enxerto e do leito encontram-se preservados. A área delimitada em azul de **B** está ampliada em **D**, na qual se observa a presença de tecido de granulação maduro na interface enxerto-leito, ricamente celularizado e vascularizado (setas verdes) e osteoblastos enfileirados (setas marrons) promovendo a deposição de novo osso na interface, como também pode ser visto em **E**, em um corte de outro espécime do mesmo grupo experimental (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC30:

Os enxertos ósseos dos espécimes desse grupo apresentavam-se parcialmente delimitados superiormente pela membrana, que em vários pontos estava desintegrada. Em nenhum dos espécimes foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação presente na interface era maduro e o infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em todos os espécimes, os limites inferiores do enxerto e do leito receptor estavam totalmente preservados. A osteogênese observada em três espécimes a partir do enxerto e a partir do leito receptor era discreta e em dois espécimes era intensa, com a presença de trabeculado de osso imaturo depositado de forma aleatória na interface e espaços medulares preenchidos por medula óssea. Os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 18.

Figura 18- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) parcialmente delimitado superiormente pela membrana reabsorvível (M), que em vários pontos apresenta-se desintegrada, leito receptor (L) e interface enxerto-leito (I). A área delimitada em amarelo de **A** está ampliada em **B** e corresponde à interface enxerto-leito receptor, com presença de tecido de granulação maduro (TG) e intensa atividade de osteogênese com deposição de trabéculas de tecido ósseo neoformado (ON), também visualizado em **C**, que corresponde ao destaque em vermelho de **A**. A área delimitada em azul de **B** pode ser vista em **D** e demonstra na interface o tecido de granulação maduro e intensa atividade de osteogênese, com camadas de osteoblastos bem definidas (setas vermelhas). O tecido ósseo formado na interface é de osso imaturo, ricamente celularizado, pouco mineralizado e com espaços medulares preenchidos por medula óssea (setas azuis) (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC60:

Os espécimes do grupo AC60 aos 30 dias apresentavam-se parcialmente delimitados superiormente pela membrana. Em nenhum espécime foram observados remanescentes do periósteo na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor.

O tecido de granulação apresentava-se maduro e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Na maioria dos espécimes, os limites inferiores do enxerto e do leito encontravam-se totalmente preservados e havia uma intensa osteogênese a partir do leito receptor e do enxerto com a presença de espaços medulares preenchidos por medula óssea, evidenciando uma atividade osteogênica mais avançada neste grupo, aos trinta dias de pós-operatório, com várias áreas de incorporação enxerto-leito. Os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 19.

Figura 19- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) parcialmente delimitado superiormente pela membrana (M), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** demonstrando intensa osteogênese ocorrendo na interface. O destaque em vermelho de **B** está ampliado em **C** onde é possível observar o tecido ósseo neoformado (ON) e presença de incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor (setas azuis), também vistos em **D**, que corresponde a ampliação da área delimitada em azul de **B**. O tecido de granulação (TG) apresentava-se maduro na interface. Em **E**, que corresponde a área delimitada em verde de **A**, pode-se verificar intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito, com a presença de espaços medulares preenchidos por medula óssea (setas marrons), promovendo uma união estrutural entre as superfícies de contato do enxerto ósseo e do leito receptor, evidenciando uma atividade osteogênica mais avançada neste grupo, aos trinta dias de pós-operatório (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN15:

Os enxertos ósseos desse grupo mantiveram-se delimitados superiormente pela membrana em apenas alguns pontos e não foram encontrados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito receptor. O tecido de granulação presente foi classificado como maduro, com uma rica fonte de células e de vasos sanguíneos. O infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares de forma leve, discreta. A maioria dos espécimes apresentavam os limites inferiores do enxerto e do osso receptor parcialmente preservados, no entanto, em dois espécimes esses limites estavam totalmente preservados. A osteogênese observada a partir do enxerto e do leito foi de leve a intensa, caracterizada pela deposição aleatória de um tecido ósseo imaturo, rico em células e espaços medulares preenchidos por medula óssea, com áreas de incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor. Na figura 20 podem ser observados os fenômenos que foram descritos para esse grupo.

Figura 20- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana reabsorvível (M) em apenas alguns pontos, o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). A área delimitada em amarelo de **A** está ampliada em **B** e demonstra intensa osteogênese ocorrendo na interface, com deposição de trabéculas de tecido ósseo neoformado (ON) rico em células e espaços medulares preenchidos por medula óssea (setas azuis) e com os limites do leito receptor parcialmente preservados (setas verdes). **C**: representa a área delimitada em vermelho de **A** onde é possível identificar o novo osso formado na interface e a presença de tecido de granulação maduro (TG) com uma rica fonte de células e de vasos sanguíneos. A área delimitada em azul de **C** pode ser vista em **D** e demonstra na interface a intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito, com a presença de osteoblastos enfileirados depositando novo osso (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN30:

Nos espécimes deste grupo, o enxerto ósseo estava parcialmente delimitado superiormente pela membrana e na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor não foi verificada a presença de remanescentes do periósteo. O tecido de granulação presente era maduro e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em todos os espécimes, os limites inferiores do enxerto e do leito encontravam-se totalmente preservados com moderada osteogênese observada a partir do enxerto e do leito, caracterizada pela presença de trabéculas de osso imaturo depositadas de forma irregular na interface, rico em células e espaços medulares. Em alguns espécimes foi observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor. Todos esses fenômenos podem ser observados na figura 21.

Figura 21- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana (M) apenas em alguns pontos, a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica moderada osteogênese observada a partir do enxerto e do leito resultando em leve incorporação (setas azuis). O tecido ósseo neoformado (ON) se caracteriza pela presença de trabéculas ósseas depositadas de forma irregular na interface, rico em células e espaços medulares (setas marrons). **C**: representa uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B**, onde é possível observar em maior aumento os eventos descritos em **B** que ocorreram na interface enxerto-leito (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN60:

Os espécimes deste grupo não apresentavam a membrana reabsorvível e não foi identificada a presença de remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação presente foi classificado como maduro e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em apenas um espécime os limites inferiores do enxerto encontravam-se totalmente preservados e nos demais, parcialmente preservados. Em relação aos limites do osso receptor, todos os espécimes estavam parcialmente preservados. A osteogênese observada a partir do leito e do enxerto foi de moderada a intensa e em três espécimes houve incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor, sendo que em um espécime essa incorporação foi discreta e nos demais, foi moderada. Esses fenômenos podem ser observados na figura 22.

Figura 22- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN60 aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). A área delimitada em amarelo de **A** está ampliada em **B** e demonstra intensa osteogênese (ON) ocorrendo a partir do enxerto e do leito na interface e com os limites do leito receptor parcialmente preservados (setas verdes). **C**: representa a área delimitada em vermelho de **A** onde é possível identificar o novo osso formado na interface ricamente celularizado, com espaços medulares (setas azuis) preenchidos por medula óssea, com os limites do enxerto e do leito parcialmente preservados (setas verdes) resultando em áreas de incorporação enxerto-leito, demonstrando que esse grupo experimental foi o único que apresentou incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor aos trinta dias de pós-operatório, acelerando o processo de reparo ósseo através da utilização da tetraciclina. À área delimitada em azul de **C** pode ser vista em maior aumento em **D** e demonstra na interface a intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito, com a presença de osteoblastos enfileirados depositando novo osso (setas marrons) (Hematoxilina-eosina).

5.1.1.3 Análise aos 60 dias

Grupo controle:

Nos espécimes do grupo controle, aos 60 dias de pós-operatório, o enxerto ósseo não se apresentava mais delimitado por membrana, pois esta já havia sido reabsorvida. Em nenhum espécime foi observada a presença de remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito receptor. O tecido de granulação presente foi classificado como maduro e em apenas um espécime estava ausente. Neste mesmo espécime, outros fenômenos também estavam mais avançados em relação aos demais, como a ausência de infiltrado inflamatório, a não preservação dos limites inferiores do enxerto e do osso receptor e a intensa atividade de osteogênese a partir do leito e do enxerto resultando em uma incorporação leve entre o enxerto ósseo e o leito. Nos demais espécimes, os limites do enxerto e do leito encontravam-se parcialmente ou totalmente preservados. A atividade osteogênica foi classificada como moderada e intensa a partir do enxerto e do leito e incorporação entre enxerto ósseo e leito receptor presente de forma leve e ausente em dois espécimes. O tecido ósseo formado na interface era primário ou imaturo, rico em células e depositado de maneira aleatória, apresentando alguns espaços medulares preenchidos por medula óssea. O infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares de forma discreta. Estes fenômenos podem ser observados na figura 23.

Figura 23- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo controle aos 60 dias.

Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) não mais delimitado superiormente pela membrana, a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica ausência de tecido de granulação e de infiltrado inflamatório, os limites do enxerto e do leito receptor tornaram-se mais indefinidos (setas azuis) e a interface enxerto-leito mostra maior preenchimento por tecido ósseo neoformado (ON) em relação aos períodos anteriores. Há intensa atividade osteogênica a partir do leito e do enxerto resultando em leve incorporação. **C**: representa uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B**, onde é possível observar as regiões onde houve integração entre o osso neoformado com o enxerto (setas azuis) e a presença de espaços medulares preenchidos por medula óssea (setas marrons) no osso neoformado (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC15:

Nos espécimes desse grupo, a membrana reabsorvível não era mais identificável e não havia a presença de remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação apresentava-se maduro em todos os espécimes analisados e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Os limites inferiores do enxerto e do leito receptor encontravam-se parcialmente preservados, com intensa osteogênese na interface caracterizada por tecido ósseo imaturo com presença de espaços medulares preenchidos por medula óssea. Em apenas um espécime, os limites estavam totalmente preservados com moderada osteogênese, demonstrando um atraso em relação aos demais. Os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 24.

Figura 24- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC15 aos 60 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) não mais delimitado superiormente pela membrana, a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica intensa osteogênese. O tecido ósseo neoformado (ON) presente na interface enxerto-leito em **C** pode ser visto em maior aumento em **D**, demonstrando a intensa atividade osteogênica com os limites inferiores do enxerto e do leito receptor parcialmente preservados (setas azuis) (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC30:

Os espécimes deste grupo não apresentavam mais a presença da membrana reabsorvível e não foram observados remanescentes do periósteo em nenhum espécime. O tecido de granulação foi classificado como maduro na interface enxerto-leito e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. A maioria dos espécimes apresentava os limites inferiores do enxerto parcialmente preservados e em apenas um espécime estavam ausentes. Os limites do leito receptor estavam parcialmente preservados somente em um espécime e nos demais os limites estavam ausentes, com intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto. Em apenas dois espécimes a osteogênese foi moderada. Foi observada uma discreta incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor em dois espécimes. Os eventos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 25.

Figura 25- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC30 aos 60 dias. Em **A**, tem-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto (E), leito receptor (L) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e corresponde à interface enxerto-leito receptor, com presença de intensa osteogênese (ON) a partir do leito e do enxerto, onde é possível observar discreta incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor, demonstrando um estágio mais avançado nos fenômenos de reparação óssea nesse grupo em comparação aos demais, com os limites inferiores do enxerto parcialmente preservados (setas vermelhas), visto também em **C** que corresponde a área delimitada em vermelho de **A**. O destaque em azul de **A** está ampliado em **D** e demonstra na interface um tecido de granulação (TG) maduro com uma rica fonte de células osteoprogenitoras (setas azuis) (Hematoxilina-eosina).

Grupo AC60:

Aos 60 dias de pós-operatório, os espécimes desse grupo experimental apresentavam remanescentes da membrana em apenas alguns pontos e não foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação foi classificado como maduro e o infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em todos os espécimes do grupo, os limites inferiores do enxerto e do osso receptor não estavam preservados e havia intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto. Foi observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor em todos os espécimes analisados. Esses eventos são observados na figura 26.

Figura 26- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo AC60 aos 60 dias. Em **A**, tem-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana (M) em apenas alguns pontos, leito receptor (L) e interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e demonstra na interface intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto com os limites inferiores do enxerto e do osso receptor não preservados (setas verdes) e discreta incorporação enxerto-leito. Também visto em **C** em maior aumento, representando a área delimitada em vermelho de **B**. É possível observar o tecido ósseo neoformado (ON) a partir do leito e do enxerto e presença de discreta incorporação enxerto-leito (setas verdes), diferentemente dos grupos anteriores no mesmo período de avaliação, demonstrando um estágio mais avançado nos fenômenos de reparação óssea nesse grupo. O tecido de granulação (TG) apresentava-se maduro na interface com uma rica fonte de células osteoprogenitoras (setas azuis) e de vasos sanguíneos (setas vermelhas). O destaque em azul de **A** está ampliado em **D** e também demonstra em outra área do corte, os fenômenos que foram descritos em **C** (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN15:

Nos espécimes desse grupo, a membrana não era identificável e não havia a presença de remanescentes do periósteo na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor. O tecido de granulação presente era maduro e o infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Em todos os espécimes, os limites inferiores do enxerto e do leito receptor encontravam-se parcialmente preservados, com intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto, sendo observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor em alguns espécimes. Esses fenômenos podem ser observados na figura 27.

Figura 27- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN15 aos 60 dias. Em **A**, tem-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto ósseo (E) não mais delimitado superiormente pela membrana, o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e demonstra intensa osteogênese (ON) ocorrendo a partir do leito e do enxerto em toda interface, também visto em **C**. Os limites inferiores do enxerto estão parcialmente preservados (setas verdes), sendo observada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor, também visto em **D** em maior aumento, representando a área delimitada em azul de **B** (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN30:

Os espécimes desse grupo experimental não apresentavam membrana identificável e não foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação foi classificado como maduro e o tipo de infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Nos espécimes desse grupo, os limites inferiores do enxerto e do osso receptor não estavam preservados, havia intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto e foi observada moderada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor, devido à grande presença de tecido ósseo neoformado na interface, compartilhando espaços medulares, medula óssea e promovendo a união entre as superfícies de contato do enxerto e do leito. Os eventos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 28.

Figura 28- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN30 aos 60 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). A área delimitada em amarelo de **A** está ampliada em **B** e representa intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto ocorrendo na interface resultando em moderada incorporação (setas azuis) com grande presença de tecido ósseo neoformado (ON) na interface, compartilhando espaços medulares (setas marrons), medula óssea e promovendo a união entre as superfícies de contato do enxerto e do leito. Essa incorporação se diferenciou dos demais grupos no mesmo tempo de avaliação, demonstrando que os fenômenos de reparação óssea nesse grupo estavam mais avançados que todos os demais grupos analisados. **C**: representa uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B**, onde é possível observar em maior aumento os eventos descritos em **B** que ocorreram na interface enxerto-leito (Hematoxilina-eosina).

Grupo TCN60:

Os espécimes desse grupo experimental exibiam o enxerto ósseo parcialmente delimitado superiormente pela membrana que se apresentava desintegrada em vários pontos. Não foram observados remanescentes do periósteo na interface enxerto-leito. O tecido de granulação era maduro e o infiltrado inflamatório predominante foi de mononucleares, discretos. Na maioria dos espécimes desse grupo, os limites inferiores do enxerto e do leito estavam parcialmente preservados e em apenas um espécime estavam ausentes. Foi observada intensa osteogênese a partir do leito e do enxerto e em dois espécimes, a osteogênese a partir do enxerto encontrava-se moderada. Houve uma moderada incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor em três espécimes analisados e discreta incorporação em dois espécimes. Os eventos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 29.

Figura 29- Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo TCN60 aos 60 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E) delimitado superiormente pela membrana reabsorvível (M) apenas em alguns pontos, a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde se verifica intensa osteogênese observada a partir do enxerto e do leito, com os limites inferiores do enxerto e do leito receptor parcialmente preservados (setas azuis) resultando em moderada incorporação, confirmando o papel da tetraciclina na aceleração dos eventos relacionados ao reparo ósseo, aos sessenta dias de pós-operatório. O tecido ósseo neoformado (ON) se caracteriza pela presença de trabéculas ósseas depositadas de forma irregular na interface, rico em células e espaços medulares (setas marrons). **C**: representa uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B**, onde é possível observar em maior aumento os eventos descritos em **B** que ocorreram na interface enxerto-leito (Hematoxilina-eosina).

5.1.2 Análise imunohistoquímica

A tabela 1 fornece as informações sobre presença (+) ou ausência (-) de marcação para OCN e TRAP nos espécimes analisados. Nas figuras de 30 a 43 estão apresentados os cortes teciduais imunomarcados para OCN e TRAP, aos 30 dias de pós-operatório.

Tabela 1- Imunomarcacão para osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) nos espécimes analisados aos 30 dias de pós-operatório.

Grupos	OCN			TRAP		OCN/TRAP
	Espécimes	Positiva (+)	Negativa (-)	Positiva (+)	Negativa (-)	
C n=4	1	+++		+		>
	2	+		+		
	3	+			—	
	4	+++		++		
AC15 n=4	1	+		+		<
	2	+		++		
	3		—	++		
	4	+		+		
AC30 n=4	1	+++		+		>
	2	++			—	
	3	+++		+		
	4	+++		+		
AC60 n=4	1	+		+		<
	2	+		+		
	3	+		++		
	4	+		++		
TCN15 n=4	1	+		++		=
	2	+		+		
	3	++		++		
	4	++		+		
TCN30 n=4	1	+++		+		>
	2	+++		++		
	3	+++		+		
	4	+++		++		
TCN60 n=4	1	+		++		>
	2	+++		+		
	3	++		+		
	4	++		+		

Legenda: +: Leve ++: Moderado +++: Intenso

5.1.2.1 Análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para OCN

Grupo controle:

A análise imunohistoquímica para OCN evidenciou exuberante marcação na camada de células osteoprogenitoras e osteoblásticas localizada nas superfícies ósseas neoformadas. Os osteoblastos apresentaram-se com coloração acastanhada. No tecido conjuntivo jovem ou tecido de granulação maduro presente na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor, muitas células marcaram-se positivamente de forma isolada e aleatória. Os resultados observados neste grupo estão representados na figura 30.

Figura 30- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo controle imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A** pode-se observar o enxerto ósseo (E), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). A área delimitada em amarelo de **A** está ampliada em **B** e representa a osteogênese a partir do leito e do enxerto ocorrendo na interface com grande presença de tecido ósseo neoformado (ON). É possível observar a camada de células osteoprogenitoras e osteoblásticas imunomarcada para OCN, com coloração acastanhada, localizada nas superfícies ósseas neoformadas (setas laranjas). No tecido de granulação (TG) presente na interface, muitas células marcaram-se positivamente de forma isolada e aleatória (setas marrons). **C:** representa uma ampliação da área delimitada em vermelho de **B**, onde é possível observar em maior aumento os eventos descritos em **B**.

Grupo AC15:

A marcação de OCN neste grupo revelou-se muito discreta, especialmente nos osteoblastos na superfície do enxerto e do leito receptor. Eventualmente, algumas células do tecido de granulação interposto entre as duas estruturas apresentavam-se positivas. Neste grupo, chamou atenção um espécime marcado negativamente para a OCN. Na figura 31 podemos observar os eventos que ocorreram neste grupo.

Figura 31- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC15 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, verifica-se o enxerto ósseo (E), a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). **B**: representa uma ampliação da área delimitada em amarelo de **A** relativa à interface onde é possível observar tecido ósseo neoformado (ON) a partir do leito, com discreta marcação para OCN nos osteoblastos presentes na superfície óssea (setas laranjas). Eventualmente, algumas células do tecido de granulação (TG) presente na interface apresentavam-se positivas (setas marrons).

Grupo AC30:

A OCN neste grupo estava exuberantemente marcada nos osteoblastos das superfícies ósseas especialmente nas áreas neoformadas, muito embora em muitas células do tecido de granulação maduro ou tecido conjuntivo jovem na interface ela também tenha marcado positivamente. Os resultados observados neste grupo estão representados na figura 32.

Figura 32- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC30 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, tem-se uma visão panorâmica do corte onde podem ser identificados o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e demonstra atividade de osteogênese ocorrendo a partir do leito e do enxerto em toda interface. É possível observar a intensa marcação para OCN nos osteoblastos das superfícies ósseas (setas laranjas), especialmente nas áreas de tecido ósseo neoformado (ON), muito embora em muitas células do tecido de granulação (TG) presente na interface, muitas células marcaram-se positivamente (setas marrons). Os eventos descritos em **B** podem ser vistos em maior aumento em **C**, onde é possível visualizar osteócitos imunomarcados para OCN (setas verdes) aprisionados no interior da matriz óssea após sua síntese. **D**: representa a área delimitada em laranja de **A**, no qual pode-se observar osteoblastos imunomarcados (setas laranjas) na superfície do osso neoformado e células do tecido de granulação imunomarcadas para OCN (seta marrom).

Grupo AC60:

A marcação com OCN neste grupo aos 30 dias revelou-se muito discreta, tanto nas células das superfícies ósseas quanto nas células do tecido de granulação maduro ou tecido conjuntivo jovem na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor. Os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 33.

Figura 33- Fotomicrografia do espécime representativo do grupo AC60 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). A marcação com OCN neste grupo revelou-se muito discreta, tanto nas células (seta laranja) presentes nas superfícies do osso neoformado (ON), quanto nas células (setas marrons) do tecido de granulação (TG) na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor.

Grupo TCN15:

Neste grupo, a análise imunohistoquímica para OCN evidenciou uma marcação entre as intensidades leve a moderada nos espécimes analisados e restrita às áreas de células osteoprogenitoras e osteoblásticas nas superfícies ósseas neoformadas (Figura 34).

Figura 34- Fotomicrografia do espécime representativo do grupo TCN15 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o leito receptor (L), a interface enxerto-leito (I), o tecido de granulação (TG) e o osso neoformado (ON). A marcação com OCN neste grupo evidenciou uma marcação entre as intensidades leve a moderada nos espécimes analisados e restrita às áreas de células osteoprogenitoras e osteoblásticas nas superfícies ósseas neoformadas (setas laranjas).

Grupo TCN30:

Em todos os espécimes deste grupo foi observada intensa marcação para OCN aos 30 dias de pós-operatório. A OCN esteve marcada exuberantemente nas células das superfícies ósseas neoformadas, nas células do tecido de granulação maduro e em alguns osteócitos presos na matriz óssea neoformada (Figura 35).

Figura 35- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN30 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, pode ser observado o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). É possível identificar a presença de tecido ósseo neoformado (ON) na interface com osteoblastos imunomarcados para OCN (setas laranjas) nas superfícies ósseas e osteócitos imunomarcados (setas verdes) presos na matriz óssea neoformada. No tecido de granulação (TG), também pode-se observar células imunomarcadas para OCN (setas marrons). O destaque em amarelo de **A** está ampliado em **B** e demonstra, em maior aumento, os eventos descritos em **A**. **C**: representa os mesmos eventos descritos em **A** em outra área analisada do mesmo espécime.

Grupo TCN60:

A intensidade da marcação para OCN foi de leve a intensa nos espécimes analisados. Foi verificada marcação exuberante da OCN nas células das superfícies ósseas neoformadas e também nas células do tecido conjuntivo jovem ou tecido de granulação maduro (Figura 36).

Figura 36- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN60 imunomarcado para OCN aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L) e a interface enxerto-leito (I). A marcação com OCN neste grupo foi de leve a intensa com presença de marcação nas células do tecido de granulação (TG) (setas marrons). Os eventos descritos em **A** também podem ser visualizados em **B**. Em **C** é possível observar osteoblastos com coloração acastanhada (setas laranjas) presentes nas superfícies do osso neoformado (ON) e células imunomarcadas do tecido de granulação (setas marrons).

5.1.2.2 Análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para TRAP

Grupo controle:

Na análise imunohistoquímica para TRAP nos espécimes do grupo controle foi verificado que em diversos pontos da superfície óssea era frequente a presença de várias células positivas à TRAP, destacando-se a presença das células clásticas nas superfícies ósseas normais do leito apenas. A TRAP demarcou os osteoclastos que estavam presentes em pontos focais, com a mesma coloração acastanhada. Observou-se neste grupo um espécime marcado negativamente para a TRAP. Os resultados observados neste grupo estão representados na figura 37.

Figura 37- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo controle imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar no leito receptor (L) a presença de células clásticas imunomarcadas para TRAP em pontos focais nas superfícies ósseas normais do leito (setas verdes). Os eventos descritos em **A** podem ser visualizados em **B**, em maior aumento.

Grupo AC15:

A intensidade da marcação para TRAP foi de leve a moderada neste grupo. A TRAP demarcou algumas células mononucleadas, outras binucleadas presentes nas superfícies ósseas neoformadas. No tecido conjuntivo jovem ou tecido de granulação maduro presente na interface enxerto-leito, eventuais células foram marcadas isoladamente. Na figura 38 podem ser observados os eventos que ocorreram neste grupo.

Figura 38- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC15 imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar o leito receptor (L), a interface enxerto-leito (I), o tecido de granulação (TG) e o osso neoformado (ON). A área delimitada em vermelho de **A** está representada em **B** e demonstra que a imunomarcagem para TRAP demarcou algumas células mononucleadas, outras binucleadas presentes nas superfícies ósseas neoformadas (setas verdes) e eventuais células do tecido de granulação (setas marrons).

Grupo AC30:

A marcação de intensidade leve com a TRAP nos espécimes analisados deste grupo fazia-se pontualmente em osteoclastos localizados nas superfícies ósseas e nos espaços correspondentes aos canais de Volkmann ou a espaços medulares. Neste grupo, chamou atenção um espécime marcado negativamente para a TRAP. Os fenômenos descritos para esse grupo podem ser observados na figura 39.

Figura 39- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo AC30 imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, observa-se o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L), a interface enxerto-leito (I) e o tecido de granulação (TG). A marcação de intensidade leve com a TRAP neste grupo fazia-se pontualmente em osteoclastos localizados nas superfícies ósseas (setas verdes) e nos espaços correspondentes aos canais de Volkmann ou a espaços medulares (setas marrons). Os eventos descritos em **A** também podem ser visualizados em **B**, em maior aumento.

Grupo AC60:

Neste grupo, a marcação para TRAP foi de leve a moderada nos espécimes analisados, sendo demarcadas células clásticas destacadas isoladamente em pontos das superfícies ósseas. Eventualmente, algumas células foram imunomarcadas em pequenos espaços medulares ou canais de Volkmann. Os resultados observados neste grupo estão representados na figura 40.

Grupo TCN15:

Foi observada imunomarcaco leve a moderada de células com TRAP ora na superfície óssea ora em células isoladas do tecido conjuntivo jovem ou tecido de granulação maduro. Também foi verificada marcação positiva para TRAP em alguns espaços medulares (Figura 41).

Figura 41- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN15 imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, pode-se observar a interface enxerto-leito (I) e o leito receptor (L). Foi verificada marcação positiva para TRAP em alguns espaços medulares (setas marrons). O destaque em vermelho de **A** está ampliado em **B** onde é possível observar na interface a presença de tecido de granulação (TG), osso neoformado (ON) a partir do leito e imunomarcaco leve de células isoladas do tecido de granulação (seta laranja).

Grupo TCN30:

Houve marcação leve a moderada em células TRAP positivas em pontos das superfícies ósseas neoformadas e nos espaços medulares nos espécimes analisados deste grupo (Figura 42).

Figura 42- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN30 imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, observa-se o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L), a interface enxerto-leito (I) e o osso neoformado (ON). Houve marcação leve a moderada em células TRAP positivas em pontos das superfícies ósseas (seta verde) e nos espaços medulares (setas marrons) nos espécimes analisados deste grupo. Em **B**, é possível observar, em maior aumento, as células TRAP positivas nos espaços medulares (setas marrons) presentes no tecido ósseo neoformado na interface.

Grupo TCN60:

Foram observados pontos focais de marcação para a TRAP com coloração acastanhada de intensidade leve a moderada em células presentes nas superfícies ósseas e nos espaços medulares (Figura 43).

Figura 43- Fotomicrografias do espécime representativo do grupo TCN60 imunomarcado para TRAP aos 30 dias. Em **A**, verifica-se o enxerto ósseo (E), o leito receptor (L), a interface enxerto-leito (I) e o tecido de granulação (TG). É possível observar na extremidade esquerda do corte tecidual, pontos focais de marcação para a TRAP em células presentes nas superfícies ósseas (setas verdes) e nos espaços medulares (setas marrons). O destaque em vermelho de **A** está representado em **B** e demonstra a presença de leve marcação para a TRAP nas células (setas verdes) da superfície do osso neoformado (ON) na interface.

5.2 Análise microscópica quantitativa

5.2.1 Análise histomorfométrica

5.2.1.1 Avaliação da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

A Tabela 2 demonstra os resultados médios da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito de todos os grupos experimentais aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório. Não foi observada formação óssea na interface enxerto-leito em nenhum espécime do grupo C aos 7 dias, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0,02$) em relação ao grupo AC15 ($17,93 \pm 15,15\%$) e TCN60 ($24,48 \pm 17,99\%$). Aos 30 dias, a maior porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface foi encontrada no grupo TCN60 ($80,42 \pm 18,69\%$), seguido do grupo AC60 ($76,20 \pm 13,41\%$), porém sem diferença estatística entre eles. O grupo C apresentou a menor porcentagem de área de osso neoformado na interface ($54,22 \pm 30,82\%$), sendo este resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo AC15 ($73,09 \pm 28,24\%$) e TCN60 ($80,42 \pm 18,69\%$), com $p = 0,02$. Aos 60 dias, todos os espécimes do grupo AC60 apresentaram $100,00 \pm 0,00\%$ da área da interface preenchida por tecido ósseo neoformado, contudo sem diferença estatística quando comparado aos demais grupos. O grupo C novamente apresentou a menor porcentagem de formação óssea na interface ($75,38 \pm 25,66\%$), enquanto que nos espécimes do grupo AC15 e TCN60 do mesmo período, $96,09 \pm 5,44\%$ e $90,68 \pm 14,55\%$ da área relativa à interface estava ocupada por tecido ósseo neoformado, respectivamente ($p = 0,02$). Quando comparados os períodos de avaliação, os espécimes de 60 dias mostraram maior porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface do que os de 30 dias e 7 dias, independentemente do tipo de tratamento dado às superfícies de contato enxerto-leito, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0$).

O gráfico da Figura 44 auxilia a visualização dos resultados observados na Tabela 2.

Tabela 2- Porcentagem média de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.

Período de avaliação	Área de tecido ósseo neoformado na interface (%)					
	$\bar{x} \pm dp$					
	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN15	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	17,93±15,15 ^{aA}	3,06±4,97 ^{abA}	6,38±9,88 ^{abA}	15,66±18,48 ^{abA}	6,69±9,04 ^{abA}	24,48±17,99 ^{aaA}
30 dias	73,09±28,24 ^{abB}	62,90±25,31 ^{abbB}	76,20±13,41 ^{abbB}	58,32±21,52 ^{abbB}	69,40±25,51 ^{abbB}	80,42±18,69 ^{abB}
60 dias	96,09±5,44 ^{aC}	87,20±27,52 ^{abcC}	100,00±0,00 ^{abcC}	93,61±12,78 ^{abcC}	88,97±12,63 ^{abcC}	90,68±14,55 ^{aC}

$\bar{x} \pm dp$ = média $\pm$ desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha ou letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Figura 44- Gráfico da porcentagem média de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.

5.2.1.2 Avaliação da porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

A Tabela 3 demonstra os resultados médios da porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório. A extensão de superfícies ósseas consolidadas ao osso neoformado aumentou significativamente com o tempo em todos os grupos ($p < 0,0001$). Não foi observada consolidação das superfícies ósseas do enxerto e do leito ao tecido ósseo neoformado na interface em nenhum espécime do grupo C e do grupo AC60 aos 7 dias. Os demais grupos apresentaram pequena extensão de superfícies consolidadas, mas sem diferença estatisticamente significativa. Aos 30 dias, o grupo C foi o que apresentou menor porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado

(54,40±31,19%), sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0,0015$) em relação ao grupo TCN60 (82,34±16,12%), ao grupo TCN30 (80,11±13,80%) e ao grupo AC15 (81,08±16,38%), que foram os grupos que demonstraram as maiores porcentagens de superfícies consolidadas. Aos 60 dias, o grupo AC60 apresentou a totalidade das superfícies ósseas do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado na interface, sendo este resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo C, que apresentou cerca de 70% de consolidação das superfícies ($p = 0,0015$). Esta foi também a menor porcentagem de consolidação entre os grupos também apresentando diferença estatisticamente significativa ($p = 1,0015$) em relação aos grupos AC15 (96,53±5,37%), TCN15 (96,11±5,03%) e TCN60 (95,74±6,62%).

O gráfico da Figura 45 auxilia a visualização dos resultados observados na Tabela 3.

Tabela 3- Porcentagem média de extensão de superfícies do enxerto e do leito receptor consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.

Período de avaliação	Extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface (%)					
	$\bar{x} \pm dp$					
	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN15	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	8,24±10,98 ^{aA}	1,65±3,68 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aA}	4,10±6,12 ^{aA}	2,19±4,89 ^{aA}	5,72±5,13 ^{aA}
30 dias	81,08±16,38 ^{aB}	72,12±22,55 ^{abbB}	74,53±10,75 ^{abbB}	63,82±25,34 ^{abbB}	80,11±13,80 ^{aB}	82,34±16,12 ^{aB}
60 dias	96,53±5,37 ^{aC}	88,82±19,12 ^{abC}	100,00±0,00 ^{aC}	96,11±5,03 ^{aC}	84,34±17,01 ^{abC}	95,74±6,62 ^{aC}

$\bar{x} \pm dp$ = média $\pm$ desvio padrão

Letras minúsculas diferentes na mesma linha ou letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Figura 45- Gráfico da porcentagem média de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados observados neste estudo confirmaram que a desmineralização óssea das superfícies de contato entre o enxerto ósseo autógeno em bloco e o leito receptor com gel de ácido cítrico (10%, pH=1) ou tetraciclina hidrociorada na concentração de 50mg/ml são métodos eficazes na antecipação dos eventos biológicos relacionados à neoformação óssea na interface enxerto-leito. Especial destaque deve ser dado ao período de avaliação de 7 dias, sendo esta a primeira vez em que foi possível observar neoformação óssea nas interfaces de enxertos autógenos em bloco em período tão precoce. Note-se que nesse período, mais de 24% da área da interface enxerto-leito já estava ocupada por osso em neoformação no grupo TCN60, o que confirma que a desmineralização antecipa a reparação óssea. Aos 30 dias, os grupos desmineralizados superaram até mesmo o grupo controle de 60 dias, em especial os grupos AC60 e TCN60.

O processo de remodelação óssea fisiológica baseia-se na mobilização e dissolução dos cristais minerais através da produção de ácidos, provavelmente ácido cítrico e láctico, pelos osteoclastos (MELCHER, 1976) e a partir desse conhecimento, a hipótese inicialmente levantada neste estudo de que a desmineralização óssea artificial, com substâncias ácidas em procedimentos cirúrgicos de enxertia óssea, poderia antecipar o fenômeno de reabsorção, que é um dos mecanismos envolvidos na remodelação, foi confirmada.

No tecido ósseo, a fase orgânica contém os fatores osteogênicos e osteoindutores que estão impedidos de agir pela presença da fase mineral da matriz (STEVENSON; EMERY; GOLDBERG, 1996). A desmineralização óssea de maneira intencional poderia remover a fase mineral do osso e expor o conteúdo osteoindutor da matriz orgânica, acelerando o processo de reparo e promovendo maior formação óssea. Esse aspecto foi comprovado em diversos trabalhos de Urist (URIST, 1965; URIST; DOWELL, 1968; URIST et al., 1968; URIST et al., 1970) quando realizou a desmineralização óssea artificial com ácido clorídrico e constatou que a desmineralização foi capaz de induzir a formação de osso em áreas ectópicas, como o tecido muscular de ratos e camundongos, através da diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos promovida pela desmineralização. Da mesma forma pode ter acontecido neste estudo, cuja desmineralização óssea do enxerto em

bloco e do leito receptor com ácido cítrico ou tetraciclina hidrocloreada pode ter levado à liberação de fatores osteoindutores, como as BMPs, que estavam presas na matriz orgânica e que são responsáveis pela diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, acelerando a neoformação óssea, podendo ser verificada neste estudo através dos resultados da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface (Tabela 2), que foram bem superiores nos espécimes desmineralizados comparados à não desmineralização.

No estudo de Salmeron (2015) foi observado, através de microscopia confocal, que houve maior expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 nas superfícies desmineralizadas do que em não desmineralizadas, confirmando a atuação das BMPs no reparo ósseo.

O objetivo principal da desmineralização da interface enxerto-leito proposta pela equipe de pesquisadores da FOB-USP é, além de antecipar o período de consolidação desses enxertos, visto neste trabalho aos 30 e 60 dias de pós-operatório, evitar o destacamento dos enxertos no momento da inserção de implantes (KOERDT et al., 2014). É requisito fundamental para a consolidação do enxerto ao leito, que haja íntimo contato entre as duas estruturas para que possa ocorrer revascularização do tecido enxertado (TRIPLETT e SCHOW, 1996).

Perfurações ou desgastes na cortical óssea do leito receptor com o objetivo de promover a revascularização e melhorar o processo de incorporação (BUSER et al., 1993; GORDH et al., 1997; ALBERIUS; GORDH, 1998; CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000; FARIA et al., 2008; MAZZONETTO, 2008; BARBOSA et al., 2009; PEDROSA et al., 2009; DAYANGAC et al., 2016), além de constituírem-se trauma cirúrgico adicional, podem resultar em reabsorção excessiva do leito, no qual o enxerto pode submergir, diminuindo seu volume e espessura final (DAYANGAC et al., 2016; FARIA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009). Para contornar esse inconveniente, outras propostas como a interposição de plasma rico em plaquetas (PRP) na interface (MIRANDA et al., 2006), de BMPs (GORDH et al., 1999; KRISHNAN et al., 2015) e aplicação de laser de baixa potência (O'DONNELL et al., 1996; OBRADOVIC; KESIC; PESEVSKA, 2009; VALIATI et al., 2012) foram sugeridas, métodos esses que envolvem custos adicionais e aumento do tempo cirúrgico. Contrariamente, a desmineralização óssea com ácido cítrico ou tetraciclina hidrocloreada não envolve custo adicional ou aumento do tempo cirúrgico significantes. Por essa razão e em face dos resultados positivos que vêm sendo

alcançados, a desmineralização seria uma alternativa vantajosa aos demais procedimentos citados, pois minimizaria o risco de reabsorção e preservaria a estrutura óssea já fragilizada pela reabsorção natural.

Na análise microscópica qualitativa dos espécimes deste estudo, aos 7 dias de pós-operatório foi observado um padrão no processo de reparação óssea em todos os grupos, independentemente do tipo de tratamento realizado, com presença de tecido de granulação imaturo e delicada rede de fibrina (Figuras 9 a 15), provavelmente devido ao estágio precoce da reparação. Essa observação está de acordo com o estudo de Rezende et al. (2014) no qual o mesmo evento foi verificado.

Por outro lado, 30 dias de pós-operatório foi o período no qual as diferenças entre os grupos foram mais evidentes. Foi observada de moderada a intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito com deposição de trabéculas de osso imaturo de maneira aleatória, promovendo uma união estrutural entre as superfícies de contato do enxerto ósseo e do leito receptor, tanto nos espécimes desmineralizados quanto nos não desmineralizados (Figuras 16 a 22). Entretanto, foi evidenciada uma atividade osteogênica mais avançada no grupo AC60, com várias áreas de incorporação entre o enxerto e o leito e que também foram vistas nos espécimes desmineralizados com tetraciclina hidrocloreada. Esses achados concordam com o estudo de Domingues (2013) que verificou um estágio mais avançado de maturação, com áreas de remodelação óssea, nos espécimes desmineralizados com ácido cítrico (50%, pH=1) durante 3 minutos e no estudo de Rezende et al. (2014) nos espécimes desmineralizados com gel de ácido cítrico e tetraciclina (50%, pH=1), também durante 3 minutos.

Já aos 60 dias de pós-operatório foi verificada intensa osteogênese a partir do enxerto e do leito, com seus limites parcialmente preservados, demonstrando áreas de remodelação óssea e incorporação nos espécimes desmineralizados (Figuras 23 a 29), o mesmo observado no estudo de Domingues (2013) aos 45 dias.

A fim de comprovar os resultados observados na análise qualitativa e por ser um método amplamente conhecido e confiável para a análise do reparo ósseo, a histomorfometria para avaliação de área de osso neoformado e extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao novo osso, foi realizada neste estudo. Diversos autores utilizaram a análise histomorfométrica para avaliação da área de osso neoformado e obtiveram êxito em suas pesquisas (GORDH et al.,

1999; MIRANDA et al., 2006; BARBOSA et al., 2009; DOMINGUES, 2013; REZENDE et al., 2014; ROJAS-PAULUS, 2016; DAYANGAC et al., 2016).

A análise histomorfométrica para avaliação da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito aos 7 dias de pós-operatório demonstrou nenhuma formação óssea na interface nos espécimes do grupo C, enquanto que os grupos AC15 e TCN60 já demonstravam formação de tecido mineralizado (Tabela 2). Esses resultados contrastam com os achados de Rezende et al. (2014) e Domingues (2013) que relataram nenhuma atividade de osteogênese aos 7 e 15 dias, respectivamente. Em defeitos críticos em calvária de ratos, entretanto, Rojas-Paulus (2016) também conseguiu verificar formação óssea 7 dias após ter enxertado os defeitos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico a 10% durante 15 segundos. A provável explicação para a precocidade da formação de tecido ósseo observada aos 7 dias no presente estudo pode ser atribuída ao fato de que a desmineralização óssea promove alterações na superfície do enxerto e do leito, com liberação de fatores osteoindutores, como as BMPs, presas na matriz orgânica, além da possibilidade de antecipar a ação dos osteoclastos na remodelação óssea (URIST, 1965; SALMERON, 2015; REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015).

As alterações de rugosidade superficial provocadas pelo ácido cítrico em superfícies ósseas desmineralizadas produziram mudanças no comportamento de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre osso da calvária de ratos (SALMERON, 2015). Foi observado que a desmineralização com ácido cítrico pode alterar a composição química e a topografia superficial do osso, podendo essas alterações, influenciar o comportamento das células que passaram a “reconhecer” as superfícies como rugosas, o que inibiria sua migração e promoveria sua diferenciação em osteoblastos, favorecendo a deposição de novo osso no local. De fato, a autora constatou que em amostras desmineralizadas as células apresentavam morfologia compatível com estágios mais avançados de diferenciação do que aquelas cultivadas sobre osso não desmineralizado. No mesmo estudo também foi verificado, através de microscopia confocal, que houve maior expressão de BMP-2, BMMP-4 e BMP-7 nas superfícies desmineralizadas do que nas não desmineralizadas controle. Os resultados obtidos por Salmeron (2015) podem justificar os achados favoráveis à desmineralização neste estudo e estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura (POLSON; PROYE, 1983; HEATH et al.,

1984; LORENZO et al., 1992; EKRYLANDER et al., 1994; DODDS et al., 1995; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003).

Aos 30 dias, foi observada maior porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface no grupo TCN60 ($80,42 \pm 18,69\%$), seguido do grupo AC60 ($76,20 \pm 13,41\%$), porém sem diferença estatística entre eles. O grupo C apresentou a menor porcentagem de área de osso neoformado na interface ($54,22 \pm 30,82\%$), sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0,02$) em relação ao grupo AC15 ($73,09 \pm 28,24\%$) e TCN60 ($80,42 \pm 18,69\%$). Esses resultados foram superiores aos encontrados por Rezende et al. (2014) em superfícies desmineralizadas, com área média de osso neoformado na interface de $34,39 \pm 13,4\%$ e se igualaram aos encontrados por Domingues (2013), com área média de $71,34 \pm 12,03\%$ nas superfícies desmineralizadas com ácido cítrico apenas. Essa diferença pode ser atribuída ao modelo animal empregado (ratos Wistar) cujo metabolismo é mais intenso do que o de cobaias e coelhos empregados nos estudos anteriores.

Aos 60 dias, todos os espécimes do grupo AC60 apresentaram 100% da área da interface preenchida por tecido ósseo neoformado, contudo sem diferença estatística quando comparado aos demais grupos. O grupo C novamente apresentou a menor porcentagem de formação óssea na interface ($75,38 \pm 25,66\%$), enquanto que nos espécimes do grupo AC15 e TCN60 do mesmo período, $96,09 \pm 5,44\%$ e $90,68 \pm 14,55\%$ da área relativa à interface estava ocupada por tecido ósseo neoformado, respectivamente ($p = 0,02$). Quando comparados os períodos de avaliação, os espécimes de 60 dias mostraram significativamente maior porcentagem de área de tecido ósseo neoformado na interface do que os de 30 e 7 dias, independentemente do tipo de tratamento realizado. Esses resultados estão de acordo com os achados de Rezende et al. (2014) e Domingues (2013), aos 90 e 45 dias de pós-operatório ($54,00 \pm 11,23\%$ e $71,18 \pm 8,9\%$, respectivamente), nos espécimes desmineralizados somente com ácido cítrico, entretanto com valores bem superiores aos encontrados nesses estudos. Isso pode ser devido ao fato do tempo de avaliação ter sido diferente entre os estudos, dificultando as comparações nesse período.

Pôde-se perceber, através da análise histomorfométrica, que os grupos AC15 e TCN60 apresentaram significativamente os melhores resultados, com maior porcentagem de área de osso neoformado na interface enxerto-leito em todos os períodos avaliados comparados a não desmineralização. O protocolo de

desmineralização com ácido cítrico durante 15 segundos também se apresentou como o melhor em outros estudos realizados pela linha de pesquisa em que se insere este trabalho, como no estudo de Rojas-Paulus (2016) em enxertos ósseos autógenos particulados no reparo de defeitos críticos na calvária de ratos, promovendo maior área, volume e densidade de osso neoformado no defeito do que nos grupos desmineralizados com tetraciclina hidrociorada e nos grupos que não sofreram desmineralização. O mesmo se verificou no trabalho de Rezende et al. (2015), ao avaliar o comportamento de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre discos ósseos desmineralizados com ácido cítrico (50%, pH=1) durante 15, 30, 90 ou 180 segundos. Os autores verificaram, através de microscopia eletrônica de varredura, que as amostras desmineralizadas produziram maior área de osso coberta por células e diferenciação mais acelerada de pré-osteoblastos em comparação as amostras sem desmineralização, principalmente nos tempos de 15 e 30 segundos.

Em contrapartida, os bons resultados encontrados neste estudo sobre a tetraciclina hidrociorada aplicada durante 60 segundos, diferem dos trabalhos de Rojas-Paulus (2016) e Manfredi (2016) que também utilizaram esse agente desmineralizante. Rojas-Paulus (2016) observou resultados negativos ao usar a tetraciclina, com pouca ou nenhuma formação de novo osso ao redor das partículas do osso autógeno enxertado em defeitos críticos em todos os períodos de avaliação e em diferentes tempos de desmineralização. Manfredi (2016), por sua vez, verificou ao avaliar o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 em superfícies ósseas desmineralizadas com ácido cítrico (10%, pH=1) e tetraciclina hidrociorada a 50mg/ml durante 15, 30 ou 60 segundos, que 60 segundos de aplicação de tetraciclina foi um tempo excessivamente longo de desmineralização, o que poderia ter atrapalhado o crescimento e a diferenciação celular. Contudo, as diferenças metodológicas nesses estudos dificultam e impedem a comparação com os resultados observados para a tetraciclina nesta dissertação.

A opção para o estudo da tetraciclina hidrociorada como agente desmineralizante em superfícies ósseas nos trabalhos citados e neste em especial, leva em consideração que a tetraciclina vem sendo amplamente empregada em periodontia como agente biomodificador radicular em procedimentos regenerativos, substituindo o ácido cítrico e o EDTA (LABAHN et al., 1992; BLOMLOF; BLOMLOF; LINDSKOG, 1996; SCHWARTZ et al., 2000; NAGATA et al., 2005; KASSAB et al.,

2006; SANT'ANA et al., 2007; ABED et al., 2013; CABA-PAULINO, 2014; MITTAL et al., 2014) apresentando resultados positivos também em osso (RIFKIN; VERNILLO; GOLUB, 1993; WIKESJO; SELVIG, 1999). A concentração de 50 mg/ml utilizada para a tetraciclina neste estudo foi escolhida com base nos diversos trabalhos com resultados favoráveis sobre a desmineralização em dentina (WIKESJO et al., 1986; NAGATA et al., 2005; PENMATSA et al., 2013). Além disso, uma revisão de literatura recente demonstrou carência de estudos analisando esse agente sobre tecido ósseo (ROJAS-PAULUS et al., 2015).

Em relação à extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado na interface, foi observado aumento significativo com o tempo em todos os grupos ($p < 0,0001$), como era esperado. Aos 7 dias, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme Tabela 3. Aos 30 dias, o grupo C apresentou menor porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado ($54,40 \pm 31,19\%$), sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0,0015$) em relação aos grupos TCN60 ($82,34 \pm 16,12\%$), TCN30 ($80,11 \pm 13,80\%$) e AC15 ($81,08 \pm 16,38\%$), que foram os grupos que demonstraram as maiores porcentagens de superfícies consolidadas. Aos 60 dias, o grupo AC60 apresentou a totalidade das superfícies ósseas do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado na interface sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0,0015$) quando comparado ao grupo C ($70,10 \pm 28,04\%$). O grupo C demonstrou novamente menor porcentagem de extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao tecido ósseo neoformado ($70,10 \pm 28,04\%$) do que os grupos AC15 ($96,53 \pm 5,37\%$), TCN15 ($96,11 \pm 5,03\%$) e TCN60 ($95,74 \pm 6,62\%$), com $p = 0,0015$. Esses achados comprovam a superioridade dos grupos desmineralizados quando comparados ao grupo sem desmineralização, no que diz respeito ao aumento da extensão das superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao novo osso formado na interface. Esse comportamento tem especial importância na prevenção do destacamento dos enxertos no momento da inserção de implantes, por exemplo, além de cumprir com o objetivo principal proposto pela linha de pesquisa em que se insere este trabalho.

Os resultados observados para a extensão de superfícies consolidadas aos 30 e 60 dias de pós-operatório estão de acordo com os resultados de Rezende et al. (2014) que verificaram maior extensão de superfícies consolidadas no grupo desmineralizado ($40,19 \pm 8,45\%$ e $55,46 \pm 19,65\%$) do que no grupo sem

desmineralização ($22,99 \pm 12,77\%$ e $40,99 \pm 13,60\%$) aos 30 e 90 dias de pós-operatório, respectivamente. Também corroboram com os resultados de Domingues (2013) que observou que os enxertos ósseos em bloco desmineralizados com ácido cítrico apresentaram significativamente superfícies de consolidação do osso neoformado cerca de 20% mais extensas do que os enxertos não desmineralizados aos 30 e 45 dias de pós-operatório.

A avaliação da extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao osso neoformado é um indicador muito importante para verificar o imbricamento do novo osso ao enxerto e ao leito, pois é necessário que ocorra além da neoformação óssea na interface, uma união estrutural do novo osso com o osso maduro do enxerto e do leito (RODRIGUES et al., 2012; MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009).

O estudo de marcadores da remodelação óssea, através de análise imunohistoquímica, também é um importante meio para complementar e aumentar a credibilidade da avaliação da consolidação de enxertos ósseos em áreas de reparo, possibilitando a compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre a consolidação do enxerto ao leito. A técnica de imunohistoquímica emprega anticorpos para detectar, quantificar e localizar proteínas específicas. Neste estudo, foram utilizados os anticorpos primários anti-OCN e anti-TRAP como um meio para compreender os fenômenos envolvidos na reparação óssea.

A fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) é uma enzima encontrada em células osteoclásticas e eritrócitos liberada durante a reabsorção, promovendo degradação da matriz orgânica, sendo considerada importante marcador da atividade osteoclástica (TEITELBAUM, 2000; FLORENCIO-SILVA et al., 2015). A osteocalcina (OCN) é uma proteína não colágena, sintetizada predominantemente por osteoblastos e também está presente na matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteoide, melhor representando o processo de formação óssea (BRONCKERS et al., 1985; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Está associada também ao fenômeno do “turnover”, ou seja, quando a reabsorção e a formação ósseas estão ocorrendo simultaneamente (DUCY et al., 1996).

A OCN pode se apresentar de duas diferentes formas: carboxilada e subcarboxilada. A primeira forma possui alta afinidade pelos cristais de hidroxapatita permanecendo na matriz óssea durante a mineralização, porém a forma

subcarboxilada possui menor afinidade aos minerais e é transportada para outros órgãos através da corrente sanguínea, demonstrando possuir efeitos no pâncreas, tecido adiposo e sistema nervoso (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem, por meio de análise imunohistoquímica, superfícies ósseas desmineralizadas com ácido cítrico ou tetraciclina hidrociorada, impossibilitando a comparação dos resultados encontrados nesse estudo para OCN e TRAP.

A análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para OCN nesse estudo aos 30 dias de pós-operatório evidenciou de leve a intensa marcação na camada de células osteoprogenitoras e osteoblásticas localizada nas superfícies ósseas neoformadas em todos os grupos avaliados. No tecido de granulação maduro presente na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor, muitas células marcaram-se positivamente de forma isolada e aleatória. Os osteoblastos apresentaram-se com coloração acastanhada.

Sendo a OCN um marcador de neoformação óssea e a TRAP, um marcador de reabsorção, é interessante que seja observada a relação entre eles nos espécimes estudados. Assim, pela análise da tabela 1, é possível perceber que nos grupos controle, AC30, TCN30 e TCN60 houve maior intensidade de marcação para OCN do que para TRAP, sugerindo maior atividade osteoblástica nesses grupos em relação aos demais. No grupo TCN15 atividades osteoblásticas e osteoclásticas estavam equilibradas, mas nos grupos AC15 e AC60, a atividade osteoclástica pareceu ser bem maior que a osteoblástica. Embora esses dados não consigam justificar por completo os eventos histomorfométricos encontrados, é relevante observar que, na maioria dos espécimes onde a marcação para TRAP foi maior do que para OCN, a localização dessa marcação era predominantemente dentro dos espaços medulares, em alguns casos, até mesmo dentro do osso neoformado. Esse dado deve ser interpretado mais como um fenômeno de remodelação natural do osso neoformado, do que como uma desvantagem do método de tratamento aplicado às superfícies.

Assim, a análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para TRAP demonstrou que em diversos pontos da superfície óssea era frequente a presença de células mononucleadas e binucleadas positivas à TRAP, destacando-se a presença das células clásticas nas superfícies ósseas normais e nos espaços correspondentes aos canais de Volkmann ou a espaços medulares. No tecido de

granulação maduro presente na interface enxerto-leito, eventuais células foram marcadas isoladamente. A TRAP demarcou os osteoclastos que estavam presentes em pontos focais, com a mesma coloração acastanhada e com marcação variando de leve a moderada em todos os grupos.

Resultados parcialmente similares foram encontrados no estudo de Pedrosa et al. (2009) realizado em enxertos ósseos removidos da calvária e transplantados para a mandíbula de coelhos com o leito mantido intacto ou perfurado. A TRAP exibiu intensa marcação no grupo não perfurado aos 5, 7 e 10 dias de pós-operatório e aos 5, 7, 10 e 20 dias para o grupo perfurado. Já a marcação para OCN ocorreu igualmente em ambos os grupos, sem diferença estatisticamente significativa. Além desses marcadores, outros também foram estudados, como o VEGF, e os autores observaram o mesmo perfil de marcação entre a TRAP e o VEGF e sugeriram que nos espécimes com o leito perfurado houve manutenção da vascularização em um nível constante (VEGF) durante todo o experimento, o que garantiu uma taxa de remodelação do enxerto (TRAP) na mesma escala. Em relação aos achados para OCN, uma provável explicação sugerida pelo autor seria de que esta proteína não é afetada pelo procedimento cirúrgico adotado no estudo, permanecendo estável durante todos os períodos avaliados e sem sofrer alterações em sua marcação devido a perfuração do leito.

Hawthorne et al. (2013), pertencentes ao mesmo grupo de pesquisa de Pedrosa et al. (2009) encontraram resultados semelhantes em enxertos ósseos em bloco autógenos e alógenos removidos da calvária e transplantados para a mandíbula de coelhos bilateralmente, com o leito perfurado em ambos os grupos. A avaliação para TRAP demonstrou diferença estatisticamente significativa aos 7 dias de pós-operatório entre os grupos, mais intensamente para o grupo de enxertos alógenos, e a OCN não apresentou diferença estatística. No grupo de enxertos alógenos foi verificada uma perda contínua de volume até os 60 dias de pós-operatório, com marcada contração do enxerto entre os dias 7 e 10. Os autores sugeriram que este resultado pode ser explicado pela maior marcação para a TRAP aos 7 dias. Já para a OCN, a ausência de diferença estatística pode ser explicada pelo fato dessa proteína não ter interferido no processo de remodelação óssea avaliado nesse estudo.

Um dado interessante a ser comentado é que a análise qualitativa dos cortes teciduais imunomarcados para TRAP apresentou imunomarcação com

características bem semelhantes ao que foi visto para a OCN, como observado nas Figuras 37 a 43. Este fato pode ser explicado pela presença da TRAP também em osteoblastos e osteócitos, conforme verificado nos estudos de Solberg et al. em 2014 e 2015.

A TRAP é bem conhecida como um importante marcador de osteoclastos, porém no recente estudo de Solberg et al. (2014) foram observados em ratos com osteoporose experimental, osteócitos positivos a TRAP, bem como níveis aumentados de TRAP localizados em vesículas intracelulares de osteoblastos e osteócitos, em ossos medulares, perto da superfície óssea. Em estudo subsequente, Solberg et al. (2015) examinaram ossos longos de ratos jovens em crescimento e observaram que a microscopia confocal de imunofluorescência mostrou co-localização da TRAP com RANKL e osteoprotegerina em osteócitos e que a microscopia eletrônica de transmissão mostrou co-localização de TRAP e RANKL em vesículas de osteoblastos e osteócitos, suportando os resultados obtidos por microscopia confocal. Os autores sugeriram que a TRAP também está localizada em lisossomos secretores RANKL/osteoprotegerina positivos em osteoblastos e osteócitos, o que poderia ter implicações para a regulação dos osteócitos da osteoclastogênese.

Em face dessas discussões, é lícito supor que as imunomarcações encontradas neste estudo são coerentes com os estágios de reparo dos enxertos, sem necessariamente ter correspondência com os fenômenos de antecipação da neoformação e consolidação dos enxertos ao leito receptor. Talvez, o emprego de outros marcadores em estudos subsequentes mais direcionados e em fases mais precoces da cicatrização possam dizer mais a respeito dos efeitos da desmineralização no comportamento celular.

Tendo em vista tudo o que foi discutido e os resultados conquistados neste estudo pode-se afirmar que a desmineralização óssea das superfícies de contato entre o enxerto ósseo autógeno em bloco e o leito receptor tanto com ácido cítrico (10%, pH=1) quanto com tetraciclina hidrocloreada na concentração de 50 mg/ml promove antecipação e intensificação da neoformação óssea e maiores extensões de superfícies consolidadas, sendo estas características vantajosas em diversos tratamentos com enxertos ósseos, como nas áreas de Periodontia, Implantodontia, Cirurgia Buco-Maxilo-Faciais e também na Ortopedia.

Em vista da similaridade de comportamento dos grupos onde a desmineralização foi efetuada, pode-se afirmar que um protocolo mais adequado de tratamento da interface ainda não está estabelecido de forma inequívoca. Os únicos grupos que diferiram estatisticamente do grupo controle em todos os períodos de avaliação foram os grupos AC15 e TCN60, com relação à área de osso neoformado na interface enxerto-leito e extensão de consolidação das superfícies ósseas. Assim, tanto o ácido cítrico como a tetraciclina podem ser considerados adjuvantes vantajosos no procedimento de enxerto ósseo autógeno.

Uma sugestão de continuidade desta linha de pesquisa seria comparar diferentes protocolos de desmineralização também em enxertos alógenos e xenógenos, tanto em bloco como particulados em outros modelos experimentais, incluindo estudos clínicos em humanos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

7.1 Conclusão geral

Pode-se concluir, com base nos resultados alcançados nesse estudo e de acordo com a metodologia e amostra empregadas, que a desmineralização das superfícies ósseas de contato entre o enxerto ósseo autógeno em bloco removido da calvária de ratos Wistar e o leito receptor com ácido cítrico (10%, pH=1) ou tetraciclina hidrocloreada (50 mg/ml) durante 15, 30 ou 60 segundos promove maior área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito, principalmente nos períodos mais precoces de reparação. A consolidação do osso neoformado ao enxerto e ao leito receptor é maior em todos os grupos desmineralizados em relação ao controle. Os grupos AC15 e TCN60 apresentam melhor comportamento.

7.2 Conclusões específicas

- a) A análise qualitativa demonstra estágios mais avançados no processo de reparo ósseo desde os 7 dias nos grupos desmineralizados em relação ao controle, com consolidação ocorrendo a partir dos 30 dias de pós-operatório, em especial nos espécimes desmineralizados com tetraciclina por 60 segundos;
- b) A análise histomorfométrica da porcentagem de área de osso neoformado na interface enxerto-leito demonstra maior área de formação óssea na interface nos grupos desmineralizados em relação ao grupo controle em todos os períodos avaliados. A extensão de superfícies do enxerto e do leito consolidadas ao novo osso é superior nos grupos desmineralizados em relação ao controle a partir dos 30 dias de reparo;
- c) A análise imunohistoquímica para os marcadores de formação (OCN) e reabsorção (TRAP) ósseas é inconclusiva para explicar os achados histomorfométricos. A relação OCN/TRAP é maior nos grupos controle, AC30,

TCN30 e TCN60, ou seja, nesses grupos é evidenciada mais atividade osteoblástica do que osteoclástica, entretanto, a localização da imunomarcagem margeando as superfícies do osso neoformado e no interior dos espaços medulares sugere que a observação revela fenômenos de remodelação óssea normal, sem distinção entre os grupos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABED, A. M. et al. Debris and smear layer removal efficacy and changes in morphology of dentinal tubules after using citric acid, tetracycline-hydrochloride and mixture of tetracycline and acid and detergent. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 10, n. 2, p. 232-7, Mar 2013.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J Mol Histol**, v. 39, n. 2, p. 201-8, Apr 2008.
- ALBERIUS, P.; GORDH, M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 124, n. 12, p. 1382-6, Dec 1998.
- BADR, M. et al. The efficacy of platelet-rich plasma in grafted maxillae. A randomised clinical trial. **Eur J Oral Implantol**, v. 3, n. 3, p. 233-44, Autumn 2010.
- BARBOSA, D. Z. et al. Autogenous bone graft with or without perforation of the receptor bed: histologic study in rabbit calvaria. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 3, p. 463-8, May-Jun 2009.
- BIANCO, P. et al. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. **Calcif Tissue Int**, v.49, n. 6, p. 421-6, Dec 1991.
- BLOMLOF, J. P.; BLOMLOF, L. B.; LINDSKOG, S. F. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol**, v. 67, n. 9, p. 841-5, Sep 1996.
- BRONCKERS, A. L. et al. Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. **Coll Relat Res**, v. 5, n. 3, p. 273-81, Jun 1985.

BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 13, n. 1, p. 29-45, 1993.

CABA-PAULINO, C. E. **Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico na área de superfície radicular recoberta por fibroblastos do ligamento periodontal humano. Estudo à microscopia eletrônica de varredura.** 2014. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014.

COOK, S.D. et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. **J Bone Joint Surg Am**, v. 77, n. 5, p. 734-50, May 1995.

DAYANGAC, E. et al. Radiological and Histological Evaluation of the Effects of Cortical Perforations on Bone Healing in Mandibular Onlay Graft Procedures. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 18, n. 1, p. 82-8, Feb 2016.

DE CARVALHO, P. S.; VASCONCELLOS, L. W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 4, p. 565-70, Jul-Aug 2000.

DE REZENDE, M.L. et al. Bone demineralization with citric acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. **J Periodontol**, v. 86, n. 1, p. 146-54, Jan 2015.

DODDS, R. A. et al. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. **J Bone Miner Res**, v. 10, n. 11, p. 1666-80, Nov 1995.

DOMINGUES, R.S. **Efeito da desmineralização ácida da interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco.** 2013. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

EK-RYLANDER, B. et al. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 14853-6, May 27 1994.

FARIA, P. E. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 4, p. 393-401, Apr 2008.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **Biomed Res Int**, v. 2015, n. 2015, p. 1-17, 2015.

GANSS, B.; KIM, R.H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 10, n. 1, p. 79-98, 1999.

GORDH, M. et al. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 117, n. 6, p. 664-70, Dec 1997.

GORDH, M. et al. Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting. **Plast Reconstr Surg**, v. 103, n. 7, p. 1909-18, Jun 1999.

HAUSCHKA, P. V.; LIAN, J. B.; GALLOP, P. M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 10, p. 3925-9, Oct 1975.

HAWTHORNE, A. C. et al. Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 10, p. 1164-72, Oct 2013.

HEATH, J.K. et al. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. **Biochim Biophys Acta**, v. 802, n. 1, p. 151-4, Nov 1984.

HU, Y.; TANG, X.X.; HE, H.Y. Gene expression during induced differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 6527-34, Dec 2013.

KASSAB, M. M. et al. The effect of EDTA in attachment gain and root coverage. **Compend Contin Educ Dent**, v. 27, n. 6, p. 353-60; quiz 361, Jun 2006.

KIM, H.J. et al. Progressive ankylosis protein (ANK) in osteoblasts and osteoclasts controls bone formation and bone remodeling. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 8, p. 1771-83, Aug 2010.

KOERDT, S. et al. 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**, v. 18, n. 1, p. 179-88, Jan 2014.

KRISHNAN, L. et al. Hydrogel-based Delivery of rhBMP-2 Improves Healing of Large Bone Defects Compared With Autograft. **Clin Orthop Relat Res**, v. 473, n. 9, p. 2885-97, Sep 2015.

LABAHN, R. et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J Periodontol**, v. 63, n. 4, p. 303-9, Apr 1992.

LEWANDROWSKI, K.U. et al. An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. **Calcif Tissue Int**, v. 61, n. 4, p. 294-7, Oct 1997.

LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech**, v. 60, n. 1, p. 107-14, Jan 2003.

LORENZO, J.A. et al. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. **Matrix**, v. 12, n. 4, p. 282-90, Aug 1992.

MANFREDI, G. G. P. **Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico sobre a composição química superficial e sobre o comportamento de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvária de ratos**. 2016. Dissertação

(Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016.

MAZZONETTO, R. **Reconstrução em Implantodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade**. Nova Odessa: Napoleão. v., n., p., 2008.

MELCHER, A. H. Biological processes in resorption, deposition and regeneration of bone. In: STAHL, S. S. (Ed.). **Periodontal surgery. Biologic basis and technique**. Springfield: Charles C Thomas, p. 99-120, 1976.

MIRANDA, S. R. et al. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 6, p. 694-9, Dec 2006.

MITTAL, M. et al. Comparative evaluation of root surface morphology after planing and root conditioning with tetracycline hydrochloride – an in vitro SEM study. **J Tenn Dent Assoc**, v. 94, n. 1, p. 21-6; quiz 26-7, Spring-Summer 2014.

NAGATA, M. J. et al. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 908-14, Jun 2005.

OBRADOVIC, R. R.; KESIC, L. G.; PESEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 3, p. 447-51, May 2009.

O'DONNELL, R. J. et al. Effect of Er:YAG laser holes on osteoinduction in demineralized rat calvarial allografts. **J Orthop Res**, v. 14, n. 1, p. 108-13, Jan 1996.

OGATA, Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. **J Periodont Res**, v. 43, n. 2, p. 127–35, Apr 2008.

PEDROSA, W. F., JR. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 11, p. 1254-64, Nov 2009.

POLSON, A.M.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol**, v. 54, n. 3, p. 141-7, Mar 1983.

PRICE, P. A. et al. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 5, p. 1447-51, May 1976.

REZENDE, M.L. et al. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. **J Periodontol**, v. 85, n. 5, p. e121-9, May 2014.

REZENDE, M.L.R. **Efeito da desmineralização das superfícies ósseas de contato na consolidação de enxertos autógenos em cobaias**. 2008. Tese (Livre-docência em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2008.

RIFKIN, B. R.; VERNILLO, A. T.; GOLUB, L. M. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. **J Periodontol**, v. 64, n. 8 Suppl, p. 819-27, Aug 1993.

RODRIGUES, M.G.S. et al. A desmineralização de enxertos ósseos autógenos onlay pode melhorar suas propriedades mecânicas: estudo biomecânico e por MEV. **Implant News**, v. 9, n. 3, p. 329-36, 2012.

ROJAS-PAULUS, J. E. **Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Estudo microscópico e microtomográfico**. 2016. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016.

ROJAS-PAULUS, J.E. et al. Desmineralização Óssea: Uma ferramenta clínica para o reparo. **Perio News** v.9, p.140-4, 2015.

SALMERON, S. **Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal**. 2015. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2015.

SANT'ANA, A. C. et al. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 2007-17, Oct 2007.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 72-8, 2002.

SCHWARTZ, Z. et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. **J Periodontol**, v. 71, n. 4, p. 586-97, Apr 2000.

SOLBERG, L. B. et al. Increased tartrate-resistant Acid phosphatase expression in osteoblasts and osteocytes in experimental osteoporosis in rats. **Calcif Tissue Int**, v. 94, n. 5, p. 510-21, May 2014.

SOLBERG, L. B. et al. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) co-localizes with receptor activator of NF-KB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)-positive vesicles in rat osteoblasts and osteocytes. **Histochem Cell Biol**, v. 143, n. 2, p. 195-207, Feb 2015.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-8, Sep 2000.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S. R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 54, n. 4, p. 486-94, Apr 1996.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-9, Nov 1965.

URIST, M. R.; DOWELL, T. A. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. **Clin Orthop Relat Res**, v. 61, p. 61-78, Nov-Dec 1968.

URIST, M. R. et al. Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop Relat Res**, v. 59, p. 59-96, Jul-Aug 1968.

URIST, M. R. et al. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. **Clin Orthop Relat Res**, v. 68, p. 279-93, Jan-Feb 1970.

VALIATI, R. et al. Effect of low-level laser therapy on incorporation of block allografts. **Int J Med Sci**, v. 9, n. 10, p. 853-61, 2012.

WIKESJO, U. M.; SELVIG, K. A. Periodontal wound healing and regeneration. **Periodontol 2000**, v. 19, p. 21-39, Feb 1999.

Apêndices

APÊNDICE A – Sequência do processamento histotécnico adotado pelo Laboratório de Patologia da FOB-USP para a coloração por Hematoxilina e Eosina

Após a descalcificação dos espécimes em solução de Morse, o material foi transferido para cassetes plásticos devidamente identificados e levados para o Histotécnico para a realização das seguintes etapas:

- Desidratação: 1 banho do espécime em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto I, II, III e IV, totalizando 6 banhos com duração de 1,5 hora cada;
- Diafanização: 4 banhos do espécime em xilol com duração de 1,5 hora cada;
- Inclusão: 2 banhos do espécime em parafina quente a 68°C com duração de 1,5 hora cada.

Em seguida, os espécimes foram colocados em fôrma própria para preparação dos blocos de parafina. Após a obtenção do bloco de parafina, foram realizados os cortes transversais de 5µm de espessura com o Micrótomo Leica RM2045 no centro de cada espécime, abrangendo leito receptor, enxerto ósseo e membrana e foi feita a montagem dos cortes histológicos em lâminas de vidro que permaneceram em estufa a 70°C durante uma noite.

Após esse período, foi realizada a coloração dos cortes histológicos pela técnica de Hematoxilina e Eosina, descrita a seguir:

- 1- Imersão em xilol I e II durante 20 minutos cada;
- 2- Passagem em álcool absoluto I, II, álcool 95% e álcool 70%;
- 3- Lavagem em água corrente por aproximadamente 30 segundos, até remover o excesso do álcool;
- 4- Coloração por Hematoxilina durante 20 minutos;
- 5- Lavagem em água corrente por aproximadamente 30 segundos, até remover o excesso da Hematoxilina;
- 6- Imersão no diferenciador por duas vezes;
- 7- Lavagem em água corrente durante 10 minutos;
- 8- Coloração por Eosina durante 10 minutos;

- 9- Passagem em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto I, II, III, IV, álcool absoluto + xilol, xilol I, II e III;
- 10- Montagem das lâminas com resina líquida e colocação das lamínulas.

Apêndices

APÊNDICE B – Sequência do processamento imunohistoquímico adotado pelo Laboratório de Histologia da FOB-USP para imunomarcção com anti-OCN e anti-TRAP.

Após a obtenção dos cortes histológicos de 4µm de espessura colocados sobre lâminas de vidro silanizadas referentes aos 7 grupos experimentais no período de 30 dias de pós-operatório foi realizada a técnica imunohistoquímica pelo método de detecção por imunoperoxidase com os anticorpos primários anti-OCN e anti-TRAP e o polímero N-Histofine descrita a seguir:

- 1- Os cortes foram colocados na estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina;
- 2- Incubação dos cortes em xilol (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha) com 2 banhos de 10 minutos e 1 banho de 5 minutos;
- 3- Reidratação dos cortes com 2 banhos de álcool absoluto (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha) durante 5 minutos e 1 banho em álcool 70% de 5 minutos;
- 4- Lavagem dos cortes com água destilada durante 3 minutos;
- 5- Recuperação dos epítomos por aquecimento em solução tamponada de citrato de sódio 10mM durante 30 minutos e mais 10 minutos para esfriar;
- 6- Lavagem em PBS (solução fosfato tamponada, pH 7,2) com 2 banhos de 3 minutos;
- 7- Demarcação com Dako pen (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) nas lâminas;
- 8- Bloqueio da atividade da peroxidase endógena com o bloqueador de peroxidase (EP-12-20521, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) por 10 minutos;
- 9- Lavagem em PBS com 2 banhos de 3 minutos;
- 10- Bloqueio das proteínas sorológicas para reduzir as ligações inespecíficas com o anticorpo com a utilização da solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé Brasil Ltda, Brasil) a 7% em PBS durante 15 minutos nas lâminas;
- 11- Após esse período, foi feita a aspiração do excesso da solução bloqueadora e os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos para OCN

Apêndices

- e TRAP diluídos em 1:50 em diluente de anticorpo universal (EP-12-20511, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Para o controle negativo, um dos cortes foi incubado somente com o diluente de anticorpo, sem exposição prévia ao anticorpo primário;
- 12-Lavagem dos cortes em PBS com 2 banhos de 3 minutos;
- 13-Incubação dos cortes com N-Histofine (H1602, Nichirei Biosciences Inc., Tóquio, Japão) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- 14-Lavagem dos cortes em PBS com 2 banhos de 3 minutos;
- 15-Incubação dos cortes com solução DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, EP-12-20541, EasyPath, Immunobioscience Corp., EUA) por 2 a 3 minutos;
- 16-Lavagem dos cortes em PBS com 2 banhos de 3 minutos;
- 17-Contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer por 3 minutos;
- 18-Montagem das lâminas com resina líquida e colocação das lamínulas.

Apêndices

APÊNDICE C – Tabelas contendo as informações coletadas para a análise microscópica qualitativa (análise histológica)

Tabela 1- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo C aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		C																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6 ^a	1	2	3	4	5	6	1	2	3 ^{no}	4	5	6
Interface	Remanescentes do periosteio	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1		3	3	3	3	3	3	3			3	3	3
		ausente (0)														0				
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	parcial													X					X
		Total	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X				X	X	
		ausente														X				
	Preservação dos limites do osso receptor	parcial								X	X				X				X	X
		Total	X	X	X	X	X		X			X	X	X				X		
		ausente														X				
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							1		2	3	1	3	2	3		2	3	2
		incipiente								X										
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							1		1	3	1	3	2	3		2	3	2
		incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0			0										
x	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)														1			1	1
		ausente (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0			0		
	Tipo de infiltrado inflamatório predominante	PMN (1,2,3)	2	2	2	2	2													
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1	1
		ausente (0)														0				
leito																				

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 2- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo AC15 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		AC15																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6 a	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6 a
Interface	Remanescentes do periósteo	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	parcial													X	X	X	X		
		total	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X					X	
		ausente																		
	Preservação dos limites do osso receptor	parcial													X	X	X	X		
		total	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X					X	
		ausente																		
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	2	
		incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	2	
		incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
x	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tipo de infiltrado inflamatório predominante																			
leito		PMN (1,2,3)	1	1	1	1	1													
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		ausente (0)																		

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 3- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo AC30 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		AC30																	
			7d						30d						60d					
			1 no	2	3	4	5	6 a	1 a	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Interface	Remanescentes do periosteio	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)		0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)		1	1	1	1			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	Parcial													X	X	X		X	X
		Total		X	X	X	X			X	X	X	X	X						
		Ausente															X			
	Preservação dos limites do osso receptor	Parcial																		X
		Total		X	X	X	X			X	X	X	X	X						
		Ausente													X	X	X	X	X	
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)								3	1	1	3	1	3	3	3	3	3	2
		Incipiente																		
		ausente (0)		0	0	0	0													
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)								3	1	1	3	1	3	3	3	3	2	2
		Incipiente																		
		ausente (0)		0	0	0	0													
leito	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)															1			1
		ausente (0)		0	0	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0		0	
	Tipo de infiltrado inflamatório predominante	PMN (1,2,3)		1	1	1	1													
		mononuclear (1,2,3)		1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ausente (0)																		

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 4- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo AC60 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		AC60																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6 a
Interface	Remanescentes do periosteio	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	Parcial																		
		Total	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
		Ausente													x	x	x	x	x	
	Preservação dos limites do osso receptor	Parcial																		
		Total	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
		Ausente													x	x	x	x	x	
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0												
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
		incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0												
	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)													1	1	1	1	1	
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
leito	Tipo de infiltrado inflamatório predominante	PMN (1,2,3)	1	1	1	1	1	1												
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		ausente (0)																		

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 5- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo TCN15 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		TCN15																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6 a	1	2	3	4	5	6	1 no	2	3 a	4	5	6 a
Interface	Remanescentes do periosteio	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0			0	0	
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1		3	3	3	3	3	3	3			3	3	
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	Parcial							X			X	X	X	X			X	X	
		Total	X	X	X	X	X			X	X									
		Ausente																		
	Preservação dos limites do osso receptor	Parcial							X			X	X	X	X			X	X	
		Total	X	X	X	X	X			X	X									
		Ausente																		
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							3	2	2	1	3	3	3			3	3	
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							3	2	2	1	3	3	3			3	3	
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
x	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0			0	0	
	Tipo de infiltrado inflamatório predominante																			
leito		PMN (1,2,3)	1	1	1	1	1													
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1			1	1	
		ausente (0)																		

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 6- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo TCN30 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		TCN30																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6 a	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Interface	Remanescentes do periósteeo	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	Parcial																		
		Total	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X						
		Ausente													X	X	X	X	X	X
	Preservação dos limites do osso receptor	Parcial																		
		Total	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X						
		Ausente													X	X	X	X	X	X
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0													
x	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)													2	2	2	2	2	2
		ausente (0)	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0						
	Tipo de infiltrado inflamatório predominante	PMN (1,2,3)	1	1	1	1	1													
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ausente (0)																		
leito																				

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Tabela 7- Dados coletados da análise microscópica dos espécimes do grupo TCN60 aos 7, 30 e 60 dias de pós-operatório

Objeto de análise	Evento		TCN60																	
			7d						30d						60d					
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Interface	Remanescentes do periosteio	presentes (1,2,3)																		
		ausentes (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tecido de granulação	presente (1,2,3)	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		ausente (0)																		
	Preservação dos limites inferiores do enxerto	Parcial							x	x	x	x	x			x	x	x	x	x
		Total	x	x	x	x	x	x						x						
		Ausente													x					
	Preservação dos limites do osso receptor	Parcial							x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
		Total	x	x	x	x	x	x												
		Ausente													x					
enxerto	Osteogênese a partir do leito receptor	presente (1,2,3)							3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0												
	Osteogênese a partir do enxerto	presente (1,2,3)							3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	2
		Incipiente																		
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0												
	Incorporação enxerto-leito	presente (1,2,3)							1	2	2					2	2	2	1	1
		ausente (0)	0	0	0	0	0	0				0	0	0	0					
leito	Tipo de infiltrado inflamatório predominante	PMN (1,2,3)	1	1	1	1	1	1												
		mononuclear (1,2,3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ausente (0)																		

1/2/3 = imaturo / estabelecido / maduro

a = ausente

no = não observável

Anexos

Anexos

ANEXO A – Carta de Aprovação do CEEPA (FOB-USP)

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 015/2015

Bauru, 28 de outubro de 2015.

Senhora Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado *"Efeito da desmineralização óssea superficial na consolidação de enxertos ósseos autógenos. Estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária de ratos"*, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado ad referendum** pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), nesta data.

Esta comissão solicita que ao final da pesquisa seja enviado relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Vigência do projeto:	Outubro/2015 a Outubro/2017
Espécie/Linhagem:	Wistar
Nº de animais:	n = 126 (54 machos e 72 fêmeas)
Peso/Idade	500 g / 4 meses
Sexo:	Machos e fêmeas
Origem:	Biotério de criação da FOB-USP

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof.a Dr.a Maria Lucia Rubo de Rezende
Docente do Departamento de Prótese

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73

e-mail: ceepa@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>