UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JEFREY ELIAS ROJAS PAULÚS

**Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado
no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos.
Estudo microscópico e microtomográfico**

BAURU
2016

Jefrey Elias Rojas Paulús

**Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado
no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos.
Estudo microscópico e microtomográfico**

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-Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

BAURU
2016

R638e Rojas, Jeffrey
Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Estudo microscópico e microtomográfico. / Jeffrey Elias Rojas Paulus. – Bauru, 2016.
119 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 016/2013
Data: 19 de Agosto 2013

DADOS CURRICULARES

28 de outubro 1988	Nascimento: Santo Domingo Republica Dominicana
Filiação	Olga Paulús Sigfrido Rojas
2006-2011	Graduação em odontologia pela Faculdade de odontologia da Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD)
2012-2013	Curso de Especialização em Prótese Dentaria – Centro de pós-graduação em odontologia (CPO – UNINGA, Bauru/SP)
2012-2014	Curso de Especialização em Periodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOB/USP)
2014	Curso de Aperfeiçoamento em cirurgia Avançada em Implantodontia – Instituto de Ensino Odontológico (IEO, Bauru/SP)
2014	Treinamento em tomografia computadorizada de feixe cônico (FUNBEO, Bauru/SP)
2013-2016	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas – Reabilitação Oral (Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, porque ele me deu a força e a determinação para chegar até aqui.

Aos meus pais,

Porque sem eles não teria sido possível chegar até o final desta jornada.

A cada uma das pessoas que fizeram parte desta pesquisa, já que sem ele não teria sido possível tê-la em nossas mãos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela vida e pela saúde que me deu durante todo este tempo aqui no Brasil. Por me permitir chegar até o final deste caminho como mestrando. Pela força e determinação que só o Senhor pode dar.

Quando cheguei pela primeira vez em Bauru nunca pensei que demoraria tanto minha estadia aqui, mas Ele me fez conhecer pessoas maravilhosas ao longo desta jornada, sem as quais não teria sido possível concluí-lo, as quais fizeram este caminho, um pouquinho mais agradável. Obrigado meu Deus por tudo o que o Senhor tem feito na minha vida, não tenho palavras para agradecer, mas a minha vida toda estarei sempre grato por tuas bênçãos e milagres que Tu tens feito nela.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Sigfrido Rafael Rojas Peña e Olga Rosalia Paulús Soriano porque sem o apoio deles não tivesse sido possível chegar até aqui. Eles sabem o quanto amo eles, e como estar longe durante estes quatro anos tem sido difícil.

Agradeço ao meu irmão Sigfrido Eliezer Rojas Paulús, pela ajuda em cada uma das coisas que precisei em quanto estive no Brasil, cada coisa que precisava na República ele resolvia, obrigado pelo carinho e pela motivação de cada dia para ir pra frente.

Obrigado a cada um dos meus familiares que acreditaram tanto em mim, me motivando e compartilhando os meus logros e minhas conquistas. Sempre me apoiaram nas minhas decisões.

Quero fazer um agradecimento especial aos meus tios Clara y Rodney Moret, que de maneira desinteressada abriram a porta da sua casa para mim durante 6 meses que fiquei em Michigan na faculdade de Ann Arbor. Eles me brindaram o carinho, amor e o conforto durante esse tempo. Dando-me tudo como se fossem meus pais, eu nunca vou esquecer esse grande detalhe e os levarei sempre no meu coração.

Agradeço minha namorada, Mariza Errera, pela ajuda, amor, dedicação e compreensão que me deu durante este tempo. Ela sempre compreendeu minhas ausências e tempo longe e me ajudou a suportar os momentos difíceis. Muito obrigado meu amor!

Agradeço também ao Departamento de Periodontia da Faculdade de Ann Arbor, dirigido pelo Prof. Dr. William Giannobile, especialmente, a Dra. Ivonne Kapila, por me receber durante seis meses no seu laboratório na faculdade de Odontologia em Ann Arbor. A cada um dos meus companheiros durante esse tempo: Islam, sempre lembrarei das suas orações, Liu, Adam, Ruma, Kama, Alberto, Rachel, e os demais que sempre me ofereceram ajuda no meu tempo lá, sempre lembrarei de cada um de vocês.

Não tenho palavras para agradecer a Igreja Adventista de Greenville, Deus a colocou no meu caminho e sem cada um dos seus membros não poderia ter sido possível alcançar cada uma das coisas que consegui. Cada um me brindou seu sorriso em cada culto e me ofereceram um lar longe de casa, a dissertação não teria lugar para por cada nome das pessoas que levo no meu coração.

Muito obrigado a Família Contelli-Xavier (Dani, Xavier, Ismenia, João), Kennerly-Herrera (Pericles, Cilma, Paula, Lais, Lavinha, o vó e a vó) e a família Bressan (Cristina, Ivaldo, Mariana e Melina). Me mostraram o que era ajudar um estranho de maneira desinteressada só por cumprir a tarefa que Deus nos deixou de ajudar ao próximo. Vocês foram minha família em cada momento aqui em Bauru, quando não sabia pra onde ir, sabia que meu telefone tinha onde ir.

A cada um dos meus amigos de Louvart, pelos momento que passamos cantando e louvando o senhor.

Agradeço a cada um dos professores da disciplina de Periodontia a Dra. Carla Damante, Dra. Adriana Campos Passanezi, a Dra. Mariana, ao Dr. Sebastião, chefe de nosso departamento, ao Dr. Euloir de quem tive o privilégio de obter conhecimentos na especialização, cada um deles são os responsáveis do meu conhecimento sobre Periodontia hoje em dia.

A cada um dos meus colegas pós-graduandos, Rafael, Paula Cunha, Paula Karam, Roberta, Samira, Jorge, Emília, João, Larissa, Monica, Lucas, Isis, Matheus, Renato, Erika, Rafaela, Luísa e Vitor.

Aos funcionários do Departamento de Periodontia, Marcela, Marcão, Ivania juntos todos foram uma grande família.

Agradeço especialmente a Maria Alejandra Frias Martinez, da qual sinto saudade, já que foi minha irmã e meu apoio durante todo este tempo aqui no Brasil.

Agradeço grandemente o Payely Faña, o Gustavo Manfredi e o Jefry Vargas, porque foram de grande ajuda na cirurgia dos animais.

Agradeço a cada um dos funcionários do biotério, o Elias, Erasmo e os demais que sempre ofereceram sua ajuda com o agendamento e os protocolos do biotério.

Agradeço ao Prof. Dr. Heitor Marques Honório, pela ajuda e disposição nas análises estatísticas deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Dr. Daniel Rezende, a Dra. Aline, a Setty, Emilia e a Dri. Por me suportarem heheheh e por todas as experiências felizes que tivemos nos cursos de implantes e cirurgia avançada, não tenho palavras para agradecer eles como me fizeram sentir parte da família.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Alberto Consolaro e a Profa. Dra. Renata Consolaro, já que sem sua ajuda não poderia ter sido feito o análise histológico deste trabalho.

Ao departamento de endodontia, o Bruno Cavenango, o Murilo, o Pablo Amoroso, e o Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, pela ajuda com o empréstimo do microtomógrafo e nas indicações no processamento das imagens.

E por último mas não menos importante, quero fazer um agradecimento especial a minha orientadora Profa. Dra. Maria Lucia Rubo de Rezende, quem durante todo este tempo me guiou na realização deste trabalho, graças a ela hoje sou uma melhor pessoa no pessoal e no profissional. Posso dizer que quando comecei o mestrado não tinha nem a ideia de como fazer uma pesquisa, muito menos uma dissertação de mestrado, já que infelizmente na minha graduação não teve essa formação. Mas, a professora Malu, me ajudou e me fez entender o necessário para desenvolver um sentido critico de como fazer as coisas e de como posso dar o melhor de mim sempre que eu me proponha uma meta. Muito obrigado Dra. Malu, a senhora não tem ideia do que seus ensinios fizeram em mim e o tanto que lembrarei da senhora a cada dia.

Se por acaso esqueço de alguém, agradeço a cada um dos que estiveram comigo durante este tempo, aos que me ofereceram um sorriso, aos que falaram um oi num corredor, aos que simplesmente estiveram ai para me ouvir nos momentos difíceis, muito obrigado!!

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”

Isaías 41:10.

RESUMO

O processo de desmineralização óssea tem sido mostrado vantajoso em procedimentos de enxertia óssea empregando blocos osseos, porem a sua utilização na periodontia em enxertos osseos autógenos particulados não esta ainda descrita na literatura. De acordo com a literatura é possível observar que existem diferentes agentes demineralizantes na pratica clinica os quais podem ser empregados no processo de desmineralização óssea, razão pela qual este estudo teve como objetivo comparar dois diferentes agentes desmineralizantes de enxertos ósseos autógenos particulados (ácido cítrico pH1 a 50% e tetraciclina hidrociorada a 50mg/ml) em diferentes tempos de aplicação, quanto ao efeito produzido no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Foram utilizados 120 ratos adultos machos com aproximadamente 4 meses de vida. Neste estudo foi utilizado o modelo de defeito crítico de 8 mm, esses animais foram divididos em 8 grupos de estudo formados por 15 animais (5 em cada período experimental): CN (controle negativo): os defeitos permaneceram sem enxerto; CP (controle positivo): os defeitos foram preenchidos por osso particulado não desmineralizado; AC 15: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 15 segundos; AC 30: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 30 segundos; AC 60: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 60 segundos; TCN 15: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 15 segundos; TCN 30: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 30 segundos; TCN 60: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 60 segundos. Foi realizada eutanasia dos animais aos 7, 30 e 60 dias para realização de microtomografia computadorizada e analise histomorfometrica, para avaliar a área, volume e densidade óssea nos defeitos após os tempos experimentais definidos. Aos 7 dias, não era esperada formação de tecido ósseo significativa, mas surpreendentemente, os espécimes desmineralizados com ácido cítrico demonstraram precocidade na produção de eventos regenerativos já nesse período. Durante os períodos experimentais foi possível observar como os espécimes tratados com acido cítrico apresentavam

maior formação óssea nos defeitos quando comparados com os controles e com os grupos onde empregados tetraciclina. Efeito provavelmente relacionado com a eliminação da parte mineral do osso e liberação de Proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento, liberados a partir da matriz óssea. Concluiu-se que a desmineralização com ácido cítrico do osso autógeno particulado enxertado em defeitos críticos promoveu maior área, volume e densidade de formação óssea do que a desmineralização com tetraciclina e do que a não desmineralização. Observando-se melhores resultados aos 15 e 30 segundos de desmineralização.

Palavras-chave: Proteínas ósseas morfogenéticas, enxerto ósseo, Periodontia, Ácido cítrico

ABSTRACT

Effect of demineralization of particulate autogenous bone graft in critical size defects in rat calvaria. Microscopic and microtomogrfic study.

Bone demineralization process has been shown useful in bone grafting procedures using onlay bone grafting, however its use in periodontics in bony autogenous particulate graft is not yet described in the literature. According to the literature you can see that there are different demineralizantes agents in clinical practice which can be used in bone demineralization process, which is why this study was to compare two different demineralization agents of bone autogenous particulate graft (citric acid pH1 the 50% tetracycline Hydrochloride and 50mg / ml) in different application time, the effect produced in the repair of critical defects in rat calvarium. 120 adult male rats with approximately 4 months of age were used. In this study we used the 8mm critical defect model, the animals were divided into 8 study groups consisting of 15 animals (5 in each experimental period): CN (negative control): the defect remained free graft; CP (positive control): the defects were filled by non-demineralized bone particles; AC 15: The defects were filled with demineralized bone particles of citric acid for 15 seconds; AC 30: defects were filled with demineralized bone particles of citric acid for 30 seconds; AC 60: The defects were filled with demineralized bone particles of citric acid for 60 seconds; TCN 15: defects were filled with demineralized bone particles tetracycline for 15 seconds; TCN 30: defects were filled with demineralized bone particles tetracycline for 30 seconds; TCN 60: defects were filled with demineralized bone particles tetracycline for 60 seconds. aeutanasia animals was performed at 7, 30 and 60 days for performing computed microtomography and histomorphometric analysis to assess the area, bone volume and density of the defects after the defined experimental times. At 7 days, it was not expected significant formation of bone tissue, but surprisingly, samples demineralized with citric acid demonstrated earliness in the production of regenerative events already during this period. During the experimental periods was possible to observe how the specimens treated with citric acid showed increased bone formation in defects when compared to controls and to groups where employees tetracycline. Effect probably related to the disposal of the mineral part of

bone and release of bone morphogenetic proteins and factors of growth, released from the bone matrix concluded that the demineralisation by citric acid particulate autogenous bone graft in critical defects caused greater area, volume formation and bone density than tetracycline demineralization and demineralization that do not. Observing better results at 15 and 30 seconds demineralization.

Key words: Bone morphogenetic protein, Bone graft, Periodontics, Citric Acid

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Sequência de procedimentos cirúrgicos para obtenção das amostras	48
Figura 2	- Tela do computador mostrando as imagens obtidas após escaneamento das peças com o Microtomografo.....	50
Figura 3	- Tela do computador do programa desenhado para realizar as medições de área de preenchimento, volume e densidade óssea das amostras	51
Figura 4	- Tela do computador do Adobe Photoshop com as imagens dos cortes teciduais.....	52
Figura 5	- Reconstruções das amostras ósseas após desmineralização óssea com Ácido Cítrico aos sete dias A. Amostra desmineralizada por 15 segundos. B. Amostra desmineralizada por 30 segundos. C. Amostra Desmineralizada por 60 segundos.....	57
Figura 6	- Reconstruções das amostras ósseas após desmineralização óssea com Ácido Cítrico aos trinta dias A. Amostra desmineralizada por 15 segundos. B. Amostra desmineralizada por 30 segundos. C. Amostra Desmineralizada por 60 segundos.....	59
Figura 7	- Reconstruções das amostras ósseas após desmineralização óssea com Ácido Cítrico aos sessenta dias A. Amostra desmineralizada por 15 segundos. B. Amostra desmineralizada por 30 segundos. C. Amostra Desmineralizada por 60 segundos.....	61
Figura 8	- Controles positivo e negativo após 30 e 60 dias. A. Controle negativo após 30 dias. B. Controle Negativo após 60 dias. C. Controle Positivo após 30 dias D. Controle Positivo após 60 dias.....	63

Figura 9 - Cortes histológicos do grupo controle negativo A. Controle negativo após sete dias. B. Controle negativo após 60 dias.....	65
Figura 10 - Cortes histológicos do grupo controle positivo após 7, 30 e 60 dias. A. Controle Positivo após 7 dias. B. Controle Positivo após 30 dias. C. Controle Positivo após 60 dias.....	67
Figura 11 - Cortes histológicos do grupo AC15 após 7, 30 e 60 dias. A. AC 15 após 7 dias. B. AC 15 após 30 dias. C. AC 15 após 60 dias.....	69
Figura 12 - Cortes histológicos do grupo AC30 após 7, 30 e 60 dias. A. AC 30 após 7 dias. B. AC 30 após 30 dias. C. AC 30 após 60 dias.....	73
Figura 13 - Cortes histológicos do grupo AC60 após 7, 30 e 60 dias. A. AC 60 após 7 dias. B. AC 60 após 30 dias. C. AC 60 após 60 dias.....	75
Figura 14 - Cortes histológicos do grupo TCN 15 após 7 e 60 dias. A. TCN 15 após 7 dias. B. TCN 15 após 60 dias.....	77
Figura 15 - Cortes histológicos do grupo TCN 30 após 7, 30 e 60 dias. A. TCN 30 após 7 dias. B. TCN 30 após 30 dias. C. TCN 30 após 60 dias.....	79
Figura 16 - Cortes histológicos do grupo TCN 60 após 7, 30 e 60 dias. A. TCN 60 após 7 dias. B. TCN 60 após 30 dias. C. TCN 60 após 60 dias.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais resultados de estudos sobre reparo de defeitos críticos de 8mm em calvária de ratos	37
Tabela 2 - Área média de tecido mineralizado no defeito crítico avaliada por μ -CT	59
Tabela 3 - Volume médio de tecido mineralizado no defeito crítico avaliado por μ -CT	61
Tabela 4 - Densidade média de tecido mineralizado no defeito crítico	63
Tabela 5 - Análise histomorfométrica da porcentagem de área ocupada por tecido mineralizado no interior dos defeitos críticos.....	83

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru
MMPs	Metaloproteinases da matriz
μCT	Microtomografia computadorizada
HA	Hidroxiapatita
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
TCN	Tetraciclina ácida
DBB	Osso desmineralizado bovino
AB	Osso autógeno
HA-TCP	Hidroxiapatita em associação com fosfato tricálcico
PLGA	Ácido poliglicólico
N-HA	Derivado da casca do ovo
DFDBA	Osso iofilizado desmineralizado alógeno
EMD	Proteína derivada na matriz do esmalte
OBS	Células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo
TCN	Células endoteliais derivadas do tecido adiposo
CTDA	Células tronco indiferenciadas derivadas do tecido adiposo
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
AC	Ácido cítrico
GTCE	Granuloma do tipo corpo estranho
TGI	Tecido de granulação imaturo
TGM	Tecido de granulação maduro
TCFM	Tecido conjuntivo fibroso maduro
TCFNO	Tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea
ANOVA	Análise de variância a dois critérios
GTCE	Granuloma do tipo corpo estranho
TGI	Tecido de granulação imaturo
TGM	Tecido de granulação maduro

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
μm	Micrometro unidade de comprimento
mm	Milímetro (unidade de comprimento)
mm^2	Milímetro quadrado (unidade de comprimento)
g	Gramma (unidade de massa)
mg	Miligramma (unidade de massa)
mm^3	Milímetro cubico (unidade de comprimento)
cm^3	Centímetro cubico (unidade de área)
mL	Mililitro (unidade de volume)
<	Menor que
μCT	Microtomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	DESMINERALIZAÇÃO ÓSSEA.....	27
2.2	REPARO DE DEFEITOS CRITICOS.....	30
2.2.1	ESTUDOS HISTOMORFOMETRICOS	31
2.2.2	ESTUDOS EMPREGANDO μ CT.....	35
2.3	MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ -CT).....	38
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	SELEÇÃO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA.....	47
4.2	PROCEDIMENTO CIRURGICO DE CRIAÇÃO E PREENCHIMENTO DOS DEFEITOS CRITICOS.....	47
4.3	MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)	50
4.4	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA QUALITATIVA	51
4.4.1	CRITÉRIOS APLICADOS NA ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA.	52
4.5	ANÁLISE HISTOMORFOMETRICA	53
5	RESULTADOS	55
5.1	ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ - CT).....	57
5.1.1	ÁREA DE TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO NO DEFEITO (mm ²).....	57
5.1.2	VOLUME DE OSSO NEOFORMADO NO DEFEITO (MM ³)	59
5.1.3	DENSIDADE DE OSSO NEOFORMADO NO DEFEITO (MG/MM ³)	61
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA	65
5.2.1	GRUPO CN	65
5.2.2	GRUPO CP	65

5.2.3	GRUPO AC15	69
5.2.4	GRUPO AC30	71
5.2.5	GRUPO AC60	75
5.2.6	GRUPO TCN15	77
5.2.7	GRUPO TCN30	79
5.2.8	GRUPO TCN60	81
5.3	ANÁLISE HISTOMOFOMÉTRICA.....	83
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	117

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da terapia periodontal é deter o processo de doença e regenerar os tecidos periodontais perdidos estimulando a formação de novo osso, novo cemento e novo ligamento periodontal (PASSANEZI et al., 2011) mantendo as características ultraestruturais e morfológicas originais (AVILA et al., 2009; CORTELLINI; BOWERS, 1995).

A destruição tecidual causada pela progressão da doença periodontal pode resultar em grandes defeitos ósseos os quais podem ser muito difíceis de reconstruir (ALFOTAWEI et al., 2014). Assim, os enxertos ósseos foram estabelecidos como tratamento de defeitos infraósseos, a fim de melhorar o reparo e inserção de novo osso ao cemento (HEGEDUS, 1923; SCHALLHORN, 1997). Graças aos avanços na tecnologia e na engenharia tecidual, vários materiais de enxertia óssea têm sido desenvolvidos para o tratamento desses defeitos, incluindo materiais autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos que servem de arcabouço para a formação tecidual, podendo ajudar na diferenciação de células osteoprogenitoras (ELDESOQUI et al., 2014).

Entre os diferentes biomateriais, o osso autógeno é reconhecido como “padrão ouro”, porque reúne características ideais como biocompatibilidade, capacidade osteogênica e osteoindutiva (CARRULLI et al., 2013) e baixo risco de reações imune adversas (HSIONG; MOONEY, 2006). Entretanto, alguns problemas têm sido citados para o uso de material autógeno na região craniofacial, como morbidade do sitio doador, quantidade limitada de tecido para enxertia, irregularidades na morfologia, reabsorção imprevisível do enxerto, necessidade de sítios cirúrgicos adicionais e tempo clínico aumentado (AICHELMANN-REIDY; YUKNA, 1998, KIM et al., 2012). Por isso, novas técnicas cirúrgicas e novos biomateriais ainda têm sido alvos de estudos frequentes.

O osso humano liofilizado desmineralizado é reconhecido por estimular a formação de osso através de osteoindução (LIBIN; WARD; FISHMAN, 1975), sendo que a desmineralização imposta pelo processo de liofilização expõe proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) localizadas na matriz óssea, que induzem a

diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras (URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983). Defeitos periodontais preenchidos com biomateriais contendo BMPs têm resultado em diminuição da profundidade de sondagem e ganho no nível clínico de inserção periodontal (MEADOWS, et al., 1993; PEARSON; ROSEN; DEPORTER, 1981; QUINTERO, et al., 1982; SONIS; KABAN; GLOWACKI, 1983).

A exposição artificial de BMPs inerente ao osso liofilizado despertou a atenção de pesquisadores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) que o relacionaram com o processo fisiológico de remodelação óssea (REZENDE et al., 2014), já que a reparação óssea se inicia pela proliferação de células clásticas, que utilizam substâncias ácidas para eliminar a fase mineral dos tecidos, expondo seu conteúdo proteico previamente à fase de deposição de novo tecido (LI; ZHANG; KIRNERS, 2003; LORENZO, et al., 1992; POLSON; PROYE, 1983; GOLDBERG; STEVENSON, 1987; ACCORSI-MENDONCA, et al, 2008, URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983; URIST 1965; URIST et al., 1968; URIST; DOWELL, 1968; URIST, 1968). A observação desse processo natural levantou a hipótese de que a desmineralização artificial do osso *in situ* pelo uso de ácidos, durante procedimentos cirúrgicos regenerativos poderia antecipar um dos eventos da remodelação óssea, que é a reabsorção e, conseqüentemente, acelerar o processo de reparo.

O uso de substâncias ácidas em Odontologia não é recente. Desde o século passado, Buonocore (1955) apresentou um método simples para aumentar a adesão da resina acrílica à superfície do esmalte, onde se verificou que essa adesão era maior quando o esmalte era desmineralizado com ácido fosfórico a 85% por 30 segundos, do que sem desmineralização. Antes disso, Stewart (1889), na tentativa de eliminar bactérias de sítios periodontais, já preconizava o uso de ácido clorídrico ou sulfúrico na superfície radicular, estabelecendo-se como pioneiro para que outros estudos surgissem no campo da biomodificação de superfícies de dentina e cimento (BAL; EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992) e paralelamente, na desmineralização de enxertos alógenos com o objetivo de potencializar os processos reparativos em tratamentos cirúrgicos (URIST, 1965; URIST, et al., 1968; LEWANDROWSKI, et al., 1997).

A desmineralização ácida também proporciona a liberação de enzimas proteolíticas chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs) das quais a osteogênese e a remodelação óssea são dependentes, uma vez que osteoblastos e osteoclastos expressam MMPs (LI; ZHANG; KIRNERS, 2003). A elas se atribui participação nos processos de formação e remodelação óssea, salientando que as MMPs-2 e -9, na forma ativa ou inativa, são expressas por células osteogênicas e do tecido conjuntivo durante as diferentes etapas da regeneração óssea alveolar, na substituição do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo, durante a formação, na maturação e na remodelação de novo osso (LORENZO et al., 1992).

O primeiro trabalho a empregar desmineralização óssea *in situ* com o objetivo de acelerar o reparo, foi o de Rezende. (2008) ao desmineralizar com ácido cítrico pH 1 a 50% por 3 minutos, as superfícies de contato de enxertos ósseos autógenos em bloco realizado em calvária de cobaias. A autora observou que nos espécimes tratados com ácido houve aumento da formação e da densidade do novo osso na interface enxerto-leito, assim como da extensão das superfícies de consolidação óssea. A análise dos resultados permitiu a conclusão de que essa nova abordagem de tratamento promoveu a osteogênese na interface e acelerou a consolidação desses enxertos. Esses resultados foram posteriormente confirmados em coelhos por Rodrigues et al. (2012) e Domingues (2013) e em cultura de células por Rezende et al. (2015), que verificaram que a migração, adesão e proliferação de pré-osteoblastos em osso fresco desmineralizado eram mais intensas do que em osso não desmineralizado.

Esses resultados promissores suscitaram a investigação sobre os possíveis efeitos benéficos da desmineralização ácida quando usada em osso autógeno particulado no reparo de defeitos ósseos circunscritos, para eventual aplicação em defeitos periodontais.

Defeitos críticos produzidos em animais têm sido empregados para estudar o comportamento de diferentes tipos de enxerto quanto ao seu potencial emprego em periodontia (MOKBEL et al., 2008) e constituem-se em um passo importante e necessário no estudo de novos biomateriais, para acrescentar informações indispensáveis para o conhecimento de seu comportamento antes de sua aplicação clínica (NAGATA, et al., 2009; INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007; OLIVEIRA et

al., 2008; SPICER, et al., 2012; MESSORA, et al., 2008; ALHAG, et al., 2011; DONOS et al., 2011; SCHWARZ, et al., 2009; DE ALMEIDA et al., 2013; NAGATA et al., 2013; MOKBEL et al., 2013; MARQUES, et al., 2014; CUNHA, et al., 2014).

Entretanto, as imagens obtidas para microscopia óptica não representam o espécime como um todo, o que pode levar a erros de interpretação de um dado fenômeno. A microtomografia computadorizada (μ CT) revolucionou o diagnóstico clínico desde sua introdução no início dos anos 1970 e pode compensar essa deficiência por oferecer visão tridimensional do objeto de estudo como um todo, antes da amostra ser processada para microscopia (HOUNSFIELD, 1973). A disponibilidade de sistemas comerciais com resolução microscópica e capacidade para imagens *in vivo* e *in vitro* abriu novas aplicações para μ CT como potencial para substituir a série histológica como padrão de referência e para obtenção de informação quantitativa para as investigações (HOLDSWORTH; THORNTON, 2002), inclusive para complementar a análise histomorfométrica no estudo do reparo de defeitos críticos demonstrando ser este, um modelo confiável e reproduzível para esse tipo de avaliação (LUVIZUTO, et al., 2011).

À luz dos argumentos expostos, esta dissertação se propôs a avaliar microscopicamente e por meio de μ CT, o comportamento de enxertos ósseos autógenos particulados desmineralizados em defeitos críticos em calvária de ratos visando a um futuro emprego no reparo de defeitos periodontais.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESMINERALIZAÇÃO ÓSSEA

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

O primeiro passo do mecanismo de remodelação óssea é a desmineralização local, por meio da produção de ácidos pelos osteoclastos (MELCHER, 1976). Essas substâncias ácidas dissolvem a fase mineral e liberam enzimas da superfície óssea, hidrolisando a matriz orgânica e formando cavidades ou lacunas que logo são preenchidas por proteínas produzidas pelos osteoclastos as quais atuam como substrato para a adesão e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (DODDS et al., 1995)

A desmineralização óssea artificial ganhou expressão na década de 1960, quando vários trabalhos de Urist (URIST 1965; URIST et al., 1968; URIST; DOWELL, 1968; URIST, 1968) demonstraram em animais, a capacidade de indução óssea intramuscular de diferentes substratos após serem desmineralizados *in vitro*, provendo suficiente evidência para a teoria de indução óssea por meio da desmineralização. Baseado nesses resultados, Urist (1965) foi quem primeiro utilizou o termo BMP. As BMPs são parte da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), essenciais para a formação óssea endocondral (MAIA et al., 2013). Sua liberação ocorre de acordo com o nível de desmineralização (PIETRZAK et al., 2012). Mais de 15 BMPs já foram identificadas e caracterizadas, sendo as únicas, entre os fatores de crescimento a influenciar a proliferação e diferenciação de osteoblastos, uma vez que têm a capacidade de instituir este processo a partir de células progenitoras *in vitro*, bem como *in vivo* (MAIA et al.,

2013). Possuindo papel osteoindutivo multifacetado, presume-se que as BMPs funcionam como fatores quimiotáticos que iniciam o recrutamento de células progenitoras e promovem a maturação destas células em condrócitos, osteoblastos e osteócitos (KHOJASTEH et al., 2013).

Foi observado que fibras colágenas, fatores de crescimento e outras citocinas são expostos no processo de desmineralização também de dentina e são capazes de regular a diferenciação de células osteoprogenitoras (SCHWARTZ et al., 2000). Sendo o colágeno um dos elementos mais abundantes no osso (WALLACE et al., 2014), é de se supor que esses mesmos eventos possam ocorrer em superfícies ósseas desmineralizadas.

Entretanto, poucos trabalhos relataram o potencial efeito da desmineralização óssea *in situ* no reparo ósseo. Enxertos em blocos ósseos tipo *onlay* foram realizados em calvária de cobaias por Rezende et al. (2014), que verificaram maior consolidação e densidade do osso neoformado quando a interface enxerto-leito foi desmineralizada por 3 minutos com ácido cítrico pH 1 a 50 %. Análises histomorfométricas demonstraram que o procedimento de desmineralização resultou em neoformação óssea e consolidação dos enxertos aos 30 dias, só alcançados pelos espécimes não desmineralizados aos 60 dias, antecipando, pois, os eventos de reparo. Foi sugerido que a desmineralização seria uma alternativa vantajosa sobre a perfuração e/ou desgaste do leito como métodos para melhorar a consolidação dos enxertos, por não apresentar risco de reabsorção e preservar a estrutura óssea já fragilizada pela reabsorção natural.

Resultados semelhantes já haviam sido alcançados por Domingues (2013) em tíbias de coelhos onde a desmineralização da interface enxerto *onlay*-leito receptor foi realizada com ácido cítrico por 3 minutos. Após 15, 30 e 45 dias, foi observado histomorfometricamente que a desmineralização resultou em maior área de formação óssea e maior extensão de superfícies ósseas consolidadas, especialmente aos 30 dias.

O processo de desmineralização também melhorou o comportamento elástico de enxertos em bloco *onlay* realizados por Rodrigues et al. (2012) em tíbias de coelhos. Os autores observaram que o módulo de elasticidade da interface

enxerto/leito receptor desmineralizada por ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 24 % durante 3 minutos foi maior, aos 90 dias, do que em amostras não desmineralizadas, sugerindo que inserção de implantes nesta interface pode ocorrer com menor risco de destacamento do enxerto.

Procurando entender os fenômenos que justificariam os bons resultados observados com a desmineralização de enxertos ósseos, Rezende et al. (2015) estudaram em calvária de cobaias, o efeito da desmineralização superficial do osso fresco com ácido cítrico pH 1 ao 50% durante 15, 30 e 180 segundos sobre o comportamento de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre essas superfícies por 24, 48 e 72 horas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou que a desmineralização ácida produziu maior área óssea de cobertura por células e diferenciação mais rápida dos pré-osteoblastos em comparação a amostras não desmineralizadas, especialmente nos tempos de 15 e 30 segundos. Os autores ressaltaram que o procedimento poderia ser vantajoso nos procedimentos que visam à regeneração de defeitos ósseos.

Foi também demonstrado recentemente que o procedimento de desmineralização superficial com ácido cítrico pode alterar a composição química e a topografia superficial do osso fresco podendo essas alterações, influenciar o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 (SALMERON, 2015). Levando-se em conta que o diâmetro médio de uma célula pré-osteoblástica varia entre 26,82 μm a 41,07 μm (HULE et al., 2008; SONG; MANO, 2013; SUDO et al., 1983; YOU et al., 2011), Salmeron (2015) verificou que, após a desmineralização com ácido cítrico a 10% ou 50% durante 30 segundos, formaram-se picos e depressões de forma regular nas superfícies ósseas de calvárias de ratos. A distância média entre dois picos foi de aproximadamente 30 μm , compatível portanto, com o reconhecimento das superfícies pelas células como rugosas (BRUNETTE, 1986) por encontrarem-se aproximadamente dentro do perímetro celular, o que inibiria a migração celular, mas favoreceria sua diferenciação (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; SAN MIGUEL et al., 2010). A autora também verificou que após 24, 48 e 72 horas em cultura, os pré-osteoblastos recobriam maior área de superfície e em maior espessura de camadas celulares sobre os espécimes desmineralizados do que nos não desmineralizados. Além disso, as células apresentaram características morfológicas compatíveis com

estágios mais avançados de diferenciação do que as células cultivadas sobre superfícies não desmineralizadas. No mesmo estudo, foi verificado por microscopia confocal, que houve maior expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 nas superfícies desmineralizadas do que nas superfícies controle, o que levou à conclusão de que a desmineralização de superfícies ósseas parece contribuir para antecipar os eventos biológicos que resultam na deposição de novo osso.

Uma recente revisão de literatura constatou que a desmineralização artificial do tecido ósseo antecipa o processo fisiológico dos osteoclastos por meio da eliminação da parte mineral com o intuito de expor a matriz orgânica, aumentando a biodisponibilidade de citocinas e fatores de crescimento que estejam contidos nesta fase orgânica do osso (ROJAS-PAULUS et al., 2015), mas nenhum estudo foi encontrado empregando a tetraciclina ácida (TCN) como agente desmineralizante. Em procedimentos periodontais regenerativos, a TCN tem sido empregada como biomodificador radicular em substituição ao ácido cítrico e ao EDTA (NAGATA et al., 2005; ABED et al., 2013; MARIOTTI, 2003), com efeitos benéficos como inibição da collagenase (GOLUB et al., 1985; GOLUB et al., 1991), capacidade antimicrobiana e anti-inflamatória (GLABER; CREAMER, 1991; WIKESJÖ et al., 1986), inibição da reabsorção óssea (RIFKIN; VERNILLO; GOLUB, 1993) e promoção da formação óssea (WIKESJO; SELVIG, 1999). Entretanto, outros estudos demonstraram efeitos nocivos da TCN sobre a neoformação óssea, uma vez que sua presença no meio pode inibir a expressão de BMPs (MUTHUKURU; SUN, 2013), inibir MMPs (GOLUB et al., 1991) e causar uma doença pigmentativa conhecida como “black bone disease” (PANDIT; HADDEN, 2004).

2.2 REPARO DE DEFEITOS CRÍTICOS

O termo defeito crítico é definido como o menor defeito ósseo criado numa espécie animal que não pode ser regenerado espontaneamente, de forma que, em lugar de ser preenchido por osso, esse defeito é preenchido por tecido conjuntivo fibroso (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SPICER et al., 2012). Materiais ou estratégias para regeneração óssea completa têm sido testados nesses defeitos no estabelecimento de terapias regenerativas (SPICER et al., 2012). Entretanto, alguma

controvérsia existe com respeito ao diâmetro dos defeitos para que sejam considerados críticos. Em ratos, o diâmetro de 8 mm tem sido recomendado por alguns autores (MOKBEL et al., 2008; SPICER et al., 2012; HEO et al., 2015; MARQUES et al., 2014), enquanto que existem trabalhos que empregaram 9 mm (LEACH et al., 2006; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011), 7 mm (AGACAYAK et al., 2012), 6 mm (ELDESOQI et al., 2014), 5 mm (DE ALMEIDA et al., 2013; MARQUES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015) e 4 mm (LEE et al., 2015; NOTODHARDJO et al., 2010). Cooper et al. (2010) observaram que em pequenos defeitos considerados não-críticos (2,3 mm) no modelo murino, somente foi alcançado 35% de reparo ósseo, dados que os levaram a sugerir que embora os ratos tenham sido considerados um modelo confiável na avaliação de potencial de reparo de biomateriais, pequenos defeitos não têm o potencial de um modelo de rápido reparo ósseo craniofacial. Entretanto com os avanços tecnológicos, a cada dia é possível fazer uma avaliação mais detalhada das diferenças da quantidade e qualidade de formação óssea em pequenos defeitos.

Nesta revisão de literatura, foram selecionadas apenas as publicações que consideraram defeitos de 8 mm de diâmetro e com metodologia semelhante à desta dissertação para facilitar a comparação dos resultados.

2.2.1 ESTUDOS HISTOMORFOMÉTRICOS

Múltiplos biomateriais têm sido testados quanto à efetividade no fechamento de defeitos críticos. Será dada ênfase aos estudos que tiveram pelo menos um grupo constituído de osso autógeno ou alógeno para fins de comparação dos resultados com os desta dissertação.

Um estudo de Oliveira et al. (2008) compararam os resultados da implantação de osso desmineralizado bovino (DBB) e osso autógeno (AB) em defeitos críticos criados na calvária de 50 ratos machos de 3 meses de idade aos 7, 14, 21, 30 e 90 dias pós-operatórios (n=5). Seus dados demonstraram superioridade do AB em todos os períodos estudados. Assim, a porcentagem de tecido ósseo neoformado nos defeitos foram para AB e DBB respectivamente aos 7 dias, de 4,51% e 1,86%; aos 30 dias, de 40,23% e 8,87%. Aso 90 dias, os defeitos implantados com AB estavam completamente fechados enquanto que os tratados com DBB

apresentaram substituição do biomaterial por tecido conjuntivo fibroso já aos 21 dias. Esses dados levaram os autores à conclusão de que, apesar da presença de BMPs em enxertos ósseos desmineralizados com seu potencial efeito na indução da formação óssea, o biomaterial empregado em seu estudo não foi capaz de suplantar o osso autógeno nesse quesito.

Mais tarde, em 2012, Zambuzzi et al. (2012), que são pesquisadores do mesmo grupo de Oliveira et al. (2008), estudaram o comportamento do osso anorgânico bovino como carreador de pré-osteoblastos MC3T3-E1 no reparo de defeitos críticos semelhantes. Coágulo (controle negativo), osso autógeno (controle positivo) e o biomaterial sozinho foram empregados para comparação. Depois de 30 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à quantidade de osso neoformado, com exceção feita em relação ao osso autógeno que se comportou muito melhor que os demais grupos, mostrando preenchimento de cerca de 20% do defeito enquanto que o biomaterial com MC3T3-E1 obteve 10%, o biomaterial sozinho, cerca de 7% e células apenas e coágulo, ambos com apenas 5% de preenchimento. Em suas conclusões, os autores argumentaram que, embora não tenha havido superioridade da combinação células + biomaterial sobre o osso autógeno, o biomaterial apresentou como vantagem, servir como veículo para levar células osteoprogenitoras para o ambiente da ferida.

Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substitutos ósseos impregnados com proteína morfogenética óssea recombinante humana-2 (rhBMP-2), Mokbel et al. (2013) realizaram defeitos críticos de 8 mm na calvária de 24 ratos (Sprague Dawley). Os defeitos foram preenchidos por um dos seguintes biomateriais: 1) osso bovino inorgânico e rhBMP-2; 2) osso alógeno liofilizado e rhBMP-2; e 3) osso autógeno. Um grupo controle foi deixado sem tratamento. Após oito semanas, foi realizada histomorfometria em cortes teciduais não descalcificados empregando um programa computadorizado analisador de imagem. Nos cortes, a área média de formação óssea foi de 4,00 mm² (50%) no grupo 1; 2,56 mm² (32%) no grupo 2; e 2,30 mm² (28,7%) no grupo 3. O grupo controle apresentou apenas 0,82 mm² (10,25%) de área média de osso neoformado. Os grupos 2 e 3 não apresentaram diferença estatística entre si. Os autores concluíram que a incorporação de rhBMP-2 aos diferentes substitutos ósseos foi eficaz na melhora da capacidade regenerativa dos defeitos críticos.

Anos antes, Mokbel et al. (2008) já haviam empregado a mesma metodologia em 24 ratos Sprague-Dawley de 1 mês de vida, 8 semanas após o preenchimento com osso desproteínizado bovino (grupo Bio-Oss) coberto (grupo XO) ou não por membrana reabsorvível (grupo XOCM), enxerto alógeno liofilizado (grupo DFDBA), Bio-Oss associado a colágeno (grupo XOC) e osso autógeno (grupo controle). Maior formação óssea nos defeitos foi produzida pelo osso autógeno ($2,97 \pm 1,82 \text{ mm}^2$; 37,1 %) seguido do DFDBA ($2,93 \pm 1,93 \text{ mm}^2$; 36,6%) e XOC ($2,25 \pm 1,94 \text{ mm}^2$; 28,1%). Os grupos XO, XOCM e controle não mostraram diferença estatisticamente significativa, apresentando $1,97 \pm 1,64$ (24,6%), $1,87 \pm 1,07$ (23,3%) e $1,85 \pm 1,04 \text{ mm}^2$ (23,1%) respectivamente. Com isso, os autores comprovaram a superioridade do osso autógeno em relação aos biomateriais testados, mas ressaltaram que estes apresentam quase os mesmos padrões de cicatrização e propriedades osteocondutivas que o osso autógeno.

Já a HA em diferentes formas de apresentação foi estudada quanto ao potencial regenerativo por outros autores. Fleckenstein et al. (2006) enxertaram HA bifásica micro e macroporosa em associação com fosfato tricálcico (HA-TCP), e com DFDBA em calvária de 44 ratos (Sprague-Dawley). A análise histomorfométrica realizada após 10 semanas demonstrou preenchimento de 47% do defeito nos espécimes enxertados com DFDBA; 19,7% nos espécimes enxertados com HA-TCP macroporosa e 8,5% com HA-TCP microporosa. Os autores concluíram que a superioridade da HA-TCP macroporosa pode ser devida à sua característica de auto-manutenção de espaço e tamanho de poros compatível com a penetração de vasos neoformados, além de servir como carreador para fatores de crescimento como BMPs.

Um composto de ácido poliglicólico e HA (PLGA/H) foi desenvolvido e testado por Kim e Kim (2008) isoladamente ou em associação com osso bovino desproteínizado (Bio-Oss) para comparação com gel de fibrina no preenchimento de defeitos críticos (n=6) em ratos machos Sprague-Dawley. Depois de 8 semanas, os resultados foram comparáveis (cerca de 3,5% de preenchimento dos defeitos), não havendo superioridade da combinação PLGA/HA sobre o Bio-Oss puro. Além disso, o PGLA não tinha ainda sido reabsorvido e não houve remodelação das partículas de HA. Nos defeitos preenchidos apenas com gel de fibrina não houve formação óssea, estando presente apenas tecido conjuntivo fibroso.

Outro biomaterial alternativo, derivado da casca do ovo (N-HA), também obteve bons resultados no preenchimento de defeitos críticos de 8 mm realizados em calvária de ratos em comparação ao Bio-Oss e à combinação N-HA + sulfato de cálcio (PARK et al., 2009). Uma análise histomorfométrica demonstrou maior porcentagem de neoformação óssea nos espécimes tratados com N-HA (11,2% e 19,2% às 4 e 12 semanas respectivamente) em comparação a defeitos não preenchidos (3,9% e 6,4% às 6 e 12 semanas respectivamente), preenchidos com Bio-Oss (6,4% e 8,2% às 6 e 12 semanas respectivamente) e com a associação N-HA + sulfato de cálcio (6,3% e 12,6% às 6 e 12 semanas respectivamente). Assim, foi constatado que N-HA comportou-se como um substituto ósseo osteocondutivo e que não existe nenhum benefício na adição de sulfato de cálcio ao N-HA.

Outra proposta foi a de verificar o efeito do recobrimento do material enxertado em defeitos críticos com membranas reabsorvíveis (BioMesh) ou não reabsorvíveis (Millipore), para conter o material, evitando sua dispersão. Assim, Lim et al. (2000) após enxertarem DFDBA humano em defeitos criados na calvária de 120 ratos Sprague–Dawley, cobriram os defeitos com as membranas e verificaram que esse procedimento aumentava significativamente a quantidade de tecido ósseo neoformado nos defeitos. Os dados histomorfométricos quanto à área de neoformação óssea foram apresentados em mm², sendo que aos 7 dias, o DFDBA não recoberto por membrana apresentou o melhor resultado (7.48 ± 4.51). Às 4 e 8 semanas, maior área de osso neoformado foi vista quando o DFDBA foi recoberto pela membrana reabsorvível (23.62 ± 6.77 e 49.53 ± 23.70 respectivamente). Defeitos controle não preenchidos não apresentaram neoformação óssea significativa em nenhum tempo de observação, com predominância de tecido conjuntivo fibroso. Os autores observaram que é necessário que a membrana permaneça por no mínimo 5 semanas para que melhores resultados sejam obtidos. Atribuíram os bons resultados da regeneração guiada pelo melhor controle da inflamação, especialmente na prevenção da invasão de macrófagos e de tecido conjuntivo.

2.2.2 ESTUDOS EMPREGANDO μ CT

O volume, a área e a densidade de osso neoformado também foram estudados por Intini et al. (2008) em defeitos críticos de 8 mm realizados em calvária de 25 ratos (Sprague-Dawley). Os defeitos (n=5) foram preenchidos por 25 μ l de proteína derivada na matriz do esmalte (EMD), ou osso liofilizado desmineralizado (DFDBA), ou por rhBMP-2 em veículo de colágeno liofilizado (controle). Após oito semanas, foram feitas análises microscópicas e por μ CT. Os cortes histológicos demonstraram que, no grupo controle, o reparo ósseo ficou limitado às margens do defeito e no centro foi visto apenas um tecido fibrótico maduro bem organizado; no grupo DFDBA, grânulos não reabsorvidos do biomaterial ainda estavam presentes em todo o defeito e o reparo ósseo esteve limitado à deposição de osteoide rico em osteócitos circundando alguns desses grânulos distantes das margens do defeito; os grupos EMD e controle mostraram limitada quantidade de reparo ósseo apenas nas margens dos defeitos e o centro foi ocupado por tecido conjuntivo fibroso maduro bem organizado. As análises por μ CT, por outro lado, não demonstraram diferenças estatísticas quanto ao volume, área, ou densidade de osso formado nos defeitos dos grupos DFDBA e EMD em comparação ao controle. O volume e a área de osso neoformado nos dois grupos teste corresponderam a apenas 12,5% e 20% respectivamente em relação às medidas originais do defeito e se mantiveram inferiores ao grupo controle. Quanto à densidade, apenas o grupo DFDBA apresentou um valor significativamente superior aos demais e não distinguível estatisticamente do osso normal (~620 mg/mm³). Os autores concluíram que o emprego isolado dos biomateriais estudados não tem efeito no reparo de defeitos críticos, sugerindo que seja considerado o seu descarte na terapia regenerativa óssea.

Algumas linhagens de células também foram alvo de estudo no reparo de defeitos críticos. Cornejo et al. (2012) estudaram células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo (OBS), endoteliais (ECS) e células tronco indiferenciadas derivadas do tecido adiposo (CTDA) associadas a enxertos ósseos alógenos liofilizados de origem murina para promover o reparo de 37 defeitos críticos de 8mm realizados em ratos (Lewis). As células foram adicionadas isoladamente aos enxertos sendo que em um grupo de animais foi feita a associação entre OBS e ECS. O volume e a

densidade da área enxertada foram avaliados por μ -CT e a vascularidade foi avaliada por imunohistoquímica. Após oito semanas, o volume ósseo encontrado no grupo ECS ($24,7 \text{ mm}^3$) foi significativamente maior do que nos demais grupos, seguido pelos grupos CTDA ($20,5 \text{ mm}^3$), ECS+OBS ($16,6 \text{ mm}^3$) e OBS ($16,3 \text{ mm}^3$), esses dois últimos, sem diferença em relação ao grupo controle que foi tratado apenas com osso autógeno sem associação com células. Embora maior densidade mineral tenha sido observada no grupo OBS ($1,30 \pm 0,06 \text{ gHA/cm}^3$), seguido pelos grupos controle ($1,29 \pm 0,004 \text{ gHA/cm}^3$), CTDA ($1,29 \pm 0,07 \text{ gHA/cm}^3$) e ECS+OBS ($1,28 \pm 0,07 \text{ gHA/cm}^3$), essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Já a quantidade de vasos neoformados foi significativamente maior no grupo ECS do que em todos os demais grupos. Com isso, os autores concluíram que a angiogênese favoreceu a neoformação óssea, sugerindo que a adição de ECS aos enxertos merece ser melhor investigada.

A tabela 1 resume os principais resultados desses estudos.

Tabela 1 – Resumo dos principais resultados de estudos sobre reparo de defeitos críticos de 8mm em calvária de ratos.

Autor	n	Material de preenchimento	Método de análise	Tempo de avaliação	Resultados
Lim et al. (2000)	5	1- DFDB 2- BioMesh 3- DFDB + BioMesh 4- Millipore 5- Controle vazio	Histomorfometria: área de osso neoformado em mm ²	1, 2, 4 e 8 semanas	1 semana: 7.48 (1), 2.88 (2), 6.43 (3), 2.57 (4), 0.43 (5) 4 semanas: 22.28 (1), 5.28 (2), 23.62 (3), 12.73 (4), 3.20 (5) 8 semanas: 33.99 (1), 8.75 (2), 49.53 (3), 37.07 (4), 4.35 (5)
Fleckenstein et al. (2006)	11	HA-TCP HA-TCP c/macro porosidades HA-TCP c/micro porosidade DFDBA	Histomorfometria: % de área ocupada por novo osso	10 semanas	HA-TCP: 6,9% Macro: 19,7% Micro: 8,5% DFDBA: 47%
Intini et al. (2008)	5	EMD DFDBA rhBMP-2 + colágeno liofilizado (controle)	μ -CT: volume (mm ³), área (mm ²) e densidade (mg/mm ³) de osso neoformado	8 semanas	Volume C: ~2; DFDBA: ~2,5; EMD: ~1; rhBMP-2: ~17 Área: C: ~40; DFDBA: ~40; EMD: ~30; rhBMP-2: ~230 Densidade: C: ~490; DFDBA: ~610; EMD: ~590; rhBMP-2: ~585
Kim e Kim (2008)	6	PLGA/HA, BioOss Gel de fibrina	Histomorfometria % de área de novo osso	8 semanas	PLGA/HA: ~3,3; Bio- Oss: ~3,5; Fibrina: 0
Mokbel et al. (2008)	6	XO: BioOss XOCM: BioOss + Bioguide DFDBA XOC: Pep Gen e colágeno AB: osso autógeno	Histomorfometria para área de formação óssea (mm ²) e % de preenchimento por novo osso	8 semanas	Área (mm ²): XO: 1,97 ± 1,64; XOCM: 1,87 ± 1,07; DFDBA: 2,93 ± 1,93; XOC: 2,25 ± 1,94; AB: 2,97 ± 1,82; C: 1,85 ± 1,04 % XO: 24,6; XOCM: 23,3; DFDBA: 36,6; XOC: 28,1; AB: 37,1; C: 23,1%
Oliveira et al. (2008)	5	AB: Osso autógeno DBB: Osso bovino desmineralizado	Histomorfometria de % de novo osso formado	7, 14, 21, 30 e 90 dias	7dias: AB- 4,51 ± 1,57; DBB - 1,86 ± 1,13; 14 dias: AB- 14,11 ± 6,61; BB - 12,02 ± 8,29 21 dias: AB- 29,93 ± 2,95; DBB- 11,83 ± 2,72 30 dias: AB- 40,23 ± 5,88; DBB- 8,87 ± 6 90 dias: AB- 53,54 ± 6,42; DBB- 15,62 ± 9,32

...continua

...continuação

Autor	n	Material de preenchimento	Método de análise	Tempo de avaliação	Resultados
Park et al. (2009)	7	Coágulo BO N-HA/CS NHA	Histomorfometria para % de preenchimento por novo osso	6 e 12 semanas	6 semanas: C- 3.9±2.1; N-HA- 11.2±3.3; BO- 6.4±4.3; N-HA/CS- 6.3±4.1 12 semanas: C- 6.4±4.8; N-HA- 19.2±6.1; BO- 8.2±3.9 N-HA/CS- 12.6±5.9
Cornejo et al. (2012)	10	Controle CTDA OBS ECS ECS + OBS	μ-CT: Volume (mm ³) Densidade (g/cm ³)	8 semanas	Volume Controle: 19.6 ± 2.8; CTDA: 20.5 ± 4.3; OBS: 16.3 ± 3.7; ECS: 24.7 ± 7.3; ECS+OBS: 16.6 ± 5.7 Densidade Óssea: Controle: 1.29±.04; CTDA: 1.29 ± .07; OBS: 1.30 ± .06; ECS: 1.28 ± .07; ECS + OBS: 1.29 ± .10
Zambuzzi et al. (2012)	ni	Coágulo AB OB anorgânico MC3T3-E1 OB + MC3T3-E1	Histomorfometria para % de preenchimento por novo osso	30 dias	Coágulo: 5% AB: 20% OB anorgânico: 7% MC3T3-E1: 5% OB + MC3T3-E1: 10%
Mokbel et al. (2013)	6	ABBM: BioOss + rhBMP-2 FDBA: Oragraft + rhBMP-2 AUTO Coágulo (C)	Histomorfometria para preenchimento ósseo (mm ²) e percentagem de novo osso (%)	8 semanas	Preenchimento ósseo: ABBM: 4,00 ± 1,69; FDBA: 2,56 ± 1,06; AUTO: 2,30 ± 0,34; C: 0,82 ± 0,25 % de novo osso ABBM: 50; FDBA: 32; AUTO: 28,7; C: 10,25%

- Publicações que alcançaram maior preenchimento ósseo
- Publicações que alcançaram preenchimento ósseo médio
- Publicações que alcançaram preenchimentos ósseo mínimo.

DFDBA: Osso alógeno iofilizado desmineralizado; AB: Osso autógeno BO: Bio Oss; CTDA: Células tronco indiferenciadas derivadas do tecido adiposo; ECS: células endoteliais; OBS: células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo

2.3 MICRO TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ-CT)

A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) tem sido preconizada como um método imaginológico confiável de avaliação tridimensional de estruturas mineralizadas (ALFOTAWAY et al., 2014). A partir dessa técnica foi desenvolvida a Micro tomografia computadorizada (μ-CT) que é uma técnica radiográfica sofisticada que permite uma avaliação quantitativa da estrutura óssea em três dimensões. A principal vantagem da técnica é a redução da dose de radiação quando comparada

com a tomografia convencional (ALFOTAWAY et al., 2014). Mesmo que as margens dos tecidos regenerados e o osso original sejam quase indiferenciáveis, a μ -CT pode ser uma ferramenta essencial para investigar a natureza da interface entre os tecidos calcificados regenerados e o osso próprio previamente existente podendo explorar a estrutura do cimento remanescente formado em raízes após procedimentos regenerativos, assim como o padrão de regeneração e trabeculado ósseo a formar-se após o uso de distintos biomateriais em engenharia tecidual (ALFOTAWAY et al., 2014; ANNIBALI et al., 2012; LEE et al., 2013).

A μ -CT também pode ser empregada na quantificação da geometria de arcabouços, análise de osso neoformado, neovascularização, e análise da matriz pré-óssea (ANNIBALI et al., 2014). Ainda, permite trabalhar menos invasivamente nos diferentes modelos animais laboratoriais, permitindo a avaliação do mesmo animal em vários períodos experimentais, reduzindo a quantidade dos mesmos e também, podendo caracterizar a estrutura dos tecidos moles e detectar anomalias ósseas (KALLAI et al., 2011; SPICER et al., 2012; ANNIBALI et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Além disso, a μ -CT tem sido comparada com análises histomorfométricas empregando microscópio óptico (PARK et al., 2011; LEE et al., 2013; PARK et al., 2014). Entretanto, as análises histológicas são limitadas a um corte feito no centro do defeito e suas informações não são imediatas como as da μ -CT (PARK et al., 2011). Ainda, a μ -CT vem sendo empregada na medicina regenerativa, provendo ao pesquisador a oportunidade de análises *in vivo* e *ex vivo* das características macro e microestruturais do tecido (KALLAI et al., 2011), bem como do cálculo do volume ósseo com menor margem de erro (16%) do que com histomorfometria convencional (MARÉCHAL et al., 2005).

Outra vantagem importante é que a análise realizada por meio de μ -CT pode ser feita até quando a área de interesse está coberta por membranas de titânio, estando a mesma sempre concordando com os resultados das análises histomorfométricas (KIGAMI et al., 2014).

Entre as desvantagens da μ -CT encontra-se o diâmetro da câmara de escaneamento dos aparelhos, que limita o tamanho das amostras de tecido a serem

analisadas, assim como a não detecção de tecido osteoide devido ao seu baixo conteúdo mineral (ANNIBALLI et al., 2013). Além disso, protocolos específicos são necessários para a utilização da μ -CT, podendo alguns demorar até 3,5 horas por amostra, dependendo do tipo de amostra óssea, tipo de equipamento usado e experiência do operador (KALLAI et al., 2011).

Resumidamente, a μ -CT funciona por meio de um programa de computador que converte em imagens tridimensionais as imagens ou cortes obtidos de um *scanner* que está conectado ao computador, gerando assim imagens mais reais do defeito a ser avaliado. O processo requer que as amostras sejam mantidas em um ambiente estável durante o escaneamento, já que a não estabilidade pode introduzir distorções ou não viabilizar a reconstrução do objeto no programa (SPICER et al., 2012).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi comparar dois diferentes agentes desmineralizantes de enxertos ósseos autógenos particulados (ácido cítrico pH1 a 50% e tetraciclina hidrocloreto a 50mg/ml) em diferentes tempos de aplicação, quanto ao efeito produzido no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar por meio de microtomografia computadorizada, a área, volume e densidade óssea nos defeitos após 7, 30 e 60 dias pós-operatórios;
 - Avaliar por meio de análise histomorfométrica, a área, volume e densidade óssea nos defeitos após 7, 30 e 60 dias pós-operatórios;
 - Comparar os dois agentes desmineralizantes entre si, com um controle negativo desprovido de enxerto e com um controle positivo constituído de enxerto ósseo não desmineralizado, quanto aos parâmetros estabelecidos nos itens anteriores.
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisas em Animais (processo 016/2013) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

4.1 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA:

Foram utilizados 120 ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus* – Var. albinus rodentia mammalia), pesando cerca de 300-400 gramas, com aproximadamente 4 meses de vida, criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Os animais receberam uma dieta constituída de ração e água fornecidos à vontade (Labina – Purina, Paulínia, SP).

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE CRIAÇÃO E PREENCHIMENTO DOS DEFEITOS CRÍTICOS:

Neste estudo foi utilizado o modelo de defeito crítico de 8 mm de acordo com os parâmetros estabelecidos por Spicer et al. (2012). Após pré-anestesia com cloridrato de xilasina (*Anasedan, Vetbrands, Jacareí/SP*) à dose de 0,1ml/Kg de peso corporal, seguido por cloridrato de ketamina (*Dopalen, Vetbrands, Jacareí/SP*) à dose de 0,1 ml/Kg de peso. Foi feita a tricotomia na região frontoparietal dos animais (FIGURA 1A), seguida de antissepsia com digluconato de clorexidina a 2% (*Chlorohex, Johnson Diversey, São Paulo*) e infiltração local de xilocaína a 2% com norepinefrina 1:50000, (*Merrell Lepetit Farmacêutica e Industrial, LTDA.*) com o objetivo de promover vasoconstrição prévia à incisão e assim, diminuir o sangramento. Os animais foram cobertos com campos cirúrgicos estéreis descartáveis e a partir deste momento os procedimentos foram realizados de forma a manter a cadeia asséptica (FIGURA 1A). O tegumento da linha média recebeu

uma incisão semilunar com lâmina de bisturi no.15 (*Lamedid Comercial e Serviços Ltda. Barueri, SP*) até atingir o periósteo. A partir desta incisão, um retalho total foi levantado para exposição da cortical óssea, da qual, com uma broca trefina de 8,0 mm de diâmetro interno em baixa rotação e sob irrigação profusa com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%, foi removido um disco bicortical (Figura 1B).

FIGURA 1. Procedimento cirúrgico. A. Ratos cobertos por campos cirúrgicos estéreis. B. Defeitos de 8mm criados com broca trefina. C. Osso autógeno raspado desmineralizado após lavagem com soro fisiológico. D. Colocação de osso no defeito criado E. espécime fixado contendo osso hospedeiro e enxerto após o período de reparo dentro de um tubo plástico para centrifugação para ser levado ao microtomógrafo..

Previamente à remoção do disco, para o preenchimento do defeito criado, foi raspado e coletado osso autógeno da calvaria do rato de uma área periférica ao defeito com raspador cirúrgico (*Rhosse Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos LTDA EPP, Ribeirão Preto, SP, Brasil*) sendo o mesmo imediatamente desmineralizado por submersão em 5 gotas de ácido cítrico pH 1 a 50% ou 10 gotas de solução de tetraciclina hidrocloreada a 50mg/mL dentro de uma cuba de aço inoxidável (FIGURA 1C) durante os períodos experimentais como descrito abaixo. A solução de tetraciclina foi obtida pela diluição de uma cápsula de 500mg de

tetraciclina hidrociorada (*Teuto/Pfizer, Anapolis, Goiás, Brasil*) em 10 mL de soro fisiológico, sendo utilizado o sobrenadante, cujo pH foi medido em peagâmetro resultando em pH = 1,57. Como a densidade dessa solução é mais baixa do que a do ácido cítrico, foi necessário o dobro de gotas para atingir o mesmo volume de solução. Após transcorridos os tempos de desmineralização, o osso foi lavado com soro fisiológico estéril e aspirado por um coletor de osso descartável (*Indusbello, Londrina, Paraná, Brasil*) durante 30 segundos antes de ser coletado e transferido para o defeito crítico criado (FIGURA 1D).

Foram constituídos os seguintes 8 grupos de estudo formados por 15 animais (5 em cada período experimental):

- CN (controle negativo): os defeitos permaneceram sem enxerto;
- CP (controle positivo): os defeitos foram preenchidos por osso particulado não desmineralizado;
- AC 15: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 15 segundos;
- AC 30: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 30 segundos;
- AC 60: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por ácido cítrico durante 60 segundos;
- TCN 15: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 15 segundos;
- TCN 30: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 30 segundos;
- TCN 60: os defeitos foram preenchidos com osso particulado desmineralizado por tetraciclina durante 60 segundos.

Após o preenchimento dos defeitos, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com fio reabsorvível 3-0 (*Catgut Cromado, Ethicon, Johnson & Johnson*). Os animais receberam analgésicos pós-operatoriamente (200 mg de paracetamol, *EMS, Hortolandia, SP, Brasil*).

A eutanásia dos animais foi feita 7 dias, 30 e 60 dias depois das cirurgias por sobredose de anestésico (3x a dose de anestesia).

4.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)

Após a eutanásia, foi feita a craniotomia para obtenção de blocos ósseos de 12mm de lado, medidos com sonda periodontal envolvendo o defeito e 2mm de margem. Os blocos de tecido foram colocados em uma solução tampão de formalina neutra a 10%, para fixação por no mínimo 24 horas. Esses blocos foram introduzidos em tubos plásticos para centrifuga de 1,5 ml (FIGURA 1E) para estabilização e padronização da posição das amostras no microtomógrafo computadorizado por raios-x Skyscan 1072 (SKYSCAN, KONTICH, BÉLGICA) existente na Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (adquirido pelo processo FAPESP 2010/16072-2). As amostras teciduais contendo os enxertos foram analisadas em resolução de 27,1 μ m por pixel, usando o procedimento de *cone beam*. Imagens tridimensionais do volume do defeito crítico e seu conteúdo foram geradas com o software ANT (versão 2.4; SkyScan) e para cada amostra, 300 cortes de imagens (1,5 mm) foram selecionados (FIGURA 2).

FIGURA 2. Tela do computador mostrando as imagens obtidas após escaneamento das peças com o Microtomógrafo.

As medições de volume de osso neoformado no defeito (mm^3), superfície de preenchimento do defeito (mm^2) e a densidade do osso neoformado (mg/mm^3) foram realizadas com o mesmo software por um único operador calibrado (FIGURA 3).

FIGURA 3. Tela do computador do programa desenhado para realizar as medições de área de preenchimento, volume e densidade óssea das amostras

4.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA QUALITATIVA

As mesmas amostras empregadas para μCT foram descalcificadas empregando solução Morse por aproximadamente 45 dias e processadas por histotécnica convencional para coloração por hematoxilina e eosina e coloração com Tricrômico de Masson, no laboratório de anatomopatologia da Disciplina de Patologia da FOB-USP. De cada amostra foram escolhidos três cortes da porção mais central para a análise. Eventos de reparo da ferida como integração das células do hospedeiro ao enxerto, crescimento de novos vasos sanguíneos e integração do enxerto foram observados ao microscópio óptico Nikon Eclipse 80i (*Nikon Instruments Inc., Nova York, Estados Unidos*) e descritos por um patologista experiente e cego ao experimento.

4.4.1 CRITÉRIOS APLICADOS NA ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA.

Para o registro das imagens dos cortes teciduais, imagens parciais dos cortes teciduais capturadas com objetivas 4X, 10X, 20X, 40X e 100X em microscópio óptico (Olympus – CX2, Olympus Imaging América Inc.) foram transferidas para um microcomputador. Empregando o programa Adobe Photoshop CS, versão 8.0.1 (1990-2003 Adobe Systems Incorporated, USA) foram compostas imagens completas (FIGURA 4).

FIGURA 4. Tela do computador do Adobe Photoshop com as imagens dos cortes teciduais

Ênfase e atenção especial foi dada à quantificação do tecido ósseo neoformado na superfície e ao redor das partículas ósseas desmineralizadas nos diferentes tempos de desmineralização.

Especificamente, um critério de mensuração foi adotado, estabelecendo escores ou valores numéricos crescentes de 1 a 5 para quantificar estes fenômenos de natureza reacional e reparatória relacionados à organização celular e tecidual. Esta progressiva graduação no processo de neoformação óssea, segue abaixo descrita:

- A. Granuloma do tipo corpo estranho.....(GTCE) = ESCORE 1
- B. Tecido de granulação imaturo..... (TGI) = ESCORE 2
- C. Tecido de granulação maduro..... (TGM) = ESCORE 3
- D. Tecido conjuntivo fibroso maduro.....(TCFM) = ESCORE 4
- E. Tecido conjuntivo fibroso com neoformação óssea (TCFNO) = ESCORE 5

Para cada grupo e tempo experimental foram elaboradas descrições do quadro microscópico encontrado nas quais se procurou caracterizar o padrão morfológico reacional ou reparatório.

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOMETRICA

Para a avaliação da área de tecido mineralizado dentro do defeito crítico, foi utilizado o programa Image J 1.49 m, National Institute of Health (NIH) – Bethesda/Maryland/EUA). Com a ferramenta polígono, foi delimitada a área correspondente aos defeitos. Com a ferramenta Analyse/Measure foi calculada a área total em μm^2 . Desse total foram subtraídas as áreas correspondentes a tecido mineralizado em seu interior. O valor resultante foi convertido em porcentagem. Cada uma dessas medidas foi realizada três vezes, com intervalo de 3 dias entre elas e a média entre as três foi considerada. Este conjunto de dados foi transferido para uma planilha do programa Excel (Microsof Office 2007, Windows XP), para o cálculo da porcentagem do osso neoformado em cada espécime.

4.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A normalidade e homogeneidade das variáveis foram verificadas. Cada parâmetro (área, densidade e volume de novo osso formado) foi avaliado separadamente. A significância das diferenças entre os grupos foram determinadas pela análise de variância a dois critérios (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey quando ANOVA indicou uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Já na avaliação dos processos histológicos, nos dados totalizados e contextualizados foram aplicados os testes estatísticos Shapiro Wilk para análise de normalidade dos resultados. Posteriormente, foram aplicados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e, para a verificação das possíveis diferenças intergrupos e tempos experimentais, o teste de Dunn. Foi empregando o programa Statistica 10.0 (*StatSoft South América SP, Brazil*), para realização de todas as análises estatísticas.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ -CT)

As informações colhidas de cada espécime a respeito de cada parâmetro avaliado referente à análise por μ -CT encontram-se descritos a seguir.

5.1.1 ÁREA DE TECIDO ÓSSEO MINERALIZADO NO DEFEITO CRÍTICO (mm^2)

Os valores médios da área de tecido mineralizado encontrado no defeito crítico estão descritos na tabela 2. Aos 7 dias, foi observada escassa neoformação óssea nos defeitos independentemente do grupo de estudo (Tabela 2). Aos 30 dias, o grupo AC15 foi o que apresentou maior área de neoformação óssea quando comparado com os demais grupos, porém essa diferença foi estatisticamente significativa apenas em comparação ao grupo CN ($p > 0,005$) (Tabela 2). Aos 60 dias, houve maior área de formação óssea no grupo TCN30 mas com diferença estatisticamente significativa somente quando comparada com o grupo CN ($p < 0,005$). A figura 5 representa espécimes avaliados aos 7 dias.

FIGURA 5. Microtomografias computadorizadas de espécimes desmineralizados com ácido cítrico aos sete dias A. Espécime desmineralizado por 15 segundos. B. Espécime desmineralizado por 30 segundos. C. Espécime desmineralizado por 60 segundos

TABELA 2 - Área média de tecido mineralizado no defeito crítico avaliada por μ -CT

Período de avaliação	Área (mm ²)						
	Grupo CN	Grupo CP	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	11,45 $\pm$ 4,60 a	14,05 $\pm$ 2,05 a	20,62 $\pm$ 9,29 b	13,08 $\pm$ 3,75a	14,001 $\pm$ 4,91 a	22,58 $\pm$ 4,79 a	17,06 $\pm$ 8,31 a
30 dias	14,02 $\pm$ 2,21 a	19,19 $\pm$ 6,60 a	22,79 $\pm$ 6,81 b	16,49 $\pm$ 3,03 a	26,06 $\pm$ 9,56 a	16,09 $\pm$ 2,23 a	24,06 $\pm$ 3,53 a
60 dias	19,38 $\pm$ 9,17 a	22,59 $\pm$ 7,36 b	25,20 $\pm$ 6,06 b	23,78 $\pm$ 6,33 b	23,67 $\pm$ 7,79 b	26,32 $\pm$ 8,91 b	23,67 $\pm$ 5,40 b

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística significativa. ($p < 0,005$)

5.1.2 Volume de tecido mineralizado no defeito (mm³)

Os valores médios do volume de tecido mineralizado dentro dos defeitos estão descritos na tabela 3. Aos 7 dias, foi observado maior volume ósseo no grupo CP com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) quando comparado ao grupo CN e TCN 60. Os grupos AC15, AC30, AC60 e TCN30 também apresentaram valores significativamente maiores do que o grupo CN (Tabela 3), mas sem diferença entre si. Aos 30 dias, o grupo AC30 foi o que apresentou maior volume ósseo quando comparado com os demais grupos, observando-se diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo CN, CP, TCN 30, TCN 60, mas sem diferença estatística entre os grupos AC15 e AC60 (Tabela 3). Aos 60 dias, foi encontrado maior volume de formação óssea no grupo AC15 com diferença estatisticamente significativa apenas em comparação aos grupos TCN30 e TCN60 (Tabela 3). A figura 6 representa espécimes avaliados aos 30 dias.

FIGURA 6. Microtomografias de espécimes desmineralizados com ácido cítrico aos trinta dias. A. Espécime desmineralizado por 15 segundos. B. Espécime desmineralizado por 30 segundos. C. Espécime desmineralizado por 60 segundos

TABELA 3 - Volume médio de tecido mineralizado no defeito crítico avaliado por μ -CT

Período de avaliação	Volume (mm^3)						
	Grupo CN	Grupo CP	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	10,82 $\pm$ 4,59a	38,15 $\pm$ 6,97b	31,14 $\pm$ 14,52 ab	31,27 $\pm$ 3,92 ab	23,77 $\pm$ 1,87 ab	21,09 $\pm$ 6,07 ab	9,86 $\pm$ 5,84 ac
30 dias	27,79 $\pm$ 8,19 bc	25,18 $\pm$ 9,76b	46,46 $\pm$ 5,58 ac	49,73 $\pm$ 7,52a	33,88 $\pm$ 7,65 ab	11,96 $\pm$ 3,38 b	17,57 $\pm$ 2,61b
60 dias	29,23 $\pm$ 9,68 ab	44,99 $\pm$ 12,05 ab	45,84 $\pm$ 12,34 b	37,10 $\pm$ 10,84 ab	45,64 $\pm$ 12,62 b	14,45 $\pm$ 3,58 a	21,81 $\pm$ 5,39 a

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística significativa. ($p < 0,005$)

5.1.3 Densidade do tecido mineralizado no defeito (mg/mm^3)

Os valores médios da densidade do tecido mineralizado no defeito estão descritos na tabela 4. Aos 7 dias, foi observada maior densidade óssea no grupo TCN30 com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$) quando comparado com os grupos CN, AC15, AC30, AC60 (Tabela 4). Aos 30 dias, o grupo TCN30 foi o que apresentou maior densidade óssea, observando-se diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos CN e CP. Aos 60 dias, foi encontrada maior densidade de osso neoformado no grupo AC60, mas esse valor não foi diferente estatisticamente quando comparado com todos os grupos ($p > 0,005$). A figura 7 representa espécimes avaliados aos 60 dias.

FIGURA 7. Microtomografias de espécimes desmineralizados com ácido cítrico aos sessenta dias A. Espécime desmineralizado por 15 segundos. B. Espécime desmineralizado por 30 segundos. C. Espécime desmineralizado por 60 segundos

TABELA 4 - Densidade média de tecido mineralizado no defeito crítico

Período de avaliação	Densidade (mg/mm ³)						
	Grupo CN	Grupo CP	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	0,78 ± 0,35a	2,05 ± 0,70 ac	2,34 ± 1,10ab	1,66 ± 0,91a	1,42 ± 0,26 a	3,89 ± 0,82 c	2,39 ± 1,24 ac
30 dias	0,77 ± 0,24a	1,41 ± 0,68 ab	2,80 ± 0,60bc	2,46 ± 0,41c	2,25 ± 0,37 ac	3,27 ± 0,82 bc	3,12 ± 1,15 bc
60 dias	0,89 ± 0,37a	1,93 ± 0,34a	1,92 ± 0,40a	1,37 ± 0,37a	2,09 ± 1,07a	1,97 ± 0,57a	1,83 ± 0,10 a

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística significante. (p<0,005)

FIGURA 8. Microtomografias de espécimes dos grupo controle positivo e negativo após 30 e 60 dias. A. Controle negativo após 30 dias. B. Controle Negativo após 60 dias. C. Controle Positivo após 30 dias D. Controle Positivo após 60 dias

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA QUALITATIVA

5.2.1 GRUPO CN

Neste grupo foi observada pouca atividade celular no período de 7 dias. O tecido predominantemente observado foi tecido de granulação maduro com escasso tecido conjuntivo imaturo. Após 30 dias observou-se uma área predominante de tecido conjuntivo imaturo com escassa formação óssea vinda da periferia do defeito. Após o período de 60 dias podia-se observar discreta formação óssea a partir das margens do defeito e fechamento parcial predominantemente por tecido conjuntivo maduro (FIGURA 9).

FIGURA 9. Fotomicrografia de espécimes do grupo controle negativo aos 7, 30 e 60 dias (A) Especime aos 7 dias apresentando tecido de granulação maduro. (B) Área de tecido conjuntivo imaturo (seta amarela) com escassa formação óssea vinda da periferia (seta preta) (C) Abundante tecido conjuntivo Maduro (seta amarela) com fechamento parcial do defeito com osso vindo da periferia (seta preta) (HE)

5.2.2 GRUPO CP

No período inicial dos sete dias foram observadas predominantes reações de tipo corpo estranho na maior parte do defeito, circundando as partículas de osso autógeno, mas nenhuma formação óssea a partir das bordas do defeito. Após 30

dias foi possível observar pequenas áreas de osteogênese em um dos defeitos observados, sendo mais abundante um tecido conjuntivo imaturo. Partículas do material enxertado persistiam em fase de remodelação e algumas circundadas por granuloma do tipo corpo estranho em fase final. Após 60 dias ainda eram observadas reações do tipo corpo estranho ao redor do material em fase final, sendo observadas escassas áreas de osteogênese ao redor de algumas partículas do osso autógeno em permeio a extensa área de tecido conjuntivo imaturo. PerifERICAMENTE foi observada osteogênese em direção ao centro do defeito, o que diminui o tamanho do defeito (independente do material).(FIGURA 10).

FIGURA 10. Fotomicrografias de espécimes do grupo controle positivo aos. (A) Controle Positivo após 7 dias, são observadas predominantes reações de tipo corpo estranho na maior parte do defeito (setas amarelas), sem nenhuma formação óssea a partir das bordas do defeito. (B) Controle Positivo após 30 dias. Pode-se observar abundante tecido conjuntivo imaturo (setas pretas) com partículas do material enxertado em fase de remodelação e algumas circundadas por granuloma do tipo corpo estranho em fase final (seta amarela) (C). Controle Positivo após 60 dias. Reações do tipo corpo estranho ao redor do material em fase final (setas amarelas). PerifERICAMENTE foi observada osteogênese em direção ao centro do defeito, o que diminui o tamanho do defeito, independente do material (seta preta) HE.

5.2.3 GRUPO AC15

Aos sete dias observaram-se escassas reações de corpo estranho com predominante tecido conjuntivo imaturo e presença de osso neoformado, associado ao material de enxerto de permeio a abundante tecido de granulação óssea. Aos 30 dias as margens do defeito eram praticamente indistinguíveis do osso neoformado a partir da periferia. Houve predomínio de um intenso processo de osteogênese diretamente associado ao material enxertado cujas formas assemelhavam-se a camadas de cascas de cebola. Aos 60 dias as margens do defeito encontravam-se totalmente indistinguíveis. Observou-se fechamento total do defeito em duas amostras e fechamento quase completo nas demais. O osso neoformado do defeito possuía características de estágio avançado de remodelação, inclusive com a presença de espaços medulares em seu interior (FIGURA 11).

FIGURA 11. Fotomicrografias de espécimes do Grupo AC15. (A). AC 15 após 7 dias eram observadas escassas reações de corpo estranho com predominante tecido conjuntivo imaturo (setas amarelas) e presença de osso neoformado, associado ao material de enxerto de permeio a abundante tecido de granulação óssea (setas pretas). (B). AC 15 após 30 dias. As margens do defeito eram praticamente indistinguíveis do osso neoformado a partir da periferia (seta amarela). Houve predomínio de um intenso processo de osteogênese diretamente associado ao material enxertado (seta preta). (C). AC 15 após 60 dias. As margens do defeito encontravam-se totalmente indistinguíveis (seta amarela). Observou-se fechamento total do defeito em duas amostras e fechamento quase completo nas demais, inclusive com a presença de espaços medulares em seu interior (setas pretas).

5.2.4 GRUPO AC30

Nas amostras correspondentes ao período de sete dias foi observado predominante tecido de granulação imaturo e reações do tipo corpo estranho associadas às partículas do material, com escassa presença de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas. Já aos 30 dias as margens do defeito eram ainda facilmente identificáveis, mas com sinais de remodelação e neoformação óssea a partir delas. Foi observado um aumento significativo de tecido ósseo neoformado, mas ainda com escassas reações de corpo estranho no defeito, associado ao biomaterial. Nesse grupo aos 60 dias as margens do defeito ainda eram identificáveis e osteogênese era visível a partir das margens. Entretanto, a osteogênese era pontual, focal e irregular. Partículas do osso enxertado ainda estavam individualizadas e circundadas por reações do tipo corpo estranho com predominante formação óssea ao redor das partículas enxertadas. Neste grupo, perde-se a característica de casca de cebola, o que é mais marcante no grupo AC15 em todos os tempos de avaliação (FIGURA 12).

FIGURA 12. Fotomicrografias de espécimes do Grupo AC30. A. AC 30 após 7 dias era observado predominante tecido de granulação imaturo e reações do tipo corpo estranho (seta amarela) associadas às partículas do material, com escassa presença de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas (seta preta) dias. B. AC 30 após 30 dias. Margens do defeito facilmente identificáveis, mas com sinais de remodelação e neoformação óssea a partir delas (setas amarelas). Foi observado um aumento significativo de tecido ósseo neoformado, mas ainda com escassas reações de corpo estranho no defeito, associado ao biomaterial (setas pretas). C. AC 30 após 60 dias. As margens do defeito ainda eram identificáveis e osteogênese era visível a partir das margens (setas amarelas). Entretanto, a osteogênese era pontual, focal e irregular. É possível partículas do osso enxertado individualizadas e circundadas por reações do tipo corpo estranho (setas pretas) com predominante formação óssea ao redor das partículas enxertadas (setas pretas).

5.2.5 GRUPO AC60

Aos sete dias era possível observar tecido de granulação maduro com predominante tecido conjuntivo maduro e escasso tecido ósseo neoformado. Já após 30 dias a formação óssea era predominante mas ainda apresentavam-se algumas reações de corpo estranho, com presença de tecido conjuntivo maduro. Já aos 60 dias era ainda eram observadas escassas reações do tipo corpo estranho, com abundante formação óssea, observando-se um fechamento quase total dos defeitos, já que as partículas do material praticamente desapareceram (FIGURA 13).

FIGURA 13. Fotomicrografias de espécimes do Grupo AC60. A. AC 60 após 7 dias. Tecido de granulação maduro com predominante tecido conjuntivo maduro e escasso tecido ósseo neoformado (setas amarelas e pretas) B. AC 60 após 30 dias. Predominante formação óssea a partir das margens do defeito (seta amarela) mas ainda apresentavam-se algumas reações de corpo estranho, com presença de tecido conjuntivo maduro (seta preta) C. AC 60 após 60 dias Escassas reações do tipo corpo estranho (seta preta), com abundante formação óssea, observando-se um fechamento quase total dos defeitos (seta amarela), já que as partículas do material praticamente desapareceram

5.2.6 GRUPO TCN15

Aos sete dias, foi possível observar neste grupo abundante tecido de granulação maduro com escassas reações do tipo corpo estranho. Já aos 60 dias observaram-se uma ou outra partícula com reação do tipo corpo estranho, com maior presença de tecido conjuntivo fibroso maduro e tecido de granulação. Neste grupo não foi possível observar o padrão de formação óssea em forma de casca de cebola (FIGURA 14).

FIGURA 14. Fotomicrografias de espécimens do Grupo TCN 15 A. TCN 15 após 7 dias. . Abundante tecido de granulação maduro com escassas reações do tipo corpo estranho (setas amarela e preta). B. TCN 15 após 60 dias Observam-se uma ou outra partícula com reação do tipo corpo estranho, com maior presença de tecido conjuntivo fibroso maduro e tecido de granulação (setas amarelas e pretas). Neste grupo não foi possível observar o padrão de formação óssea em forma de casca de cebola. (HE)

5.2.7 GRUPO TCN30

Aos sete dias foi possível observar escassas reações do tipo corpo estranho, junto com predominante tecido conjuntivo imaturo assim como tecido conjuntivo fibroso maduro em uma das amostras. Já aos 30 dias as reações do tipo corpo estranho eram predominantes em todas as amostras e só em uma amostra foi possível observar escassas áreas de formação óssea relacionada com o material. Após 60 dias, ainda eram predominantes as reações do tipo corpo estranho com escassa presença de tecido conjuntivo fibroso maduro (FIGURA 15).

FIGURA 15. Fotomicrografias de espécimes do Grupo TCN 30. A. TCN 30 após 7 dias. Escassas reações do tipo corpo estranho, junto com predominante tecido conjuntivo imaturo assim como tecido conjuntivo fibroso maduro em uma das amostras (setas amarela e preta)B. TCN 30 após 30 dias. Reações do tipo corpo estranho predominantes em todas as amostras e só em uma amostra foi possível observar escassas áreas de formação óssea relacionada com o material (seta amarela e preta).C. TCN 30 após 60 dias Ainda eram predominantes as reações do tipo corpo estranho (seta amarela) com escassa presença de tecido conjuntivo fibroso maduro (seta preta) (HE).

5.2.8 GRUPO TCN60

No período inicial de sete dias foi possível observar escassas reações do tipo corpo estranho com predominante tecido de granulação imaturo. Após 30 dias ainda era possível observar escassas áreas de reações de tipo corpo estranho, associada às partículas do material enxertado, porém era predominante a presença de tecido conjuntivo fibroso maduro. Após 60 dias as amostras continuavam com aspecto semelhante, com escassas áreas de reações do tipo corpo estranho e predominante tecido conjuntivo fibroso maduro (FIGURA 16).

FIGURA 16. Fotomicrografias de espécimes do Grupo TCN 60. A. TCN 60 após 7 dias. Escassas reações do tipo corpo estranho com predominante tecido de granulação imaturo (setas amarela e preta). B. TCN 60 após 30 dias. Escassas áreas de reações de tipo corpo estranho, associada às partículas do material enxertado (seta preta), porém era predominante a presença de tecido conjuntivo fibroso maduro (seta amarela). C. TCN 60 após 60 dias. As amostras continuavam com aspecto semelhante, com escassas áreas de reações do tipo corpo estranho e predominante tecido conjuntivo fibroso maduro (setas amarela e preta).

5.3 ANÁLISE HISTOMOFOMÉTRICA

Aos 7 dias o grupo com maior porcentagem de área de preenchimento do defeito crítico foi o AC 15 ($13,28 \pm 5,69\%$), porém, quando comparado com os outros grupos, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa. Aos 30 dias o grupo AC 15 continuava apresentando maiores valores de preenchimento ($50,26 \pm 26,38\%$) com diferença estatística significativa quando comparado com todos os demais grupos. O segundo melhor resultado foi o observado no grupo AC 30 ($29,49 \pm 13,36\%$), seguido de CN ($22,39 \pm 4,95\%$) e AC60 ($22,69 \pm 8,88\%$) sem diferença estatística significativa entre eles. Já entre os demais grupos o menor preenchimento foi exibido pelo grupo CP ($7,68 \pm 3,56\%$), sem diferença estatística significativa em relação a TCN 30 e TCN 60, esses dois últimos também não diferentes entre si. Aos 60 dias o grupo AC15 ($61,53 \pm 30,91\%$) e AC30 ($57,16 \pm 27,58\%$) apresentaram as maiores porcentagens de preenchimento, sem diferença estatística entre si, mas com diferença significativa em relação a todos os demais grupos..

A tabela 5 apresenta os valores referentes a análise histomorfométrica das amostras e o gráfico da figura 17 ajuda a visualização desses resultados.

Tabela 5. Análise histomorfométrica da porcentagem de área ocupada por tecido mineralizado no interior dos defeitos críticos

Período de avaliação	Área de preenchimento dos defeitos (%)						
	Grupo CN	Grupo CP	Grupo AC15	Grupo AC30	Grupo AC60	Grupo TCN30	Grupo TCN60
7 dias	0 a	$4,51 \pm 3,21$ A	$13,28 \pm 5,69$ a	$2,04 \pm 0,64$ A	$0,52 \pm 0,27$ A	0a	0a
30 dias	$22,39 \pm 4,95$ dc	$7,68 \pm 3,56$ d	$50,26 \pm 26,38$ b	$29,49 \pm 13,36$ Ce	$22,69 \pm 8,88$ ac	$16,00 \pm 3,04$ ad	$15,57 \pm 3,64$ Ad
60 dias	$29,59 \pm 7,77$ c	$19,99 \pm 10,09$ Ce	$61,53 \pm 30,91$ b	$57,16 \pm 27,58$ B	$36,43 \pm 12,37$ c	$5,36 \pm 1,93$ ae	$8,44 \pm 2,86$ ae

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística significativa. ($p < 0,005$)

Porcentagem de área de tecido mineralizado no interior dos defeitos críticos

Figura 17. Gráfico mostrando a porcentagem da área de tecido mineralizado no interior dos defeitos críticos

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo comprovou que desmineralização do osso particulado previamente à enxertia é benéfica no reparo de defeitos críticos, sendo os protocolos empregando ácido cítrico por 15 e 30 segundos, os mais efetivos na obtenção desse objetivo.

Embora não tenha sido demonstrada diferença estatisticamente significativa entre alguns grupos, aqueles em que foi empregado ácido cítrico obtiveram maior formação óssea do que os desmineralizados com tetraciclina ou não desmineralizados. Aos sete dias, os grupos CP, TCN15, TCN30 e TCN se comportaram de forma parecida, porém, onde foi usado ácido cítrico, foi possível observar indícios de formação óssea diretamente associada ao material enxertado.

Aos 7 dias, não era esperada formação de tecido ósseo significativo, mas surpreendentemente, os espécimes desmineralizados com ácido cítrico demonstraram precocidade na produção de eventos regenerativos já nesse período. Provavelmente, a capacidade de promover alterações superficiais e de liberar elementos osteopromotores (URIST et al., 1965; URIST et al., 1968; SALMERON, 2015) contidos na matriz orgânica óssea após a desmineralização possa explicar esse fenômeno, juntamente com a possibilidade de o ácido cítrico antecipar a ação dos osteoclastos na remodelação do tecido enxertado (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015).

Estudos anteriores da equipe de pesquisadores da FOB-USP (RODRIGUES et al., 2012; REZENDE et al. 2014; REZENDE; DOMINGUES; SALMERON, 2014; REZENDE et al., 2015; SALMERON, 2015) demonstraram que a desmineralização óssea superficial contribui positivamente para a diferenciação celular e para a aceleração da consolidação de enxertos ósseos. Provavelmente no osso particulado, assim como ocorre em superfícies planas (SALMERON, 2015), também pode ter havido alteração topográfica das superfícies das partículas, tornando-as mais propícias à adesão de células osteoprogenitoras. Além disso, foi verificado que as partículas desmineralizadas por ácido cítrico estavam mais íntegras e intactas que as não desmineralizadas, as quais sofreram reabsorção antes de serem

substituídas por novo osso. Assim, deduziu-se que a desmineralização antecipou a chegada dos osteoblastos à área, iniciando-se a deposição de matriz precocemente. Desta forma, as partículas deixaram de ser reconhecidas como corpo estranho, o que também justifica a observação de que as reações de tipo corpo estranho eram escassas nos grupos desmineralizados com ácido cítrico quando comparadas com os grupo controle positivo ou onde foi empregada a tetraciclina, nos quais aparentemente, estão sendo reabsorvidas deixando na área, tecido conjuntivo fibroso ao invés de tecido ósseo.

Dignos de nota foram os resultados inesperados ocorridos nos grupos desmineralizados com tetraciclina, já que, possuindo baixo pH (1,54-1,62) e comportamento favorável em superfícies radiculares (NAGATA et al., 2005; ABED et al., 2013; MARIOTTI, 2003; GOLUB et al., 1985; GOLUB et al., 1991), era de se esperar comportamento semelhante também no tecido ósseo. Os resultados dos grupos tratados por tetraciclina foram ainda piores que os do grupo controle negativo, sendo observada pouca ou nenhuma formação de novo osso ao redor das partículas do material do enxerto em todos os períodos de avaliação, assim como todos os tempos de desmineralização avaliados. Por outro lado, foram encontrados dados (MUTHUKURU; SUN, 2013; GOLUB et al., 1991) relatando a tetraciclina como inibidor das BMPs e das MMPs, consequentemente da neoformação óssea, o que poderia em parte, explicar o pobre comportamento desses grupos em relação à formação de tecido conjuntivo fibroso em lugar de osso. Outra possível explicação para esse efeito aparentemente adverso da tetraciclina é que resíduos de pigmentos da tetraciclina se incorporam a superfície óssea, gerando uma reação de tipo corpo estranho em lugar de neoformação óssea e interferindo na comunicação e expressão das BMPs e MMPs (MUTHUKURU; SUN, 2013; GOLUB et al., 1991).

O objetivo da comparação entre ácido cítrico e tetraciclina neste estudo, foi testar uma segunda opção de agente desmineralizante, já que alguns profissionais atuantes em centros cirúrgicos enfrentam resistências quanto ao emprego do ácido cítrico em hospitais devido à inexistência de preparados comerciais estéreis de ácido cítrico no mercado. A tetraciclina hidrociorada, por sua vez, já vem esterilizada dentro de cápsulas permitindo seu amplo uso em qualquer ambiente. Não é conhecido método seguro de esterilização do ácido cítrico sem risco de alteração de

suas propriedades químicas, embora seja esse um procedimento desnecessário frente à impossibilidade de crescimento bacteriana em pH tão baixo.

Os resultados aqui apresentados para histomorfometria aos 7 e 30 dias para o grupo AC 15 (13,28% e 50,26% respectivamente) mostraram-se superiores quando comparados com os resultados aos 7 e 30 dias do trabalho de Lim et al. (2000) que obtiveram preenchimento ósseo máximo de 7,48 mm² e 22,28 mm² respectivamente empregando DFDB em defeitos críticos. Quando os mesmos autores usaram DFDB associado à membrana Biomech, seus resultados foram mais altos aos 30 dias (23,62 mm²) sendo que aos 60 dias tanto o grupo empregando DFDB, DFDB e Biomech e empregando millipore apresentaram menor preenchimento que os grupos AC 15 (61,53) e AC 30 (57,16) deste trabalho (33,99 mm²) (49,53 mm²), (37,07 mm²), respectivamente.

Os trabalhos de Mokbel et al. (2008) e (2013) também utilizaram diferentes biomateriais no preenchimento de defeito críticos (BiosOss, BioOss + Bio Guide, DFDBA, osso autógeno, Pep Gen) e avaliaram o preenchimento através de análise com μ -CT e análise histomorfométrica. Esses trabalhos mostraram bons resultados de área de preenchimento com os materiais empregados, porém não é possível sua comparação com o presente trabalho já que os autores mediram preenchimento a partir das bordas dos defeitos e no presente trabalho foram utilizadas as reconstruções da μ -CT para determinar a área de preenchimento.

Os resultados de 60 dias de avaliação apresentados por Intini et al. (2008) mostraram resultados de volume inferiores aos desta pesquisa em defeitos preenchidos com DFDBA, EMD e rhBMP-2 após a avaliação com μ -CT. Porém, densidade e área foram bem maiores em todos os grupos avaliados, em especial naqueles em que foi empregada a rhBMP-2. Dada à grande diferença entre seus resultados e os aqui apresentados poder-se-ia especular que tal discrepância possa ser atribuída à metodologia e ao equipamento empregado por eles, muito mais sensível às variações de mineralização do que o aqui empregado. Não se pode deixar de observar, entretanto, que os resultados de Intini et al. (2008) diferem em muito de todos os demais autores estudados (Tabela 1), fazendo com que a comparação fique muito prejudicada.

Por outro lado, Cornejo et al. (2012) apresentaram dados bem inferiores ao deste estudo quanto ao volume e densidade óssea em defeitos críticos enxertados com células endoteliais (ECS) e osso autógeno (OBS) após 8 semanas. Seus valores maiores foram de 24,7 mm³ e 1,30 mg/mm³ para volume e densidade respectivamente para defeitos tratados com ECS e uma mistura de ECS e OBS também respectivamente, ao passo que no mesmo período, o grupo AC15 desta dissertação apresentou volume de 45,84 mm³ e o grupo AC 60 apresentou 2,09 mg/mm³.

Ainda se tratando de análise histomorfométrica, o emprego da desmineralização de osso autógeno no preenchimento de defeitos críticos teve excelentes resultados quando comparados com outros trabalhos onde foram empregados outros biomateriais (MOKBEL et al., 2008, 2013; FLECKENSTEIN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; ZAMBUZZI et al., 2012; KIM; KIM, 2008). Entre esses trabalhos o que obteve maior preenchimento foi o realizado por Oliveira et al. (2008) que, após 30 dias e 90 dias alcançaram preenchimento de 40,23% e 53,54% respectivamente quando empregado osso autógeno. Por outro lado Fleckenstein et al. (2006) obtiveram preenchimento de 47% com DFDBA após 10 semanas. Bons resultados foram também observados por Mokbel et al. (2013) que, após 8 semanas de avaliação, observaram um preenchimento ósseo de 50% quando empregado ABBM (BioOss + rhBMP-2). Porém esses resultados permaneceram inferiores aos observados nesta dissertação após 60 dias, onde foi possível alcançar um preenchimento ósseo de até 61,53% quando realizada a desmineralização do osso autógeno com ácido cítrico por 15 segundos e de 57,16% quando desmineralizado por 30 segundos, demonstrando que de fato este processo pode proporcionar vantagens significativas de ganho ósseo.

Apenas um autor apresentou dados de porcentagem de preenchimento ósseo por histomorfometria aos 30 dias de avaliação, com resultado máximo de 20% de preenchimento com o uso de enxerto ósseo autógeno (ZAMBUZZI et al., 2012). No mesmo período de 30 dias, trabalhos resultados deste estudo demonstraram preenchimento maior que esse em todos os grupos testes com ácido cítrico AC15 (50,26%), AC30 (29,49 ± 13,36%) e AC60 (29,49 ± 13,36%) e até mesmo no grupo CN (22,39%).

O resultado de maior preenchimento ósseo nos tempos de desmineralização de 15 e 30 segundos encontram ressonância nos trabalhos de Rezende et al. (2015), que demonstraram maior crescimento e viabilidade de osteoblastos MC3T3-E1 em espécimes desmineralizados por 15 e 30 segundos e também no trabalho de Salmeron (2015), que concluiu que a desmineralização de osso autógeno durante 30 segundos parece promover a proliferação e diferenciação celular, alterando a topografia do osso e proporcionando superfícies com características de composição e topografia favoráveis para um melhor comportamento das células osteoprogenitoras. A racionalização para o uso desses tempos de desmineralização baseiam-se na observação de que o ácido cítrico gera uma remoção mineral da matriz orgânica, expondo a matriz e aumentando a biodisponibilidade de BMPs, permitindo a sua participação no processo de formação do osso (ROJAS-PAULUS et al., 2015; REZENDE et al., 2014; REZENDE; SALMERON, 2015). O período de 15 segundos de desmineralização parece ser suficiente para eliminar essa porção mineral sem danificar a estrutura das BMPs. Ao contrário, nos grupos TCN30 e TCN60 foi observado pouco preenchimento ósseo aos 7 dias (nenhum preenchimento em ambos os grupos) 30 dias ($16,00 \pm 3,04\%$ e $5,57 \pm 3,64\%$ respectivamente) e 60 dias ($5,36 \pm 1,93\%$ e $8,44 \pm 2,86\%$ respectivamente), o que poderia estar relacionado com o potencial de inibição das BMPs e MMPs por parte das tetraciclina (MUTHUKURU; SUN, 2013; GOLUB et al., 1991).

Os resultados da avaliação por μ CT revelaram dados relativamente altos para de área de tecido mineralizado no interior dos defeitos em relação à análise histomorfométrica. Analisando os números encontrados para 7 dias, verifica-se que a histomorfometria praticamente não encontrou osso neoformado nos defeitos. Já a μ CT considerou as partículas de osso enxertado desmineralizado ou não, tornando a avaliação precoce, imprecisa, sem correspondência com a realidade do reparo mais tardio. Aos 30 dias, observou-se superioridade numérica, mas não estatística dos grupos tratados com ácido cítrico em relação à área de tecido mineralizado no interior dos defeitos. Uma certa equiparação dos resultados foi encontrada aos 60 dias. Infelizmente, não é possível comparar dados de μ CT com os histomorfométricos porque os primeiros são avaliados em mm^2 e os segundos em porcentagem. demonstraram que o processo de desmineralização de fato é vantajoso já que foi observada maior área de preenchimento ósseo no grupo TCN

30 aos 7 dias ($22,58 \text{ mm}^2$), no grupo AC 60 aos 30 dias ($26,06 \text{ mm}^2$) e no grupo TCN 30 aos 60 dias ($26,32 \text{ mm}^2$). Aos 7 dias não foi observada diferença estatística entre os grupos, já aos 30 dias sim era possível observar diferença estatística significativa entre o AC15 e CP, AC30, AC60, TCN30 e TCN60.

Os dados relativos à densidade óssea são importantes por informarem, indiretamente, a respeito do grau de maturidade do osso neoformado. Assim, quanto maior a densidade, mais maduro está o tecido (INTINI et al., 2008). A análise desse parâmetro na tabela 4 destaca a densidade apresentada pelo grupo AC 30 aos 30 dias, maior do que todos os demais grupos, mas com significância estatística apenas com o grupo CN. Do mesmo modo, aos 60 dias, destaca-se o grupo TCN30, também com densidade numericamente maior que os demais grupos. Mais uma vez, apenas uma publicação, a de Cornejo et al. (2012) permitiu comparação com os dados aqui apresentados. Empregando células tronco derivadas do tecido adiposo de ratos, células endoteliais e osso autógeno, esses autores encontraram aos 60 dias, densidades ósseas inferiores aos grupos desmineralizados deste estudo (Tabelas 1 e 4).

Os dados de volume complementam os de área e não podem ser avaliados por histomorfometria, já que se refere a uma grandeza tridimensional. Assim, é compreensível que aos 7 dias, o grupo controle positiva tenha apresentado os maiores valores, já que espera-se que o osso não desmineralizado enxertado no defeito ainda permaneça quase que totalmente não reabsorvido em um período tão precoce de observação. Todos os grupos em que foi empregada desmineralização quer com ácido cítrico ou com tetraciclina, apresentaram valores comparáveis entre si e com o grupo CP.

Aos 30 dias, o que se observou no grupo CP foi uma considerável diminuição do volume ósseo, o que não ocorreu com os grupos desmineralizados, em especial naqueles em que foi empregado ácido cítrico. Provavelmente este evento deveu-se à reabsorção ocorrida com as partículas do osso não desmineralizado previamente à nova deposição de osso, conforme constatado na avaliação de 60 dias (Tabela 3). Verifica-se assim, que a desmineralização antecipou a formação óssea, minimizando a fase de reabsorção.

Diante do exposto, conclui-se inequivocamente, que a desmineralização de enxertos ósseos e seus respectivos leitos representam uma linha de pesquisa merecedora de maiores investimentos científicos para procurar esclarecer vários pontos ainda obscuros como processos bioquímicos envolvidos, comportamento celular frente a superfícies desmineralizadas, caracterização dessas superfícies do ponto de vista físico e molecular, assim como outros estudos in vivo procurando reproduzir as situações clínicas em que esse procedimento poderia ter efeito potencialmente benéfico.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os dados colhidos, segundo a metodologia estabelecida e dentro das limitações apresentadas, pode-se concluir que:

- A desmineralização com ácido cítrico do osso autógeno particulado enxertado em defeitos críticos promoveu maior área, volume e densidade de formação óssea do que a desmineralização com tetraciclina e do que a não desmineralização;
 - O protocolo de desmineralização que parece alcançar melhores resultados em relação aos parâmetros estudados é da aplicação de ácido cítrico durante 15 ou 30 segundos;
 - Tetraciclina não parece ser um bom agente desmineralizante para o objetivo de acelerar o reparo ósseo de defeitos críticos.
-

Referências

REFERÊNCIAS

1. 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.** v.10, n.2, p.232-7, 2013
 2. 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, p.201-208, 2008
 3. ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects **J Mater Sci: Mater Med** v.22, p.997–1004, 2011
 4. AGACAYAK, S. et al. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect **European Review for Medical and Pharmacological Sciences** v.16, p.679-686, 2012
 5. AICHELMANN-REIDY, M.E.; YUKNA, R.A. Bone replacement grafts. The bone substitutes. **Dent Clin North Am** v.42, p.491-503, 1998
 6. ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. **Int J Prosthodont.** v.17, n.5, p.536-43, 2004
 7. AL-FOTAWEI, R. et al. Radiological Assessment of Bioengineered Bone in a Muscle Flap for the Reconstruction of Critical-Size Mandibular Defect. **PLOS ONE** v.9, n.9, p. e107403, 2014
 8. ALHAG, M. et al. Evaluation of early healing events around mesenchymal stem cell-seeded collagen-glycosaminoglycan scaffold. An experimental study in Wistar rats. **Oral Maxillofac Surg** v.15, p.31-39, 2011
 9. ANNIBALI, S. et al. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial “critical size” defect: Preliminary data **Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials** v. 102b, n. 4, p. 815-825, Mai 2014
-

10. AVILA, G. et al. A novel decision-making process for tooth retention or extraction. **J Periodontol.** v.80, n.3, p.476-91, 2009
 11. BAL, B.; EREN, K.; BALOS, K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. **J Nihon Univ Sch Dent.** v.32, n.4, p. 281-93, 1990
 12. BARRÈRE, F.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE GROOT, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Int J Nanomedicine.** v.1, n.3, p.317-32, 2006
 13. BEZERRA, B. B. et al. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical size bone defects. **Clin. Oral Impl. Res.** v.23, p. 938–942, 2012
 14. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg.** v.9, n.4, p.310-6, 1998
 15. BRUNETTE, D.M. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. **Exp Cell Res** v.167, n.1, p. 203-217, 1986
 16. BUONOCORE, M. G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials on enamel surfaces. **J Dent Res.** v.34, n.6, p.849-53, 1955
 17. CARULLI, C. et al. Tissue engineering applications in the management of bone loss **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism** v.10, n.1, p.22-252, 2013
 18. CARVALHO, P.S.P.; 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, p.565–570, 2000
 19. CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone Morphogenetic Proteins **Growth Factors** v.22, n.4, p. 233–241, 2004
 20. COOPER, G.M. et al. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD) **Plast Reconstr Surg.** v.125, n.6, p. 1685–1692, 2010
-

21. CORNEJO, A. et al. Effect of Adipose Tissue-Derived Osteogenic and Endothelial Cells on Bone Allograft Osteogenesis and Vascularization in Critical-Sized Calvarial Defects **Tissue Engineering** v. 18, n. 15, 16, 2012
 22. CORTELLINI, P.; BOWERS, G. Periodontal regeneration of intrabony defects: An evidence based treatment approach. **Int J Periodontol Rest Dent.** v.15, p.128–45, 1995.
 23. CRIGGER, M.; RENVERT, S.; BOGLE, G.. The effect of topical citric acid application on surgically exposed periodontal attachment **Journal of Periodontal Research** v.18, p. 303-305, 1983
 24. CRIGGER, M. et al. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs **J Periodontal Res.** v.13, p. 538-549, 1978
 25. CUNHA, M. J. S. et al. Effect of Low-Level Laser on Bone Defects Treated with Bovine or Autogenous Bone Grafts: In Vivo Study in Rat Calvaria **Bio Med Research International** v. 2014, 9 p.
 26. DE ALMEIDA, A.L.P.F. et al. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft. An experimental study in rat calvaria. **Clin. Oral Impl. Res.** v.25, p.1131–1136, 2014
 27. DE BIASE, P.; CAPANNA, R. Clinical Applications of BMPs **Injury, Int. care injured** v.36s, p.43-46, 2005
 28. DEL FATORE, A.; TETI, A.; RUCCI, N. Osteoclast receptors and signaling **Archives of biochemistry and Biophysics** v.473, p.147-160, 2008
 29. DE OLIVEIRA, R.C., et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvária. **Clin. Oral Impl. Res.** v.19, p.749-754, 2008
 30. 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, 1995
 31. DOMINGUES, R.S.; SALMERON, S.; REZENDE, M.L.; Efeito da desmineralização ácida na consolidação de enxerto ósseo autógeno em bloco. Relato de caso. **Innov Implant Biomater Esthet.** v.8, n.1, p.48-52, 2014
-

32. DOMINGUES, R. S. **Efeito da desmineralização ácida na interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco** 2013. 193 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
 33. DONOS, N. et al. The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects. **Clin Oral Impl. Res.** v.22, p.1346-1353, 2011
 34. DONOS, N. et al. The effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. **Clin. Oral Impl. Res.** v.15, p. 101–111, 2004
 35. DUMAS, A. et al. Bone mass and microarchitecture of irradiated and bone marrow-transplanted mice: influences of the donor strain **Osteoporos Int** v.20, p.435–443, 2009
 36. ELDESOQI, K. et al. (2014) Safety Evaluation of a Bioglass–Polylactic Acid Composite Scaffold Seeded with Progenitor Cells in a Rat Skull Critical-Size Bone Defect. **PLOS ONE** v.9, n.2, p. e87642, 2014
 37. FLECKENSTEIN, K.B. et al. Effect of a Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate Alloplast on Osseous Repair in the Rat Calvarium **J Periodontol** v.7, n.1, p. 39-45, 2006
 38. GARBER, L. et al. Thiol-acrylate nanocomposite foams for critical size bone defect repair: A novel biomaterial **Journal Of Biomedical Materials Research A** v.101A, n. 12, p.3531-3541, 2013
 39. GLABER, W.L.; CREAMER H.R. Suppression of human neutrophil function by tetracyclines **J Periodontol Res.** v.28, p.52-58, 1991
 40. GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clinical Orthop. Relat. Res.** v.225 p.7-16, Dez. 1987
 41. GOLUB, L.M. et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: New therapeutic implications for an old family of drugs **Crit Rev Oral Biol Med** v.2, p.297-321, 1991
 42. GOLUB, L.M. et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. **J Periodontol.** v.56, n.11, p.93-7, 1985
-

43. HEGEDUS, Z. The rebuilding of the alveolar processes by bone transplantation. **Dent Cosmos**. v.65, p.736–742, 1923
 44. HEO, S.C. et al. Periostin Accelerates Bone Healing Mediated by Human Mesenchymal Stem Cell-Embedded Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Scaffold. **PLOS ONE** v.10, n.3, p.e0116698, 2015
 45. HERITIER, M. Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric acid application on human root dentin. **J Periodontol**. v.54, n.9, p. 515-21, 1983
 46. HSIONG, S.X.; MOONEY, D.J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol 2000**. v.41, p.109-22, 2006
 47. HOLDSWORTH, D.W.; THORNTON, M.M. Micro-CT in small animal and specimen imaging. **Trends in Biotechnology** v.20, n. 8, p.34-39, 2002.
 48. HOUNSFIELD, G.N. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. **Br.J.Radiol**. v.46, p.1016-1022, 1973
 49. HULE, R.A., et al. Correlations between structure, material properties and bioproperties in self-assembled beta-hairpin peptide hydrogels. **Faraday Discuss**. v.139, p.251-64, 2008
 50. INODA, H.; YAMAMOTO, G.; HATTORI, T. Rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**. v.36, p.39-44, 2007
 51. INTINI, G. et al. A Comparative Analysis of Bone Formation Induced by Human Demineralized Freeze-Dried Bone and Enamel Matrix Derivate in Rat Calvaria Critical-Size Bone Defects. **J Periodontol** v.79, p.1217-1224, 2008
 52. JONES, L. et al. No influence of alimentary zinc on the healing of calvarial defects filled with osteopromotive substances in rat **European Journal of Orthodontics** v.32, p.124–13, 2010
 53. JONES, L. et al. Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1,3 and 6 months after implantation with osteopromotive substances. **Journal of Cranio-maxillofacial Surgery** v.35, p.350-357, 2007
 54. KALLAI, I. et al. Microcomputed tomography–based structural analysis of various bone tissue regeneration models **Nat Prot** v.6, n.1, p.105-110, 2011
-

55. KAZANCIOGLU, H.O.; EZIRGANLI, S.; AYDIN, M.S. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects **J Craniofac Surg** v.24, n.6, p. 2141-2146, 2013
 56. KHOJASTEH, A. et al. Effect of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** v.116, p.405-423, 2013
 57. KHOJASTEH, A.; ESLAMINEJAD, M.B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet rich plasma **OOOOE** v.106, n.3, p.356-362, 2008
 58. KIGAMI, R. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis and bone regeneration in non-critical-size bone defects in rat calvaria **Journal of Oral Science**, v. 56, n. 1, p.17-22, 2014
 59. KIM, S.S.; KIM, B.S. Comparison of Osteogenic Potential Between Apatite-Coated Poly(LactideCo-Glycolide)/Hydroxyapatite Particulates and Bio-Oss **Dental Materials Journal** v.27, n.3, p.368—375, 2008
 60. KIM, H.J. et al. Effect of acellular dermal matrix as a delivery carrier of adipose-derived mesenchymal stem cells on bone regeneration **Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials** v.100b, n.6, Agosto 2012
 61. KIM, Y.K. et al. Guided bone regeneration using demineralized allogenic bone matrix with calcium sulfate: case series **J Adv Prosthodont.** v.5, n.2, p.167-171, 2013
 62. KOCHI, G. et al. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v.107, p.e42-e48, 2009
 63. KOK, I.J. et al. Evaluation of a Collagen Scaffold for Cell-Based Bone Repair **Int J Oral Maxillofac Implants**; v.29, n.1, p.e122–e129, 2014
 64. LABAHN, R. et al. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. **J Periodontol.** v.63, n.4, p. 303-309, 1992.
 65. LEACH, J.K. et al. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration **Biomaterials** v.27, p.3249-3255, 2006
-

66. LEE, J.H. et al. The incorporation of bFGF mediated by heparin into PCL/gelatin composite fiber meshes for guided bone regeneration **Drug Deliv. and Transl. Res.** v.5, p.146–159, 2015
 67. LEE, S.S. et al. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds **Biomaterials** v.34, p.452-459, 2013
 68. LEWANDROWSKI K-U, et al. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. **J Orthop Res.** v.15, n.5, p.748-56, 1997
 69. LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRNERS, R.S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc Res Tech.** v.60, p.107-114, 2003
 70. LIBIN, B.M.; WARD, H.L.; FISHMAN, L. Decalcified, lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects. **J Periodontol** v.46, p.51-6, 1975
 71. LIM, S.C.; LEE, M.A.; YEO, H.H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats **Pathology International** v.50, p. 594–602, 2000
 72. LIN, Y. et al. Bone Regeneration by BMP-2 enhanced adipose stem cells loading on alginate gel **Histochem Cell Biol** v.129, p.203–210, 2008
 73. LORENZO, A. et al. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. **Matrix** v.12, p. 282-290, 1992
 74. LUVIZUTO, E.R. et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects **Biomaterials** v.32, n.15, p. 3855-3861, 2011
 75. MAIA, F.R. Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties **Acta Biomaterialia** v.9, p.8773–8789, 2013
 76. MARÉCHAL, M. et al .Histomorphometry and microcomputed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. **Clin. Oral Impl. Res.** v.16, p. 708–714, 2005
-

77. MARKS, S.C.J.R.; MEHTA, N.R. Lack the effect of citric acid treatment of root surfaces on the formation of new connective tissue attachment. **J Clin. Periodontol.** v.13, p.109-116, 1986.
 78. MARIOTTI, A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol** v.8, n.1, p.205-226, 2003
 79. MARQUES, L. et al. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect **Lasers Med Sci** v.30, n.4, p.1225-1230, 2015
 80. MATTHEWS, S.J.E. Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMPS) **Injury, Int. J. Care Injured** v.36s, p.34-37, 2005
 81. MEADOWS, C.L. et al. A comparison of polylactic acid granules and decalcified freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. **J Periodontol** v.64, p.103-9, 1993
 82. MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol.** v.47, n.5, p.256-60, 1976
 83. MESSORA M.R. et al. Bone healing in critical size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvária. **J periodontal Res** v.43, p. 217-23, 2008
 84. MIRANDA, S.R. et al. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. **Clin. Oral Impl. Res.** v.17, p. 694–699, 2006
 85. MOKBEL, N. et al. Healing patterns of critical size bony defects in rats after grafting with bone substitutes soaked in recombinant human bone morphogenetic protein-2: histological and histometric evaluation. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v.51, n.6, p.545-9, 2013
 86. MOKBEL et al., Healing patterns of critical sized bony defects in rat following bone graft. **Oral Maxillofac Surg** v.12, p.73-78, 2008.
 87. MONJO, M. et al. In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical size cortical bone defects **Acta Biomaterialia** v.6, p.1405-1412, 2010
-

88. MOON, H.J. et al. Bone formation in calvarial defects of Sprague-Dawley rats by transplantation of calcium phosphate glass **J Biomed Mater Res** v.74A, p. 497–502, 2005
 89. MOTT, D.A. et al. Enhancement Of osteoblast proliferation Invitro By selective enrichment Of Demineralized freeze-Dried bone Allograft with specific growth factors **Journal of Oral Implantology** v.28, n.2, p.57-66, 2002
 90. MUKHERJEE, D.P. et al. An Animal Evaluation of a Paste of Chitosan Glutamate and Hydroxyapatite as a Synthetic Bone Graft Material **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater** v.67B, p. 603–609, 2003
 91. MUTHUKURU, M.; SUN, J. Doxycycline Counteracts Bone Morphogenic Protein 2–Induced Osteogenic Mediators **J Periodontol** v.84, p.656-665, 2013
 92. NAGATA, M.J.H. et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing **J Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 121, p.6-14, 2013
 93. NAGATA, M.J.H. et al. Influence of the Ratio of Particulate Autogenous Bone Graft/Platelet-Rich Plasma on Bone Healing in Critical-Size Defects: A Histologic and Histometric Study in Rat Calvaria **J Orthop Res** v.28, p.468–473, 2010
 94. NAGATA, M.J.H. et al., Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/ platelet-rich plasma on bone healing in critical –size defects: An immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone** v.45, p.339-345, 2009
 95. NAGATA, M.J.H. et al. Healing of Dehiscence Defects Following Root Surface Demineralization With Tetracycline: A Histologic Study in Monkeys **J Periodontol** v.76, p.908-914, 2005
 96. NIEMEYER, P. et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model **Acta Biomaterialia** v.6, p.900-908, 2010
 97. NOTODIHARDJO, F.Z et al. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats **Journal of cranio max Surg** v.40, p.287-291, 2010
 98. O'DONNELL, R.J. et al. Effect of Er:YAG Laser Holes on Osteoinduction in Demineralized Rat Calvarial Allografts **Journal of Orthopaedic Research** v.14, n.1, p.108-113, 1996.
-

99. OLIVEIRA, O.H.C.; MUNCINELLI, E. A.G. Efficacy of Root Surface Biomodification in Root Coverage: A Systematic Review **J Can Dent Assoc** v.78, c.122, 2012
 100. OLIVEIRA, M.R et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.44, n.5, p.649-55, 2015
 101. ORTOLAN, X. R. et al. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone **Jounal of cranio max Surg** v.42, p. 520-524, 2014
 102. OZDEMIR, H. et al. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats **J Periodont Res** v.48, p.722–726, 2013
 103. PANDIT, S.; HADDEN, W. Black pigmentation of bone due to long-term minocycline use. **Surgeon**. v.2, n.4, p.236-7, 2004
 104. PARK, J-W. et al. Bone healing with oxytocin-loaded microporous b-TCP bone substitute in ectopic bone formation model and critical-sized osseous defect of rat **J Clin Periodontol** v.41, p.181–190, 2014
 105. PARK, J-W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clin Oral Impl. Res.** v.20, p. 372-378, 2009
 106. PARK, S.Y. et al. The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects **J Periodontal Implant Sci** v.41, p.218-226, 2011
 107. PASSANEZI, E. et al. **Distancias Biológicas Periodontais**. Artes Medicas, São Paulo, 2011, 304 p.
 108. PAULO, A.O. et al. Repair of Critical-Size Defects with Autogenous Periosteum-Derived Cells Combined with Bovine Anorganic Apatite/Collagen: An Experimental Study in Rat Calvaria **Braz Dent J** v.22, n.4, p.322-328, 2011
 109. PEARSON, G.E.; ROSEN, S.; DEPORTER, D.A. Preliminary observations on the usefulness of a decalcified, freeze-dried cancellous bone allograft material in periodontal surgery. **J Periodontol** v.52, p.55-9, 1981
-

110. PIETRZAK, W.S. et al. The in vitro elution of BMP-7 from demineralized bone matrix. **Cell Tissue Bank** v.13, p.653–661, 2012
 111. PITARU, J. E. et al. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblast in vitro. **J Period Res.** v.19, n.4, p. 408-18, 1984
 112. POLSON, M.A.; PROYE, M.P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol.** v.54, n.3, p.141-147, 1983
 113. QIU, Q.Q. et al. Evaluation of Bone Regeneration at Critical-Sized Calvarial Defect by DBM/AM Composite. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.** v.81, n.2, p.516-523, 2007
 114. QUINTERO, G. et al. A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. **J Periodontol** v.53, p.726-30, 1982
 115. REGISTER, A.A. Bone and Cementum Induction by Dentin, Demineralized in situ **J Periodontol**, v.44, n.1, p.49-54, 1973
 116. REZENDE, M.L. et al. Bone Demineralization With Citric Acid Enhances Adhesion and Spreading of Preosteoblasts **J Periodontol** v.86, n.1, p.146-154, 2015.
 117. 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-e129, 2014
 118. Rifkin BR1, Vernillo AT, Golub LM. 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, p.819-27, 1993
 119. RILEY, E.H. et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Biology and Applications **Clinical Orthopaedics And Related Research Number** n.324, p.39-46, 1996
 120. RODRIGUES, M. et al. Biochemical and SEM studies on the demineralization of onlay bone grafts: implications on mechanical properties. **Implant News** v.9, n.3, p.329-36, 2012
-

121. ROJAS-PAULUS, J.E. et al. Desmineralização Ossea: Uma ferramenta clínica para o reparo **Perio News** v.9, p.140-144, 2015
 122. ROODMAN, G.D. Cell biology of the osteoclast **Experimental Hematology** v.27 p. 1229–1241, 1999
 123. SALMERON, S. **Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pre-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal** 2015. 161 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2015.
 124. SAN MIGUEL, B. et al. Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds **J Biomed Mat Res A**. v.94, n.4, p.1023-1033, 2010
 125. SCHWARZ, F. et al. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. **Clin. Oral Impl. Res.** v.20, p.1219-1230, 2009
 126. SELVIG, K.A. et al. Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. **J Periodontal Res.** v.16, n.1, p.123-9, Jan.1981
 127. SELVIG, K.A.; HALS, E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. **J Periodont Res.** v.12, n.6, p.419-29, 1977
 128. SCHALLHORN, R.G. Present status of osseous grafting procedures. **J Periodontol.** v.48, p.570–6, 1997
 129. SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions **Clinical Orthopaedics and Related Research** v.205, p.299-308, 1986
 130. SCHOFER, M.D. et al. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on colonization and bone formation in vivo **J Mater Sci: Mater Med** v.23, p.2227–2233, 2012
 131. SCHWARZ, F. et al. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. **Clin. Oral Impl. Res.** v.20, p. 1219–1230, 2009
-

132. SCWARTZ, Z. et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or Osteoclast **J Periodontol** v.71, n.4, p.586-597, 2000
 133. SONG, W.; MANO, J.F. Interaction between cells or protein and surfaces exhibiting extreme wettability **Soft Matter** v.9, p.2985-2999, 2013
 134. SONIS, S.T.; KABAN, L.B.; GLOWACKI, J. Clinical trial of demineralized bone powder in the treatment of periodontal defects. **J Oral Med** v.38, p.117-22, 1983
 135. SPICER, P.P. et al Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect **Nat Protoc.** v.7, n.10, p. 1918–1929, 2012
 136. STANCOVEN, B.W. et al. Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model **J Periodont Res** v.48, p. 243–251, 2013
 137. STEWART, U.T. Partial removal of cementum and descalcification of tooth in the treatment of pyorrea alveolaris. **Dent. Cosmos** v.41, p. 617-626, 1889
 138. SUDO, H. et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from new born mouse calvaria **J Cell Biol** v.96, n.1, p.191-198, 1983
 139. TABRIZI, R. et al. Use of Lyncomycin-impregnated demineralized freeze dried bone allograft in the periodontal defect after third molar surgery **J Oral Maxillofac Surg** v.72, p.850-857, 2014
 140. TAN, R. et al Repair of rat calvarial bone defects by controlled release of rhBMP-2 from an injectable bone regeneration composite **J Tissue Eng Regen Med** v.6, p.614-621, 2012
 141. TERECLA, A. et al. Repair of a Calvarial Defect With Biofactor and Stem Cell–Embedded Polyethylene Glycol Scaffold **Arch Facial Plast Surg.** v.12, n.3, p.166-171, 2010
 142. UDAGAWA, A. et al. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. **Clin. Oral Impl. Res.** v.24, p. 787–792, 2013
-

143. UMOH, J.U. et al. In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model **Phys. Med. Biol.** v.54, p.2147–2161, 2009
 144. URIST, M.R.; DELANGE, R.J.; FINERMAN, G.A. Bone cell differentiation and growth factors: formation by autoinduction. **Science** v.220, p.680-6, 1983
 145. 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, 1968
 146. URIST, M.R. et al. Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop Relat Res.** v.59, p.59-96, 1968
 147. URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science.** v.150, n.698, p.893-9, 1965
 148. VILLA, M.M. et al. Effects of Cell-Attachment and Extracellular Matrix on Bone Formation In Vivo in Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds. **PLOS ONE** v.9, n.10, p. e109568, 2014
 149. WALLACE, J.M. Effects of fixation and demineralization on bone collagen D-spacing as analyzed by atomic force microscopy **Connect Tissue Res**, v.56, n.2, p. 68–75, 2015
 150. WIKESJO, U.M.E.; SELVIG, K. Periodontal wound healing and regeneration **Periodontology 2000**, v.19, p. 21-39, 1999
 151. WIKSEJO, U.M.E et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment conditions detin surfaces. **J Periodonal Res.** v.21, p.322-329, 1986
 152. YOON, E. et al. In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Mode **TISSUE ENGINEERING** v. 13, n. 3, p.619-627, 2007
 153. YOU, L. et al. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats **Acta Pharmacol Sin** v.32, n.12, p.1498-1504, 2011
 154. YUN, J.I. et al. Effect of systemic parathyroid hormone(1–34)and a b-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model **J Clin Periodontol** v.37, p.419–426, 2010
-

155. ZAMBUZZI, W.F. et al. Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. **Braz Dent J.** v.23, n.4, p.315-2, 2012
 156. ZHAO, J. et al. Combination of b-TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs to heal critical size mandibular defects in rats **Oral Diseases** v.16, p.46–54, 2010
 157. ZHANG, Y. et al. Determination of a critical size calvarial defect in senile osteoporotic mice model based on in vivo micro-computed tomography and histological evaluation **Arch. Gerontol. Geriatr.** v.3125, 2015
 158. ZHONG, C. et al. Reconstruction Of Rat Calvarial Defects With Human Mesenchymal Stem Cells And Osteoblast-Like Cells In Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Scaffolds **European Cells and Materials** v. 20, p. 109-120, 2010
-

Anexos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 016/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhora Professora,

Informamos Vossa Senhoria que após análise por um relator e, tendo sido atendida a solicitação dessa Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, o projeto de pesquisa **Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Estudo microscópico e microtomográfico**, de autoria de Jeffrey Rojas, sob sua orientação, foi novamente avaliado pelo relator e considerado **APROVADO**, por esta Comissão em reunião realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pommermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende
Docente do Departamento de Prótese