UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ADRIANA DOS SANTOS CAETANO

**Efeito da desmineralização por ácido cítrico na consolidação de
enxertos ósseos autógenos em bloco: análise qualitativa,
quantitativa e imuno-histoquímica em humanos**

BAURU
2019

ADRIANA DOS SANTOS CAETANO

Efeito da desmineralização por ácido cítrico na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco: análise qualitativa, quantitativa e imuno-histoquímica em humanos

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Andreotti Damante

Versão Corrigida

BAURU

2019

Caetano, Adriana

Efeito da desmineralização por ácido cítrico na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco: análise qualitativa, quantitativa e imuno-histoquímica em humanos / Adriana dos Santos Caetano. – Bauru, 2019.

112p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carla Andreotti Damante

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

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

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: CAAE
65044417.6.0000.5417
DATA:17/03/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Adriana dos Santos Caetano

Nascimento	17 de fevereiro de 1987. Vera Cruz-SP
Filiação	Ademir dos Santos Caetano (in memoriam) Helena Alves dos Santos Caetano
2005-2008	Curso de Graduação Odontologia-Universidade do Sagrado Coração (UNISAGRADO-2019)
2009-2011	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Mestrado, área de Patologia Bucal da Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru
2012-2014	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Especialização, área de Implantodontia, Associação Educativa do Brasil-SOEBRÁS, Instituto de Odontologia de Ponta Edgard Moraes (OPEM)
2017-2018	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Aperfeiçoamento, Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Santa Casa de Misericórdia de Marília e Santa Casa de Misericórdia de Pederneiras
2015-2019	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Doutorado, área de Periodontia da Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru
2019-2019	Oficial do Exército Brasileiro- Dentista- Implantodontista- 2º Batalhão Logístico Leve- Campinas

Dedicatória

Dedico este trabalho ao herói da minha vida

Ademir dos Santos Caetano (in memoriam)

“Papai eu fiz de tudo para que o senhor não partisse, mas Deus o quis
para perto de Si”

A finalização desse ciclo é uma vitória, mas também é fruto de muitas
lutas, dificuldades, de momentos que o Senhor esqueceu de ti e focou
com muito **amor** em mim. Floresça e proteja-me.

*“Nenhuma vida é curta demais quando nela se cumpre a vontade de
Deus”.*

EU TE AMAREI ETERNAMENTE.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, por permitir a realização deste trabalho e a concretização desse ciclo na minha vida profissional. Os planos de Deus são perfeitos, a permissão de cada fato ocorrido durante o Doutorado mostrou que mesmo diante das dificuldades e das nossas limitações, ele nos capacita e nos fortalece. Obrigada Deus, porque o seu amor não falha, e por meio dele sou plenamente realizada.

A cada passo conquistado minha eterna gratidão a Deus

A minha mãe **Helena**, minha inspiração de todos os dias. Um amor incondicional que transforma guerra em paz, tristeza em alegria, desânimo em confiança, sabe expressar aquilo que realmente é necessário nos momentos corretos. Seu equilíbrio diante das diversas situações na nossa família, sua HUMILDADE e seu caráter fazem de mim todos os dias uma grande mulher. Obrigada por acreditar em mim e sempre me incentivar. Missão não imposta, porém regada com muita fé foi cumprida, meu doutorado. TE AMO!

Aos meus irmãos, **André, Fernando e Davi**, tão diferentes entre si, porém quando se voltam para mim, enxergam orgulho e orgulho. Meus sobrinhos, alegria da nossa família, um anjo se foi, porém surgiram vocês...os gêmeos “**Miguel e Gabriel**” e as gêmeas “**Ester e Estela**” e o **Arthur**. Titia ama muito vocês. Agradeço as minhas cunhadas **Silvana, Jhenifer e Gabriela** por todo carinho.

Agradeço meus avós **Neuza e Vital**, por todo apoio em todos os momentos da minha vida. Sempre cuidaram de mim como uma princesa. Ahhh... vocês não sabem a imensa satisfação que sinto e como derramo em lágrimas, quando vejo vocês falando: essa é minha neta Dri, a primeira dentista da família. Eu amo muito vocês. In memoriam, **Maria de Lourdes** minha avó já não está mais comigo fisicamente, sempre alegrava com minhas vitórias.

Aos meus familiares **tios e tias, primos e primas**...a energia positiva de vocês, o carinho e o amor transmitido são diamantes colecionados, e com eles estou construindo um castelo. Castelo de sucesso, de motivação, de oportunidades e de realização profissional. Obrigada por toda ajuda emocional e financeira.

“Ter uma família significa que você é parte de algo muito maravilhoso. Significa que você amará e será amado pelo resto da sua vida, não importa o quê.”
(Lisa Weeda)

Agradeço, **Danila (Da)**, uma amiga que se tornou irmã, não somente pela convivência física durante esses 6 anos, mas pelo zelo que tens comigo. Você sempre fala sobre propósitos, e eu afirmo que nossa amizade foi e tem sido um lindo propósito de Deus, pois com você eu cresci, amadureci e tive a oportunidade de compartilhar uma infinidade(rs) de momentos, receber os melhores conselhos, e se alegrar diante de grandes conquistas. Você é meu espelho. Através de você ganhei uma família maravilhosa e um irmão **Gabriel**, que oferece uma riqueza de conselhos, e destaca por um caráter singular. Meu casal preferido, que o amor de Deus nos cubra eternamente.

Aos meus amigos da velha guarda, **Louise**, um exemplo de gentileza, obrigada por ser base quando muitas vezes me falta o chão, e sempre me fazer enxergar que a vida é você estar em PAZ. Você e sua família são muito especiais. Aos coreanos do meu Brasil, **Joana**, que me acompanha desde do dia da minha matrícula da faculdade, o tempo passa e você sempre presente me incentivando. **Jane** e **Cristian**, obrigada por toda ajuda, mas quero enfatizar que sou grata Jane, por você me incentivar a ser guerreira e estar com a cabeça levantada em todos os momentos, que Deus te recompensa sempre, inclusive com comidas rs. Adoro você! A **Melissa**, **Victor** e **Alessandra** grandes amigos, obrigada por compartilhar dia-a-dia das minhas conquistas.

Rafael (Poma)..como foi bom te conhecer e sobretudo ter a oportunidade de te conquistar como amiga e “irmã”. Você é um ser iluminado, com um coração gigante, um menino de ouro e nossa amizade representa um mundo não egoísta, você mostrou que o melhor seu, também pode ser o melhor da outra pessoa. Obrigada por todo momento compartilhado de estudos, de experiências, de conselhos, de brigas e de muito companheirismo na alegria e tristeza. Conte sempre comigo! Também quero agradecer ao meu amigo **Heliton**, meu primeiro companheiro da pós-graduação, obrigada por gritar aos meus ouvidos: Dri vai, arrasa, acredite no seu potencial. Meu, você não fez isso ainda?! (lembranças “since” 2009). Quando eu estava em dúvida entre continuar seguindo a pós-graduação na patologia, você aconselhou siga o seu coração, o caminho foi longo, as vezes duvidoso, mas HOJE tenho certeza que fiz a escolha certa e sou uma ótima implantodontista. Agradeço a **Renata**, uma amiga especial, que além de permitir um laço de irmandade, é um orgulho. Obrigada por todos momentos na OPEM e a parceria na odontologia.

“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos.”

Sócrates

Eu sabia que iria realizar o doutorado, foram tantas propostas, lugares e nesse caminho de escolhas tive o imenso prazer de voltar para FOB-USP e ter como orientadora, a **Profa. Dra. Carla Andreotti Damante**. Profa, quero agradecer por ter proporcionado essa oportunidade e confiado a minha pessoa um trabalho com muitos detalhes e o envolvimento de pacientes. Poderia ser muito melhor, como também poderia ter sido muito mais difícil. A professora tem uma característica singular que é o dom de extrair o melhor de todas as situações, transformar o que é complexo em simples e permitir leveza no dia-a-dia...Obrigada, por toda experiência compartilhada e por permitir durante a fase de doutorado que eu agregasse valor nas áreas implantodontia e cirurgia. A melhor maneira de retribuir é CONTE SEMPRE COMIGO.

Quero agradecer, imensamente, a Profa. Dra. **Maria Lúcia Rubo de Rezende**, esta tese foi iniciada e finalizada porque a senhora em meio a tantas coisas para resolver, escolheu se envolver nesse projeto. Obrigada pelas cirurgias de reconstrução óssea, carinho imenso pelos pacientes, por preocupar se as coisas estavam caminhando bem, por fornecer material de consumo e se prontificar a trabalhar juntamente comigo no capítulo de resultados, enfim não tenho palavras para agradecer pela orientação. Agradeço por se orgulhar quando soube que realmente tinha dado certo meu concurso no exército, e pelo árduo conselho que me fez repensar em vários detalhes e crescer como aluna, pesquisadora e humana. Serei eternamente, grata.

“Se você quiser ter desvaneios, brincar as idéias, não tenha ilusões, tenha fantasias e exercite sua capacidade de sonhar. Se você quiser alcançar uma meta estabelecida, tenha ambições reais, organize-se e planeje o caminho a seguir.”

Abílio Diniz

Quero agradecer imensamente, **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por abrir as portas da Faculdade de Odontologia-UNESP, o acesso ao departamento e permitir a parceria da nossa pesquisa ao laboratório. Não tenho palavras para agradecer essa boa vontade. Agradeço também seus queridos alunos por toda atenção, envolvimento e cuidado com a técnica da imunoistoquímica, sem eles essa etapa jamais aconteceria de maneira excelente. Sou totalmente fã da sua carreira brilhante, da maneira como transmite os ensinamentos, como os detalhes sobre o tecido ósseo e as proteínas. Os momentos que tive com a senhora proporcionaram inspiração para finalizar minha tese de doutorado e aumentou a vontade em aprender sempre mais sobre reparo ósseo. A professora, sem dúvidas é um espelho e uma referência a ser seguida. Obrigada por tudo.

Agradeço imensamente ao **Dr. Cléverson Teixeira Soares**, pelo apoio e disposição em sempre ajudar. As portas do Instituto Lauro de Souza Lima e do Laboratório Anatomed, estão sempre abertas para mim pela sua permissão, isso é gratificante. Obrigada, pelas experiências compartilhadas no microscópio e nas etapas laboratoriais. Quero agradecer ao senhor Osmar, com muito destreza realizou a parte laboratorial das lâminas, sempre muito animado e cuidado. Agradeço, Débora do laboratório Anatomed, que recebeu as peças teciduais e mesmo com tantas atividades separou um tempo e nos ajudou muito nesse trabalho. Obrigada!

“O desejo de ir em direção ao outro, de se comunicar com ele, ajudá-lo de forma eficiente, faz nascer em nós uma imensa energia e uma grande alegria, sem nenhuma sensação de cansaço.”

(Dalai Lama)

Agradeço também a todos os **professores da Disciplina de Periodontia: Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana, Profa. Dra. Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando, Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende (Malu), Prof. Dr. Sebastião Luíz Aguiar Gregghi**, todo conhecimento compartilhado e experiências na área de Periodontia.

Agradeço aos amigos, colegas, e aos momentos compartilhados com vocês nesse tempo de doutorado: **Raphaella Coelho Michel, Talyta Sasaki Jurkevicz, Giovana Fuzeto Veronesi, Isis de Fátima Balderrama, Vitor Kondo Miyahira, Andréia Pereira, Erika Carvalho, Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi Luísa Andrade Valle, Vitor de Toledo Stuani, Matheus Volz Cardoso, Paula de Oliveira Cunha**. Em especial que agradecer a ajuda da **Luciana Tanaka, Cecilia Reyes e Rafael Ferreira** que colaboraram diretamente nos procedimentos executados com pacientes da minha pesquisa.

Agradeço a todos os funcionários da disciplina de Periodontia: **Edilaine Lúcio Rodrigues Torrecilha**, sempre com muita paciência disposta a ajudar e incentivar nossos dias no departamento e nas clínicas da **Ivânia Komatsu da Costa Arruda**, turbilhão de emoção com seu jeito de ser, agir, proteger, preocupadíssima com tudo, para que as coisas sempre ficassem corretas. Obrigada pelas tentativas em padronizar meu uniforme da clínica, e pelos conselhos de mãe em nessa etapa do meu doutorado. Que Deus te ilumine sempre. A secretária, **Marcela Maria Pereira**, meiga e muito querida, obrigada por ser gentil em todos os momentos comigo e cuidadosa com os documentos e e-mails. Você é esplêndida. Também, agradeço ao **Marco Antonio de Godoy**, por toda ajuda no laboratório. A **Hebe** da clínica da pós-graduação, por todos momentos compartilhados nas etapas cirúrgicas e protéticas.

À secretária da disciplina de Prótese: **Déborah Andrea Riêra Blasca** por toda a ajuda na fase inicial do doutorado.

Agradeço ao departamento de Anatomia da FOB-USP, ao Prof. **André Luiz Shinohara** pela orientação na fotografia das lâminas. A secretária **Daniela Ariane Alves**, por ser prestativa nas minhas visitas ao laboratório da anatomia.

Aos professores Dr. **Heitor Marques de Honório** e o Prof. Dr. **José Roberto Pereira Lauris**, pela contribuição da realização da análise estatística. Ao querido, **Prof. Dr. Wagner Teobaldo**, pela ajuda nas referências e momentos compartilhados em Bauru.

Agradeço especialmente, o **Prof. Dr. Edgard Franco Moraes Junior**, por toda paciência e ensinamento oferecido para mim depois que desvinculei de uma área básica, Patologia Bucal e decidi dedicar a carreira clínica. Sempre vou lembrar que se tivermos fé em Deus, disciplina, dedicação, perseverança e se fizermos o melhor com muito amor para nossos pacientes a recompensa nos alcançará.

Ao **INSTITUTO OPEM**, meu eterno agradecimento, considerada minha segunda casa por muitas pessoas. Realmente foi o lugar que cresci, amadureci, adquiri experiências enriquecedoras e fiz laços de amizade da qual eu levarei para vida toda. Em destaque ao **Prof. Adriano Campesi Tonin**, uma pessoa competente que por meio de uma maneira simples, consegue nos direcionar para as resoluções clínicas desafiadoras, enriquecendo minha vida de implantodontista. Obrigada por todos momentos compartilhados. A equipe daqueles questionados, vocês tem vida?rs Queridíssimos, **Paulo Vitor Ogliari, Vinicius Bizelli e Mario Roberto Nalesso**, na qual eu tive a oportunidade de compartilhar tempo e momentos diferentes com cada um de vocês, porém posso chamar todos de irmãos. Conte comigo sempre! Ao senhorito, **Prof. Dr. Rafael Dias**, obrigada por todos os momentos compartilhados (legais e não legais) rs, pelo apelido de Drizoka, pela admiração que tem por mim pessoa, e eu sei que posso contar com você sempre. Aos **funcionários da OPEM**, Milena, Simone, Tânia, Luisa, Andressa, Solange sem vocês, a jornada seria mais dura em Bauru. Vocês estão em meu coração.

Agradeço, a minha segunda casa atualmente, cidade de Campinas, especialmente o **Exército Brasileiro - Segundo Batalhão Logístico Leve**. Ao querido Comandante Tenente-coronel, **Pedro Castelo Branco Neto**, e ao sub-comandante **Marcos Henrique Mendes Arruda** por me receber com tanto carinho nessa nova jornada, mostrando que o que prevalece em nosso trabalho é a qualidade e não a quantidade, e sobre tudo o caráter. A equipe da minha formação, Capitão **Angelo kênio** e Tenente **Godóis**, Tenente **Saraiva** por todo ensinamento. A equipe da Saúde, aos Tenentes **Nayara, Vieira, Camylla, Kaça, Solim, Caio**, pessoas que tornam meus dias em Campinas mais coloridos, e que se tornaram muito especiais. Agradeço os soldados **Figueredo, Zago, Caires e Avelino**, por permitirem aprender com vocês, mas também ensiná-los como agir em diversas situações no consultório odontológico.

Agradeço imensamente aos **pacientes** que participaram dessa pesquisa, vocês foram peça fundamental para que esse trabalho fosse realizado. Dias de dificuldades, ansiedades e de muita expectativa para a instalação dos implantes, um novo sorriso.

Obrigada por confiar em mim o sonho de vocês.

Minha pesquisa contribuirá para a literatura, para o título de Doutorado, porem minha maior satisfação foi poder reabilitar vocês com implantes osseointegrados, restabelecendo a função e estética, melhorando a qualidade de vida.

Mas nós não devemos esquecer que temos um dever muito grande: nós lidamos com seres humanos e é nosso dever fazê-los felizes através de um sorriso bonito.

Façamos a diferença com nosso comprometimento e dedicação. Façam as pessoas felizes. Dêem tudo de si! Deus Proteja a todos.

Adriana dos Santos Caetano

Agradecimentos Institucionais

À **Faculdade**, na pessoa do **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** e ao vice-diretor **Prof. Dr. Guilherme Janson**.

À **Profa. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**, presidente da Comissão de Pós-Graduação e a comissão **Ana Letícia Palombo Momesso, Fátima Cassador Carvalho, Leila Regina da Silva e Maria Margareth Pereira Mokarzel** por todos os esclarecimentos prestados.

À **Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana**, chefe do departamento de Prótese por ser uma professora humilde e com muitos talentos, sempre a disposição de todos os alunos.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

“Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Introdução: A partir da perda dos dentes, inicia-se um processo de reabsorção óssea alveolar contínua e progressiva, acarretando deficiências ósseas, as quais impossibilitam a instalação de implantes osseointegrados. Técnicas de reconstrução óssea são empregadas, sendo o enxerto autógeno em bloco considerado “padrão ouro” para correção de defeitos ósseos em altura e espessura. Entretanto, diversos fatores podem influenciar a consolidação e união do enxerto em bloco com o leito receptor. Objetivo: Avaliar clinicamente, histologicamente (qualitativa e quantitativa), pela técnica imuno-histoquímica e imagens tomográficas o efeito da desmineralização pela aplicação de ácido cítrico a 10% pH1 por 30s da superfície óssea receptora e da superfície do bloco. Metodologia: A metodologia aplicada foi um ensaio clínico de boca dividida, 09 pacientes, os quais foram submetidos a cirurgias de enxerto autógeno em bloco, obtidos da região da sínfise mandibular, para reconstrução óssea em região anterior de maxila. O lado teste recebeu tratamento com ácido cítrico a 10% (pH1) por 30s (bloco e leito), sendo o lado controle sem tratamento adicional. Após seis meses, foram removidas biópsias com uma trefina de 2 mm de diâmetro durante a perfuração para instalação de implantes nas áreas enxertadas. Após a coleta, as amostras foram submetidas ao processamento histotécnico para coloração com Hematoxilina e Eosina para avaliação histomorfométrica. Cortes histológicos das mesmas amostras receberam marcação imuno-histoquímica da osteocalcina para análise dos eventos de formação e remodelação óssea e para o fator de crescimento endotelial (VGEF). Mensurações nos cortes tomográficos foram realizadas antes e após 5 meses da realização do enxerto ósseo, como também avaliação da estabilidade primária do implante (torque) no momento da cirurgia. Para a análise estatística, todas as variáveis seguiram um padrão de normalidade sendo utilizado o teste t pareado e o teste de Wilcoxon, adotando-se $p < 0,05$. Resultados: A análise quantitativa histológica revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na área de formação óssea na interface do enxerto ósseo do lado teste ($62,24 \pm 22,20$) em relação ao lado controle ($43,51 \pm 7,37$). A imunomarcação das proteínas osteocalcina no lado teste ($2,38 \pm 0,916$) e lado controle ($2,00 \pm 0,535$), como também a VGEF no lado teste ($1,50 \pm 0,756$) como no lado controle ($1,63 \pm 0,518$), não apresentaram diferença

estatisticamente significativa para ambas ($p>0.05$). Nas análises tomográficas, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) para cada uma das medidas (apical, centro, coronal) em relação a medida final para a inicial, porém, não houve diferença ($p>0,05$) entre o lado teste e controle para todas as variáveis analisadas. Conclusão: Os resultados encontrados sugerem que a desmineralização por ácido cítrico em enxertos ósseos autógenos em bloco e no leito, favoreceu histologicamente, uma maior área de neoformação óssea, porém não apresentou resultados superiores quanto aos parâmetros clínicos, tomográficos e visuais.

Palavra-chave: ácido cítrico. Desmineralização. Enxerto ósseo

ABSTRACT

Effect of citric acid demineralization in the consolidation of autogenous bone graft in block: Qualitative, quantitative and immunohistochemical analysis in humans

Introduction: With teeth loss, it begins a process of continuous and progressive alveolar bone resorption, causing bone defects, which make it impossible for the installation of osseointegrated implants. Bone reconstruction techniques are employed, being the autogenous graft in block, considered the "gold standard" for correction of bone defects in height and thickness. However, several factors can influence the consolidation and union of the block bone graft with the receptor bed.

Objective: To clinically and histologically (qualitative and quantitative), by immunohistochemical and tomographic images, evaluate the effect of demineralization by citric acid to 10% pH1 for 30s, of recipient bed and the block surface. Methodology: the methodology applied was split-mouth clinical trial. Nine patients who underwent surgeries of the autogenous graft in block, obtained in the region of the mandibular symphysis, for bone reconstruction in the anterior region of maxilla. Test side received treatment with 10% citric acid (pH1) for 30s (block and bedside). Control side did not receive any treatment. After six months, a biopsy was removed with a trephine of 2 mm diameter during drilling for installation of implants in grafted areas. After collection, the samples were subjected to histotechnical processing and staining with hematoxylin and eosin for histomorphometric evaluation. Histological cuts of the same samples received immunohistochemical marking with osteocalcin for analysis of events of formation and bone remodeling and to the endothelial growth factor (VGEF). The tomographic measurements were performed before and after 5 months of the completion of the bone graft, as well as measurement of primary stability of the implant (torque) at the time of the implant installation surgery. For the statistical analysis, all variables followed a pattern of normality and paired t test and the Wilcoxon test were applied adopting $p < 0.05$.

Results: The quantitative histological analysis revealed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the area of bone formation at the interface of the bone graft of the test side (62.24 ± 22.20) in relation to the control side (43.51 ± 7.37). The immunostaining of proteins osteocalcin in test (2.38 ± 0.916) and control side (2.00 ± 0.535), as well as the VGEF in test (1.50 ± 0.756) and control side (1.63 ± 0.518),

showed no statistically significant difference for both ($p>0.05$). In the tomographic analyzes, a statistically significant difference ($p<0.05$) for each of the measures (apical, middle, coronal) in relation to the final measure for the initial, however, there was no difference ($p>0.05$) between the test and control for all the variables analyzed. Conclusion: The results suggest that citric acid demineralization in block and layer autogenous bone grafts, favored histologically, a larger area of bone neoformation, but did not present superior results regarding clinical, tomographic and visual parameters.

Key words: Citric acid. Demineralization. Bone graft

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (FIGURAS)

- Figura 1:** Esquema representando o desenho do estudo..... 46
- Figura 2:** Esquema representativo dos procedimentos cirúrgicos na região edêntula a ser enxertada sendo: A: visão clínica intra-oral por vestibular; B: visão oclusal; C: visualização após confecção do retalho total; D: visão por oclusal; E: área do mento exposta após elevação do retalho total; F: área demarcada para remoção dos enxertos; G: enxerto em bloco removido; H: condicionamento com ácido cítrico com pH 1 por 30s da porção medular do enxerto. 51
- Figura 3:** Imagem representativa, sendo em: A: instalação do parafuso para fixação do enxerto ósseo; B: ajuste com uma posta diamantada da área do bloco; C: enxertos em blocos fixados; D: visualização por oclusal dos enxertos em bloco instalados; E: Suturas; F: imagem da sutura por oclusal..... 53
- Figura 4:** Imagem da paciente no pós operatório imediato com a bandagem na região superior a fim de se evitar edema no pós operatório..... 54
- Figura 5:** Esquema representando a fase 2, sendo: visão clínica intra oral por vestibular (A) e oclusal (B); C: posicionamento e estabilidade do guia cirúrgico; visão por vestibular (D) e oclusal (E) da área enxertada; F: visão após a remoção dos parafusos de fixação; G: uso da trefina para coleta do material; H: material obtido dentro da trefina. 56
- Figura 6:** Representação esquemática do espécime para análise microscópica qualitativa e quantitativa, identificando o objeto de análise: A: apical; C: coronal; P: parafuso de fixação do implante; EO: enxerto ósseo; IO: interface óssea entre o enxerto-leito receptor; ON: osso neoformado. As linhas tracejadas representam a área que foi biopsiada pela trefina para serem utilizadas para análise histológica e imunohistoquímica após a remoção do implante..... 57
-
-

Figura 7:	Pontos de referência vertical e horizontal das mensurações em tomografia computadorizada “Cone Beam”. Legenda: ENA (Espinha Nasal Anterior).	61
Figura 8:	Imagem representativa da interação enxerto ósseo ao leito receptor, para escolha da região (A) e posterior delineamento (B) da interface do tecido ósseo para avaliação da neoformação óssea. Legenda: LR: leito receptor, EO: Enxerto ósseo.	63
Figura 9:	Fluxograma do estudo.....	67
Figura 10:	Corte coronal e axiais da Tomografia computadoriza “Cone Beam”, ilustrando o grau severo de reabsorção óssea em A antes e em B depois da cirurgia de enxerto ósseo em bloco.	71
Figura 11:	Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo teste (A) e do grupo controle (B) . Observa-se tecido ósseo contendo várias lacunas, muitas dessas, preenchidas por osteócitos (setas vermelhas). Notam-se ainda espaços medulares apresentando tecido fibroso (estrela azul), vasos sanguíneos e áreas de neoformação ósseas (seta amarela).	72
Figura 12:	Imagem referente a imunomarcação para proteínas osteocalcina e VEGF, setas cor vermelha com áreas representativas do início da mineralização.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Anticorpos utilizados na técnica de imuno histoquímica	60
Tabela 2:	Distribuição da amostra de acordo com o gênero.....	68
Tabela 3:	Valores correspondentes aos torques (N/cm) para as medidas correspondentes a cada paciente e a média geral seguido do desvio padrão para cada um dos lados.....	69
Tabela 4:	Valores em milímetros correspondentes as mensurações tomográficas iniciais, finais e suas diferenças para cada um dos lados.....	70
Tabela 5:	Valores da porcentagem da área de tecido neoformado presente na interface enxerto-leito em ambos os lados.....	74
Tabela 6:	Avaliação da imunomarcção das proteínas Osteocalcina e Fator de Crescimento Endotelial (VEGF) nos pacientes da amostra divididos em lado teste e controle.	76
Tabela 7:	Valores correspondentes a média e desvio padrão dos escores para a imunomarcção em ambos os lados.....	76

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Desvio padrão
®	Marca registrada
BSA	Albumina Bovina
BMPs	Proteína ósseas morfogenéticas
d.p.	Desvio padrão
Dr(a).	Doutor(a)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
ENA	Espinha Nasal Anterior
g	Gramas
H2O2 - 30v	Peróxido de Hidrogênio Diluído
OCN	Osteocalcina
IEL	Interface enxerto-leito
pH	Potencial hidrogeniônico
RT	Resistencia a tração
TRAP	Fosfatase ácido tartarato resistente
TCN	Tetraciclina Hidroclorada
Prof(a).	Professor(a)
PGA	Fio de Sutura Ácido Poliglicólico
s	Segundo(s)
S	Significante
RUNX 2	Fator de Transcrição 2
SP	São Paulo
Mm	milímetro (s)
N/cm	Torque

n	número
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial
PBS	Tampão Fosfato Salino
PRP	Plasma rico em Plaquetas
Tc	Tomografia Computadorizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	Reabilitação oral em área edêntula	29
2.2	Enxerto ósseos	30
2.3	Tratamento da interface leito receptor-enxerto	32
2.4	Desmineralização óssea.....	33
2.5	Marcadores imuno-histoquímicos para o tecido ósseo	37
3	OBJETIVOS	41
4	METODOLOGIA.....	45
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	45
4.2	DESENHO DO ESTUDO	45
4.3	AMOSTRA	47
4.3.1	Critérios de Inclusão	47
4.3.2	Critérios de Exclusão	47
4.4	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	48
4.5	RANDOMIZAÇÃO DA AMOSTRA	48
4.6	CEGAMENTO DO ESTUDO	48
4.7	INTERVENÇÕES	48
4.7.1	Diagnóstico por Exames de Imagens	48
4.7.2	Etapas Cirúrgicas	49
4.7.2.1	Fase 1.....	49
4.7.2.2	Fase 2.....	55
4.7.2.3	Fase 3.....	57
4.8	PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO	57
4.8.1	Coloração por Hematoxilina-Eosina	58
4.8.2	Marcação Imuno-Histoquímica	58

4.9	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO	60
4.9.1	Avaliação por Inspeção Visual Trans-Operatória.....	60
4.9.2	Avaliação Clínica da Estabilidade do Implante Dentário.....	61
4.9.3	Avaliação Tomográfica	61
4.9.4	Análise Microscópica Qualitativa	62
4.9.5	Análise Microscópica Quantitativa	62
4.9.6	Avaliação Imuno-histoquímica - Qualitativa Ordinal	63
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5	RESULTADOS	67
5.1	Amostra	67
5.2	Parâmetros de Avaliação.....	68
5.2.1	Avaliação por Inspeção Visual Trans-Operatória.....	68
5.2.2	Avaliação Clínica da Estabilidade do Implante Dentário.....	69
5.2.3	Avaliação Tomográfica	69
5.2.4	Análise Microscópica	72
5.2.5	Avaliação Imuno-Histoquímica	74
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE	103
	ANEXO	109

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores levam à perda dos dentes, o que desencadeia um processo de reabsorção óssea alveolar, considerada crônica, progressiva, irreversível e cumulativa, sendo mais rápida nos primeiros seis meses, e contínua durante toda a vida do paciente (ATWOOD et al., 197; CAWOOD et al., 1994). A perda de tecido ósseo resulta em defeitos em altura e espessura que exigem correções por meio de enxertias ósseas previamente a instalação de implantes osseointegrados (MATSUMOTO, 1999; ALOY-PRÓSPER A et al., 2015).

Materiais de reconstrução óssea têm sido empregados, incluindo autógenos, alógenos, xenógenos, aloplásticos. O enxerto autógeno é considerado “padrão ouro”, apresenta características de osteocondução, osteoindução, além das células viáveis com capacidade osteogênica (FILLINGHAM; JACOBS, 2016). Dentre as técnicas de aumento da altura e/ou espessura óssea, destaca-se o enxerto em bloco do tipo autógeno. Esses enxertos podem ser obtidos de sítios intra e/ou extrabuciais (WILTFANG et al., 2004), sendo que as regiões mais utilizadas como área doadora são o mento, linha oblíqua da mandíbula, a crista ilíaca, e a calota craniana (COSTA-MENDES; SAUVIGNÉ; GUIOL, 2016; CLAVERO; LUNDGREN, 2003).

Apesar das propriedades benéficas dos enxertos em bloco, alguns autores relatam que eles podem apresentar consolidação insuficiente e/ou reabsorção excessiva, inviabilizando a reabilitação da área enxertada por implantes (KOERDT et al., 2013; MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA- DIAGO, 2009; SBORDONE et al., 2011). Objetivando otimizar a consolidação dos enxertos e diminuir sua taxa de reabsorção, desde tempos passados foram propostos diferentes métodos de tratamento da interface enxerto ósseo/leito receptor, demonstrando que a incorporação dos enxertos parece ser melhorada quando se expõe a medula óssea, quer pela perfuração da cortical do leito e/ou enxerto (ALBERIUS; GORDH; LINDBERG, 1996; BUSER et al., 1993), ou pela remoção por desgaste da camada cortical do osso receptor (ALBERIUS; GORDH, 1998; CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000), gerando uma substancial diminuição da perda do volume do leito quando essas técnicas são empregadas (ALBERIUS et al.,

1996). Além desses procedimentos, têm sido citados o uso de plasma rico em plaquetas (PRP) (MIRANDA et al., 2006), proteínas ósseas morfogenéticas (GORDH et al., 1999), laser em baixa potência (O'DONNELL et al., 1996) e desmineralização óssea (RODRIGUES et al., 2012; DOMINGUES, 2013; REZENDE, 2014;2015; CARVALHO, 2017, MANFREDI et al., 2019), sendo essa última foco do nosso grupo de estudo.

A desmineralização faz parte do processo biológico de remodelação do tecido ósseo no qual células clásticas lançam ácidos orgânicos (como o ácido cítrico) sobre a matriz mineralizada, formando cavidades superficiais e expondo a matriz orgânica com seu conteúdo osteoindutor, o qual atrai e estimula células mesenquimais indiferenciadas a se transformarem em osteoblastos (MELCHER, 1976).

A linha de pesquisa em que se insere este projeto é inovadora e vem sendo ampliada gradativamente, estimulada pelos resultados positivos, previamente alcançados por nossa equipe de pesquisadores, porém ainda não foram confirmados em humanos e revelaram que os fenômenos biológicos por trás desses eventos ainda não estão bem esclarecidos. Assim, é possível afirmar que existem suficientes indícios, até o presente, de que a desmineralização superficial é um procedimento biologicamente seguro e que pode ser um importante coadjuvante nos procedimentos de enxertos ósseos autógenos. Tais evidências estimularam o desenvolvimento deste estudo clínico inédito em humanos abordando avaliações histológicas, imuno-histoquímicas e análises tomográficas sobre o efeito da desmineralização com ácido cítrico na consolidação de enxertos ósseos em bloco em pacientes com indicação para reconstrução óssea previamente à instalação de implantes na região anterior da maxila.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REABILITAÇÃO ORAL EM ÁREA EDÊNTULA

É sabido que sempre houve uma busca do homem na substituição dos dentes perdidos, com a utilização de substâncias sintéticas ou naturais, como marfim, osso seco, fio de ouro, ligas de prata entre outros, com intuito de devolver em parte ou no todo a função do órgão perdido (LEMONS; NATIELLA, 1986; MISCHI; DIETSH, 1993). O conceito de reabilitação das áreas edêntulas inovou a odontologia, quando o Professor da Universidade de Gotemburgo, Per-Ingvar Bränemark e sua equipe, em 1952, estudavam a microcirculação, através de uma câmara de titânio implantada em fíbula de coelho. Desta forma surgiu a osseointegração, sendo estabelecida como uma conexão estrutural e funcional direta entre osso e a superfície de um implante submetido à carga funcional (BRANEMARK, 1985)

Após o surgimento dos implantes osseointegráveis a reabilitação de pacientes total e parcialmente desdentados, realizada até então com próteses dento, muco e dentomucossuportadas passou a ser uma excelente alternativa de tratamento com prognóstico favorável (BRANEMARK, 1985; CHIAPASCO; GATTI, 2003). O pré-requisito para instalação de implantes é tecido ósseo, que muitas vezes apresenta limitações provocadas pela perda dos elementos dentais, inviabilizam a reabilitação bucal devido à reabsorção óssea que ocorre após as exodontia (ATWOOD, 1963).

A reabsorção do rebordo alveolar é uma alteração constante após as exodontia (ATWOOD, 1963; TALLGREN, 1972), sendo considerada crônica, progressiva, irreversível e cumulativa, sendo mais rápida nos primeiros seis meses, e contínua durante toda a vida do paciente (ATWOOD, 1971; CAWOOD; HOWELL, 1988). A reabsorção óssea contínua, leva à atrofia dos maxilares (TALLGREN, 1972; CAWOOD; STOENLINGA; BROUNS, 1994).

Cawood e Howell (1988), com base em um estudo transversal randomizado em 300 crânios secos desenvolveram uma classificação para maxilares desdentados. A classificação adotada considerou Classe I, rebordos dentados; Classe II, rebordos imediatamente após a extração; Classe III, crista arredondada

com altura e espessura adequadas; Classe IV, rebordo em ponta de faca, adequada em altura e inadequada em espessura; Classe V, rebordo plano, inadequado em espessura e altura; e Classe VI, rebordo rebaixado, com evidências de alguma perda do processo basal. Os autores enfatizaram que a forma do osso basal da mandíbula e da maxila permaneça relativamente estável, porém mudanças que ocorrem no processo alveolar são altamente significativas em altura e espessura.

Sabendo que a presença do tecido ósseo, em qualidade e principalmente em quantidade é o pré-requisito para instalação de implantes em uma posição protéticamente adequada, é indiscutível a utilização de técnicas de reconstruções ósseas para as reabilitações implantossuportadas em rebordos com reabsorções e/ou atrofia óssea (LEKHOLM; ZARB, 1985), surge então os enxertos ósseos em Odontologia (SINET-PEDERSEN; ENEMARK, 1988; JENSEN; SIMONSEN; SINDET-PEDERSEN, 1990; MISCH, 1997).

2.2 ENXERTO ÓSSEOS

O histórico sobre as primeiras bases científicas para estudo dos enxertos ósseos foi baseado no fenômeno chamada osteogênese defendido por Ollier (1867), quando foi observado no enxerto a transferência de osso e perióstio e acreditava que ambos permaneciam vivos. Em seguida, Barth (1983) observou nos seus estudos que vários dias após a transferência do enxerto ósseo, este se apresentava sem vitalidade e que somente com a invasão gradual de células oriundas do leito receptor, ocorreria o repovoamento com células vivas, denominado muito mais tarde e mantido até os dias atuais de osteocondução. Phemister (1914) concluiu definitivamente que algumas células osteogênicas da superfície do enxerto ósseo sobreviviam por difusão de nutrientes advindos do leito receptor. Os primeiros pesquisadores a empregarem os enxertos ósseos autógenos para reconstrução de maxilas atroficas associado aos implantes foram Breine e Branemark (1980), o que abriu caminhos para a execução da técnica até os dias atuais (ALOY-PRÓSPERA et al., 2015; AGHALOO et al., 2016; URBAN et al., 2017; GULINELLI et al., 2019).

O sucesso das reconstruções ósseas esta baseado primordialmente no fenômeno da neoformação óssea, sendo determinada a partir de três fases, osteogênese, ocorre quando o enxerto é suprido de células capazes de formação óssea, a osteoindução representa a capacidade do enxerto de estimular a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente pela ação de um ou mais agentes indutores e a osteocondução ocorre por um material que conduz o crescimento e permite a aposição óssea a partir do remanescente ósseo da área receptora (GARG, 1999). Os materiais de enxerto ósseo para reconstrução dos maxilares, foram classificados como autógeno, alógeno, aloplásticos, considerado mecanismo de ação, onde somente o osso autógeno apresentou a capacidade de formar osso por osteogênese, osteoindução e osteocondução (MISCH; DIETSH, 1993).

Revascularização, incorporação, substituição e remodelação são os processos envolvidos nas técnicas de enxertia óssea. A revascularização ocorre em um período de duas semanas, através de vasos sanguíneos no interior dos espaços medulares. Na incorporação, ocorre o processo de união do enxerto ao osso hospedeiro. No processo de substituição, o enxerto ósseo é reabsorvido e substituído por depósito de osso novo (ANDERSON et al., 1964; DELEU; TRUETA, 1965; GARBIN JUNIOR et al., 2017)

Diversas regiões são empregadas nas reconstruções ósseas, como crista ilíaca (BOYNE; JAMES, 1980; CHIAPASCO; ZANIBONI; BOISCO, 2006), fíbula (CHIAPASCO; GATTI, 2004), tíbia (KIRMEIER et al., 2007), calota craniana (PEREIRA C., 2011), intra-bucal a sínfise mentoniana e linha oblíqua da mandíbula, sendo as áreas intra-bucais mais utilizadas como doadoras (COSTA-MENDES; SAUVIGNÉ; GUIOL, 2016).

A área doadora da região do mento, e sua remoção na forma de bloco teve início com as investigações de Sindet-Pedersen e Enemark (1988) visando o tratamento de defeitos ósseos de fissuras alveolares congênitas. A região do mento é uma das áreas mais utilizadas, apresenta como benefícios fácil acesso a área doadora e quantidade de tecido ósseo cortical e medular (MISCH, 1997; KAUFMAN, WANG, 2003) e como limitações potencial dano de ramos nervosos (LINKOW, 1983; MISCH et al., 1992).

A reconstrução óssea dos defeitos da maxila resulta em ganho de tecido ósseo e permite a instalação de implantes com melhor ancoragem, o que favorece uma reabilitação em uma posição proteticamente favorável (URBAN, 2015). Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão ouro”, quando utilizados na forma de bloco. O sucesso desse tipo de técnica está diretamente ligado a sua estabilização rígida ao leito receptor (BURGER; MESHKINI; LINDEBOOM, 2011), porém esses enxertos podem apresentar consolidação insuficiente e/ou reabsorção óssea inviabilizando a reabilitação da área enxertada por implantes (KOERDT et al., 2013; MAESTRE-FERRÍN; BORONAT-LÓPEZ; PEÑARROCHA-DIAGO, 2009).

As superfícies de contato entre enxerto ósseo em bloco e leito receptor têm sido referenciadas nas publicações, enfatizando principalmente a importância da adaptação congruente do enxerto ao leito e ao tratamento dado à interface para otimizar a consolidação do tecido enxertado (ALBERIUS et al., 1996b; GORDH; et al., 1997; CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000; PEDROSA et al., 2009).

2.3 TRATAMENTO DA INTERFACE LEITO RECEPTOR-ENXERTO

Na tentativa de encontrar meios para melhorar a sobrevivência dos enxertos em bloco e conseqüentemente o sucesso do tratamento, foram identificados fatores que podem influenciar o resultado do procedimento, entre eles: a origem embriológica do enxerto (KUSIAK; ZINS; WHITAKER, 1985; CHEN et al., 1994), a extensão da sua revascularização (KUSIAK; ZINS; WHITAKER, 1985), suas características arquiteturais, osso esponjoso ou cortical (OZAKI; BUCHMAN, 1998), métodos de fixação (LIN et al., 1990), manutenção do periósteo, sobrevivência de células ósseas viáveis do enxerto, perfurações ou decorticalizações no leito receptor (ALBERIUS et al. 1996a) e tratamentos aplicados à interface enxerto-leito ósseo hospedeiro (GORDH et al., 1997; MIRANDA et al., 2006).

Os mecanismos que governam os eventos biológicos inerentes ao processo de incorporação e remodelação dos enxertos onlay são focos de estudo, visto que podem otimizar os resultados dos procedimentos de reconstruções ósseas maxilomandibulares. Sendo assim, com o intuito de favorecer a consolidação dos

enxertos ósseos ao leito receptor, tratamentos de superfície vêm sendo utilizados. As pesquisas iniciais foram por meio da técnica de perfuração e descorticalização mostrando melhores resultados nos grupos onde foram aplicados esta técnica (ALBERIUS et al. 1996 GORDH; et al. 1997, DE CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000; PEDROSA et al., 2009).

Resultados favoráveis a descorticalização e perfuração do leito receptor, foram encontrados no trabalho de De Carvalho (2000). Com o objetivo de avaliar a influência do preparo do leito sobre a incorporação de enxertos ósseos autógenos, foram utilizados 6 cães com 3 tipos de leitos mandibular, cortical, perfurado e descorticalizado. Após 45 e 90 dias, os animais foram sacrificados e o tecido ósseo removido. Os espécimes foram preparados e corados com hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson. Os enxertos ósseos autógenos foram integrados ao leito receptor, principalmente nos grupos perfurados e decorticados. Os resultados mais pobres foram encontrados no grupo cortical.

2.4 DESMINERALIZAÇÃO ÓSSEA

A desmineralização faz parte do processo biológico de remodelação do tecido ósseo no qual células clásticas lançam ácidos orgânicos (como o ácido cítrico) sobre a matriz mineralizada, formando cavidades superficiais e expondo a matriz orgânica com seu conteúdo osteoindutor, o qual atrai e estimula células mesenquimais indiferenciadas a se transformarem em osteoblastos (MELCHER, 1976). Uma série de experimentos iniciados por Urist (URIST, 1965; URIST; DE LANGE; FINERMAN, 1983; URIST et al., 1968, demonstraram que a desmineralização ácida de fragmentos ósseos ou de dentina induz a formação de osso quando implantados em regiões intramuscular e subcutânea em ratos.

Ficou claro que o processo de desmineralização libera proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) da matriz óssea, permitindo que esses fatores induzam células dos tecidos adjacentes a se diferenciarem em osteoblastos. Esses trabalhos levaram ao desenvolvimento e aplicação clínica de preparados comerciais de osso alógeno liofilizado desmineralizado e não desmineralizado de diversas origens,

usados isoladamente ou como adjuntos aos enxertos ósseos autógenos (BOWERS et al., 1989; REGISTER, 1973). As superfícies de contato entre enxerto ósseo em bloco e leito receptor têm sido referenciadas nas publicações, enfatizando principalmente a importância da adaptação congruente do enxerto ao leito e ao tratamento dado à interface para otimizar a consolidação do tecido enxertado (ALBERIUS et al., 1996b; BUSER et al., 1993; CARVALHO; VASCONCELLOS; PI, 2000).

Estudos em humanos mostraram o benefício do uso de ácidos leves como o ácido cítrico no favorecimento da regeneração periodontal (SANT'ANA et al. 2009), uma vez que o processo mimetiza o que ocorre de forma fisiológica no tecido ósseo. A observação desse efeito benéfico da desmineralização ácida natural de tecidos mineralizados e de resultados favoráveis alcançados com o uso de desmineralização radicular e óssea em procedimentos de regeneração de defeitos periodontais (COLE et al., 1980; CRIGGER et al., 1978; CRIGGER; RENVERT; BOGLE, 1983) motivou o desenvolvimento de experimentos por nossa equipe que confirmaram ação favorável da desmineralização ácida superficial do osso sobre o comportamento de pré-osteoblastos (REZENDE et al., 2015, MANFREDI et al., 2019), na consolidação de enxertos ósseos (REZENDE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012; DOMINGUES, 2013; CARVALHO, 2017).

Rodrigues et al. (2012) avaliaram o efeito da desmineralização com EDTA sobre as propriedades mecânicas da interface enxerto e leito (IEL) em um estudo experimental. Foram realizados enxertos ósseos nas tíbias de coelhos após um dos seguintes tratamentos da IEL: desmineralização com EDTA pH neutro a 24% por três minutos (G-EDTA); o mesmo tratamento de G-EDTA associado a perfurações do leito receptor (G-EDTA-P); apenas perfurações do leito receptor (G-P); nenhum tratamento da interface (G-C). Após 90 dias, blocos ósseos contendo os enxertos foram removidos, preparados e submetidos a testes mecânicos de determinação da resistência à tração (RT) e módulo de elasticidade (E) em máquina de ensaio universal. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que todas as fraturas ocorreram na IEL. Os autores concluíram que a desmineralização por EDTA não interfere na RT da interface. Entretanto, o módulo de elasticidade dos espécimes tratados com EDTA foi significativamente maior do que nos não tratados, sugerindo

maior capacidade de deformação durante a introdução de implantes e menor probabilidade de destacamento do bloco durante esse procedimento.

Domingues (2013) também avaliou histomorfometricamente em tibia de coelhos a hipótese de que a desmineralização “in situ” das superfícies de contato enxerto-leito poderia influenciar a consolidação. A autora verificou que em espécimes tratados com ácido cítrico a 50% em pH 1 durante 3 minutos, aos 30 dias de pós-operatório, houve maior área de neoformação óssea na interface e superfícies de consolidação mais extensas do que em espécimes não desmineralizados. Também nesse estudo nenhum dano tecidual foi observado em decorrência da ação do ácido.

Rezende et al. (2014) realizaram desmineralização das superfícies ósseas em bloco tipo “onlay” em calvária de cobaias. O grupo teste foi tratado com gel contendo associação de tetraciclina e ácido cítrico a 50% em pH1 por 3 minutos. No grupo controle os blocos e leitões receptores não foram desmineralizados. Os espécimes obtidos desses grupos foram submetidos a análise quantitativa e qualitativa aos 7, 30 e 90 dias de pós-operatório. Os resultados levaram à conclusão que a desmineralização ácida promoveu a osteogênese na interface enxerto-leito e acelerou a consolidação dos enxertos. Importante foi a observação nesse estudo de que nenhum dano celular ou tecidual foi observado em decorrência do uso do ácido, permanecendo o tecido ósseo vital durante todo o experimento.

Rezende et al. (2015) buscaram compreender os efeitos da desmineralização óssea superficial com ácido cítrico na adesão e proliferação de células pré-osteoblásticas cultivadas em osso de calvária de cobaias. Os autores concluíram que a desmineralização superficial de superfícies ósseas com ácido cítrico (50%, pH 1) durante 15 a 30 segundos resulta num substrato adequado para a proliferação e disseminação de pré-osteoblastos e expõe elementos químicos essenciais que podem desempenhar um papel na diferenciação celular e mineralização óssea.

Foi encontrado também que amostras desmineralizadas mostraram células com morfologia em estágios mais avançados de diferenciação do que as não desmineralizadas em cultura celular. A área de recobrimento superficial foi significativamente maior após 24 horas de cultura nos grupos teste do que no

controle e a espessura da camada de células também foi maior nos grupos teste às 48 e 72 horas de avaliação. Houve significativamente maior expressão de BMP-2 e BMP-7 nas amostras dos grupos teste do que no grupo controle (SALMERON, 2015).

Carvalho (2017) investigou em calvária de ratos, os efeitos da desmineralização óssea em enxertos ósseos em bloco. Superfícies de contato foram desmineralizadas com tetraciclina hidrocloreto (TCN) ou ácido cítrico (AC) a 10% (pH=1) por 15, 30 ou 60 segundos (n=6). Enxertos controle foram realizados sem desmineralização. Após 7, 30 e 60 dias, blocos teciduais contendo os enxertos foram removidos e processados histotecnica para coloração com hematoxilina e eosina. Os espécimes de 30 dias de pós-operatório também forneceram amostras para avaliação imunohistoquímica para osteocalcina (OCN) e fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP). A autora concluiu que a desmineralização das superfícies ósseas de contato entre o enxerto ósseo e o leito receptor com AC ou TCN durante 15, 30 ou 60 segundos promoveu maior área de tecido ósseo neoformado na interface enxerto-leito do que a não desmineralização, principalmente nos períodos mais precoces de reparação. A consolidação do osso neoformado ao enxerto e ao leito receptor também foi maior em todos os grupos desmineralizados em relação ao controle.

O estudo mais recente da nossa equipe de pesquisa mostrou que a desmineralização com ácido cítrico e tetraciclina de superfícies ósseas são favoráveis para o crescimento e diferenciação de células pré-osteoblásticas. Sendo assim Manfredi et al. (2019) avaliaram o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre superfícies ósseas de calvária de ratos desmineralizadas com tetraciclina ácida (50mg/mL) e com ácido cítrico (10%, pH1) em diferentes tempos de aplicação. Foram removidas 126 amostras ósseas bicorticais e elas foram distribuídas aleatoriamente em um dos seguintes grupos de estudo (n=18): AC 15, desmineralizadas por ácido cítrico durante 15 segundos; AC 30, desmineralizadas por ácido cítrico durante 30 segundos; AC 60, desmineralizadas por ácido cítrico durante 60 segundos; TCN 15, desmineralizadas por tetraciclina durante 15 segundos; TCN 30, desmineralizadas por tetraciclina durante 30 segundos; TCN 60, desmineralizadas por tetraciclina durante 60

segundos e C, grupo controle formado por amostras não desmineralizadas. Os pré-osteoblastos foram cultivados sobre as amostras por 24, 48 e 72 horas examinadas à microscopia eletrônica de varredura. Vinte e uma amostras coletadas de outros 11 animais foram distribuídas entre os mesmos grupos e analisadas com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para análise da composição química superficial.

2.5 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS PARA O TECIDO ÓSSEO

A avaliação por microscopia óptica convencional é um método amplamente empregado para o estudo da consolidação de enxertos ósseos. Entretanto, o estudo de alguns marcadores da remodelação óssea é um importante meio para complementar e aumentar a credibilidade da avaliação. A osteocalcina (OC), a mais abundante proteína não-colagenosa no osso, é produzida por osteoblastos e destaca-se no processo de ossificação e VEGF na osteocondução com proliferação e migração de células endoteliais, níveis normais dessa proteína são necessários para manter a remodelação óssea (PEREIRA et al, 2017; BONARDI et al., 2018). Assim, a avaliação da expressão dessas duas proteínas em áreas de reparo ósseo é importante para a compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre a consolidação dos enxertos ósseos e neoformação óssea.

Bonardi JP et al., 2018 realizaram a imunomarcagem de proteínas em regiões de enxerto de levantamento do seio maxilar. Doze seios maxilares foram preenchidos osso autógeno (grupo controle), e nove com biomaterial ChronOS misturado na porção 1:1 com enxerto osso autógeno (grupo teste). Após 6 meses, foram obtidas amostras simultaneamente à instalação de implantes e estas foram submetidas a análises histomorfométricas e imuno-histoquímicas para o fator de transcrição 2 (RUNX2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fosfatase ácida resistente a tartarato e osteocalcina. A análise histológica das amostras obtidas do grupo teste revelou a presença de osso imaturo, enquanto amostras do grupo controle indicaram a formação de osso lamelar. Os resultados deste estudo demonstram um atraso na formação óssea, mas intensa diferenciação celular após 6 meses de consolidação do enxerto osso no grupo de teste. A quantidade de osso

imaturado e a imunomarcagem para essas proteínas fornecem evidências de uma via osteogênica que pode melhorar a neoformação óssea.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo realizar uma análise clínica, histológica (qualitativa e quantitativa), pela técnica imuno-histoquímica e imagens tomográficas para avaliar o efeito da desmineralização pela aplicação de ácido cítrico a 10% pH1 por 30s das superfícies ósseas contactantes de enxertos ósseos “onlay” realizados na região anterior de maxila em comparação à técnica convencional (sem desmineralização).

4 Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, sob o CAAE 65044417.6.0000.5417(Anexo A). A pesquisa foi realizada mediante concordância dos indivíduos recrutados, os quais foram informados claramente a respeito de todas as etapas, bem como da utilização de seus dados para fins de pesquisa e os mesmos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), seguindo as normas da Resolução 466/2012 do CONEP.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo foi um ensaio clínico (considerando a boca dividida), duplo cego, realizado na clínica de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP). Os pacientes selecionados deveriam apresentar defeitos ósseos na região anterior da maxila com indicação para enxerto ósseo em bloco visando posterior reabilitação com implantes osseointegrados. A figura 1 representa o desenho do estudo.

Figura 1: Esquema representando o desenho do estudo.

No lado teste, o enxerto autógeno em bloco e seu leito receptor foram desmineralizados com ácido cítrico 10% pH 1 por 30s. No lado controle, o enxerto ósseo autógeno em bloco foi realizado pela técnica convencional, sem desmineralização.

Esta pesquisada foi delineada de acordo com os critérios de ensaio clínico do CONSORT Statment e está registrado no ClinicalTrials.gov (NCT 03357068).

4.3 AMOSTRA

Com o objetivo de padronizar a seleção dos pacientes de maneira a obter uma amostra homogênea, foram utilizados os seguintes critérios:

4.3.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão para seleção dos pacientes foram:

- ✓ Pacientes parcialmente edêntulos com defeito ósseo Classe IV (CAWOOD; HOWELL, 1988) na região anterior da maxila com espessura entre 1,5 e 3,0 mm;
- ✓ Pacientes periodontalmente saudáveis ou previamente tratados (ausência de doença periodontal severa e generalizada).

4.3.2 Critérios de Exclusão

Adotou-se como critérios de exclusão:

- ✓ Indivíduos com doenças sistêmicas que contraindicassem a cirurgia ou prejudicassem a cicatrização;
 - ✓ Pacientes recebendo radioterapia e quimioterapia;
 - ✓ Indivíduos em terapias com bisfosfonatos;
 - ✓ Grávidas;
 - ✓ Fumantes.
-
-

4.4 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi realizado baseado em investigação científica, considerando o trabalho de KIRMEIER et al. (2008), que apresentou um desvio padrão (1,07), sendo assim foi estabelecido que 18 pacientes deveriam ser incluídos no presente estudo. Durante a fase de recrutamento dos indivíduos, não foi possível completar o número de 18 pacientes, então a amostra diminuiu e completada com 9 pacientes. Na literatura o estudo de boca dividida (PANDIS et al. 2013) se destaca quando comparado ao clínico convencional, pois ele apresenta alto nível de evidência científica e menor possibilidade de vieses. Orientação: Prof, Dr. José Roberto Pereira Lauris.

4.5 RANDOMIZAÇÃO DA AMOSTRA

A alocação dos lados teste e controle foi feita por randomização simples e aleatória.

4.6 CEGAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi duplo-cego. O paciente não foi informado qual lado foi teste e controle. O examinador que realizou a avaliação das lâminas confeccionadas a partir das amostras dos pacientes também não recebeu informações sobre os grupos.

4.7 INTERVENÇÕES

4.7.1 Diagnóstico por exames de imagens

Todos os pacientes foram submetidos aos exames imaginológicos. As tomadas radiográficas e tomografia computadorizada foram sempre feitas pelo

mesmo operador na Clínica de Radiologia do Departamento de Estomatologia FOB-USP.

A panorâmica foi o exame preliminar, avaliou a presença ou ausência de altura óssea na região anterior da maxila, sendo a medida em relação a altura da espinha nasal até a crista óssea a ser reabilitada. Já em relação a área doadora, que no caso foi a sínfise mandibular, avaliou-se a disponibilidade óssea (altura do mento) e/ou possíveis variações anatômicas (presença de dentes supranumerários, lesões periapicais, extensão mais anteriorizada do forame mental, dentre outras variações.

A radiografia periapical foi realizada na região anterior da maxila previamente a instalação dos implantes, fase de reabertura e fase protética, verificando a osseointegração dos implantes, adaptação dos componentes protéticos e prótese implantossuportada.

Já a tomografia computadorizada “Cone Beam” foi solicitada na avaliação inicial previa a cirurgia de reconstrução óssea. Os pacientes foram submetidos a tomografias computadorizadas processadas por I-CAT Cone Beam 3-D Dental Imaging System. Radiografias panorâmicas foram obtidas a partir de um único aparelho panorâmico, o Rotograph Plus® produzido pela Villa Sistemi Medicali.

4.7.2 Etapas cirúrgicas

Os pacientes passaram por 03 etapas cirúrgicas:

- **Fase 1** (reconstrução óssea):
- **Fase 2** (reabertura do enxerto autógeno, biópsia com trefina e instalação dos implantes;
- **Fase 3** (reabertura dos implantes).

4.7.2.1 Fase 1

As cirurgias de reconstrução óssea foram realizadas por um único operador experiente. Os pacientes apresentaram exames pré-operatórios com risco cirúrgico

prévio, classificação ASA I e ASA II (ASA Physical Status Classification System, 2014) e exames laboratoriais (Hemograma, Coagulograma, Hemoglobina Glicada, Uréia e Creatina) dentro do padrão normalidade, ou seja, aptos para a realização dos procedimentos propostos.

Como protocolo medicamentoso pré-operatório, 1 hora antes da cirurgia foram administrados 02 comprimidos de Dexametasona (4mg), 01 comprimido de Clavulin/ou Amoxicilina (875mg), 01 comprimido de Nimesulida (100mg). Nos casos de alergia a penicilina, 01 comprimido de Clindamicina (300mg) foi prescrito.

Para antissepsia intra-oral, os pacientes realizaram bochecho com solução de clorexidina 0,12% por 1 minuto e para antissepsia da face foi utilizada clorexidina a 2%.

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia local (Mepivacaína HCL2%+epinefrina 1:100.000). A região anterior da maxila (Figura 2 A e B) recebeu anestesia infiltrativa terminal por vestibular e por palatino. Um retalho mucoperiosteal foi levantado a partir de uma incisão horizontal na crista do rebordo desdentado e duas incisões relaxantes periféricas realizadas com lâmina de bisturi nº. 15C (Swann-Morton, Estados Unidos) e descolador de Molt nº. 9. Uma vez exposto (Figura 2 C e D), o leito receptor dos enxertos direito e esquerdo foi mapeado com papel cartão estéril que serviu de matriz para a coleta de osso da área doadora.

Figura 2: Esquema representativo dos procedimentos cirúrgicos na região edêntula a ser enxertada sendo: A: visão clínica intra oral por vestibular; B: visão oclusal; C: visualização após confecção do retalho total; D: visão por oclusal; E: área do mento exposta após elevação do retalho total; F: área demarcada para remoção dos enxertos; G: enxerto em bloco removido; H: condicionamento com ácido cítrico com pH 1 por 30s da porção medular do enxerto.

A região doadora escolhida para todos os enxertos foi a sínfise da mandíbula. Para a coleta dos enxertos ósseos, foi empregada anestesia por bloqueio dos nervos mentuais direito e esquerdo (quantia correspondente a 2 tubetes) além de anestesia infiltrativa no fundo do vestibulo anterior inferior (quantia correspondente a 1 tubete). Uma incisão horizontal superficial perpendicular à tábua óssea vestibular foi realizada aproximadamente na mucosa alveolar cerca de 4mm apical à junção muco-gengival empregando lâmina de bisturi nº. 15C (Swann-Morton, Estados Unidos). A partir dessa incisão, o tecido foi dissecado obliquamente em planos musculares até atingir o periósteo o qual também foi incisado perpendicularmente. A partir da incisão no periósteo deslocou-se um retalho mucoperiosteal até a base da mandíbula, expondo-se a sínfise (Figura 1E). Os mapas cirúrgicos foram posicionados na sínfise para permitir a delimitação dos enxertos com brocas carbides 701 e 702 montadas em peça reta 1:1 a 30000 rpm e irrigação abundante com soro fisiológico.

Removidos os mapas cirúrgicos, a osteotomia foi completada com as mesmas brocas (Figura 1F). Os blocos ósseos (Figura 1G) a serem transplantados para as áreas receptoras foram removidos do leito doador com auxílio de cinzel reto e martelo. Após sua remoção, os blocos ósseos foram desgastados para se adaptarem ao leito receptor empregando as brocas de fissura anteriormente citadas sob irrigação profusa com soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%).

Em seguida, com uma broca de aço esférica de 1mm de diâmetro montada na peça reta 1:1 a 30000 rpm e irrigação constante com soro fisiológico, foram feitas perfurações no leito receptor do lado controle. No lado teste, as perfurações foram feitas após a desmineralização do leito com o ácido cítrico a 10% pH1 durante 30s, sendo realizada também a desmineralização da porção interna do enxerto ósseo (Figura 1H). O ácido cítrico empregado era composto por Natrosol 2%, Propilenoglicol 5%, Nitagin 0,1%, Nitasol 0,1%, água (30g), adquirido em uma farmácia de manipulação (Bauru Fórmulas, Bauru, São Paulo).

Os enxertos ósseos em bloco foram fixados aos leitos receptores empregando parafusos de titânio 1,8 mm de diâmetro com o comprimento variando entre 10mm e 12mm (Bionnovation®, Bauru, Brasil) com a porção medular voltada para a cortical do leito receptor (Figura 3A). Os enxertos do lado teste receberam o

mesmo protocolo de fixação, foram desmineralizados com ácido cítrico, conforme já descrito, em sua face interna, ou seja, a face que entrou em contato com o leito receptor. Após a instalação dos parafusos, pequenos ajustes com pontas diamantadas esféricas foram realizadas com irrigação constante para remover irregularidades do bloco (Figura 3B). Feito isso, notou-se boa adaptação do enxerto ósseo sobre o leito recepto (Figura 3C e D).

Figura 3: Imagem representativa, sendo em: A: instalação do parafuso para fixação do enxerto ósseo; B: ajuste com uma ponta diamantada da área do bloco; C: enxertos em blocos fixados; D: visualização por oclusal dos enxertos em bloco instalados; E: Suturas; F: imagem da sutura por oclusal.

Em seguida, o tecido mole foi reposicionado recobrando os enxertos sem tensão e os retalhos foram suturados com fio não-reabsorvível 5-0 (Nylon, Shallon®, Goiás, Brasil) (Figura 3 E e F). Na maxila a sutura da área doadora foi feita em planos, empregando fio reabsorvível 5-0 (P.G.A, BRAUN®, Rio de Janeiro, Brasil) na camada muscular e mucosa bucal.

Imediatamente, após a finalização da cirurgia, foi realizada bandagem com Fita Micropore Nexcare Bege com 50mm de altura (Figura 4).

Figura 4: Imagem da paciente no pós operatório imediato com a bandagem na região superior a fim de se evitar edema no pós operatório.

Aos pacientes foi feita prescrição de Clavulin (875mg) de 12/12 horas por 07 dias, Nimesulida (100mg) de 12/12 horas por 03 dias e leves bochechos de clorexidina a 0,12% para higiene bucal duas vezes ao dia por 07 dias. Os pacientes receberam orientações quanto à medicação bem como quanto à higiene e dieta pós-operatória. Os pacientes com próteses removíveis provisórias foram acompanhados mensalmente para os devidos ajustes e reembasamento das próteses.

4.7.2.2 Fase 2

A segunda fase cirúrgica (Figura 5 A e B) foi realizada após seis meses das cirurgias de enxerto ósseo para a reabertura do enxerto, coleta de espécime para análise anatomohistoimunopatológico e instalação de implantes. Para a instalação dos implantes, um guia cirúrgico em acetato foi confeccionado (Figura 5 C).

Após anestesia infiltrativa terminal e elevação de retalho mucoperiosteal (Figura 5 D e E) conforme já descrito, foram removidos os parafusos de fixação dos enxertos (Figura 5 F). Antes de iniciar a instalação dos implantes, foram colhidas biópsias contendo a interface entre tecido ósseo enxertado e leito receptor (Figura 5 G) além do tecido circundante de forma a não interferir na viabilização da instalação dos implantes. Para isso foi empregada uma broca trefina de 2 mm de diâmetro (S.I.N[®], São Paulo, Brasil) (Figura 5 H), representado pela Figura 6. O material obtido era removido de dentro da trefina e colocado imediatamente em formol tamponado a 10% (Merck, Darmstadt, Germany).

Figura 5: Esquema representando a fase 2, sendo: visão clínica intra oral por vestibular (A) e oclusal (B); C: posicionamento e estabilidade do guia cirúrgico; visão por vestibular (D) e oclusal (E) da área enxertada; F: visão após a remoção dos parafusos de fixação; G: uso da trefina para coleta do material; H: material obtido dentro da trefina.

Figura 6: Representação esquemática do espécime para análise microscópica qualitativa e quantitativa, identificando o objeto de análise: A: apical; C: coronal; P: parafuso de fixação do implante; EO: enxerto ósseo; IO: interface óssea entre o enxerto-leito receptor; ON: osso neoformado. As linhas tracejadas representam a área que foi biopsiada pela trefina para serem utilizadas para análise histológica e imuno-histoquímica após a remoção do implante.

Foram instalados implantes Drive Ti com diâmetro de 3,5mm (Sistema Neodent®, Curitiba, Brasil) de acordo com o planejamento protético de cada caso. Em seguida, o tecido mole foi reposicionado recobrando os enxertos sem tensão e os retalhos foram suturados com fio não-reabsorvível 5-0 (Nylon, Shallon®, Goiás, Brasil)

4.7.2.3 Fase 3

Após 3 meses, os implantes foram cirurgicamente expostos para receber cicatrizadores escolhidos de acordo com a altura do tecido mole de cada caso. Após 15 dias foi dada sequência na reabilitação protética implantossuportadas para finalização desse estudo e instalação da prótese da paciente.

4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

As biópsias coletadas permaneceram em formol tamponado a 10% (Merck, Darmstadt, Germany) por no mínimo 48 horas e processadas no laboratório de

Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru, SP). Todos os espécimes foram descalcificados em ácido nítrico a 10% durante aproximadamente 5 dias. Em seguida, foram desidratados em soluções crescentes de etanol (70°, 95° e absoluto), diafanização em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha KGaA, Darmstadt, Alemanha) e inclusão em Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) fundida em estufa.

As amostras passaram por processos de coloração por hematoxilina-eosina e sob supervisão do Dr. Cleverson Teixeira Soares no laboratório de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru, SP). E para as análises imuno-histoquímicas, as mesmas foram enviadas para o laboratório da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Campus de Araçatuba) e processadas sob supervisão da Prof. Dra. Roberta Okamoto.

4.8.1 Coloração por hematoxilina-eosina

Cortes semi-seriados foram realizados em micrótomo Leica® RM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), com 3 µm de espessura, e montados sobre lâminas convencionais (Dako Cytomation North America Inc, Carpinteria, CA, EUA), e corados por hematoxilina-eosina.

4.8.2 Marcação imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para as proteínas osteocalcina e VEGF (TABELA 1) baseou-se na técnica da imunoperoxidase seguindo a metodologia padronizada na Faculdade de Odontologia da Unesp de Araçatuba, como descrita a seguir:

- ✓ obtenção de cortes microscópicos de 3µm de espessura do tecido ósseo colocados em lâminas de vidro do tipo silanizadas (25 x 75 x 1mm, Superfrost Plus Easypath);
 - ✓ as lâminas contendo as biópsias foram desparafinizadas em estufa em xilol a 60°C por 30 minutos, xilol a temperatura ambiente por 18 minutos e, em seguida, foram hidratadas com imersão em álcool
-

absoluto por 6 minutos, imersão em álcool 95% por 2 minutos, imersão em álcool 80% por 2 minutos, imersão em álcool 70% por 2 minutos e imersão em álcool 50% por 2 minutos;

- ✓ lavagem das lâminas em três banhos de 1,5 com PBS;
 - ✓ o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma solução de 20 ml de peróxido de hidrogênio diluído (H2O2-30v) e 180 ml de PBS Normal 45 minutos;
 - ✓ lavagem em três banhos de 1,5 minutos com solução salina tamponada com fosfato (PBS = Phosphate Buffer Saline) Triton.
 - ✓ a recuperação antigênica foi realizada por meio da incubação dos espécimes do tecido ósseo em solução de Tampão Citrato 10 mM e pH 6,0. As lâminas foram deixadas 10 minutos na vaporeira tampada, 10 minutos na vaporeira destampada e 20 minutos na bancada esfriando.
 - ✓ O bloqueio da enzima endógena Biotina foi realizado com 8g de leite mólico desnatado e 200 ml de água destilada por 20 minutos.
 - ✓ realizou-se a incubação “overnight” com o anticorpo primário policlonais contra osteocalcina e contra VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), no título pré- estabelecido 1:100, diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) a 1% (Sigma, A9647, EUA) colocado em câmara úmida e resfriado em uma temperatura de 2°C a 8°C;
 - ✓ lavagem das lâminas em PBS com Triton por 5 minutos;
 - ✓ Em seguida, realizou-se a reação com o anticorpo secundário biotinilado anti-cabras (Jackson Immunoresearch Laboratories) por uma hora em temperatura ambiente.
 - ✓ lavagem das lâminas em PBS com Triton por 4,5 minutos;
 - ✓ O complexo ABC (Vector Laboratories, Canada) composto por 10 µl A (Adivina), 10 µl B (Biotina) e 980 µl PBS-BSA) foi aplicado por 45 minutos;
 - ✓ lavagem das lâminas em PBS com Triton por 5 minutos;
 - ✓ procedeu-se então, a visualização da reação antígeno-anticorpo por meio da incubação com a solução de 3,3’ Diaminobenzidina
-
-

Tretrahidroclorido (DAB, SIGMA, St Louis, EUA), por 10 minutos ao abrigo da luz;

- ✓ As lâminas foram lavadas com água destilada para paralisar a reação;
- ✓ os cortes microscópicos das biópsias foram lavados em água destilada e, em seguida contra-corados com hematoxilina de Harris (SIGMA, 63103, St Louis, EUA) por 2 minutos;
- ✓ As lâminas com água corrente para tirar o excesso de hematoxilina;
- ✓ os cortes microscópicos foram lavados em água corrente e destilada e, em seguida, desidratados em concentração graduais com imersão em álcool 95%, imersão em álcool 100%, ambos por um minuto e imersão em álcool 100% por dois minutos, mergulhados em xilol I e II por 5 minutos e montados com resina sintética Permound e lamínulas;

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica

<u>Molécula-alvo</u>	<u>Anticorpo Primário</u>	<u>Anticorpo Secundário</u>
VEGF	Anti-VEGF(Santa Cruz Biotechnology, sc -1881)	Anticorpo biotilnado produzido em burros e Anti-IgC de cabras (Jackson ImmunoResearch)
Osteocalcina	Anti- Osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology, sc- 18319)	Anticorpo biotilnado, produzido em burros e Anti-IgC de cabras (Jackson ImmunoResearch)

4.9 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

Para todos os parâmetros de avaliações os avaliadores estavam cegos sobre qual lado foi o teste ou o controle.

4.9.1 Avaliação por inspeção Visual Trans-operatória

Uma inspeção visual foi realizada após confecção do retalho mucoperiosteal, sendo possível observar a região enxertada e verificar a relação das bordas do enxerto ao leito receptor e a presença de eventuais espaços (microgaps) com interposição de tecido mole. As características teciduais foram mensuradas a partir de análise descritiva para ambos os lados.

4.9.2 Avaliação Clínica da estabilidade do implante dentário

A avaliação do torque (N/cm) dos implantes osseointegrados foi obtida ao final da instalação após verificar o adequado posicionamento do implante na região instalada. Tal avaliação ocorreu por meio do torquímetro cirúrgico presente no kit do implante (sistema Neodent, Curitiba, Brasil). Os dados dessa mensuração foram registrados para posterior comparação entre os lados (teste e controle).

4.9.3 Avaliação tomográfica

Além da tomografia computadorizada “Cone Bean” solicitada na avaliação inicial, um novo exame foi realizado após 5 meses da cirurgia de reconstrução óssea. Dessa forma, foi possível diagnosticar o grau de reabsorção óssea e também o ganho de tecido ósseo obtido após o enxerto.

Para isso, medidas lineares foram realizadas em cortes parassagittais. No plano horizontal, foram eleitos dois pontos de referência a partir da espinha nasal anterior (ENA), direita e esquerda (Figura 6). Essas medidas foram apresentadas como valores médios. No plano vertical 3 foram de referência foram determinados: crista (3 mm apical à crista óssea), centro, apical (3 mm coronal ao ENA) (Figura 7).

Figura 7: Pontos de referência vertical e horizontal das mensurações em tomografia computadorizada “Cone Bean”. Legenda: ENA (Espinha Nasal Anterior).

4.9.4 Análise Microscópica Qualitativa

Os cortes teciduais foram analisados por um patologista experiente (A.S.C) utilizando um microscópio óptico (Leica DMLS, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha) com objetivas de 4, 5, 10, 40 e 100x quanto aos eventos envolvidos no processo de reparo ósseo dos enxertos. A interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor foi a região de análise.

Na interface enxerto-leito foram avaliados a presença ou ausência de tecido de granulação, presença ou ausência do tecido fibroso, incorporação entre o enxerto ósseo e o leito receptor, tipo de tecido ósseo presente (organizado ou desorganizado), tipos de células ósseas e o tipo de infiltrado inflamatório predominante, quando presente.

4.9.5 Análise Microscópica Quantitativa

Imagens digitais parciais dos cortes teciduais capturadas com objetiva de 20x em microscópio óptico (Olympus – CX2, Olympus Imaging America Inc.) foram transferidas para um microcomputador. Empregando o programa Adobe Photoshop CS, versão 8.0.1 (1990-2003 Adobe Systems Incorporated, USA), foram compostas imagens dos espécimes completos. Nestas imagens foi avaliada a porcentagem de osso neoformado na interface enxerto-leito receptor (Figura 8), avaliados a partir do Software ImageJ (Estados Unidos), pela ferramenta “régua”.

Para minimizar o erro inerente a essa avaliação, cada uma dessas medidas foi realizada três vezes pelo mesmo examinador (M. L. R. R), com intervalo de uma semana entre as medições. Foi considerada a média aritmética entre as três medidas.

Figura 8: Imagem representativa da interação enxerto ósseo ao leito receptor, para escolha da região (A) e posterior delineamento (B) da interface do tecido ósseo para avaliação da neoformação óssea. Legenda: LR: leito receptor, EO: Enxerto ósseo.

4.9.6 Avaliação Imuno-histoquímica- Qualitativa Ordinal

A avaliação da expressão imuno-histoquímica da proteína Osteocalcina e VEGF nas biópsias dos enxertos ósseos, realizados na maxila, foi realizada percorrendo-se a região da interface do enxerto em um microscópio óptico binocular. A análise qualitativa ordinal consiste na atribuição de escores, no caso da imuno-histoquímica, representar as áreas com marcações positivas para cada uma das proteínas avaliadas. Os escores atribuídos, relacionados à área positivamente imunomarcada, foram leve, moderado e intenso.

Foram consideradas as marcações de acordo com as características das proteínas avaliadas, sendo que para a VEGF, foram consideradas positivas as marcações marrom acastanhadas observadas em osteoblastos e também em vasos sanguíneos. No caso da proteína osteocalcina, marcador da mineralização óssea, foram consideradas positivas as marcações observadas em osteoblastos, osteócitos bem como na matriz extracelular mineralizada.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de todas as variáveis foram avaliados pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov para análise da distribuição de normalidade. Os dados da neoformação óssea e mensuração tomográfica seguiram uma distribuição de normalidade o que permitiu a realização do teste t pareado. Já os valores correspondentes a imunomarcacão e do torque não obedeceram a uma distribuição paramétrica dos dados, sendo realizado o teste de Wilcoxon. Para todos os testes adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA

Durante o período de realização do estudo, 419 pacientes foram inicialmente considerados potencialmente elegíveis. Entretanto, 410 apresentaram algum critério de exclusão e foram excluídos. Portanto, restaram 09 pacientes (18 regiões) que foram aleatoriamente divididas em lado teste e lado controle, compondo a amostra analisada neste estudo. Entretanto, para análise imuno-histoquímica e quantitativa um paciente foi excluído. A figura 9 ilustra o fluxograma dos pacientes deste estudo.

Figura 9: Fluxograma do estudo.

Após a avaliação clínica e imaginológica foram selecionados pacientes que se encaixaram nos critérios de inclusão da pesquisa. Sendo assim, a casuística foi composta por 09 (nove) pacientes, sendo 5 (cinco) mulheres e 4 (quatro) homens. Os pacientes tinham entre 39 a 58 anos (média $48,3 \pm 6,08$). Três pacientes apresentavam hipertensão arterial sistêmica (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição da amostra de acordo com o gênero.

Variáveis	Gênero		TOTAL
	Masculino	Feminino	
Idade (anos)	$54 \pm 2,16$	$43,8 \pm 3,56$	$48,3 \pm 6,08$
Hipertensão arterial	2	1	3
Área Edêntula do 12 ao 22	3	2	5
Área Edêntula do 11 ao 22	0	1	1
Área Edêntula do 12 ao 21	1	2	3

5.2 PARAMETROS DE AVALIAÇÃO

5.2.1 Avaliação por inspeção Visual Trans-operatória

Na fase de reabertura do enxerto ósseo e instalação do implante foi analisado clinicamente a relação do enxerto ao leito receptor. Uma inspeção visual foi realizada após confecção do retalho mucoperiosteal, sendo possível observar a região enxertada e verificar a relação das bordas do enxerto ao leito receptor e a presença de eventuais espaços (microgaps) com interposição de tecido mole. A remoção do parafuso de fixação do enxerto e da coleta de material para análise imuno-histológica (biópsias) ocorreram sem nenhuma intercorrência que pudesse comprometer ou gerar movimentação do enxerto. Portanto, tais condições podem ser descritas homogeneamente em ambos os grupos e, clinicamente, não foi possível considerar a superioridade ou favorecimento de algum lado.

5.2.2 Avaliação Clínica da estabilidade do implante dentário

Foram instalados 18 implantes Implantes Drive Ti de diâmetro 3,5mm (sistema Neodent®, Curitiba, Brasil) e com comprimento de 11,5mm (tabela 3). Os valores correspondentes as medidas e a média com desvio padrão dos torques de instalação dos implantes estão descritas na tabela 2, sendo apresentado os valores para comparação entre os lados.

Tabela 3: Valores correspondentes ao torques (N/cm) para as medidas correspondentes a cada paciente e a média geral seguido do desvio padrão para cada um dos lados.

Paciente	Lado		Valor de p
	Teste	Controle	
1	45	40	-
2	32	32	-
3	50	40	-
4	45	45	-
5	45	45	-
6	50	45	-
7	45	45	-
8	35	40	-
9	45	40	-
TOTAL	43,56 ± 6,126	41,33 ± 4,301	0,157

Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon.

5.2.3 Avaliação tomográfica

A tomografia computadorizada “Cone Bean” inicial demonstrou reabsorção óssea severa como visto na Figura 10. Após 5 meses de enxerto ósseo autógeno foi possível observar ganho de tecido ósseo, conforme demonstrado na Figura 9. As mensurações realizadas no exame de imagem na região apical, central e coronária mostraram um ganho maior de tecido ósseo no lado teste, detalhado na Tabela 4.

Tabela 4: Valores em milímetros correspondentes as mensurações tomográficas iniciais, finais e suas diferenças para cada um dos lados.

Medidas (mm)	Lado Teste			Lado Controle		
	Inicial	Final	P	Inicial	Final	P
Apical	7,48±1,68	9,69±1,89	0,007	6,70± 1,49	8,58± 1,84	0,03
Diferença Intergrupo (Apical)	2,12			1,88		
	0,332 (p>0,05)					
Centro	3,45±1,11	8,87±1,78	0,000	3,64± 0,97	8,34± 1,82	0,00
Diferença Intergrupo (centro)	5,41			4,69		
	0,722 (p>0,05)					
Coronal	2,92±1,07	5,56± 1,42	0,000	3,01± 1,19	5,19± 1,54	0,006
Diferença Intergrupo (coronal)	2,64			2,18		
	0,464 (p>0,05)					

Análise estatística realizada pelo teste t pareado. Diferença estatística observada somente intra-grupo, não persistindo entre grupos (p>0,05).

Figura 10: Corte coronal e axiais da Tomografia computadoriza “Cone Bean”, ilustrando o grau severo de reabsorção óssea em A antes e em B depois da cirurgia de enxerto ósseo em bloco.

5.2.4 Análise Microscópica

Para as análises quantitativas, foram utilizados valores de 8 pacientes. Um paciente foi excluído da amostra pois o espécime tecidual não possibilitou avaliação (artefato de técnica – separação da interface enxerto ao leito). Para as demais avaliações histopatológicas, o número foi de 9 pacientes.

Avaliação Qualitativa

A avaliação qualitativa pode ser observada, conforme exemplificada na figura 11.

Figura 11: Fotomicrografias ópticas de um espécime representativo do grupo teste (**A**) e do grupo controle (**B**). Observa-se tecido ósseo contendo várias lacunas, muitas dessas, preenchidas por osteócitos (setas vermelhas). Notam-se ainda espaços medulares apresentando tecido fibroso (estrela azul), vasos sanguíneos e áreas de neoformação ósseas (seta amarela).

Em todos os espécimes do grupo teste, o tecido enxertado apresentava-se totalmente vital, com numerosos osteoplastos contendo osteócitos em seu interior, sem sinais evidentes de reabsorção. Os limites do enxerto estavam distinguíveis do osso neoformado na interface apenas por linhas de reversão, demonstrando total integração entre as estruturas. Da mesma forma, o osso neoformado na interface enxerto-leito demonstrava áreas de maturidade, com formação de sistemas lamelares concêntricos com numerosos osteócitos em seus osteoplastos e espaços medulares a partir dos quais era possível observar uma camada de osteoblastos revestindo as paredes ósseas. Em alguns espécimes ainda era possível observar áreas de tecido ósseo imaturo recém-formado na interface, assim como áreas de

remodelação tanto do enxerto quanto do leito receptor. O leito receptor, por sua vez, também estava completamente integrado e distinguível do osso neoformado apenas por linhas de reversão. Em apenas um dos espécimes foi vista presença de tecido conjuntivo fibroso parcialmente interposto entre enxerto e leito receptor. Não foram identificados infiltrados inflamatórios em nenhum dos espécimes.

Na maioria dos espécimes do grupo controle, os enxertos estavam consolidados ao leito através de uma interface de tecido ósseo neoformado predominantemente trabecular, com numerosos e amplos espaços medulares, repletos de células e vasos sanguíneos. Os enxertos apresentavam-se vitais e sem evidência de perda de espessura por processo reabsortivo externo. Por outro lado, na interface com o osso neoformado, era possível observar intensa remodelação, evidenciada pela presença constante de osso imaturo recém-depositado em áreas de reabsorção. O osso depositado na interface mostrava-se organizado em lamelas concêntricas apenas em 3 espécimes (4A, 5B e 6B). Em 5 espécimes (3A, 4A, 5B, 7A e 9B) foi vista a presença de tecido conjuntivo fibroso invaginado entre tecido neoformado na interface e leito, tornando a incompleta a consolidação das duas estruturas. A presença de infiltrado inflamatório foi rara e geralmente associada a áreas de formação de fibrina associadas à presença de invaginação de tecido conjuntivo na interface enxerto-leito.

Avaliação Quantitativa

Para as análises das avaliações quantitativas, os valores correspondentes a porcentagem da área do tecido ósseo neoformado na região da interface entre o enxerto e o leito receptor estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Valores da porcentagem da área de tecido mineralizado presente na interface enxerto-leito em ambos os lados

Paciente	Lado		Valor de p
	Teste	Controle	
1	41,62	49,04	-
2	53,91	41,52	-
3	90,11	51,99	-
4	53,09	41,29	-
5	70,42	40,07	-
6	57,75	53,85	-
7	34,00	32,79	-
8	97,04	37,56	-
Total	62,24 ± 22,20	43,51 ± 7,37	0,049

Análise estatística realizada pelo Teste T pareado. *diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

5.2.5 Avaliação Imuno-histoquímica

A imunomarcção da osteocalcina foi observada predominante moderada e intensa no lado teste quando comparada ao grupo controle. As células marcadas como os osteoblastos, osteócitos bem como a matriz extra-celular demonstrou tecido ósseo com maiores áreas de mineralização, demonstrando um processo adiantando de formação óssea. Foi possível observar maiores marcações para esta proteína no leito ósseo receptor, mostrando regiões de tecido mais maduro. Na região da interface receptor/enxerto, foram evidenciadas especialmente marcações da matriz extracelular, bem como de células, tanto no lado teste como no lado controle. Em alguns pontos foi possível observar áreas representativas do início da mineralização, conforme

A imunomarcção da proteína VEGF foi observada nos vasos sanguíneos, nos osteoblastos e também na matriz extracelular. O lado controle apresentou escores representando maiores áreas de imunomarcção quando comparado ao lado teste. Porém a predominância em ambos os grupos foi de imunoexpressão da proteína categorizada como leve.

Figura 12: Imagem referente a imunomarcacão para proteínas osteocalcina e VEGF, setas cor vermelha com áreas representativas do início da mineralizao.

Tabela 6: Avaliação da imunomarcção das proteínas Osteocalcina e Fator de Crescimento Endotelial (VEGF) nos pacientes da amostra divididos em lado teste e controle.

Paciente	Lado	Imunomarcadores	
		Osteocalcina	VEGF
1	Teste	+	++
	Controle	++	++
2	Teste	+++	+++
	Controle	++	+
4	Teste	+++	+
	Controle	+	+
5	Teste	+++	++
	Controle	+++	++
6	Teste	+++	+
	Controle	++	++
7	Teste	++	+
	Controle	++	++
8	Teste	+++	+
	Controle	++	+
9	Teste	Não foi possível realizar a análise do fragmento	
	Controle		

Legenda: VEGF: Fator de Crescimento Endotelial. Escores para a imunomarcção divididos em: +:leve; ++: moderada; +++: intensa.

Para fins de análise estatística, os escores da imunomarcção foram substituídos por números, sendo: + = 1; ++ = 2; +++ = 3. As medidas estão presentes na tabela 7, com os respectivos valores de p ($p > 0,05$), não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os lados.

Tabela 7: Valores correspondentes a média e desvio padrão dos escores para a imunomarcção em ambos os lados.

Imunomarcadores	Lado		Valor de p
	Teste	Controle	
Osteocalcina	2,38 ± 0,916	2,00 ± 0,535	0,317
VEGF	1,50 ± 0,756	1,63 ± 0,518	0,564

Legenda: VEGF: Fator de Crescimento Endotelial. Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A reabilitação com implantes osseointegrados está ligada a alta taxa de sucesso, é o procedimento mais indicado na substituição dos dentes perdidos, porém defeitos ósseos na região anterior da maxila limitam/ou impossibilitam a reabilitação com próteses implantossuportadas em uma posição protéticamente favorável (ARORA et al., 2017).

Para resolução desse problema os enxertos autógenos considerados “padrão ouro” são empregados nas reconstruções ósseas (GARCÍA-GARETA, COATHUP, BLUNN RACHMIEL et al., 2017), e sua forma em bloco viabilizam a correção dos defeitos ósseos em altura e espessura (ALOY-PRÓSPER A., 2015).

Essa técnica apresenta como limitação risco de perda substancial de volume ósseo (GORDH et al, 1996), que varia de acordo com variados diâmetros das brocas utilizados nos procedimentos de perfuração e descorticalização (BURCHARDT; BUSBEE; ENNEKING, 1975; SIMON et al., 1993). O uso de agentes desmineralizadores tem sido investigado como alternativa viável em relação a esses procedimentos. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da aplicação da desmineralização, especialmente o ácido cítrico em enxertos autógenos na forma de bloco.

São escassos os trabalhos na literatura que apontam o uso da desmineralização da interface dos enxertos autógenos “onlay” com o ácido cítrico REZENDE, 2008; DOMINGUES, 2013; CARVALHO, 2017. Neste sentido, o presente estudo representa a primeira pesquisa que teve como proposta investigar em humanos o efeito da desmineralização com ácido cítrico na interface dos enxertos autógenos em blocos, em indivíduos com defeitos ósseos na região anterior da maxila, por meio de observações clínicas, histológicas, pela técnica imuno-histoquímica e imagens tomográficas, tendo como hipótese encontrar uma melhora na consolidação dos enxertos.

Em nosso estudo, podemos identificar que o uso do ácido cítrico 10% pH1 aplicado por 30s sobre o leito receptor e a porção medular do enxerto, promoveu,

histologicamente, uma maior área de osso em neoformação. Tais achados justificam que o emprego do ácido cítrico provocou alterações em nível de tecido ósseo, antecipando a neoformação óssea no grupo teste. Tais achados concordam com Melcher, 1976, o qual evidenciou a liberação de ácidos pelos osteoclastos, como o ácido láctico e o ácido cítrico no processo fisiológico de remodelação óssea, assim como outro estudo demonstrou substâncias ósseas morfogenéticas com a técnica de desmineralização (URIST et al, 1968).

Os resultados superiores da neoformação óssea no grupo teste, corroboram com Rezende (2008), Rodrigues (2012), Domingues (2013) e Carvalho (2017), porém o que difere do presente trabalho foi a realização desses estudos em animais. Rezende (2008) e Carvalho (2017) utilizaram como agentes desmineralizantes tetraciclina e ácido cítrico, Rodrigues et al. (2012) aplicaram gel de EDTA e Domingues (2013) usou o ácido cítrico a 50%. Nesses trabalhos foi observado que mesmo diante de diferentes ácidos e protocolos, a técnica de desmineralização resultou em aumento da densidade do novo osso, extensão das superfícies de consolidação óssea e promoveu maior área de tecido ósseo neoformado. Também foi possível avaliar eventos precoces da neoformação óssea, o que no presente estudo não foi possível investigar, uma vez que realizado com seres humanos. No entanto, a análise das biópsias teciduais realizadas após 6 meses demonstraram uma maior área de osso neoformado.

Os resultados positivos com a técnica da desmineralização, envolvem o pH dos agentes desmineralizantes, visto que ele tem efeito na dissolução mineral (MELCHER, 1976). Quanto menor o pH maior é a atividade osteoclástica e dissolução dos cristais de hidroxapatita (KIM et al., 2001). Nesse estudo acredita-se que o pH 1,0 favoreceu a exposição precoce do conteúdo osteoindutor da matriz orgânica do osso.

Como relatado por Koerdt et al. (2013) durante o processo de neoformação óssea, o preparo do leito receptor é importante, sendo assim no presente estudo como preconizado na literatura realizou-se perfurações e descorticalizações, associado a aplicação do ácido cítrico 10% pH1 a 30s. Sabe-se quanto maior liberação de fatores de crescimento em áreas enxertadas, melhor é o prognóstico, por esse motivo além do procedimento convencional, achamos oportuno

desmineralizar a interface óssea para avaliar o quanto o ácido contribui no enxerto autógeno em bloco

O aumento da neoformação óssea demonstrou que durante a desmineralização do leito-enxerto dos pacientes, a diferenciação celular pode ter sido aumentada no grupo do lado teste. O que corrobora com Rezende (2015), Salmeron (2015) e Manfredi et al. (2019), os quais verificaram que a desmineralização com o ácido cítrico acelerou a diferenciação dos pré-osteoblastos, evidenciando células com morfologia em estágios mais avançados, além de maior expressão de BMP-2 e BMP-7.

O uso do ácido cítrico sobre o leito receptor e a porção medular do enxerto, não apresentou superioridade quanto as análises clínicas, tomográficas e imuno-histoquímicas quando comparado o lado teste com o controle. Tal condição pode ser justificada pela condição que o ácido cítrico desencadeia ação nos fenômenos iniciais da neoformação óssea dos enxertos autógenos em bloco.

No que diz respeito a análise clínica, não houve diferença entre o lado teste e controle, entretanto houve manutenção do volume ósseo e remoção dos parafusos de fixação sem intercorrências o que possibilitou em ambos os lados a instalação de implantes. Esses dados positivos condizem com os achados da literatura que mesmo diante dos avanços na engenharia tecidual, o enxerto autógeno permanece "padrão de critério" devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras, potencial osteocondutoras e não imunogênicas (GARCIA-JUNIOR et al., 2018) quando associado a sua utilização em forma de bloco constitui-se uma modalidade de tratamento previsível (NKENKE; NEUKAM, 2014). No presente trabalho não houve registro de complicações nervosas na área doadora. Apenas dois pacientes apresentaram hematomas e nenhum sujeito queixou-se de dor no pós-operatório. As medicações empregadas e bandagem mantiveram o controle do edema, sintomatologia dolorosa e infecção.

Ainda no que diz respeito as observações clínicas, sabemos que a associação da regeneração tecidual guiada com enxertos autógenos é uma alternativa que pode ser utilizada com o intuito de manutenção do volume ósseo (DONOS et al., 2002; JARDINI et al., 2005), decorrente do preenchimento dos

espaços (GAPs) entre o bloco e o leito receptor, bem como o bloqueio da invaginação do tecido epitelial, porém, em nosso estudo não houve associação desta técnica como preconizado na literatura, por ser o primeiro estudo em humanos e geraria o aumento de variáveis e aumentaria o vieses.

A reabilitação de todos os pacientes com implantes osseointegrados e próteses provisórias sobre implantes apresentou sucesso e sobrevivência, como em outros estudos que avaliaram implantes inseridos em áreas estéticas (CHEN; BUSER, 2014; WEIGL; STRANGIO, 2016).

Este estudo não tinha como objetivo inicial realizar mensurações nas tomografias computadorizadas, porém foi oportuno e importante, pois o enxerto autógeno em bloco foi benéfico nas regiões parcialmente atroficas da maxila, agregando valor a para literatura. Quando comparado os resultados das mensurações do lado teste com controle, não foram significantes, porém na avaliação intra-grupos, no exame inicial e após 5 meses de enxerto, os dados mostraram que a técnica empregada permitiu um ganho de tecido ósseo. Tal fato já é comprovado na literatura, onde as reconstruções de defeitos ósseos através da técnica de enxerto em bloco promovem aumento de tecido ósseo importante e possuem um prognóstico favorável (VERDUGO; URIBARRI; D'ADDONA, 2017).

As imunomarcações das proteínas osteocalcina e VEGF não mostraram diferenças entre o lado teste e controle estatisticamente significantes. Porém entre no lado teste, a imunomarcacão da osteocalcina foi predominante moderada e intensa, e a expressão leve do VEGF, o que direciona para neoformação óssea mais adiantada quando comparada ao lado controle. Em concordância com literatura, pesquisadores mostraram em áreas enxertadas da maxila a predominância da proteína osteocalcina em tecido ósseo com neoformação completa (BONARDI et al., 2018), também visualizaram VEGF em tecido de granulação e na angiogênese, fase inicial dos enxertos (PEREIRA et al., 2017). Os achados da imunomarcacão das proteínas utilizadas no estudo mostra o equilíbrio celular do tecido ósseo, e que a aplicação do ácido cítrico não interferiu negativamente, mantendo o padrão de normalidade de tecido ósseo maduro, esperado em reaberturas de enxertos ósseos autógenos com um tempo de reconstrução aproximadamente de 6 meses.

É importante considerar as diferenças metodológicas entre os trabalhos citados e a presente pesquisa, no que diz respeito aos métodos de desmineralização com ácido cítrico, uma vez que, neste estudo a técnica foi executada pela primeira vez em humanos e os demais foram estudos experimentais em animais. Como limitações do presente estudo, é importante destacar a dificuldade em conseguir uma amostra com maior número de participantes.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a desmineralização com ácido cítrico pH1 aplicado por 30s em enxerto autógeno em bloco, apresentou histologicamente na região de interface uma maior área de neoformação óssea o que sugere a hipótese de aumento da consolidação dos enxertos ósseos. Quanto aos parâmetros clínicos, tomográficos e visuais não apresentou resultados superiores, novos estudos se fazem necessários para maiores evidências.

Referências

REFERÊNCIAS

AGHALOO, T.L. et al. Bone augmentation of the edentulous maxilla for implant placement: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 31, p. s19-s30, 2016.

ALBERIUS, P. et al. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat skull. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 104, n. 5-6, p. 554-61, 1996a.

ALBERIUS, P. et al. Onlay bone graft behaviour after marrow exposure of the recipient rat skull bone. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v. 30, n. 4, p. 257-66, 1996b.

ALBERIUS, P. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 124, p. 1382-1386, 1998.

ALBREKTSSON, T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.

ALOY-PRÓSPER, A. et al. The outcome of intraoral onlay block bone grafts on alveolar ridge augmentations: a systematic review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 20, n. 2, p. e251-8, mar. 2015.

ANDERSON, K.J. et al. End point results of processed heterogenous, autogenous and homogenous bone transplants in the human: a histologic study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 33, p. 220-38, 1964.

ARORA, H. et al. Immediate implant placement and restoration in the anterior maxilla: Tissue dimensional changes after 2-5 year follow up. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 19, n. 4, p. 694-702, aug. 2017.

ATWOOD, D.A. Post-extraction changes in the adult mandible as illustrated by microradiographs of midsagittal sections and serial cephalometric roentgenograms. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 13, n. 5, p. 810-24, sep/oct. 1963.

ATWOOD, D.A. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 26, n. 3, p. 266-79, sep. 1971.

BARTH, A. Über histologische befunde nach knochen-implantation. **Langenbecks Archiv für Klinische Chirurgie**, Berlin, v. 43, suppl. 32, p. 409-13, 1893.

BONARDI, J.P. et al. Prospective and randomized evaluation of chronos and bio-oss in human maxillary sinuses: histomorphometric and immunohistochemical assignment for Runx 2, vascular endothelial growth factor, and osteocalcin. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 76, n. 2, p. 325-335, feb. 2018.

BOWERS, G.M. et al. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 60, n. 12, p. 683-93, 1989.

BOYNE, P.J.; JAMES, R.A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v. 38, n. 8, p. 613-6, aug. 1980.

BRÅNEMARK, P.I. Introduction to osseointegration. In: BRÅNEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. (Ed.) **Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985. p. 41-9.

BREINE, U., BRÅNEMARK, P.I. Reconstruction of alveolar jaw bone: an experimental and clinical study of immediate and performed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v. 14, suppl. 1, p. 23-48, 1980.

BURCHARDT, H.; BUSBEE III, G.A.; ENNEKING, W.E. Repair of experimental autologous grafts of cortical bone. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 57, n. 6, p. 814-9, sep. 1975.

BURGER, E.A.; MESHKINI, H.; LINDEBOOM, J.A. One versus two titanium screw fixation of autologous onlay bone grafts in the anterior maxilla: a randomised histological pilot study. **European Journal of Oral Implantology**, Began, v. 4, n. 3, p. 219-25, aut. 2011.

BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 13, n. 1, p. 29-45, 1993.

CARVALHO, E.B. **Efeito da desmineralização óssea superficial na consolidação de enxertos ósseos autógenos: estudo histomorfométrico e imunohistoquímico em calvária de ratos**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2017.

CARVALHO, P.S.; VASCONCELLOS, L.W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 4, p. 565-70, 2000.

CAWOOD, J.I.; HOWELL, R.A. A classification of the edentulous jaws. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 232-6, aug. 1988.

CAWOOD, J.I.; STOENLINGA, P.J.; BROUNS, J.J. Reconstruction of the severely resorbed (Class IV) maxilla. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 23, n. 4, p. 219-25, 1994.

CHEN, S.T.; BUSER, D. Esthetic outcomes following immediate and early implant placement in the anterior maxilla - a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 29, p. 186-215, 2014.

CHEN, N.T. et al. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 93, n. 4, p. 714-22, 1994.

CHIAPASCO, M.; GATTI, C. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a 3- to 8-year prospective study on 328 implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 5, n. 1, p. 29-38, 2004.

CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M.; BOISCO, M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 17, suppl 2, p. 136-59, oct. 2006.

CLAVERO, J.; LUNDGREN, S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 5, n. 3, p. 154-60, 2003.

COLE, R.T. et al. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 1-9, 1980.

COSTA-MENDES, L.; SAUVIGNÉ, T.; GUIOL, J. Morbidity of autologous bone harvesting in implantology: Literature review from 1990 to 2015. **Revue de Stomatologie, de Chirurgie Maxillo-faciale et de Chirurgie Orale**, Paris, v. 117, n. 6, p. 388-402, dec. 2016

CRIGGER, M. et al. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 13, n. 6, p. 538-49, 1978.

CRIGGER, M.; RENVERT, S.; BOGLE, G. The effect of topical citric acid application on surgically exposed periodontal attachment. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 303-5, 1983.

DELEU, J.; TRUETA, J. Vascularization of bone grafts in the anterior chamber of the eye. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 47, p. 319-29, 1965.

DOMINGUES, R.S. **Efeito da desmineralização ácida da interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco**. 2013. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts: an experimental study in the rat. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 13, n. 2, p. 203-13, 2002.

FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **The Bone & Joint Journal**, London, v. 98-B, n. 1 Suppl A, p. 6-9, jan. 2016.

GARBIN JUNIOR, E.A. et al. Potential of autogenous or fresh-frozen allogeneic bone block grafts for bone remodelling: a histological, histometrical, and immunohistochemical analysis in rabbits. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 55, n. 6, p. 589-93, jul. 2017.

GARCIA JÚNIOR IR et al. Maxillary alveolar ridge atrophy reconstructed with autogenous bone graft harvested from the proximal ulna. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 29, n. 8, p. 2304-6, nov. 2018.

GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M.J.; BLUNN, G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, New York, v. 81, p. 112-21, dec. 2015.

GARG, A.K. Grafting materials in repair and restoration. In: LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MAR, R.E. (Ed.). **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Carol Stream: Quintessence Books, 1999, p. 83-101.

GORDH, M. et al. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, Rochester, v. 117, n. 6, p. 664-70, 1997.

GULINELLI, J.L. et al. Use of calcium phosphate cement for repairing bone: defects histomorphometric and immunohistochemical analyses. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 30, n. 4, p. 1016-21, jun. 2019.

JARDINI, M.A.; DeMARCO, A.C.; LIMA, L.A. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and endodontics**, St. Louis, v. 100, n. 6, p. 666–673, 2005.

JENSEN, J.; SIMONSEN, E.K.; SINDET-PEDERSEN, S. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with bone grafting and osseointegrated implants: a preliminary report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 48, p. 27-32, 1990.

KAUFMAN, E.; WANG, P.D. Localized vertical maxillary ridge augmentation using symphyseal bone cores: a technique and case report. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 18, n. 2, p. 293-8, mar-apr. 2003.

KIM, Y.S. et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via upregulation of toll-like receptors. **Bone**, New York, v. 45, n. 1, p. 68-76, 2009.

KIRMEIER, R. et al. Evaluation of three-dimensional changes after sinus floor augmentation with different grafting material. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 366-72, apr. 2008.

KOERDT, S. et al. Expression of growth factors during the healing process of alveolar ridge augmentation procedures using autogenous bone grafts in combination with GTR and an anorganic bovine bone substitute: an immunohistochemical study in the sheep. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 18, n. 1, p. 179-88, jan. 2013.

KUSIAK, J.F.; ZINS, J.E.; WHITAKER, L.A. The early revascularization of membranous bone. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 76, n. 4, p. 510-6, 1985.

LEKHOLM, U.; ZARB, G.A. Patient selection and preparation. In: BRÄNEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. (Ed.) **Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985. p. 199-209.

LEMONS, J., NATIELLA, J. Biomaterials, biocompatibility, and peri-implant considerations. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 3-23, 1986.

LIN, K.Y. et al. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 86, n. 3, p. 449-56, 1990.

LINKOW, L.I. Bone transplants using the symphysis, the iliac crest and synthetic bone materials. **Journal of Oral Implantology**, Abingdon, v. 11, n. 2, p. 211-47, 1983.

MAESTRE-FERRÍN, L.; BORONAT-LÓPEZ, A.; PEÑARROCHA-DIAGO, M.A. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: an update. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 14, n. 8, p. e402-7, aug. 2009

MANFREDI, G.G.D.P. et al. Bone demineralization promotes superior spread of preosteoblast in culture. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 82, n. 7, p. 1004-11, jul. 2019.

MATSUMOTO, M.A. **Análise microscópica de rebordos alveolares maxilares reconstruídos com enxertos autógenos de crista ilíaca e região mentoniana**. 1999. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.

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

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

MISCH, C.E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 158-67, fall. 1993.

MISCH, C.M. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 6, p. 767-76, 1997.

MISCH, C.M. et al. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 7, n. 3, p. 360-6, fall. 1992.

NKENKE, E.; NEUKAM, F.W. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. **European Journal of Oral Implantology**, Began, v. 7, suppl 2, p. s203-17, sum. 2014.

O'DONNELL, R.J. Effect of Er:YAG laser holes on osteoinduction in demineralized rat calvarial allografts. **J Orthop Res**, v.14:108-113,1996.

OLLIER, L. **Traite experimental et clinique de la regeneration des os et la production artificielle du tissue osseux**. Paris: P. Masson et Fils, 1867.

OZAKI, W.; BUCHMAN, S.R. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 102, n. 2, p. 291-9, aug. 1998.

PANDIS, N. et al. Survival of bonded lingual retainers with chemical or photo polymerization over a 2-year period: a single-center, randomized controlled clinical trial. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedic**, St. Louis, v. 144, n. 2, p. 169-75, aug. 2013.

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

PEREIRA, R.D.S. et al. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 19, n. 5, p. 867-75, oct. 2017.

PHEMISTER, D. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, Chicago, v. 19, p. 303-9, 1914.

RACHMIEL, A. et al. Vertical alveolar distraction osteogenesis of the atrophic posterior mandible before dental implant insertion. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 75, n. 6, p. 1164-75, jun. 2017.

REGISTER, A.A. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 44, n. 1, p. 49-54, 1973.

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

REZENDE, M.L. et al. Bone demineralization with citric acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 86, n. 1, p. 146-54, jan. 2015.

REZENDE, M.L. et al. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 85, n. 5, p. e121-129, 2014.

RODRIGUES, M.G.S. et al. A desmineralização de enxertos ósseos autógenos onlay pode melhorar suas propriedades mecânicas: estudo biomecânico e por MEV. **Implant News**, v. 9, p. 329-336, 2012.

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 em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2015

SANT'ANA, A.C. et al. A combined regenerative approach for the treatment of aggressive periodontitis: long-term follow-up of a familial case. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 29, n. 1, p. 69-79, feb. 2009.

SBORDONE, C. et al. Volume changes of grafted autogenous bone in sinus augmentation procedure. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 69, n. 6, p. 1633-41, 2011.

SIMON, P. et al. Les multi perforations des allogreffes osseuses cryoconservees. Etude histologique et microradiographique comparative d'allo- greffes perforees et non perfores chez le mouton. **International Orthopaedics**, Berlin, v. 17, p. 98-103, 1993.

SINET-PEDERSEN, S.; ENEMARK, H. Mandibular bone grafts for reconstruction of alveolar clefts. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 46, n. 7, p. 533-7, 1988.

TALLGREN, A. The continuing reduction of the residual alveolar ridge in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 27, n. 2, p. 120- 32, feb. 1972.

URBAN, I.A. et al. Long-term evaluation of peri-implant bone level after reconstruction of severely atrophic edentulous maxilla via vertical and horizontal guided bone regeneration in combination with sinus augmentation: a case series with 1 to 15 years of loading. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 19, n. 1, p. 46-55, feb. 2017.

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

URIST, M.R. et al. Inductive substrates for bone formation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 59, p. 59-96, jul/aug. 1968.

URIST, M.R.; DeLANGE, R.J.; FINERMAN, G.A. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, Washington, v. 220, n. 4598, p. 680-6, 1983.

VERDUGO, F.; URIBARRI, A.; D'ADDONA, A. Autogenous bone block grafting provides facial implant tissue stability long-term. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 19, n. 3, p. 478-85, jun. 2017.

WEIGL, P.; STRANGIO, A. The impact of immediately placed and restored single-tooth implants on hard and soft tissues in the anterior maxilla. **European Journal of Oral Implantology**, Began, v. 9, suppl 1, p. S89-106, 2016.

WILTFANG, J. et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 187-93, 2004.

WOOD, R.A.; MEALEY, B.L. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 83, n. 3, p. 329-36, mar. 2012.

Apêndice

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

Página 1 de 1

Caro Participante:

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada Técnica **"Efeito da desmineralização por ácido cítrico na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco: análise qualitativa, quantitativa e imuno-histoquímica em humanos"**, que se refere a um projeto de pesquisa, com autoria da aluna Adriana dos Santos Caetano e orientação da Prof^a Dra. Carla Andreotti Damante.

O objetivo deste estudo é ganhar osso perdido para futura colocação de implantes. Será realizada a reconstrução óssea com um bloco de osso retirado de um local da boca e colocado em outro. Em um dos grupos, o bloco e o local onde vai ser colocado, receberão tratamento com ácido leve comumente utilizado em odontologia. Os resultados contribuirão para uma grande melhora em relação ao ganho de espessura/ altura do osso, possibilidade de colocar implantes e próteses fixas, o que não seria possível sem algum tipo de enxerto de osso. O(a) senhor(a) foi convidado(a) por não ter osso suficiente para poder instalar implantes. Essa cirurgia tem como vantagem o uso de seu próprio osso, o qual cicatriza melhor que ossos de laboratório.

Através do exame de tomografia computadorizada será definido se há necessidade do enxerto em bloco. O senhor deve vir à FOB com meios próprios e será recebido pela pesquisadora na clínica de Periodontia. No dia da cirurgia, dois locais diferentes serão abertos. O bloco será removido do queixo ou atrás dos últimos dentes de baixo. Através de um sorteio, o paciente ficará num grupo onde o bloco não receberá tratamento ou outro onde será aplicado um ácido leve no bloco e no local que vai receber o bloco por 30s e posteriormente lavado com soro. Depois o bloco será fixado na região através de parafusos de titânio. Após 5 meses, o osso estará cicatrizado para receber os implantes. Depois de 4 meses dos implantes, será feita uma cirurgia para expor o implante e melhorar a estética da gengiva, caso necessário. Depois de 3 meses os dentes serão colocados. O paciente deve pagar pelo parafuso de titânio que segura o bloco, pelos implantes, parafusos de prótese e trabalho do protético (serviço terceirizado) que fará os dentes. A mão de obra das cirurgias e dos passos para colocação dos dentes não será cobrada. Durante a cirurgia de colocação do pino do implante, um furo tem que ser feito para ele seja colocado. O osso retirado do local do furo, que seria descartado, será armazenado para a pesquisa para posteriores análises no microscópico.

Considerando que toda pesquisa oferece algum tipo de risco, nesta pesquisa o risco/ complicação pode ser avaliado como inchaço, local roxo, sangramento na boca, contaminação da ferida, abertura da ferida com exposição do bloco, dor, excesso ou falta de sensibilidade temporária. Todos esses riscos são tratáveis durante a cirurgia, pela anestesia e com medicamentos apropriados após a cirurgia.

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

Pode ser que o senhor (a) tenha que ficar uma ou duas semanas sem sua prótese provisória para permitir melhor cicatrização da área. Também ficará com a região coberta por um esparadrapo da cor da pele (bandagem) para evitar o inchaço, por 3 dias.

O (A) senhor(a) tem o direito de deixar de participar da pesquisa a qualquer momento e isso não comprometerá em nada na continuidade do seu tratamento, e também pode procurar seus direitos caso sinta lesado por algum motivo. Todos os dados obtidos com a pesquisa serão utilizados posteriormente para publicações científicas nacionais e internacionais, levando sempre em conta a ética, respeito e seriedade profissional. Em nenhum momento sua identidade será revelada, garantindo o sigilo e privacidade. O senhor receberá uma via desse documento. Com o abandono da pesquisa, todos os dados obtidos e informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e serão totalmente guardados por força do sigilo profissional, como apresentado no Art. 9 do Código de Ética Odontológica, não havendo qualquer comprometimento com a continuação do seu tratamento.

Desde já, agradecemos sua atenção e participação e colocamo-nos à disposição para maiores informações.

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

_____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica.).

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos item IV.3 e IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Rubrica do Participante da Pesquisa :

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese e Periodontia

Página 1 de 1

serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Nome/Assinatura do Pesquisador(a) Responsável

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **14hs às 17 horas**, em dias úteis.
Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75
Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901
Telefone/FAX(14)3235-8356
e-mail: cep@fob.usp.br

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

e-mail: dep-prot@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 32358277

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

Rubrica do Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

Anexo

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA DESMINERALIZAÇÃO POR ÁCIDO CÍTRICO NA CONSOLIDAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS EM BLOCO: ANÁLISE QUALITATIVA, QUANTITATIVA E IMUNO-HISTOQUÍMICA EM HUMANOS

Pesquisador: Adriana dos Santos Caetano

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65044417.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.959.542

Apresentação do Projeto:

É um projeto de doutorado, o qual irá avaliar a consolidação e a neoformação óssea dos enxertos após a desmineralização por ácido cítrico da superfície óssea receptora e da superfície do bloco de enxerto ósseo. A amostra do estudo será composta por 18 pacientes, os quais serão submetidos a cirurgias de enxerto autógeno em bloco do ramo mandibular para reconstrução óssea em região atrófica. O grupo teste (09 pacientes) receberá tratamento com ácido cítrico a 10% (pH1) por 30s (bloco e leito). O grupo controle (09 pacientes) não receberá tratamento adicional. Após cinco meses da realização dos enxertos ósseos e no momento da instalação de implantes na área enxertada, serão removidas biópsias com uma trefina de 2 mm de diâmetro dos sítios onde serão inseridos os implantes, de forma a não remover tecido exclusivamente para a realização do experimento.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo analisar qualitativamente, quantitativamente e através da técnica imuno-histoquímica o efeito da desmineralização por ácido cítrico das superfícies ósseas contactantes em cortes microscópicos de enxertos ósseos "onlay" realizados em humanos em comparação à técnica convencional (sem desmineralização).

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 1.959.542

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um Projeto de doutorado interessante, que busca avaliar o efeito da desmineralização na cirurgia de enxerto autógeno em bloco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE necessita de correções:

Especificar que está previsto indenização caso haja danos ao participante em consequência da pesquisa.

É importante constar também que se um grupo apresentar melhor resultado em relação ao outro, caso o enxerto não dê certo, o participante terá direito a ter acesso à técnica que apresentou melhores resultados. O TCLE não pode estar previamente assinado pelo pesquisador, deve ser assinado junto com o participante.

Recomendações:

Recomenda-se as seguintes correções no TCLE:

- 1) Especificar que está previsto indenização caso haja danos ao participante em consequência da pesquisa.
- 2) É importante constar também que se um grupo apresentar melhor resultado em relação ao outro, caso o enxerto não dê certo, o participante terá direito a ter acesso à técnica que apresentou melhores resultados.
- 3) O TCLE não pode estar previamente assinado pelo pesquisador, deve ser assinado junto com o participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência de ordem ética, necessita de correções no TCLE

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 1.959.542

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP, reunido ordinariamente no dia 18.03.2017, acata por unanimidade, o parecer COM PENDÊNCIA emitido pelo relator. Encaminha ao pesquisador para as modificações necessárias e atualização do cronograma. Para visualizar os motivos da pendência, localize a pasta Pareceres (Apreciação Faculdade de Odontologia de Bauru-USP), arquivo PARECER CONSUBSTANCIADO.

De acordo com a Res. CNS 466/12 e com as Normas Operacionais internas deste CEP, as pendências devem ser respondidas exclusivamente pelo pesquisador responsável no prazo de 30 dias, a contar da data de envio do parecer deste CEP. Após esse prazo o protocolo será arquivado. Solicita-se ainda que as respostas sejam enviadas por meio de ofício, de forma ordenada, conforme os itens das considerações deste parecer, destacando a localização das possíveis alterações realizadas nos documentos do protocolo, com realce no texto, inclusive no TCLE, se for o caso.

Diante do exposto, este CEP manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão de seu parecer final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_867344.pdf	16/02/2017 16:21:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa.pdf	15/02/2017 21:22:05	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	15/02/2017 21:21:27	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Outros	05_Questionariotecnico.pdf	15/02/2017 21:10:19	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Outros	termodeaquiescencia.pdf	15/02/2017 21:07:37	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	15/02/2017 21:05:50	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Outros	Cartadeencaminhamento.pdf	15/02/2017 21:04:41	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	03_Declaracaocompromissopesquisador.pdf	15/02/2017 21:01:29	Adriana dos Santos Caetano	Aceito
TCLE / Termos de	04_TermodeConsentimento.pdf	15/02/2017	Adriana dos Santos	Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 1.959.542

Assentimento / Justificativa de Ausência	04_TermodeConsentimento.pdf	20:59:46	Caetano	Aceito
Folha de Rosto	01_FOLHADEROSTO_ADRIANASCAE TANO.pdf	15/02/2017 20:52:04	Adriana dos Santos Caetano	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 10 de Março de 2017

Assinado por:**Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida**
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br