UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAL E
PERIODONTIA

WAGNER FERNANDES PEDROSA JUNIOR

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO, TOMOGRÁFICO E HISTOLÓGICO SOBRE A
REMODELAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS “ONLAY”.
PARTE II (CALOTA CRANIANA)

RIBEIRÃO PRETO

2008

WAGNER FERNANDES PEDROSA JUNIOR

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO, TOMOGRÁFICO E HISTOLÓGICO SOBRE A
REMODELAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS “ONLAY”.

PARTE II (CALOTA CRANIANA)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Salata

RIBEIRÃO PRETO

2008

Pedrosa Jr., Wagner Fernandes.

Estudos imunoistoquímico, tomográfico e histológico sobre a remodelação de enxertos ósseos “onlay”. Parte II (Calota Craniana).
Ribeirão Preto, 2006.
67 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial - CTBMF

Orientador: Salata, Luiz Antonio

1. Enxerto ósseo de calota craniana. 2. Tomografia computadorizada. 3. Imunoistoquímica. 4. Revascularização óssea.

Dedico este trabalho

A **Deus** por iluminar minha vida em todos os momentos e mostrar os caminhos certos que devem ser trilhados.

Aos meus pais **Vagner e Maria de Lourdes** que sempre me deram incondicionalmente amor e carinho e que proporcionaram tudo para que eu pudesse conquistar meus objetivos com honestidade e dignidade.

As minhas irmãs **Marcela e Jerusa** que além de me apoiarem e me respeitarem, também me deram sobrinhos maravilhosos que amo como se fossem meus filhos, **Lorena, Bruno e Vitória**.

Ao meu amor **Karin**, que inúmeras vezes viajou até Ribeirão Preto para estar comigo, operando e transportando coelhos em seus braços, cuidando de mim nas febres que tive, apoiando nos momentos de nostalgia e sorrindo nas horas difíceis. Amor, OBRIGADO!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Luiz Antonio Salata** que além de se mostrar uma pessoa muito agradável de conviver, também me proporcionou conhecimentos que anteriormente jamais encontrei em livros e revistas.

Ao professor **Samuel Porfírio Xavier** que além de dividir muitas experiências profissionais também se mostrou um grande amigo principalmente nos momentos em que mais precisei.

AGRADECIMENTOS

À professora **Roberta Okamoto** que me recebeu e me deu todas as condições para realização de uma importante etapa deste trabalho.

Aos meus colegas **Paulo Esteves Pinto Faria**, **Maya Fernanda Manfrim Arnez**, **Juliana de Sousa Maniglia** e **Aline M. Corvetto** que participaram da realização deste projeto.

Agradeço às pessoas fundamentais para a realização deste trabalho: **Antonio Carlos dos Santos**, **Ariovaldo Theodoro**, **Sebastião Carlos Bianco**, **Antonio Sergio Aparecido Mesca**, **Antonio Massaro** e **Rubens Fernando de Melo** pela dedicação, disponibilidade e incentivo.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial e Periodontia **Tatiana Angeli Passos Fernandes** e **Aparecida Dulce de Oliveira Negretti**, e às secretárias da seção de Pós-Graduação **Isabel Cristina Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto**, pelo apoio, ajuda e convivência.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste projeto.

À **FORP-USP** e todo o **Corpo Docente** pelos conhecimentos transmitidos.

RESUMO

Vários estudos têm abordado fatores que governam a longevidade dos enxertos ósseos “onlay”. Entretanto, poucas informações têm sido disponibilizadas sobre eventos moleculares que ocorrem ao longo do tempo. Os enxertos de calota craniana têm sido reportados produzir respostas superiores em relação a outras regiões doadoras nas reconstruções maxilo-faciais, mas sem a devida comprovação científica. Este estudo tem por objetivos (1) estudar o padrão morfológico de enxertos ósseos “onlay” de calota craniana e compará-los com os eventos biológicos através de respostas imunoistoquímicas e (2) estabelecer os efeitos das perfurações no leito receptor sobre a manutenção do volume e densidade óssea. Sessenta coelhos do tipo New-Zealand White foram submetidos à enxertia óssea “onlay” de calota craniana na mandíbula. Em trinta coelhos o leito receptor foi perfurado (grupo perfurado) enquanto nos demais o leito foi mantido intacto (grupo não perfurado). Seis animais de cada grupo foram sacrificados aos 5, 7, 10, 20 e 60 dias após a cirurgia. Cortes histológicos foram preparados da região enxertada para análises imunoistoquímica e histológica. Na avaliação imunoistoquímica se observou marcações das proteínas Osteoprotegerina (OPG), “Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand” (RANKL), Fosfatase Alcalina (ALP), Osteopontina (OPN), “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF), “Tartrate-Resistant Acid Phosphatase” (TRAP), Colágeno do tipo I (COL I) e Osteocalcina (OC). O exame tomográfico foi realizado após a cirurgia e no sacrifício dos animais. Os achados histológicos revelaram que as perfurações contribuíram para uma maior deposição óssea nos períodos iniciais na interface entre o enxerto e o leito receptor, acelerando o processo de incorporação. Os resultados tomográficos mostraram menor reabsorção para o grupo perfurado ($P \leq 0,05$) e ambos os grupos mostraram altas taxas de densidade óssea aos 60 dias. Estas evidências são corroboradas pelos resultados imunoistoquímicos que mostraram maior marcação de proteínas ligadas a revascularização e osteogênese (VEGF, OPN, TRAP e ALP) no grupo perfurado. Esses achados indicam que o volume ósseo de enxertos da calota craniana é mais bem conservado quando o leito receptor é perfurado, provavelmente em razão de uma mais efetiva revascularização do enxerto e maior deposição óssea.

Palavras Chave: Enxerto Ósseo de Calota Craniana, Tomografia Computadorizada, Imunoistoquímica, Revascularização Óssea.

ABSTRACT

Several studies have discussed factors that govern the longevity of onlay bone grafts. However, little information has been made available on molecular events that occur over time. Cranial bone grafts have been reported to produce greater responses compared to other donor regions in maxillofacial reconstructions, but necessary scientific verification was still lacking. The objectives of this study are (1) to study the morphological pattern of cranial onlay bone grafts and compare them to the biological events through immunohistochemical responses, and (2) to establish the effects of perforations on maintaining the volume and bone density of the receptor bed. Sixty New Zealand White rabbits were submitted to cranial onlay bone grafts of the mandible. In thirty rabbits, the receptor bed was perforated (perforated group), while for the remaining specimens the bed was kept intact (non-perforated group). Six animals from each group were culled at 5, 7, 10, 20 and 60 days after surgery. Histological cuts from the grafted area were prepared for immunohistochemical and histological analyses. During the immunohistochemical evaluation, markers were found for proteins Osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand (RANKL), Alkaline Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP), Type I Collagen (COL I) and Osteocalcin (OC). The tomography examination (CT scan) was conducted after surgery and at culling. The histological findings revealed that the perforations contributed to higher bone deposition during the initial stages at the graft-receptor bed interface, accelerating the incorporation process. The results of the CT scan showed lower resorption for the perforated group ($P \leq 0.05$), and both groups showed high bone density rates at 60 days. This set of evidence is corroborated by the immunohistochemical results, which showed more markers of proteins associated with revascularization and osteogenesis (VEGF, OPN, TRAP and ALP) in the perforated group. These findings indicate that the bone volume of cranial dome grafts is better maintained when the receptor bed is perforated, probably resulting from more effective graft revascularization and greater bone deposition.

Keywords: Calvarial Bone Grafts, Computerized Tomography, Immunohistochemistry,
Bone Revascularization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Demarcação do leito doador (calota craniana)	52
Figura 2 -	Enxerto ósseo removido ao lado do guia cirúrgico	52
Figura 3 -	Leito receptor com perfurações padronizadas	52
Figura 4 -	Enxerto ósseo fixado na mandíbula	52
Figura 5 -	Corte tomográfico no plano coronal	53
Figura 6 -	Avaliação do volume pelo software Dicom Works	53
Figura 7 -	Avaliação da densidade pelo Software E-film Workstation	53
Figura 8 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 5 dias	54
Figura 9 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 7 dias, região abaixo do periósteo	54
Figura 10 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 7 dias, margem do enxerto	55
Figura 11 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 10 dias	55
Figura 12 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 20 dias	56
Figura 13 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 60 dias, leito receptor e enxerto	56
Figura 14 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo não perfurado de 60 dias, cortical externa do enxerto	57

Figura 15 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 5 dias	57
Figura 16 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 07 dias, próximo a uma perfuração	58
Figura 17	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 10 dias, margem do enxerto	58
Figura 18 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 10 dias, região da perfuração no centro da interface	59
Figura 19 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 20 dias, margem do enxerto	59
Figura 20 -	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 60 dias, margem direita do enxerto	60
Figura 21	Fotomicrografia do enxerto ósseo no grupo perfurado de 60 dias, margem esquerda do enxerto	60
Figura 22 -	Fotomicrografias mostrando imunomarcações das proteínas estudadas	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Gráfico da variação de densidade óssea em (HU) em relação aos tempos experimentais	63
Gráfico 2 -	Gráfico da variação de volume ósseo em (mm ³) em relação aos tempos experimentais	65
Gráfico 3 -	Gráfico da média dos escores imunoistoquímicos das proteínas estudadas, em relação aos tempos experimentais	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da densidade (HU) e resultado da comparação entre as fases inicial e final, nos vários tempos experimentais e para os grupos	62
Tabela 2 - Média e desvio padrão da diferença (final - inicial) de densidade (HU) e resultado da comparação entre os grupos (perfurado e não perfurado) e entre os tempos de avaliação	63
Tabela 3 - Média e desvio padrão do volume (mm^3) e resultado da comparação entre as fases inicial e final, nos vários tempos experimentais e para os grupos	64
Tabela 4 - Média e desvio padrão da diferença (final - inicial) de volume (mm^3) e resultado da comparação entre os grupos (perfurado e não perfurado) e entre os tempos de avaliação	65

LISTA DE ABEVIATURAS E SIGLAS

TC -	Tomografia Computadorizada
ALP -	Fosfatase Alcalina
OPG -	Osteoprotegerina
RANKL -	Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B ligand
OC -	Osteocalcina
OPN -	Osteopontina
VEGF -	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
COL I -	Colágeno Tipo I
TRAP -	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
FAPESP -	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
PFA -	Paraformaldeído
ROI -	Ferramenta para delimitar Região de Interesse (Software E-film)
BSP -	Sialoproteína
PBS -	Phosphate-buffered saline
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético

LISTA DE SIMBOLOS

P -	Nível de significância
ml -	Mililitro
kg -	Kilograma
mg -	Miligrama
mm -	Milímetro
mm ² -	Milímetro quadrado
mm ³ -	Milímetro cúbico
pH -	Potencial hidrogeniônico
Hu -	Hounsfield
kV -	Quilovoltagem
mA -	Miliamper

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
2	PROPOSIÇÃO	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	CIRURGIAS	27
3.2	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA	29
3.3	HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA	30
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	HISTOLOGIA	33
4.1.1	Grupo Não Perfurado	33
4.1.2	Grupo Perfurado	34
4.2	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA	35
4.2.1	Densidade do Enxerto Ósseo	35
4.2.2	Volume do Enxerto Ósseo	36
4.3	IMUNOISTOQUÍMICA	37
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO..	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICES	51

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Muitas cirurgias no esqueleto craniofacial requerem o uso de enxerto ósseo para reconstrução de deformidades congênitas ou adquiridas ou ainda para aumento volumétrico em cirurgias estéticas. O enxerto ósseo também pode ser usado para preenchimento de defeitos em situação “inlay”, promover suporte estrutural em cirurgia ortognática ou ainda reconstruir perímetros perdidos por tumores, traumas ou perda de função em situação aposicional ou “onlay”.

É conhecido que o sucesso da aplicação de enxertos ósseos autógenos aposicionais ou “onlay” é comprometido pela ocorrência de padrões imprevisíveis da remodelação do enxerto em relação ao tempo, podendo chegar a perdas de até 50% de seu volume original e dificultar em prever algum prognóstico (KÖRLOF et al., 1965 apud GORTH; ALBERIUS, 1999, p. 129). Por este motivo muitos estudos têm buscado investigar quais fatores podem influenciar ou definir o aumento da manutenção do volume dos enxertos ósseos em longo prazo, uma vez que comparado com outras modalidades de enxertia óssea, tais como a utilização de osso alógeno ou substituto ósseo, o enxerto autógeno ainda é conhecido como “gold standart” (KHAN et al., 2005).

Os eventos biológicos que cercam o reparo e a incorporação dos enxertos ósseos autógenos são parcialmente conhecidos e seguem iniciando pelo processo inflamatório, revascularização, osteocondução e repovoamento celular, osteoindução, osteogênese e remodelação (TONG; BUCHMAN, 2000). Todos estes eventos não necessariamente ocorrem cronologicamente, pois muitos podem acontecer concomitantemente, e por isso informações sobre os momentos

específicos de eventos moleculares têm sido foco de investigações com intuito de se entender qual o comportamento destes enxertos em longo prazo (FARIA et al., 2008).

Um dos primeiros fatores investigados, o qual causou discordância na literatura, foi a comparação de enxertos com origem embriológica diferente. Nesta linha de pensamento, Smith e Abramson (1974) foram pioneiros em buscar qual tecido ósseo mantinha mais seu volume após períodos experimentais. Os autores, comparando enxertos ósseos colhidos da calota craniana, com origem intramembranosa, e enxertos endocondrais retirados da crista ilíaca, ambos colocados subcutaneamente na bochecha e subperiostealmente no dorso nasal, analisados em períodos de 1, 3, 6 e 12 meses, observaram que o enxerto de origem endocondral apresentou severa reabsorção quando comparado ao enxerto de origem intramembranosa, para todos os tempos experimentais.

Procurando confirmar esta linha de pesquisa, outros trabalhos com metodologias semelhantes também encontraram maiores taxas de preservação de enxertos ósseos com origem intramembranosa (ZINS; WHITAKER, 1983; DADO; IZQUIERDO, 1989).

Tentando explicar o motivo pelo qual os enxertos ósseos com origem intramembranosa mantinham maior manutenção de volume quando comparado aos enxertos endocondrais, Kusiak et al. (1985) elaboraram uma metodologia para avaliação da revascularização de enxertos onlay, através da aplicação de material de contraste (silicone) para avaliações micro-angiográficas de enxertos ósseos “onlay” em coelhos, nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias . Os autores compararam enxertos ósseos intramembranosos bi-corticais de arco zigomático com enxertos endocondrais monocorticais de crista ilíaca, os quais foram

posicionados subperiostealmente sobre o dorso do focinho de 25 coelhos, porém sem utilização de fixação rígida. Nesta metodologia, os autores encontraram que enxertos intramembranosos (arco zigomático) submeteram a uma maior taxa de revascularização em todos os períodos experimentais, comparados aos resultados da crista ilíaca.

Por outro lado, trabalhos como de Phillips e Rahn (1990) e Sullivan e Szwajkun (1991), utilizando metodologias semelhantes às de Kusiak et al. (1985), observaram maiores taxas de revascularização nos enxertos com origem endocondral.

Um trabalho que praticamente definiu a polêmica se a origem embriológica pode influenciar na taxa de revascularização foi o de Pinholt et al. (1994), onde os autores propuseram uma comparação de quatro áreas doadoras de enxerto ósseo distintas em sua morfologia e origem embriológica. Neste trabalho foram utilizados enxertos bicorticais de mesma magnitude colhidos da crista ilíaca (endocondral), calota craniana (intramembranosa), tíbia (endocondral) e mandíbula (intramembranosa), e todos implantados em região intramuscular de ratos. Interessantemente os autores encontraram que os ossos da mandíbula e da crista ilíaca, que possuíam em suas estruturas maior porção de osso trabecular, tiveram maiores taxas de revascularização frente aos enxertos da tíbia e calvária, provando assim que a origem embriológica não influenciaria nas taxas de revascularização, mas sim a quantidade de osso trabecular que estes possuem na sua microarquitetura, o que facilitaria a penetração de vasos no interior destes tecidos.

Analisando o papel da revascularização sobre a manutenção de volume de enxertos ósseos “onlay”, Chen et al. (1994) compararam enxertos colhidos da calota craniana (intramembranoso) e da crista ilíaca (endocondral)

fixados rigidamente no focinho de coelhos. Neste estudo os autores observaram que enxertos ósseos onlay com microarquitetura mais trabecular (crista ilíaca) sofreram maiores taxas de reabsorção, mesmo obtendo maior e precoce revascularização. Esta relação demonstrou que o fator revascularização observado unilateralmente pode não ser o único que defina o sucesso da enxertia óssea em longo prazo.

Obviamente, o processo de revascularização não pode ser negligenciado, uma vez que todo “turnover” celular está vinculado a este processo, que em enxertos ósseos com microarquitetura trabecular pode ser completado em períodos mais curtos, e nos enxertos mais corticais chegar a meses para sua completa realização (ZERBO et al., 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a manutenção de volume dos enxertos ósseos “onlay” pode estar intimamente ligada a microarquitetura e a utilização de uma fixação rígida, contrapondo a teoria da origem embriológica ser a causa que defina o sucesso desta modalidade de reabilitação ao longo prazo. Na investigação do efeito da fixação rígida sobre a manutenção de volume dos enxertos ósseos “onlay”, Phillips e Rahn (1988); Phillips e Rahn (1990) e Lin et al.(1990) foram unânimes em demonstrar que o efeito de movimentação dos enxertos é sempre prejudicial para a sobrevivência destes tecidos, o que é estatisticamente minimizada pela aplicação da fixação rígida com uso de parafusos de titânio de 1,5 mm. Em relação à hipótese de que a microarquitetura óssea é um fator importante para a maior sobrevivência dos enxertos “onlay”, Hardesty e Marsh (1990), Donovan et al. (1993) e Chen et al. (1994) fizeram a comparação entre enxertos ósseos colhidos da calota craniana, com microarquitetura mais cortical, e enxertos de crista ilíaca, os quais possuem em sua estrutura um tecido mais trabecular. Nestes estudos, os autores observaram maiores taxas de reabsorção nos enxertos com microarquitetura

mais trabecular (crista ilíaca), chegando a porcentagens de reabsorção de 72% a 85%. Nos enxertos corticais (calota craniana) estas taxas de reabsorção mantiveram-se entre 32% a 34 %.

Porém só a partir do trabalho de Ozaki e Buchman (1998) pôde-se entender que a microarquitetura dos enxertos ósseos pode ser um fator biológico mais importante no que se refere à manutenção de volume, do que a relação com sua origem embriológica. Esta hipótese foi levantada neste estudo, através da comparação de enxertos com diferentes origens embriológicas e microarquiteturas. Para isto, os autores analisaram enxertos ósseos “onlay” colhidos da mandíbula de coelhos (blocos corticais com origem intramembranosa) e enxertos colhidos da crista ilíaca (blocos corticais e blocos trabeculares com origem endocondral), instalados abaixo do periósteo na calvária de coelhos. Em seus resultados os enxertos ósseos corticais, tanto da mandíbula quanto da crista ilíaca, obtiveram estatisticamente menores taxas de reabsorção em relação ao enxerto trabecular da crista ilíaca. Porém, ao comparar a variação de volume entre os enxertos corticais (mandíbula x crista ilíaca), os valores permaneceram muito semelhantes em todos os tempos experimentais (3, 8 e 16 semanas), o que levou aos autores concluir que a origem embriológica pode não ser um fator que defina a maior manutenção de volume dos enxertos ósseos “onlay”.

Uma linha de pesquisa que também é contundente em afirmar sua importância é a que sugere preparar o leito receptor com perfurações ou decorticalizações com intuito de aumentar a revascularização e o fluxo de células osteoprogenitoras na região da enxertia. Esta manobra foi realizada nos estudos de Alberius et al. (1996), Gordh et al. (1997), Carvalho et al. (2000) e Nishimura et al. (2004), e o consenso foi de que as perfurações levaram a um aumento populacional

de células angiogênicas e osteogênicas para área enxertada, o que ocasionou precoce revascularização e maior osteogênese entre enxerto e leito receptor. Porém, Adeyemo et. al., (2008) ao realizar enxertos ósseos “onlay” de crista ilíaca na mandíbula de ovelhas encontraram resultados histológicos semelhantes para grupos com leito perfurado e não perfurado.

Além destes fatores supracitados, algumas outras hipóteses foram também levantadas, tais como a permanência ou não do periósteo, orientação do enxerto ao leito receptor e se as células do enxerto ósseo que sobrevivem a enxertia participam no processo de incorporação deste ao leito receptor.

Alguns trabalhos têm enfatizado que a manutenção do periósteo aderido à cortical externa do enxerto ósseo, concomitante ao posicionamento da parte trabecular do enxerto voltado ao leito receptor, proporcionou maior manutenção de volume quando comparado aos tecidos que são totalmente livres de seu periósteo ou quando a parte cortical ficou voltada ao leito (THOMPSON; CASSON, 1970; KNIZE, 1974). Entretanto, estudos como de Hardesty e Marsh (1990) notaram que a orientação do enxerto não foi um fator preponderante na manutenção do volume, uma vez que os resultados não foram diferentes quando a porção trabecular ou a cortical estava voltada para o leito receptor.

Com relação à importância da preservação de células viáveis no enxerto ósseo autógeno, a literatura é pobre e pouca elucidativa. Um trabalho importante que tenta provar se células do enxerto ósseo podem sobreviver após o transplante e se estas possuem papel na incorporação do mesmo ao leito receptor, foi o de Gould et al. (2000), onde os autores, utilizando transplantes de ratos isógenos de sexo diferentes, conseguiram marcar as células provenientes do enxerto e observar se estas mantinham-se viáveis por períodos longos. Os autores,

avaliando em 1, 2 e 6 semanas após a enxertia, observaram que após 1 semana havia uma quantidade maior de osteócitos viáveis em todo enxerto, isto quando comparado ao grupo de 2 e 6 semanas. Entretanto, os autores afirmaram que, mesmo após 6 semanas, ainda havia células viáveis providas do enxerto e que estas também encontravam-se na região de incorporação, sugerindo sua participação no início do processo de osteogênese nos locais de fusão do enxerto e leito receptor.

Sabendo que muitas células do enxerto não sobrevivem ao ato de coleta e transplante, Zerbo et al. (2003) procuraram observar se enxertos autógenos são repovoados com o passar do tempo. Neste trabalho, os autores analisaram biópsias feitas de enxertos do mento que foram fixados em maxilas de humanos, nos tempos que variavam entre 2,5 a 7 meses após a enxertia. Os achados mostraram que nos tempos mais precoces, havia maior quantidade de lacunas livres de células, chamadas pelos autores de osso não vital, e que, com o passar do tempo, os enxertos autógenos foram remodelados e preenchidos por células viáveis.

Procurando entender melhor como os enxertos ósseos “onlay” se comportam, alguns autores procuraram identificar através de ensaios imunoistoquímicos os eventos biomoleculares aos quais estes enxertos são submetidos no processo de reparo e incorporação. Com objetivo de melhor entender momentos de maior osteogênese entre o enxerto ósseo e o leito receptor, Alberius et al. (1996) utilizaram imunomarcações de osteopontina (OPN) e sialoproteína (BSP), proteínas ricamente encontradas na matriz óssea. Neste estudo, os autores, ao avaliar a deposição óssea entre leito receptor e enxerto nos períodos de 4, 12 e 20 semanas, encontraram intensa marcação de OPN nos períodos mais precoces (4

e 12 semanas) e para BSP a marcação foi semelhante em todos os tempos experimentais.

Outro trabalho que também fez uso de marcações imunoistoquímicas no processo de reparo de enxertos “onlay”, foi o de Chen et al (1994), onde os autores utilizaram a imunomarcação para proteína TRAP, a qual é expressada por osteoclastos e pode dar indício dos momentos de maior osteoclastogênese. Os resultados deste trabalho revelaram que enxertos trabeculares (crista ilíaca) tiveram maior marcação de TRAP quando comparado aos enxertos corticais (calota craniana).

Além de estudos do processo de reparo dos enxertos ósseos “onlay”, a imunoistoquímica tem sido usada para avaliar eventos biomoleculares encontrados no reparo de defeitos ósseos. Kleinheinz et al. (2005), fizeram uso de marcações imunoistoquímicas com objetivo de estudar o efeito do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) no processo de angiogênese presente no reparo ósseo em defeitos criados na mandíbula de coelhos, onde os autores avaliaram quantitativamente e qualitativamente marcações de proteínas encontradas em células endoteliais (CD31/PECAM-1). Os autores puderam observar que defeitos ósseos com maior concentração de VEGF levaram a maiores taxas de angiogênese, o que garantiu a maior neoformação óssea nestes sítios experimentais.

Outro trabalho que também utilizou marcações imunoistoquímicas com objetivo de observar o papel da proteína osteopontina (OPN) no processo de angiogênese e osteoclastogênese foi o de Asou et al (2001), onde os autores identificaram a concentração de imunomarcações de proteínas em células endoteliais (CD31) e TRAP ao redor de discos ósseos retirados da calota de ratos e colocados em regiões ectópicas (intramuscular). Foram utilizados ratos com ou sem

a ausência da produção da proteína OPN em sua carga genética, e os resultados mostraram maior taxa de revascularização (CD31) e recrutamento de osteoclastos (TRAP) nos animais com produção da proteína OPN em sua carga genética.

Embora todos estes estudos tenham contribuído para o entendimento do intrincado mecanismo de remodelação óssea, os resultados dos achados biomoleculares não foram confrontados com dados volumétricos e densitométricos, impedindo correlações entre a ocorrência das proteínas ósseas e variações morfológicas dos enxertos ao longo do tempo.

Recentemente, o nosso grupo investigou a cronologia dos eventos biomoleculares relacionando-os à variação de volume e densidade de enxertos ósseos “onlay” obtidos de crista ilíaca, fixados em leitos intactos ou perfurados em mandíbula de coelhos (FARIA et al., 2008). Os resultados demonstraram que enxertos com ossificação endocondral e microarquitetura trabecular são sujeitos a taxas maiores de revascularização quando o leito receptor é perfurado, e que sofrem intensa reabsorção no longo prazo, sugerindo que esses enxertos devem ser submetidos à sua função biomecânica mais precocemente. Além disso, os autores mostraram uma relação entre os achados imunoistoquímicos, manutenção de volume e densidade óssea. As respostas deste trabalho instigaram o mesmo grupo de pesquisadores analisarem enxertos ósseos com microarquitetura e origem embriológica diferentes, tais como a calota craniana, que hoje tem sido utilizada como área doadora por muitos autores, uma vez que existem evidências de menor absorção e pouca morbidade pós-operatória (HARSHA et al., 1986; LIZUKA et al., 2004).

Neste novo trabalho, foram usadas as mesmas metodologias empregadas por Faria et al. (2008), utilizando a análise imunoistoquímica,

tomográfica e histológica com intuito de avaliar o comportamento dos enxertos ósseos autógenos “onlay” colhidos da calota craniana.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem por objetivos (1) estudar o padrão morfológico de enxertos ósseos “onlay” de calota craniana e compará-los com os eventos biológicos através de respostas imunoistoquímicas e (2) estabelecer os efeitos das perfurações no leito receptor sobre a manutenção do volume e densidade óssea. O estudo proposto representa a continuação de um projeto (Processo Fapesp 04/01113-4), apresentado no Congresso Europeu de Osseointegração, Zurique, em 2006 e publicado na revista Clinical Oral Implant Research (FARIA et al., 2008), o qual utilizou a mesma metodologia para avaliar enxertos ósseo autógenos aposicionais ou “onlay” colhidos da crista ilíaca de coelhos, uma vez que este modelo animal vem sendo muito utilizado neste ramo de pesquisa e pode ser proporcionalmente comparado com as respostas em humanos (ROBERTS; GARETTO, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Sessenta coelhos adultos, machos, tipo New Zealand White, pesando 3,5 a 4,0 kg, divididos em dois grupos: trinta animais foram submetidos à enxertia “onlay” com perfurações no leito receptor (grupo perfurado) e trinta animais em que a enxertia foi realizada em leito receptor não perfurado (grupo não perfurado). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de São Paulo, sob o número 06.1.573.53.9.

3.1 CIRURGIAS

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no pré e pós-operatório e sob cuidados veterinários e suporte nutricional. Os procedimentos cirúrgicos foram precedidos de sedação com acepromazina sub-cutânea (1,0 mg/Kg - Laboratorios Vabriela - Sivori, Buenos Aires, Argentina), anestesia geral com xilazina intramuscular (5,0mg/Kg - Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) misturada à quetamina (25,0mg/Kg - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embuguacú, São Paulo) e anestesia local com mepivacaína 2% e noradrenalina 1:200.000 (DFL – Indústria & Comércio S.A – Rio de Janeiro). Todas as cirurgias foram realizadas sob padrões assépticos e sempre pelo mesmo cirurgião.

Todos os animais foram submetidos a cirurgias unilaterais na calota craniana especificamente na região parietal e na mandíbula na região de corpo mandibular, logo abaixo da região de pré-molares e molares e posteriormente aos ápices dos incisivos. Um bloco ósseo de espessura total foi removido da calvária e transplantado para a mandíbula, sendo que em um grupo de animais houve preparo do leito receptor através de perfurações padronizadas e no outro grupo o leito permaneceu intacto. Para a remoção do enxerto uma incisão linear diretamente sobre a pele, medindo 4,0 cm, foi realizada ao longo da calota craniana ântero-posteriormente. O músculo e gálea aponeurótica foram incisados e rebatidos na camada suprapariosteal, seguido de incisão do periósteo para expor a cortical da calota craniana. O enxerto ósseo foi obtido de forma padronizada utilizando brocas esféricas sob irrigação abundante com salina e um guia cirúrgico medindo 10x10 mm (Figuras 1 e 2). Os enxertos removidos foram mantidos em gaze esterilizada umedecida em salina durante o preparo do leito receptor.

As enxertias ósseas no grupo perfurado foram precedidas da confecção de perfurações monocorticais do leito receptor, visando facilitar a comunicação entre a camada esponjosa do leito receptor e a cortical do enxerto. Tais perfurações foram realizadas sob irrigação abundante com soro fisiológico e a distribuição das mesmas foi padronizada utilizando guia confeccionado em aço cirúrgico (medindo 10x10mm), com oito perfurações de 1,0 mm de diâmetro, distribuídas de maneira eqüidistante (Figura 3). O enxerto foi fixado por meio de parafuso posicional de titânio (Syntes – Colorado, USA), medindo 1,5 mm de diâmetro por 6,0 mm de comprimento e colocado no centro do mesmo (Figura 4). O fechamento da ferida foi realizado com Vicryl 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson, São José dos Campos SP) no periósteo, e nylon 4-0 (Polysuture – PolySuture Ind.

Com. Ltda, São Sebastião do Paraíso-MG) na pele, com pontos simples. Os animais do grupo não perfurado foram submetidos aos mesmos procedimentos, mas os enxertos foram fixados em leitos sem perfuração.

No pós-operatório imediato os animais foram submetidos à antibioticoterapia com oxitetraciclina (0,2 ml/Kg – Laboratório Biovet, São Paulo) por 3 dias, analgésicos (Tramal® 0,02mg/kg - Biolab Searle, São Paulo) e antiinflamatório (Profenid® 3,0mg/Kg – Distribuidora Farmácia Brasil LTDA , Jandira SP) por via subcutânea e intra-muscular, respectivamente.

Seis coelhos de cada grupo foram sacrificados aos 5, 7, 10, 20 e 60 dias após a cirurgia, através de perfusão com paraformaldeído 4% com bomba peristáltica (Masterflex® Pump Controller, Cole-Parmer, USA).

3.2 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Todos os animais foram submetidos a exames tomográficos na mandíbula após a fixação do enxerto (fase inicial) e depois do sacrifício (fase final), com a finalidade de analisar a densidade e o volume ósseos. Os exames foram realizados em equipamento tomográfico helicoidal modelo Emotion™ (Siemens, Erlangen, Germany). As imagens foram adquiridas no plano coronal perpendicular à mandíbula e ao enxerto com incremento de 2.0 mm contínuo da mesa e espessura de corte de 1.0 mm (Figura 5). A reconstrução foi de 0.5 mm de espessura, com filtro de alta resolução espacial, resultando num tamanho de voxel de 0,5x0,3x0,3 mm. Para as avaliações de volume, as imagens foram geradas em padrão DICOM e

transferidas para o programa DicomWorks 1.3.5b (Figura 6), onde foi possível a visualização e mensuração do volume dos enxertos. De maneira padronizada, 11 cortes no plano coronal foram obtidos em cada enxerto, sendo que em cada corte uma medida de área em mm^2 pode ser mensurada e quando somadas e multiplicadas pelo número de cortes, obteve-se o volume total do enxerto em mm^3 . Esta análise foi realizada pelo mesmo examinador de maneira cega.

A densidade foi avaliada utilizando o software E-film (E-film Workstation 2.0.1- Merge E-film), o qual fornece a opção ROI circular com objetivo de mensurar a densidade no tecido ósseo em unidades Hounsfield (HU) – (Figura 7). Para esta análise foram considerados os 8 cortes tomográficos mais centrais, os quais davam condições de avaliação na porção superior e inferior do parafuso de fixação do enxerto. A localização e dimensão do ROI foram padronizadas e realizadas por apenas um avaliador de maneira cega e repetidas 5 vezes para cada animal com intuito de minimizar erros.

3.3 HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

Após o sacrifício, blocos ósseos da mandíbula foram reduzidos de maneira padronizada respeitando 2.0 mm das bordas anterior e posterior do enxerto. As biópsias foram mantidas em solução de Paraformaldeído (PFA 4%) a 4°C por 6 horas para completar a fixação, lavadas em solução tampão de Fosfato 0,1 M e salina a 0,9% (PBS) por 30 minutos e levadas a uma solução de EDTA 5% para serem descalcificadas. As peças foram lavadas em PBS por 24 horas e

posteriormente mantidas em solução de sacarose 30% por mais dois dias. Terminada a crioproteção cada peça foi fixada em um suporte com gel (Tissue Tek – Laboratório FK Biotec, Bento Gonçalves - RS), congelada a -20°C e cortada em um criostato (Microm HM 505 N) com espessura de 14 µm. Os cortes foram feitos de maneira semi-seriada no sentido coronal (anterior para posterior) e montados em lâminas polarizadas, onde foram divididas de maneira intercalada para as análises histológicas e imunoistoquímicas. As lâminas destinadas à análise histológica foram coradas com Tricrômio de Mallory.

O objetivo da análise histológica foi investigar os eventos morfológicos que ocorreram na interface entre enxerto e osso receptor e no enxerto, focando na presença de aposição óssea, reabsorção, reação do periósteo e efeito das perfurações na osteogênese. A análise imunoistoquímica, através do método de detecção por imunoperoxidase, foi destinada para marcações com anticorpos primários das seguintes proteínas: anti-Osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-Osteopontina (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-Colágeno Tipo I (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-Fosfatase Alcalina (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-TRAP (Santa Cruz Biotechnology, USA); anti-RANKL (Santa Cruz Biotechnology, USA) e anti-Osteoprotegerina (Santa Cruz Biotechnology, USA). Como anticorpo secundário, utilizamos o anticorpo biotilado anti-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Baltimore Pike - USA) na titulação de 1:200. Na seqüência as reações foram reveladas com a Diaminobenzidina (DAB) – (Sigma Aldrich, Saint Luis – USA). A determinação de níveis de marcações para cada anticorpo foram atribuídos de maneira semi-quantitativa, utilizando scores de 1 a 4 (1=ausente, 2= pouco, 3= moderado e 4=intenso). A análise foi realizada por três avaliadores em sistema de

duplo-cego, em imagens gravadas em microscópio Leica DMLB (Leica, Bensheim, Germany) utilizando objetiva com aumento de 100x.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo imunoistoquímico foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (ANOVA) e Post Hoc de Dunn para comparação entre os tempos experimentais de cada proteína e cada grupo isoladamente, e também empregamos o teste de Mann-Whitney para a comparação entre o grupo Perfurado e Não Perfurado, adotando nível de significância $p \leq 0,05$. Para a análise dos dados tomográficos (volume e densidade) foi utilizado um Modelo Linear de Efeitos Mistos pelo procedimento Proc Mixed do Software SAS[®] 9.0.

4 RESULTADOS

Todos os animais suportaram bem os procedimentos cirúrgicos e o pós-operatório ocorreu sem ocorrências importantes.

4.1 HISTOLOGIA

4.1.1 Grupo Não Perfurado

No grupo experimental de 5 dias os enxertos ósseos se apresentavam completamente preservados, sem imagens sugestivas de absorção ou deposição de novo osso. Um achado comum neste estágio era a presença de células adiposas, alguns vasos sangüíneos e um conjunto de células com características morfológicas de osteoblastos, encontradas próximos ao leito receptor (Figura 8). O processo de osteogênese era mais evidente a partir do dia 7, principalmente nas margens laterais do sítio enxertado com predominância de células da linhagem osteoblástica logo abaixo do perióstio – “reação do perióstio” (Figura 9). Nestas regiões, o início de deposição de novo osso (woven bone) geralmente encontrava-se próximo ao leito receptor (Figura 10). O enxerto ainda se encontrava altamente preservado, com raros pontos de reabsorção óssea. Após 10 dias o processo de reabsorção do enxerto era mais aparente, bem como um

processo osteogênico intenso nas margens do enxerto abaixo do periósteo, o que parecia iniciar a incorporação do mesmo ao leito receptor (Figura 11). Aos 20 dias, os processos de remodelação e osteogênese se mostravam bastante acelerados, invadindo a região central da interface leito-enxerto unindo essas duas estruturas. O tecido ósseo neoformado ainda era predominantemente imaturo (Figura 12). No período experimental de 60 dias todos os enxertos do grupo estavam incorporados ao leito receptor através de pontes ósseas em toda a extensão do sítio enxertado. A presença de osso maduro e organizado, com lamelas concêntricas e ósteons, se constituíram em uma característica histológica importante deste grupo (Figura 13). Nesta fase, a cortical externa do enxerto mostrava maior intensidade de pontos de absorção (Figura 14).

4.1.2 Grupo Perfurado

Aos 5 dias o grupo perfurado exibiu marcante proliferação celular entre o enxerto e o leito ósseo, principalmente nas regiões das perfurações onde foi visível a presença de muitos osteoblastos, tecido adiposo e início da formação de osso jovem (Figura 15). Aos 7 dias, a formação de osso jovem torna-se mais intensa, principalmente nas proximidades das perfurações, porém ainda caracterizado por um tecido imaturo (Figura 16). Aos 10 dias, a proliferação de células osteoprogenitoras junto ao periósteo era mais abundante, levando a uma formação de osso jovem ao longo de quase toda interface enxerto / leito receptor (Figura 17). A anatomia do enxerto permaneceu íntegra e ao lado das perfurações

havia a ocorrência de formação de pontes ósseas entre enxerto e leito receptor (Figura 18). Aos 20 dias o processo de incorporação do enxerto ao leito receptor era mais perceptível, caracterizado pelo aumento da superfície de tecido mineralizado entre as duas estruturas e o início de organização lamelar (Figura 19). Neste período havia evidências de intenso processo de remodelação nas margens e sobre o enxerto, porém com poucas imagens que caracterizassem reabsorção de osso não vital. Após 60 dias, observamos imagens sugestivas de absorção na periferia do enxerto. A incorporação do enxerto ao leito receptor estava bem estabelecida através de pontes de osso já organizado, rico em lamelas concêntricas e ósteons (Figura 20). No entanto, uma característica intrigante neste tempo foi a predominância de osso com largas trabéculas em áreas mais próximas do leito receptor (Figura 21).

4.2 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

4.2.1 Densidade do Enxerto Ósseo

Após a coleta de todos os dados e exploração destes através da aplicação do teste estatístico para as comparações desejadas, foi possível construir uma tabela composta de média e desvio padrão entre fase inicial e a fase final nos vários tempos experimentais para os grupos estudados (perfurado e não perfurado) - (Tabela 1). Nesta tabela notamos que a densidade óssea de enxertos ósseos “onlay”

da calota craniana aumenta após sua instalação e este é estatisticamente significativo a partir do tempo 7 dias para ambos os grupos.

Ao compararmos as médias da variação de densidade (fase final – fase inicial) entre os tempos experimentais (intra-grupos) - (Tabela 2) observamos que no grupo não perfurado houve uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos 5 e 10 dias e 5 e 60 dias. Já no grupo com leito perfurado, houve apenas diferença estatisticamente significativa entre os tempos 5 e 60 dias.

Na comparação entre os leitos, observamos que ambos os grupos mantém praticamente o mesmo padrão de comportamento, não havendo diferenças entre seus resultados (Gráfico 1). Porém notamos que no período entre 5 a 20 dias o grupo perfurado obteve resultados levemente maiores, no entanto no período de 60 dias houve uma inversão de comportamento tendo o grupo não perfurado maiores taxas de densidade óssea.

4.2.2 Volume do Enxerto Ósseo

Como realizado na análise da densidade, para avaliação do volume coletamos os dados e exploramos estatisticamente, os quais resultaram em uma tabela demonstrando as médias e desvios padrão dos grupos estudados (perfurado e não perfurado) nas fases inicial e final, nos vários tempos experimentais (5, 7, 10, 20 e 60 dias) - (Tabela 3). Os resultados obtidos nesta tabela mostram que ao comparar os valores obtidos entre a fase inicial e a fase final de cada tempo

experimental, apenas no tempo 60 dias houve diferença estatisticamente significativa para ambos os grupos.

Na comparação entre grupos observada no Gráfico 2 e Tabela 4, notamos que no período de 5 dias ambos os grupos tiveram leves perdas em seus volumes, porém estatisticamente não significantes. A partir do 7º dia observamos uma diferença no comportamento dos enxertos ósseos em seus respectivos leitos receptores, pois neste período o grupo com leito perfurado obteve ganho de volume, contrapondo aos resultados do grupo não perfurado que continuou tendo perdas em seu volume. Esta diferença foi estatisticamente significativa para este período de 7 dias. Este padrão de comportamento continuou nos períodos de 10 e 20 dias, onde o grupo perfurado permaneceu com ganhos de volume e o grupo não perfurado sofrendo perdas. No período de 60 dias, notamos que ambos os grupos perdem volume de maneira estatisticamente significativa quando comparamos aos resultados do período anterior (20 dias), porém o grupo não perfurado obteve maior intensidade nesta diminuição de volume.

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As marcações imunoistoquímicas das proteínas utilizadas neste estudo podem ser observadas na Figura 22 e os resultados dos escores dados para cada proteína podem ser visualizados no Gráfico 3.

Através dos resultados observamos que as proteínas OPG e RANKL, envolvidas com a regulação da indução do processo de osteoclastogênese,

obtiveram marcações semelhantes em todos os períodos, tendo maior intensidade de marcações no período de 7 dias para o grupo perfurado e aos 10 dias para o grupo não perfurado, mantendo um alto patamar de marcações ao longo prazo. A proteína TRAP, que é um marcador específico de osteoclasto e expressa no momento da reabsorção óssea, mostrou intensa taxa de marcação no período de 10 dias para o grupo não perfurado ($p \leq 0,05$) e aos 20 dias para o grupo perfurado ($p \leq 0,05$).

As proteínas OC e COL I não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos perfurado e não perfurado, embora um aumento das marcações tenha ocorrido após o período de 5 dias, mantendo-se estável até o final do experimento. A proteína ALP que também é expressa por osteoblastos e participa da mineralização da matriz óssea, exibiu marcações significativamente mais intensas no grupo perfurado comparado ao grupo não perfurado nos tempos de 7, 10 e 20 dias ($p \leq 0,05$). Na avaliação intra-grupo, os valores de ALP foram significativamente maiores nos tempos 10 e 20 dias em relação aos demais tempos ($p \leq 0,05$), porém apenas no grupo perfurado. A proteína OP, expressa por osteoblastos e osteoclastos, encontrada na matriz óssea, com participação no processo de remodelação e angiogênese mostrou aumento com forte tendência para significância estatística no período de 7 dias para o grupo perfurado ($P=0,08$).

A proteína VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), expressa por condrócitos hipertróficos e osteoblastos com função na ativação de células endoteliais no processo de angiogênese, exibiu pico de marcação no período de 10 dias em ambos os grupos ($p \leq 0,05$). Aos 60 dias o grupo não perfurado mostrou uma queda estatisticamente significativa de intensidade de marcação em relação ao grupo perfurado.

5 DISCUSSÃO

O entendimento dos aspectos biológicos da incorporação de enxertos ósseos ainda é incipiente. Em geral, a literatura revela a preocupação de clínicos e pesquisadores com os processos envolvidos na revascularização e manutenção do volume dos enxertos autógenos de diferentes áreas doadoras, bem como com a influência da microarquitetura e origem embriológica sobre esses parâmetros (ZINS; WHITAKER, 1983; KUSIAK et al., 1985; PHILLIPS; RAHN, 1988; DADO; IZQUIERDO, 1989; PHILLIPS; RAHN, 1990; LIN et al., 1990; HARDESTY; MARSH, 1990; SULLIVAN; SZWAJKUN, 1991; DONOVAN et al., 1993; PINHOLT et al., 1994). Acredita-se que enxertos ósseos autógenos com estrutura e microarquitetura mais cortical resultam em manutenção de volume aumentada, bem como a presença de perfurações ou decorticalizações do leito receptor realizada por muitos clínicos, como forma de facilitar o fluxo de células osteoprogenitoras para o enxerto, poderia incrementar a osteogênese e incorporação dos enxertos (ALBERIUS et al., 1996; GORDH et al., 1997; OZAKI; BUCHMAN, 1998; CARVALHO et al., 2000 e NISHIMURA et al., 2004). Entretanto, não há registros na literatura a respeito da incorporação de enxertos “onlay” que considerem os eventos biológicos que ocorrem no interior dos enxertos ao longo da incorporação e variações de volume e densidade dos mesmos. Recentemente, o nosso grupo (FARIA et al., 2008) reportou estudo em que informações da análise histológica, tomográfica e imunoistoquímica de enxertos de crista ilíaca foram comparadas na presença ou não de perfurações do leito receptor. A presente investigação utilizou as mesmas ferramentas metodológicas da anterior, utilizando o enxerto de calota

craniana, cuja origem embriológica (intra-membranosa) e micro-arquitetura (predominantemente cortical) diferem das características da crista ilíaca.

No presente estudo, os dados de variação de volume dos enxertos nos grupos perfurado e não-perfurado diferiram substancialmente ao longo do tempo. Embora todos os enxertos neste estudo mostraram-se integrados aos 60 dias de pós-operatório, no grupo perfurado notou-se aumentos volumétricos a partir de 7 dias e se estendeu até o período de 20 dias em relação ao volume verificado na instalação do enxerto. Aos 60 dias nesse mesmo grupo houve uma perda de volume estatisticamente significativa em relação ao tempo 20 e ao tempo inicial. Contrariamente, o grupo não-perfurado sofreu constantes perdas em todos os tempos experimentais, com um pico de decréscimo estatisticamente significativo aos 60 dias ($p \leq 0,05$) em relação aos tempos anteriores e ao tempo basal. Esta diferença de comportamento nos períodos entre 7 e 20 dias pode ser explicada pelas observações histológicas que sugerem maiores taxas de deposição de novo osso na interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor no grupo perfurado, principalmente ao redor das perfurações em períodos mais precoces. Do ponto de vista molecular, o maior ganho de volume no grupo perfurado provavelmente resultou de um aumento da ALP ($p < 0.05$) e da OPN ($p = 0.08$) aos 7 dias. A ALP expressa em osteoblastos tem papel importante na mineralização da matriz óssea (SUGAWARA et al., 2002), enquanto OPN não-colagênica é expressa em células da linhagem osteoblástica e osteoclástica, ricamente encontrada na matriz óssea (NODA; DENHARDT, 2002) e que também parece participar da angiogênese (ASOU et al., 2001). É conhecido que após o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos tenha cessado, a OPN atrairia osteoblastos para esses sítios que passam a depositar a matriz óssea (McKEE; NINCI, 1996; RITTILING; DENHARDT, 1999). A

combinação de ações da ALP e OPN pode ter garantido o aumento volumétrico observado entre 7 e 20 dias no grupo perfurado. Um dado interessante neste estudo é a curva de ocorrência de VEGF nos sítios perfurados e não-perfurados. Em ambos os grupos o VEGF atingiu níveis máximos aos 10 dias, mas a partir dos 20 dias esses valores decresceram até atingirem diferença significativamente maior aos 60 dias no grupo perfurado. O mesmo perfil de curva foi observado com as marcações de TRAP e ambos são similares às curvas de volume registradas para dois grupos. Esses dados juntos podem indicar que a perfuração do leito receptor manteve um nível constante de revascularização (VEGF) durante todo o experimento, o que garantiu uma taxa de remodelação do enxerto (TRAP) na mesma escala. As semelhanças observadas nos perfis dessas curvas sugerem que o maior volume ósseo de enxerto observado com leitos perfurados podem ter originado em grande parte do comportamento da proteína VEGF, o qual pode ter intensificado o processo de angiogênese no grupo perfurado culminando em maior recrutamento celular responsáveis pelo processo de remodelação (TRAP) e osteogênese (ALP e OPN). As proteínas COL I, OPG, OC e RANKL não apresentaram variações significantes de marcações ao longo do tempo, tanto em comparações entre grupos como intra-grupos. Este achado sugere que tais proteínas não são afetadas pelos procedimentos cirúrgicos adotados nessa investigação.

Em relação à densidade óssea, ambos os grupos exibiram comportamento semelhante, com aumento significativo entre 5 e 60 dias. Interessantemente, aos 60 dias a área do enxerto e da interface entre o enxerto e o leito receptor era ocupada por inúmeras trabéculas no grupo perfurado, o que parece ter garantido a manutenção do volume ósseo e uma tendência de diminuição de valores de densidade. Nos sítios não-perfurados o volume ósseo aos 60 dias foi

significativamente menor devida à reabsorção dos enxertos, mas com tendência a tornarem-se mais densos que enxertos instalados em leitos perfurados.

Os achados do presente estudo estão de acordo com os resultados de investigações anteriores (ALBERIUS et al., 1996; GORDH et al., 1997; CARVALHO et al., 2000; NISHIMURA et al.; 2004, FARIA et al., 2008), sugerindo que as perfurações no leito receptor influenciam positivamente no processo de revascularização e osteogênese. Lin et al. (1990) levantaram a hipótese que enxertos ósseos com maior taxa de revascularização podem sofrer maior reabsorção ao longo prazo. Esta afirmação não pôde ser confirmada em nosso estudo, uma vez que o grupo com leito perfurado mostrou taxas maiores de manutenção de volume de enxerto no decorrer dos experimentos a despeito de apresentar níveis de revascularização altos. Estudos prévios mostram que enxertos ósseos com microarquitetura mais cortical tendem a preservar o volume quando comparados aos enxertos ósseos mais trabeculares (GOLDSTEIN et al., 1995; OZAKI; BUCHMAN, 1998). Recentemente, Faria et al. (2008) reportaram taxas de reabsorção aos 60 dias de 53,7% no grupo perfurado e 69,7% para o grupo não-perfurado com enxertos de crista ilíaca. Os índices de reabsorção para enxertos de calota craniana no presente estudo foram 5,8% para o grupo perfurado e 22% para o grupo não perfurado. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Chen et al. (1994) e Donavan et al. (1993), que compararam enxertos de crista ilíaca e calota craniana em leitos ósseos sem perfurações e obtiveram taxas de reabsorção entre 72 a 85% e 32 a 34%, respectivamente.

Os resultados deste estudo demonstram que os enxertos fixados “onlay” em leito perfurado e não-perfurado são sujeitos à reabsorção, mas em escala significativamente maior em leitos não-perfurados. Esses achados estão em

desacordo com os de Adeyemo et. al. (2008), que não encontraram diferenças na integração de enxertos de crista ilíaca fixados em leitos perfurados e não-perfurados em mandíbula de ovelhas. Entretanto, esses autores não avaliaram o volume, a densidade ou qualquer outro parâmetro histométrico, dificultando qualquer comparação entre os estudos. As perfurações do leito receptor, em nosso estudo, parecem favorecer a revascularização do enxerto e o processo de deposição da matriz óssea, quando avaliado pela ocorrência de VEGF, ALP, OPN e TRAP nos sítios experimentais. Os dados compilados das proteínas COL I, OPG, OC e RANKL sugerem que a ocorrência dessas proteínas não foi alterada pela perfuração do leito receptor e mantiveram-se estáveis em todos os períodos. Por se tratar de um enxerto com microarquitetura mais cortical, a densidade óssea não foi afetada pelo tratamento do leito receptor. A evidência de que os enxertos, independentemente do grupo, apresentam intensa reabsorção entre 20 e 60 dias de pós-operatório indica que os mesmos deveriam ser submetidos à estimulação biomecânica (carga fisiológica) nesse período.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados deste estudo podemos concluir que:

- ✓ Esses achados indicam que o volume ósseo de enxertos da calota craniana é mais bem conservado quando o leito receptor é perfurado, provavelmente em razão de uma mais efetiva revascularização do enxerto e maior deposição óssea.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, W.L.; REUTHER, T.; BLOCH, W.; KORKMAZ, Y.; FISCHER, J.H.; ZÖLLER, J.E.; KUEBLER, A.C. Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep. *Oral Maxillofacial Surgery*, v. 12, p. 19-28. 2008.

ALBERIUS, P.; GORDH, M.; LINDBERG, L.; JOHNNELL, O. Onlay bone graft behavior after marrow exposure of the recipient rat skull bone. *Scandinavian Journal Plastic Reconstructive Hand Surgery*, v. 30, p. 257–266. 1996.

ASOU, Y, RITTLING, S.R.; YOSHITAKE, H.; TSUJI, K.; SHINOMIYA, K.; NIFUJI, A.; DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*, v. 142, p. 1325–1332, 2001.

CARVALHO, P.S.P.; 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*, v. 15, p. 565–570. 2000.

CHEN, N.T.; GLOWACKI, J.; BUCKY, L.P.; HONG, H.Z.; KIM, W.K.; YAREMCHUK, M.J. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 93, p. 714–722. 1994.

DADO, V.D.; IZQUIERDO, R. Absorption of onlay bone grafts in immature rabbits: Membranous versus endochondral bone and bone struts versus paste. *Annals of Plastic Surgery*, v. 23, p. 39-48. 1989.

DONOVAN, G.M.C.; DICKERSON, N.C.; HELLSTEIN, J.W.; HANSON, L.J. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 51, p. 898-903. 1993.

FARIA, P.E.; OKAMOTO, R.; BONILHA-NETO, R.M.; XAVIER, S.P.; SANTOS, A.C.; SALATA, L.A. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical Oral Implants Research*, v. 19, p. 393–401. 2008.

GOLDSTEIN, J.A., MASE, C.A., NEWMAN, M.H. The influence of bony architecture on fixed membranous bone graft survival. *Annals of Plastic Surgery*, v.34, p. 162-167, 1995.

GORDH, M.; ALBERIUS, P. Some basic factors essential to autogenic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. *Scandinavian Journal Plastic Reconstructive Hand Surgery*, v. 33, p. 129–146. 1999.

GORDH, M.; ALBERIUS, P.; LINDBERG, L.; JOHNELL, O. Bone graft incorporation after cortical perforations of the host bed. *Otolaryngology and head and neck surgery*, v. 117, p. 664-670. 1997.

GOULD, S.E.; RHEE, J.M.; TAY, B.K.B.; OTSUKA, N.Y.; BRADFORD, D.S. Cellular contribution of bone graft to fusion. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 18, p. 920-927. 2000.

HARDESRY, A.R.; MARSH, L.J. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation and embryonic origin. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 85, p. 5-14. 1990.

HARSHA, B.C.; TURVEY, T.A.; POWERS, S.K. Use of autogenous cranial bone grafts in maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 44, p. 11-15. 1986.

KHAN, S.N.; CAMMISA JR, F.P.; SANDHU, H.S.; DIWAN, A.D.; GIRARDI, F.P.; LANE, J.M. The biology of bone grafting. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v. 13, p. 77-86. 2005.

KLEINHEINZ, J.; STRATMANN, U.; JOOS, U.; WIESMANN, H.P. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 63, p. 1310-1316. 2005.

KNIZE, M.D. The influence of periosteum and calcitonin on onlay bone graft survival. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 53, p. 190-199. 1974.

KUSIAK, J.F.; ZINS, J.E.; WHITAKER, L.A. The early revascularization of membranous bone. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 76, p. 510-514. 1985.

LIN, K.Y.; BARTLETT, S.P.; YAREMCHUK, M.J.; FALLON, M.; GROSSMAN, R.F.; WHITAKER, L.A. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 86, p. 449- 456. 1990.

LIZUKA, T.; SMOLKA, W.; HALLERMANN, W.; MERICSKE-STERN, R. Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 15, p. 607-615. 2004.

MCKEE, M.D.; NANJI, A. OPN at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants, ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Research Technology* v. 33, p. 141-164. 1996.

NISHIMURA, I.; SHIMIZU, Y.; OOYA, K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, v. 15, p. 293-300. 2004.

NODA, M.; DENHARDT, D.T. Osteopontin. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, G.A.,eds. *Principles of bone biology*, 2nd edition. San Diego, California: Academic Press, 2002. p.241.

OZAKI, W.; BUCHMAN, S.R. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 102, p. 291–299. 1998.

PHILLIPS, H.J.; RAHN, A.B. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft resorption. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 82, p. 872-877. 1988.

PHILLIPS, H.J.; RAHN, A.B. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 85, p. 891-897. 1990.

PINHOLT, E.M.; SOLHEIM, E.; TALSNES, O.; LARSEN, T.B.; BANG, G.; KIRKEBY, O.J. Revascularization of calvarial, mandibular, tibial, and iliac bone grafts in rats. *Annals of Plastic Surgery*, v. 33, p. 193–197. 1994.

RITTLING, S.R.; DENHARDT, D.T. OPN function in pathology: lessons from OPN-deficient mice. *Experimental Nephrology* v. 7, p. 103-113. 1999.

ROBERTS, W.E.; GARETTO, L.P.; Fisiologia e metabolismo ósseos. In: MISCH, C.E. *Implantes dentários contemporâneos*. 2ª ed, São Paulo: Editora Santos, 2004. p. 225-237.

SMITH, D.J.; ABRAMSON, M. Membranous vs endochondral bone autografts. *Archives of otolaryngology*, v. 99, p. 203-205. 1974.

SUGAWARA, Y.; SUZUKI, K.; KOSHIKAWA, M.; ANDO, M.; IIDA, J. Necessity of Enzymatic Activity of Alkaline Phosphatase for Mineralization of Osteoblastic Cells. *Japanese Journal Pharmacology*, v. 88, p. 262 – 269. 2002.

SULLIVAN, G.W.; SZWAJKUN, P.R. Revascularization of cranial versus iliac crest bone graft in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 87, p. 1105-1109. 1991.

THOMPSON, N.; CASSON, A.J. Experimental onlay bone graft to the jaws: a preliminary study in dogs. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 46, p. 341-349. 1970.

TONG, L.; BUCHMAN, R.S. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *The Journal of Cranio-Maxillofacial Trauma*, v. 6, p. 31-41. 2000.

ZERBO, I.R.; DE LANGE, G.L.; JOLDERSMA, M.; BRONCKERS, A.L.; BURGER, E.H. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, p. 759-766. 2003.

ZINS, J.E.; WHITAKER, A.L. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 72, p. 778-785. 1983.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Figuras

Figuras 1 e 2 – Demarcação do leito doador e enxerto ósseo ao lado do guia cirúrgico.

Figuras 3 e 4 – Leito perfurado e enxerto de calota craniana fixado na mandíbula

Figura 5 – Corte tomográfico no plano coronal

Figuras 6 e 7 – Avaliação do volume pelo software Dicom Works e de densidade pelo Software E-film Workstation 2.0.1.

Figura 8 – Fotomicrografia do enxerto ósseo (BG) no grupo não perfurado de 5 dias. Observa-se proliferação de osteoblastos (Ob) próximos ao leito receptor (RB)

Figura 9 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) abaixo do perióstio “reação do perióstio”. Grupo não perfurado de 7 dias.

Figura 10 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) entre o enxerto (BG) e leito receptor (RB) no grupo não perfurado de 7 dias.

Figura 11 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) entre o enxerto (BG) e leito receptor (RB) no grupo não perfurado de 10 dias.

Figura 12 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) entre o enxerto (BG) e leito receptor (RB) no grupo não perfurado de 20 dias.

Figura 13 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) entre o enxerto (BG) e leito receptor (RB) no grupo não perfurado de 60 dias. As setas indicam formação óssea lamelar e ósteons.

Figura 14 – Fotomicrografia mostrando áreas de reabsorção (setas) na cortical externa do enxerto ósseo (BG) no grupo não perfurado de 60 dias.

Figura 15 – Fotomicrografia mostrando formação de novo osso (NB) na região de perfurações (Pf) entre o enxerto ósseo (BG) e leito receptor (RB) no grupo perfurado de 5 dias.

Figura 16 – Fotomicrografia mostrando formação de novo osso (NB) na região de perfurações (Pf) entre o enxerto ósseo (BG) e leito receptor (RB) no grupo perfurado de 7 dias.

Figura 17 – Fotomicrografia mostrando intensa formação de novo osso (NB) nas margens abaixo do periósteo (Pt) e entre o enxerto ósseo (BG) e o leito receptor (RB) no grupo perfurado de 10 dias.

Figura 18 – Fotomicrografia mostrando formação de pontes ósseas na região central entre o enxerto ósseo (BG) e o leito receptor (RB) ao lado de perfurações (Pf) no grupo perfurado de 10 dias.

Figura 19 – Fotomicrografia mostrando intensa formação de osso novo (NB) entre o enxerto ósseo (BG) e o leito receptor (RB) e abaixo do periósteo, no grupo perfurado de 20 dias.

Figura 20 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) organizado rico em lamelas concêntricas e ósteons (setas) entre o enxerto ósseo (BG) e o leito receptor (RB) no grupo perfurado de 60 dias, na margem direita do enxerto.

Figura 21 – Fotomicrografia mostrando formação de osso novo (NB) organizado rico em lamelas concêntricas e ósteons (setas) entre o enxerto ósseo (BG) e o leito receptor (RB) no grupo perfurado de 60 dias. Grandes trabéculas entre enxerto e leito receptor, na margem esquerda do enxerto.

Figura 22- Fotomicrografias mostrando marcações das proteínas indicadas pelas setas.

APÊNDICE B – Gráficos e Tabelas

Tabela 1 – Média e desvio padrão da densidade (HU) e resultado da comparação entre as fases inicial e final, nos vários tempos experimentais e para os grupos.

Tempo (dias)	Leito	Inicial		Final	
		média	dp	média	dp
5	Perf.	829,29	143,34	889,65	251,46
	Não				
	Perf.	710,38	168,69	743,35	240,12
7	Perf.	885,92*	141,54	1071,37*	107,31
	Não				
	Perf.	635,07*	162,68	736,01*	215,51
10	Perf.	795,99*	143,24	1010,44*	151,83
	Não				
	Perf.	713,43*	119,86	903,92*	72,98
20	Perf.	877,42*	70,25	1073,38*	161,13
	Não				
	Perf.	712,75*	109,50	894,79*	152,46
60	Perf.	903,27*	118,57	1164,67*	99,10
	Não				
	Perf.	854,93*	153,13	1185,43*	219,42

* - diferença estatisticamente significante entre as fases inicial e final ($p < 0,05$)

Tabela 2 – Média e desvio padrão da diferença (final - inicial) de densidade (HU) e resultado da comparação entre os grupos (perfurado e não perfurado) e entre os tempos de avaliação.

Tempo (dias)	Perfurado		Não perfurado	
	média	dp	média	dp
5	60,36 ^a	230,14	32,97 ^a	89,65
7	185,45 ^{ab}	84,09	100,95 ^{ab}	85,50
10	214,45 ^{ab}	91,74	190,49 ^{bc}	112,94
20	195,97 ^{ab}	178,84	182,03 ^{abc}	70,05
60	261,39 ^b	94,61	330,51 ^c	191,41

Tempos com letras iguais, dentro de cada tipo de grupo, não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

* - diferença estatisticamente significativa entre tipos de leito ($p < 0,05$)

Gráfico 1 – Gráfico da variação da densidade (final - inicial) para cada um dos grupos estudados, nos tempos de avaliação (5, 7, 10, 20 e 60 dias).

(*) representa significância entre os grupos

Tabela 3 – Média e desvio padrão do volume (mm³) e resultado da comparação entre as fases inicial e final, nos vários tempos experimentais e para os grupos.

Tempo (dias)	Tipo	Inicial		Final	
		média	dp	média	dp
5	Perf.	2679,33	385,95	2544,00	367,32
	Não				
	Perf.	2087,17	818,55	2051,33	889,22
7	Perf.	2373,67	388,94	2512,17	554,79
	Não				
	Perf.	1930,50	213,38	1708,00	369,24
10	Perf.	2643,00	431,93	2801,50	636,52
	Não				
	Perf.	2347,00	246,83	2305,00	418,26
20	Perf.	2228,67	252,59	2424,17	199,00
	Não				
	Perf.	1958,33	245,94	1838,17	553,38
60	Perf.	2723,33*	298,88	2564,83*	359,58
	Não				
	Perf.	2444,17*	650,07	1907,67*	595,62

* - diferença estatisticamente significativa entre fases inicial e final (p<0,05)

Gráfico 2 – Gráfico da variação do volume (final – inicial) para cada um dos grupos estudados (perfurado e não perfurado), nos tempos de avaliação (5, 7, 10, 20 e 60 dias). (*) representa significância entre os grupos

Tabela 4 – Média e desvio padrão da diferença (final - inicial) de volume (mm³) e resultado da comparação entre os grupos (perfurado e não perfurado) e entre os tempos de avaliação.

Tempo (dias)	Perfurado		Não perfurado	
	média	dp	média	dp
5	-135,33 ^{ac}	177,18	-35,83 ^a	99,17
7	138,50 ^{ab*}	407,45	-222,50 ^{a*}	185,58
10	158,50 ^{ab}	323,23	-42,00 ^a	300,65
20	195,50 ^b	132,55	-120,17 ^a	334,81
60	-158,50 ^{c*}	217,10	-536,50 ^{b*}	182,45

* - diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

Tempos com letras iguais, dentro de cada grupo, não possuem diferença estatisticamente significativa entre si

Gráfico 3 – Média dos escores das proteínas OPG, RANKL, ALP, OPN, VEGF, TRAP, COL e OC nos tempos de avaliação para os grupos perfurado e não perfurado. (*) representa significância entre os grupos.