

Paulo Almeida Júnior

*Influência de três meios de armazenamento
no processo de reparo do enxerto ósseo
autógeno. Análise histomorfométrica e
imunohistoquímica em coelhos.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – UNESP, para obtenção do
grau de “Doutor em Odontologia” – Área de
Concentração: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCO-MAXILO-FACIAL.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

Araçatuba-SP

2009

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

A498i Almeida Júnior, Paulo
Influência de três meios de armazenamento no processo de reparo do enxerto ósseo autógeno: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em coelhos / Paulo Almeida Júnior. --
Araçatuba: [s.n.], 2009.
88 f. : il. + CD ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009.
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

1. Osteogênese. 2. Osso e ossos. 3. Transplante ósseo. 4. Transplante autólogo. 5. Remodelação óssea.

Black D7
CDD 617.6

Dados Curriculares

Paulo Almeida Júnior

- NASCIMENTO: 27 de julho de 1975 – Belém-PA
- FILIAÇÃO: Paulo Almeida
Maria Augusta da Silva Almeida
- 1995 – 1998: Curso de Graduação em Odontologia – UFS.
- 1999 – 2001: Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.
- 2001 – 2003: Preceptor do Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.
- 2003 – 2005: Curso de pós-graduação em odontologia, nível de Mestrado, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.
- 2004 – 2005: Especialização em Implantodontia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
- 2005 Professor das Disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Primeiros Socorros em Odontologia e Clínica Integrada e Coordenador da Clínica de Odontologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro de Estudos Superiores de Maceió.
- 2005 - 2009: Curso de pós-graduação em odontologia, nível de Doutorado, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.
- 2007 – 2009: Especialização em Odontologia Legal pela ABO-AL.

Dedicatória

Aos meus pais, Paulo e Augusta,

Que apesar das intempéries da vida, sempre acreditaram em mim, me apoiando e incentivando, a vocês dedico mais esta árdua conquista.

*A toda minha família, em especial a Napoleão,
Margareth, Ricardo Alexandre, Mariana, Lucas,
Isabela, Ricardinho e Paulo Napoleão,*

Apesar do longo período de ausência sei que torciam por mim. Vocês sempre estiveram presentes em meu pensamento.

À Patrícia,

Pelo apoio incondicional que recebi e sacrifício nos momentos de ausência ou distância. Faço este mérito também seu meu amor.

Agradecimentos Especiais

A Deus, que nos permite a vida e oferece condições para traçarmos e percorrermos o nosso caminho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Osvaldo Magro Filho.

Agradeço profundamente por ter continuado como seu orientado, pela presença real e orientação segura durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e pela paciência nos momentos de maiores dificuldades. Admiro-lhe por sua competência, capacidade e maneira de conduzir as diversas situações profissionais e pessoais. Mais do que um grande professor você se tornou para mim um importante amigo. Muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos e pela convivência agradável durante toda a pós-graduação.

Ao professor Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Grande exemplo de dedicação à profissão e de competência. Agradeço pela oportunidade de poder ter cursado o Doutorado nesta casa que sempre muito bem me acolheu e pelas palavras de apoio e gestos de amizade durante a pós-graduação.

Ao professor Dr. Michel Saad Neto.

Agradeço pelos momentos em que conversamos e pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelas sábias palavras recebidas.

Ao professor Dr. Tetuo Okamoto, que com sua simpatia, humildade e conhecimento conquista a todos. Sinto-me honrado em ter conhecido um grande professor.

À professora Dra. Roberta Okamoto, pela valiosa colaboração e disposição na elaboração e execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Wilson Roberto Poi e Professor Dr. Celso Koogi Sonoda, pelo apoio, receptividade e orientações prestadas durante este período.

Aos amigos e companheiros da Pós-Graduação Francisley Ávila Souza, Leandro de Carvalho Cardoso, Thallita Pereira Queiroz e Thaís da Silveira Rodrigues, agradeço pelos preciosos auxílios durante a realização deste trabalho.

Aos alunos da graduação, em especial a Luana Barbosa, que prestaram fundamental auxílio na execução deste trabalho

Ao amigo Fábio Yudi Horikawa que sempre me acolheu aqui em Araçatuba como se eu fosse um irmão, muito obrigado pela convivência e auxílio.

Agradecimentos

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC – na pessoa do diretor da FCBS e do Coordenador do Curso de Odontologia, Professor Dr. Mauro Guilherme de Barros Quirino Martins e Professor Thadeu Roriz Silva Cruz, pela disponibilização de afastamento das atividades administrativas e de docência, em momentos importantes, para execução do curso de doutorado.

Aos professores das disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial do CESMAC: Edmundo Melo Júnior, José Ricardo Mikami e Sônia Ferreira Soares que sempre me apoiaram e propiciaram o término desta jornada.

Aos colegas plantonistas: André Silva Gois, Davis Almeida, Ewertom de Andrade Filho e José Ricardo Santana Júnior que durante todo este curso me apoiaram nas intermináveis trocas de plantão no Hospital de Urgência de Sergipe e na Unidade de Emergência de Arapiraca.

Aos colegas e amigos do curso de Doutorado: André Dotto Sottovia, Eleonor Álvaro Garbin, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Liliane Sheidegger da Silva Zanetti, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Leandro de Carvalho Cardoso, Thais da Silveira Rodrigues, Walter Betoni Júnior, Francisley Ávila Souza, Thallita Pereira Queiroz, Jéssica Lemos Gulinelli, Paulo Esteves Faria, Albanir Gabriel Borrasca, Marcos Heidy Guskuma, Nicolas Homsy e Martha A. Salim. Agradeço a todos vocês pelos inesquecíveis momentos pessoais e profissionais.

Aos amigos do curso de Mestrado: Camila Benez Ricieri, Flávia Priscila Pereira, Abrahão Cavalcanti, Rodolfo Valentini Neto, Cassiano Pereira, Walter Cristiano Gealh, Pedro J. Santos, Eloisa Fonseca Marão, Jonatas C. Esteves e Fernando Guastaldi. Agradeço pelos agradáveis momentos de convivência e compartilhamento de conhecimentos durante a pós-graduação.

Aos técnicos e funcionários do Biotério Central da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista: Camilo Roberto Venâncio, Odair Vicente e João; agradeço pela ajuda com os animais e por estarem sempre prontos a auxiliar.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada: Bernadete Maria Nunes Kimura, Gilmar Martins de Oliveira e Maria Dirce Colli Boatto, agradeço pela imensa contribuição e apoio para a realização do presente estudo.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada: Cleide Lemes Calzadilla e Paulo Roberto Gratão, agradeço pela disponibilidade, convívio e ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários da secção de Pós-graduação: Marina Midori Sakamoto Kawagoi, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Diogo Reatto, agradeço por tantas ajudas e pela simpatia com que me recebem.

A todos os funcionários da biblioteca que me auxiliaram em diversos momentos da elaboração desta tese.

Aos companheiros da República Pipinelas: Vinícius Baroni Peixoto (Mono), Fábio Yudi Horikawa (Farofino), Fernando Kendi Horikawa (Bussunda), Ícaro Franco de Toledo (Pimpão), Leandro de Carvalho Cardoso (Goiâno), Tales Candido Garcia da Silva (Bicho), Felipe Melhado Magri, Alex Pereira Bitencourt (Truta), Bruno Tedeschi (Cafuné), Miguel (Flô), que sempre me acolheram com respeito e amizade.

Epígrafe

Sem atalhos mergulhei pelos caminhos do saber. Conheci a inquietude, o descontentamento, mas também o fascínio irresistível do maravilhoso. Pequeno ante o grandioso, grande ante a pequenez do espírito e a pretensa força dos poderosos, de tudo procurei me aproximar, tangido pela atração do desconhecido, do irrealizado. Não haveria contudo, atalho ou caminho, não estivesse em mim a força irresistível do prazer em percorrê-lo.

Leonardo da Vinci

Resumo

ALMEIDA JÚNIOR, P. Influência de três meios de armazenamento no processo de reparo do enxerto ósseo autógeno. Análise histomorfométrica e imunoistoquímica em coelhos. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

Proposição: O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de três meios de armazenamento temporário no processo de reparo de enxertos ósseos retirados de calota craniana e fixados em mandíbula de coelhos. **Material e Método:** Foram removidos dois blocos ósseos de 9mm da calota craniana de 40 coelhos machos e colocados no ângulo mandibular direito e esquerdo. O enxerto ósseo foi fixado ao leito receptor imediatamente após a sua remoção (G1), fixado 2 horas após armazenamento em meio seco (G2), 2 horas imerso em solução fisiológica (G3) e 2 horas imerso em solução de Euro Collins® (G4), todos a temperatura ambiente. Os animais foram sacrificados aos 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Uma medida macroscópica padronizada da espessura do enxerto posicionado no leito receptor foi aferida no trans-operatório e após o sacrifício de cada grupo. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina e eosina e pela técnica de imunoistoquímica, através da expressão das proteínas osteocalcina (OC) e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). **Resultado:** A espessura do enxerto e rebordo evidenciou um comportamento uniforme entre os grupos, quando comparados no mesmo período, não havendo diferença estatisticamente significativa. A análise histométrica do percentual de osso neoformado na interface entre o leito receptor e o enxerto demonstrou não haver diferença estatística entre os grupos, no período de 7 e 15 dias pós-operatórios, exceto o grupo G1 que mostrou-se estatisticamente superior em relação ao grupo G4 ($p=0,0227$) aos 15 dias. Houve uma maior imunomarcação para TRAP e OC verificada no grupo G1, porém sem diferença significativa entre os grupos do mesmo período. **Conclusão:** A solução fisiológica e de Euro Collins® utilizadas como meio de armazenamento temporário, demonstraram influenciar de forma semelhante na biocompatibilidade do

enxerto ósseo autógeno, apresentando uma dinâmica no processo de reparo muito próxima a do enxerto realizado de forma imediata.

Palavras-chave: Osteogênese. Osso e Ossos. Transplante Ósseo. Transplante Autólogo. Remodelação Óssea.

Abstract

ALMEIDA JÚNIOR, P. Influence of three temporary storage in the repair process of autogenous bone grafts. Histomorphometric and immunohistochemical analysis in rabbits. [thesis]. Araçatuba: Dental School of São Paulo State University; 2009.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the influence of three temporary storage environments in the repair process of bone grafts removed from the calvaria and fixed in rabbits' mandible. **Materials and Methods:** Two bone blocks with 9 mm were removed from the calvaria of 40 male rabbits and placed on their right and left mandible angles. Bone graft was placed at the receptor site immediately after its removal (G1), placed 2 hours after storage in dry environment (G2), 2 hours immersed in physiological solution (G3) and 2 hours immersed in Euro Collins[®] solution (G4), all of them at room temperature. The animals were euthanized at 7, 15, 30 and 60 post-operative days. A standard macroscopic measurement of the graft thickness positioned at the receptor site was done at the trans-operative period and after the euthanasia of each group. Histological sections were stained by hematoxylin and eosin and by immunohistochemical technique, through the expression of the proteins osteocalcin (OC) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). **Results:** Ridge and graft thicknesses evidenced an uniform behavior among the groups, when the same periods were compared, and there was no statistically significant difference. Histometric analysis of the newly formed bone percentage at the interface between the receptor site and the graft showed no statistical difference among the groups in the post-operative periods of 7 and 15 days, except G1 group, which showed to be statistically higher when compared to G4 group ($p=0,0227$), at 15 days. There was a higher immunomarking for TRAP and OC, verified at G1 group, however without significant difference between the groups of the same period. **Conclusion:** Physiological and Euro Collins[®] solutions used as temporary storage environments showed to influence, similarly, the biocompatibility process of the autogenous bone graft, presenting a repair process dynamics close to immediate grafting procedure.

**Key words: Osteogenesis. Bone and Bones. Bone Transplantation.
Transplantation, Autologous. Bone Remodeling.**

Lista de Figuras

- Figura 01 - A. Remoção dos enxertos ósseos autógenos da calota craniana com trefina; 54
B. Enxerto ósseo autógeno armazenado em cuba metálica estéril;
C. Preparo do leito receptor com uma leve decorticação;
D. Fixação do enxerto ósseo autógeno no ângulo mandibular esquerdo com parafuso de titânio.
- Figura 02 - A. Esquema comparativo do enxerto e guia cirúrgico evidenciando o local de medição; 54
B. Guia cirúrgico posicionado sobre o enxerto ósseo já fixado, notar posicionamento das marcações e relação ao formato cruciforme da cabeça do parafuso de fixação.
- Figura 03 - A. Grupo enxerto imediato 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR). Trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta); 55
B. Grupo meio seco 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), com presença de tecido conjuntivo na interface. Região do enxerto sem viabilidade celular (setas);
C. Grupo soro fisiológico 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), exibindo trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (setas);
D. Grupo Euro Collins® 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), evidenciando trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a

tecido conjuntivo (seta).

- Figura 04 -
- A. Grupo enxerto imediato 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR). Trabéculas ósseas mais espessas na interface e pontos de revascularização (setas);
 - B. Grupo meio seco 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), com presença trabéculas ósseas delgadas e tecido conjuntivo na interface. Notar lacunas dos osteócitos vazias (setas);
 - C. Grupo soro fisiológico 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), exibindo delgadas trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta);
 - D. Grupo Euro Collins® 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), evidenciando delgadas trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta).
- 56

- Figura 05 -
- A. Grupo enxerto imediato 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), com presença de trabéculas ósseas espessas na interface (seta);
 - B. Grupo meio seco 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) parcialmente incorporado ao leito receptor (LR), com presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea na interface. Região do enxerto sem viabilidade celular (setas);
 - C. Grupo soro fisiológico 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), exibindo trabéculas ósseas bem desenvolvidas na interface em meio a pouco tecido conjuntivo (seta);
 - D. Grupo Euro Collins® 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), evidenciando trabéculas ósseas extensas na interface em meio a pouco tecido
- 57

- conjuntivo (seta).
- Figura 06 - A. Grupo enxerto imediato 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN) 58
incorporado e bem vascularizado ao leito receptor (LR);
B. Grupo meio seco 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN)
incorporado e pouco vascularizado ao leito receptor (LR);
ainda com presença de tecido conjuntivo sem diferenciação
óssea. Notar a presença de lacunas de osteócitos vazias
(setas);
C. Grupo soro fisiológico 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN)
incorporado e vascularizado ao leito receptor (LR), exibindo
poucas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea
(seta);
D. Grupo Euro Collins® 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN)
incorporado e vascularizado (seta) ao leito receptor (LR).
- Figura 07 - A. Grupo enxerto imediato – 30 dias 160X. Marcação 59
imunoistoquímica hiper-positiva para a OC (setas);
B. Grupo meio seco – 15 dias 160X. Marcação
imunoistoquímica positiva para a OC (seta);
C. Grupo soro fisiológico – 30 dias 160X. Marcação
imunoistoquímica super positiva para OC (setas);
D. Grupo Euro Collins® – 30 dias 160X. Marcação
imunoistoquímica super positiva para OC (setas).
- Figura 08 - A. Grupo enxerto imediato – 15 dias 160X. Marcação 60
imunoistoquímica para a TRAP. Poucos osteoclastos
marcados (setas);
B. Grupo meio seco – 30 dias 160X. Marcação
imunoistoquímica para a TRAP. Pouca evidência de
osteoclastos marcados (setas);
C. Grupo soro fisiológico – 15 dias 160X. Marcação
imunoistoquímica para a TRAP. Grande quantidades de
osteoclastos marcados (setas);

D. Grupo Euro Collins® – 15 dias 160X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Grande quantidade de osteoclastos marcados (setas).

Figura 09 -	Incisão de 2cm na região fronto-parietal.	74
Figura10 -	Acesso à região parietal (área doadora).	74
Figura 11 -	Remoção do enxerto com uso de trefina.	74
Figura 12 -	Remoção do enxerto ósseo autógeno de calota craniana bilateralmente.	74
Figura 13 -	Descolamento delicado da dura mater, visando à remoção do enxerto.	75
Figura 14 -	Exposição da dura mater após a remoção do enxerto.	75
Figura 15 -	Meio de armazenamento temporário utilizado - Solução de Euro Collins®.	75
Figura 16 -	Meio de armazenamento temporário utilizado - Soro fisiológico estéril.	75
Figura 17 -	Enxerto ósseo acondicionado em cuba metálica estéril (meio seco).	75
Figura 18 -	Ponto de referência para medição da espessura do enxerto após fixado, realizada 1,5 mm da perfuração central da cabeça do parafuso.	75
Figura 19 -	Acesso submandibular lado esquerdo.	76
Figura 20 -	Região de ângulo mandibular esquerdo (leitor receptor).	76
Figura 21 -	Preparo do leito receptor com utilização de broca esférica diamantada.	76
Figura 22 -	Leito receptor após leve decorticação.	76
Figura 23 -	Enxerto ósseo posicionado após adaptação e fixação com parafuso de titânio no ângulo mandibular esquerdo.	76
Figura 24 -	Parafuso de titânio utilizado para fixação dos enxertos ósseos.	76
Figura 25 -	Medição da espessura do ângulo mandibular esquerdo após a fixação do enxerto ósseo autógeno de calota craniana.	77
Figura 26 -	Drogas utilizadas para sedação – Cloridrato de Cetamina e	77

Xilazina.

Figura 27 - Antibiótico administrado no pós-operatório dos animais – Pentabiótico.	77
Figura 28 - Analgésico administrado no pós-operatório dos animais – Dipirona sódica.	77
Figura 29 - Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor - Programa Imagelab 2000.	78
Figura 30 - Seleção de toda a interface entre o enxerto e o leito receptor, através da ferramenta “selecionar região”.	78
Figura 31 - Cálculo da região selecionada, através da ferramenta “cálculo de regiões”.	79
Figura 32 - Planilha evidenciando a soma total da área selecionada, através da ferramenta “planilha de cálculo”.	79
Figura 33 - Seleção e cálculo das regiões de neoformação óssea na interface entre o enxerto e o leito receptor.	80
Figura 34 - Planilha evidenciando a soma das áreas onde ocorreu neoformação óssea na interface entre o enxerto e o leito receptor.	80
Figura 35 - Planilha na qual os dados obtidos foram digitados (Excel).	81
Figura 36 - Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor - Programa Imagelab 2000.	82
Figura 37 - Seleção de toda a extensão do enxerto voltada para o leito receptor.	82
Figura 38 - Cálculo do perímetro de toda a extensão selecionada, através da ferramenta “planilha de cálculo”.	83
Figura 39 - Seleção da extensão linear apenas das trabéculas ósseas formadas do enxerto em direção ao leito receptor.	83
Figura 40 - Cálculo do perímetro apenas das trabéculas ósseas formadas do enxerto em direção ao leito receptor, através da ferramenta “planilha de cálculo”.	84
Figura 41 - Planilha na qual os dados obtidos foram digitados (Excel).	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Valores (mm) e desvio padrão da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, durante o período trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final).	61
Tabela 2 -	Valores (mm) e desvio padrão da variação da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, entre o momento trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final).	61
Tabela 3 -	Valores (%) e desvio padrão da área de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto	62
Tabela 4 -	Valores (%) e desvio padrão do perímetro de osso neoformado na interface entre o leito receptor e o enxerto.	62

Lista de Gráficos

- Gráfico 1 - Valores (mm) e desvio padrão da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, durante o período trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final), de acordo com os grupos e períodos. (a) Diferença entre espessura óssea inicial e final, no mesmo grupo e período, $p < 0,001$ e (b) $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®. 63
- Gráfico 2 - Valores (mm) e desvio padrão da variação da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, entre o momento trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final). (a) $p < 0,001$. (b) $p < 0,05$. (c) $p < 0,001$. (d) $p < 0,05$. (e) $p < 0,05$. (f) $p < 0,05$. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®. 64
- Gráfico 3 - Valores (%) e desvio padrão da área de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®. 65
- Gráfico 4 - Valores (%) e desvio padrão do perímetro de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t. (b) Diferença, dentro de um mesmo período de observação, entre os grupos assinalados, $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, 65

G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

- Gráfico 5 - Medianas da positividade para OC (%) e seu valor máximo e mínimo. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®. 66
- Gráfico 6 - Número de marcações positivas para TRAP e seu desvio padrão. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,001$ – ANOVA – teste t. (b) Diferença, dentro de um mesmo período de observação, entre os grupos assinalados, $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®. 66

Lista de Abreviaturas

HE	=	Hematoxilina e eosina
cm	=	Centímetro
mm	=	Milímetro
PPP	=	Plasma pobre em plaquetas
h	=	Hora
Kg	=	Quilograma
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
COBEA	=	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
RPM	=	Rotações por minuto
OC	=	Osteocalcina
TRAP	=	Fosfatase ácida tartarato-resistente

Sumário

1	Introdução	24
2	Proposição	28
3	Material e Método	30
4	Resultado	36
5	Discussão	43
6	Conclusão	48
	Referências	50
	Figuras	54
	Anexos	67
	ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	68
	ANEXO B – Normas da revista The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants	69
	ANEXO C – Ilustração da fase cirúrgica	74
	ANEXO D – Ilustração da análise histométrica (área)	78
	ANEXO E – Ilustração da análise histométrica (perímetro)	82
	ANEXO F – Instruções de uso – Solução de Euro Collins®	85

1 Introdução¹

Enxertos ósseos são cada vez mais utilizados em ortopedia, neurocirurgia, cirurgia plástica e cirurgia buco-maxilo-facial com o intuito de tratar as mais diversas alterações.^{1,2} Na região maxilofacial pode ser usado em defeitos ósseos ocasionados por trauma, remoção de cistos ou tumores, exodontias, alterações congênicas ou na correção de deformidades faciais.³⁻⁷

O enxerto ósseo autógeno é considerado o melhor e mais previsível tipo de enxerto, sendo definido como padrão ouro^{1,8} devido a sua excelente biocompatibilidade, ausência de resposta imunogênica, apresentar capacidade osteogênica, osteocondutora e osteoindutora e também pela presença de fatores de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas.^{1,2,9-15} No entanto, seu potencial osteogênico só será preservado se a vitalidade de suas células forem mantidas e se estiver adequadamente adaptado e fixado a um leito receptor previamente preparado.^{9,16,17} Albrektsson¹⁶ demonstrou, em tíbias de coelhos, que quanto menor o trauma cirúrgico maior a taxa de revascularização do enxerto ósseo, interferindo substancialmente na incorporação e remodelação óssea. Portanto, o enxerto ósseo autógeno deveria ser manipulado cuidadosamente durante a sua remoção, armazenamento trans-operatório e fixação, objetivando preservar as propriedades de reparação e posterior remodelação.^{7,9,13,15}

As áreas doadoras de enxertos ósseos autógenos utilizadas para reconstrução de defeitos alveolares visando a posterior instalação de implantes osseointegráveis podem ser tanto intra como extra-orais,^{2,3,6,8,10} a escolha dependerá da quantidade óssea necessária para a reconstrução e da estrutura óssea desejada (cortical e/ou medular).

Desde o procedimento de obtenção do enxerto até a sua instalação no leito receptor podem decorrer alguns minutos ou algumas horas,^{5,9,18,19} principalmente nos casos em que se optar pela remoção de osso da calota craniana, na qual se torna

¹Normalização segundo a Revista The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants (Anexo B).

muito difícil trabalhar ao mesmo tempo na região doadora e receptora maxilofacial.¹⁹ Este período extracorpóreo do enxerto, bem como a forma de armazenamento pode afetar a vitalidade de células como osteócitos e osteoblastos, prejudicando a incorporação e remodelação do enxerto.^{5,7,9,11,13,18,20}

Diversas substâncias têm sido estudadas como meio de armazenamento temporário de enxertos ósseos, como: a solução fisiológica,^{5,13,15,18,19,21,22} água destilada,⁵ solução de Ringer Lactato,⁵ meio de cultura,^{5,15} antibióticos,⁹ solução glicosada,¹⁵ solução de Euro Collins[®],^{18,22} plasma pobre em plaquetas (PPP),¹⁹ e outras.¹⁸

De acordo com Piermattei e Flo,²³ o enxerto obtido de osso medular deve ser instalado o mais rápido possível. Contudo, quando for necessário armazená-lo até o momento da sua colocação no leito receptor, este deveria ser mantido envolto em compressa umedecida com sangue ou coberto com gaze umedecida em solução fisiológica ou solução de Ringer.

O meio de armazenamento temporário deve proporcionar uma redução da condição isquêmica dos enxertos ósseos, enquanto o leito receptor está sendo acessado e preparado.¹⁹ Moura et al.²¹ descreveram que a quantidade de osteócitos normais diminuiu, praticamente a metade, em 30 minutos de armazenamento em solução fisiológica. Dechichi et al.¹⁹ constataram que o PPP se mostrou superior como meio de armazenamento, em relação à preservação dos osteócitos, do que a solução fisiológica.

Laursen et al.¹³ avaliaram o metabolismo dos osteoblastos *in vitro* e constataram uma maior proliferação desta célula quando cultivados imediatamente após a sua remoção do que em relação ao grupo armazenado em solução salina por 2h e em comparação ao armazenado em meio seco, pelo mesmo período. Os autores não observaram diferença entre os três grupos, quando analisados a atividade basal da fosfatase alcalina e a síntese de pró colágeno tipo I.

Recentemente, Maus et al.¹⁵ realizaram cultura de osteoblastos através de osso medular retirado durante artroplastias de quadril e armazenados por um período de 2 e 4 horas em meio seco, em uma compressa umedecida com solução fisiológica, em solução fisiológica, em solução de glicose a 5% e em meio de cultura. A microscopia de fluorescência mostrou vitalidade celular em todos os grupos analisados. Quando

observados o metabolismo e a contagem celular, o meio seco demonstrou os piores resultados nos dois períodos. Concluíram que o meio seco deveria ser evitado e que quando o tempo de armazenamento for exceder 2 horas, o mesmo deve ser armazenado em compressa umedecida em solução fisiológica ou imerso em solução fisiológica.

A solução de Euro Collins[®] é utilizada como meio de perfusão e estocagem de órgãos durante transplantes e foi avaliada, juntamente com outras soluções, por McNulty,¹⁸ o qual verificou que quando o enxerto ósseo medular de coelhos é armazenado nesta solução, por um período de 3 horas, sob condições de baixa temperatura (2°C), a viabilidade celular alcançou os maiores índices em relação as demais soluções testadas, atingindo valores em torno de 70%.

Tanaka²² avaliou a viabilidade celular de enxertos ósseos removidos de calota craniana de ratos e armazenados em meio seco, solução fisiológica e Euro Collins[®], por períodos de 6, 12, 24 e 30 horas. Constatou, através de análise imunoistoquímica, que a expressão das proteínas testadas foi mantida em até 30 horas no grupo armazenado em solução de Euro Collins[®].

Os trabalhos que avaliam os meios de armazenamento temporário de enxertos ósseos são escassos na literatura, e avaliam, na sua maioria, o comportamento *in vitro* do metabolismo e da vitalidade celular. No entanto, pesquisas evidenciando *in vivo* a influência destes métodos de armazenamento no processo de incorporação e remodelação óssea tornam-se necessárias para a melhor compreensão da biologia dos enxertos ósseos autógenos.

2 Proposição

O objetivo deste trabalho foi avaliar, comparativamente, a influência de três meios de armazenamento no processo de reparo ósseo de enxertos ósseos autógenos retirados de calota craniana e fixados em mandíbula de coelhos, através de análise macroscópica, histomorfométrica e imunoistoquímica.

3 Material e Método

Foram utilizados 40 coelhos, machos brancos (Nova Zelândia), variação *albinus*, com idade de aproximadamente 5 meses e peso corporal de 3 a 4 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho, Primor) e água a vontade, em condições climatizadas e água canalizada, no biotério do Campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP. O estudo seguiu os princípios éticos para a experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da mesma Faculdade, sob o protocolo número 2007-004005 (Anexo A).

Cirurgia experimental (Anexo C)

Os animais foram mantidos em jejum, pesados e sedados, via intramuscular, pela combinação de 50 mg/kg de Cetamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/Kg de cloridrato de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil).

Foi realizada a tricotomia da região fronto-parietal (área doadora) e da região submandibular bilateralmente (leito receptor), logo em seguida a anti-sepsia e anestesia local com cloridrato de mepivacaína a 3% com adrenalina 1:100.000 (0,3 ml/kg, Mepivacaína – DFL, Brasil). No grupo em que o enxerto foi utilizado imediatamente após a sua retirada, acessou-se cirurgicamente a região submandibular e posteriormente a região parietal, através de incisão e divulsão por planos, nos demais grupos estudados o processo ocorreu de forma inversa, devido à necessidade do enxerto permanecer armazenado por um período de duas horas.

Após exposição da calota craniana e com o auxílio de um motor elétrico com velocidade de 2.000 RPM (SIN BLM 600 PLUS, São Paulo, Brasil), um contra-ângulo redutor de 16:1 (Kavo, Santa Catarina, Brasil) e uma broca trefina de 10 mm de diâmetro externo e 9 mm de diâmetro interno (Prudent, São Paulo, Brasil), realizou-se a retirada de dois blocos ósseos da calota craniana (figura 1A), obtidos sobre irrigação constante com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Equiplex, Goiânia, Brasil),

que foram acondicionados em uma cuba metálica estéril contendo um meio de armazenamento específico de acordo com os grupos estudados, todos sob temperatura ambiente da sala cirúrgica (figura 1B).

Todos os enxertos foram instalados em leitos devidamente preparados, por meio de uma leve decorticação (figura 1C), usando broca esférica diamantada número 6, e fixados de forma aposicional com parafusos de titânio medindo 1,4 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento (SIN, São Paulo, Brasil) (figura 1D), também sob irrigação constante com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Equiplax, Goiânia, Brasil).

Os 40 animais passaram pelo mesmo procedimento de forma igualitária, sendo que em 20 animais testou-se o enxerto imediato (lado esquerdo) e armazenado em meio seco (lado direito); nos outros 20 animais avaliou-se a manutenção do enxerto ósseo em solução fisiológica estéril (lado esquerdo) (Equiplax, Goiânia, Brasil) e Euro Collins® (lado direito) (Fresenius Kabi, São Paulo, Brasil), sendo, portanto, divididos em quatro grupos:

Grupo 1 (enxerto imediato) – no qual o enxerto retirado da calota craniana foi fixado no ângulo mandibular esquerdo imediatamente após a sua remoção.

Grupo 2 (armazenado em meio seco) – no qual o enxerto retirado da calota craniana foi fixado no ângulo mandibular direito após duas horas da sua remoção, sendo este mantido em recipiente estéril vazio, durante este período.

Grupo 3 (armazenado em solução fisiológica) – no qual o enxerto retirado da calota craniana foi fixado no ângulo mandibular esquerdo após duas horas da sua remoção, sendo este mantido imerso, em recipiente estéril, durante este período em solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

Grupo 4 (armazenado em solução de Euro Collins®) – no qual o enxerto retirado da calota craniana foi fixado no ângulo mandibular direito após duas horas da sua remoção, sendo este mantido imerso, em recipiente estéril, durante este período em solução de Euro Collins®.

Todos os tecidos foram suturados por planos, empregando-se pontos interrompidos invertidos com fio absorvível (Vycril 4-0, Ethicon, Johnson Prod., São Paulo, Brasil), nos tecido internos e pontos interrompidos simples com fio não

absorvível monofilamentar (Nylon 5-0, Ethicon, Johnson Prod., São Paulo, Brasil), na pele.

No pós-operatório os animais receberam cobertura antibiótica e analgésica por meio de administração intramuscular de Pentabiótico (0,1 ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica (1 mg/Kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses. A eutanásia dos animais foi realizada nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatório, com dez animais em cada período, sendo cinco referente aos grupos 1 e 2 e os outros cinco animais aos grupos 3 e 4.

Análise Macroscópica da Espessura

Com o objetivo de padronizar as medições foi confeccionado um guia cirúrgico metálico, com diâmetro igual ao da trefina utilizada (9 mm), no qual foi realizado um perfuração central correspondente ao tamanho da cabeça do parafuso de fixação do enxerto e uma outra perfuração 1,5 mm distante daquela, a qual serviu como ponto de medição. Para evitar erro de posicionamento no momento das medições, foi realizada uma marcação vertical e outra horizontal, as quais deveriam coincidir com o padrão cruciforme da cabeça do parafuso (figura 2A e 2B).

Com o auxílio de um espécimetro (Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Brasil), foram obtidas medidas da espessura do ângulo com o enxerto fixado ao leito receptor, em cada grupo, tanto no trans operatório como após a eutanásia em 7, 15, 30 e 60 dias. Os valores encontrados foram anotados e tabulados em planilhas no programa Excel e enviadas para análise estatística.

Processamento laboratorial

As mandíbulas foram dissecadas, osteotomizadas de forma a incluir todo o enxerto nas peças, e encaminhadas ao laboratório para fixação, descalcificação, remoção do parafuso, inclusão em parafina e obtenção dos cortes seriados de 5µm de espessura, dispondo o enxerto no seu sentido longitudinal, em relação ao parafuso, de forma a observar o enxerto e seu leito receptor.

Foi feita a coloração pela hematoxilina e eosina para avaliação histológica qualitativa e quantitativa, através de microscopia óptica.

Análise histométrica

A análise histométrica abrangeu os períodos de 7 e 15 dias, com o objetivo de analisar a quantidade (área) de trabéculas ósseas neoformadas na interface enxerto/leito receptor e também com a finalidade de estabelecer a extensão linear (perímetro) de formação de trabéculas ósseas do enxerto em direção ao leito receptor. Uma lâmina, contendo três cortes localizados próximo ao parafuso de fixação, de cada lado enxertado foi analisada, totalizando 40 lâminas e 120 cortes.

Para a realização das mensurações, foi utilizado um microscópio com objetiva de aumento (1,6X) Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação de imagem (AxioCam, MRc5, Color Vídeo Câmera, Alemanha) e as imagens capturadas através do programa AxioVision (versão 4.5 de 12/2005). A seguir as imagens foram levadas ao programa Imagelab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá), no qual foram realizadas as quantificações, em porcentagem, das áreas e do perímetro de neoformação óssea na interface do leito receptor com o enxerto. Os valores de porcentagem da área selecionada foram obtidos e apresentados em forma de planilha no programa Excel para posterior análise estatística (Anexo D e E).

Análise imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foram usados como anticorpos primários a osteocalcina - OC (OC, Goat (cabra) anti-oc – Santa Cruz Biotechnology®, USA) e a fosfatase ácida tartarato-resistente - TRAP (TRAP, Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology®, USA). O método de detecção foi pela imunoperoxidase utilizando como anticorpo secundário o biotinilado anti-cabras (goat) produzido em burro (donkey anti-goat – Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA). O sinal da reação foi ampliado com o sistema Streptavidina-Biotina (Kit DAKO, DAKO Co, USA) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB, DAKO Co, USA) como cromógeno.

Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), preservando-se as demais etapas do processamento imunoistoquímico, para avaliar a especificidade e efetividade das reações. O controle positivo foi analisado a partir das imunomarcações em tecidos localizados fora da área a ser avaliada.

Para a realização das mensurações, foi utilizado o mesmo sistema de captura de imagens utilizado na histometria, porém com uma objetiva de aumento de 16 vezes. Foi analisado o padrão de expressão de cada proteína para cada grupo no período de 15 e 30 dias, buscando envolver três campos selecionados do enxerto ósseo de cada animal, um campo central próximo ao parafuso de fixação e um de cada lado do enxerto.

A expressão da proteína osteocalcina foi verificada através de uma análise que considerou os seguintes escores: marcações negativas (-), pouco positivas (+), positivas (++) , super positivas (+++) e hiper positivas (++++) das células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de 0%, 20 % (10 a 30%), 60 % (50 a 70%) e 90% (80 a 100%), conforme metodologia proposta por Queiroz et al.²⁴, seguindo-se os escores acima mencionados.

Para a análise da expressão da enzima TRAP, procedeu-se a contagem do número das marcações na extensão dos campos três campos já determinados do enxerto ósseo, para todos os grupos. Toda a análise foi realizada pelo mesmo avaliador, sendo que este desconhecia o grupo que estava sendo avaliado.

Análise Estatística

Os resultados obtidos pela análise macroscópica, histométrica e imunoistoquímica tiveram sua normalidade testada e comprovada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Assim, os dados foram tratados por diversos testes, de acordo com a especificidade de cada amostra. O programa utilizado para realização dos testes estatísticos foi o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA).

4 Resultado

Análise histológica descritiva

Os resultados obtidos serão descritos em função dos períodos pós-operatórios e das ocorrências verificadas nos quatro grupos experimentais.

07 DIAS

Grupo 1 (enxerto imediato): o enxerto encontra-se posicionado sobre o leito receptor, e na interface nota-se uma faixa de tecido conjuntivo composto por fibroblastos ao lado de linfócitos e macrófagos. Observa-se ainda, um tecido osteóide com numerosos osteoblastos em suas bordas (figura 3A).

Grupo 2 (armazenado em meio seco): o tecido ósseo enxertado permanece em contato com o leito receptor. No espaço entre o enxerto e o osso pré-existente, permanecem extensas áreas de tecido conjuntivo bem vascularizado com presença de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. No enxerto não se observa osteócitos normais ou alterados, apenas a presença de lacunas vazias, caracterizando um osso sem vitalidade (figura 3B).

Grupo 3 (armazenado em solução fisiológica): na interface entre o enxerto e o leito receptor visualiza-se trabéculas de osso neoformado rodeada por osteoblastos em meio a um tecido conjuntivo rico em fibroblastos. Na cortical do enxerto voltada para o leito receptor nota-se presença de osteócitos normais e alterados (figura 3C).

Grupo 4 (armazenado em solução de Euro Collins®): a região entre o enxerto e tecido ósseo pré-existente apresenta um tecido conjuntivo rico em fibroblastos e alguns macrófagos. Ainda é possível observar um início de formação de trabéculas ósseas através da deposição de alguns osteoblastos. O enxerto evidencia osteócitos normais e alterados em toda a extensão da sua cortical (figura 3D).

15 DIAS

Grupo 1 (enxerto imediato): pode-se observar uma maior quantidade de osso e trabéculas ósseas formadas na interface entre o enxerto e o leito receptor, porém em

algumas áreas nota-se a presença de um tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Nota-se ainda a presença de canais de nutrição no enxerto (figura 4A).

Grupo 2 (armazenado em meio seco): no espaço entre o enxerto e o osso pré-existente é possível visualizar osso neoformado aderido ao enxerto e delgadas trabéculas ósseas distribuídas em grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Ainda persiste grande quantidade de lacunas vazias na cortical do enxerto com escassas áreas de revascularização (figura 4B).

Grupo 3 (armazenado em solução fisiológica): a interface entre o enxerto e o leito receptor evidencia delgadas trabéculas ósseas em meio a um tecido conjuntivo composto por fibroblastos, linfócitos e alguns macrófagos. No enxerto nota-se a presença de canais de nutrição e osteócitos normais e alterados (figura 4C).

Grupo 4 (armazenado em solução de Euro Collins[®]): no enxerto se observa a presença de áreas de revascularização, bem como osteócitos normais e alterados. A região entre o enxerto e o leito receptor apresenta em algumas áreas de deposição óssea com a formação de finas trabéculas ósseas em meio a um tecido conjuntivo (figura 4D).

30 DIAS

Grupo 1 (enxerto imediato): neste período, percebe-se a remodelação do enxerto ósseo, com sinais evidentes de maior incorporação junto ao leito receptor, em relação ao período anterior. Observam-se diversas regiões com intensa vascularização e atividade osteogênica junto ao enxerto ósseo, assim como trabéculas ósseas mais desenvolvidas (figura 5A).

Grupo 2 (armazenado em meio seco): a interface entre o enxerto e o leito receptor se mostra com grandes áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, no entanto em outras regiões e espécimes nota-se uma incorporação do enxerto ao leito receptor. No enxerto ainda são visíveis grandes áreas de lacunas vazias, com poucos osteócitos normais (figura 5B).

Grupo 3 (armazenado em solução fisiológica): em todos os espécimes observa-se uma incorporação do enxerto ao leito receptor, com presença de intensa vascularização e trabéculas ósseas bem desenvolvidas. Notam-se grandes quantidades de osteócitos normais e alguns alterados (figura 5C).

Grupo 4 (armazenado em solução de Euro Collins®): assim como no grupo anterior, é possível evidenciar um incorporação do enxerto ao leito receptor com extensas áreas de vascularização e trabéculas ósseas espessas, no entanto em um espécime observa-se ainda áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (figura 5D).

60 DIAS

Grupo 1 (enxerto imediato): o tecido ósseo enxertado, em todos os espécimes, encontra-se incorporado ao tecido ósseo do leito receptor. O tecido ósseo neoformado e vascularizado se apresenta uniformemente ocupando toda a extensão do enxerto (figura 6A).

Grupo 2 (armazenado em meio seco): neste grupo o enxerto se apresenta incorporado ao leito receptor na maioria das regiões, contudo existem algumas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Nota-se a presença irregular de vascularização do enxerto e lacunas vazias (figura 6B).

Grupo 3 (armazenado em solução fisiológica): o enxerto se mostra incorporado ao tecido ósseo pré-existente, porém com poucas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. A vascularização se mostra de forma regular tanto no tecido ósseo neoformado como no enxerto, assim como osteócitos normais (figura 6C).

Grupo 4 (armazenado em solução de Euro Collins®): em todos os espécimes observa-se que o enxerto está incorporado ao osso do leito receptor também com escassas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação ósseas. Nota-se grande quantidade de vascularização uniformemente distribuída (figura 6D).

Análise macroscópica da espessura do enxerto e ângulo mandibular

Valores brutos, inicial e final

Os dados foram agrupados de maneira a permitir a comparação, dentro de um mesmo grupo e período, das diferenças entre o valor inicial (trans-operatório) e final (pós-eutanásia), e foram avaliados pela análise de variância – ANOVA, teste t, com significância de $p \leq 0,05$. A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas na Tabela 1 e no Gráfico 1.

Nesse caso foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para o Grupo 1, no período de 15 dias ($p=0,0004$) e de 60 dias ($p=0,0379$), e para o Grupo 4, apenas no período de 60 dias ($p=0,0006$). Interessante ressaltar o fato de que no período de 15 dias essa diferença foi para positivo, enquanto que no período de 60 dias, a diferença foi negativa, em ambos os grupos.

Diferenças entre os valores iniciais e finais

Os dados foram agrupados de maneira a permitir a comparação, dentro de um mesmo período, das diferenças entre os grupos, e, dentro de um mesmo grupo, das diferenças entre os períodos. Os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn, permitindo assim localizar as diferenças entre os grupos de forma precisa, excluindo-se a possibilidade de igualdade ou de diferença ao acaso. A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas na Tabela 2 e no Gráfico 2.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes levando-se em conta cada período e os diferentes grupos nele estudados, ou seja, dentro de um mesmo período, todos os grupos se comportaram de maneira estatisticamente igual. Porém, quando foram feitas comparações, para um mesmo grupo, em cada um dos quatro diferentes períodos de observação, pode-se observar no Grupo 1 diferença significativa entre o período de 15 e 60 dias ($p<0,001$), e no Grupo 2, entre os períodos de 7 e 60 dias ($p<0,05$) e entre os períodos de 15 e 60 dias ($p<0,001$). No Grupo 3 foi observada diferença ($p<0,05$) entre os períodos de 15 e 60 dias e, finalmente, no grupo 4, foi observada diferença significativa entre os períodos de 7 e 60 dias ($p<0,05$) e 15 e 60 dias ($p<0,05$).

Análise histométrica

Os dados foram agrupados de maneira a permitir a comparação, dentro de um mesmo grupo, das diferenças entre o valor obtido nos diferentes períodos de observação, sendo avaliados pela análise de variância – ANOVA, teste t, com significância de $p \leq 0,05$. Já para se avaliar em um mesmo período de observação os

diferentes grupos, foi utilizada a análise de variância – ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Área de neoformação óssea

A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas na Tabela 3 e no Gráfico 3.

Todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) da área de neoformação óssea, quando feita comparação entre o período de observação de 7 e de 15 dias, embora nenhum grupo tenha se mostrado estatisticamente superior ou inferior quando comparado aos outros, dentro de um mesmo período de observação.

Perímetro de neoformação óssea

A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas na Tabela 4 e no Gráfico 4.

Todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) do perímetro de neoformação óssea, quando feita comparação entre o período de observação de 7 e de 15 dias. Avaliando-se as diferenças entre os diferentes grupos dentro de um mesmo período de observação, tem-se que para o período de observação de 15 dias, o grupo G1 mostrou-se estatisticamente superior em relação ao grupo G4 ($p = 0,0227$).

Análise Imunoistoquímica

Osteocalcina

Os dados foram agrupados de maneira a permitir a comparação, dentro de um mesmo grupo, das diferenças entre o valor obtido nos diferentes períodos de observação, sendo avaliados pelo teste de Mann-Whitney com significância de $p \leq 0,05$. Para se avaliar em um mesmo período de observação os diferentes grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas no Gráfico 5. Nesse caso, devido à distribuição por escores, os dados estão apresentados na forma de medianas, e os valores máximo e mínimo de cada grupo.

Em todos os grupos, nos períodos de 15 e 30 dias, foram observadas regiões marcadas positivamente para OC (figura 07), apesar de nenhum grupo apresentar diferença estatística significativa quando comparados os dois períodos de observação, embora tenha ficado nítida a tendência ao aumento na expressão da atividade de deposição mineral no período mais longo. Mesmo que nenhum grupo tenha se mostrado estatisticamente superior ou inferior quando comparado aos outros, dentro de um mesmo período de observação, pose-se notar uma maior expressão do grupo G1.

Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

Os dados foram agrupados de maneira a permitir a comparação, dentro de um mesmo grupo, das diferenças entre o valor obtido nos diferentes períodos de observação, sendo avaliados pela análise de variância – ANOVA, teste t, com significância de $p \leq 0,05$. Para se avaliar em um mesmo período de observação os diferentes grupos, foi utilizada a análise de variância – ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. A distribuição dos dados, bem como as diferenças estatísticas deles inferida, estão demonstradas no Gráfico 6.

Apenas o grupo G3 não apresentou diferença estatisticamente significativa na marcação TRAP, quando feita comparação entre o período de observação de 15 e de 30 dias, sendo que para o grupo G1 esse diferença foi confirmada com valor de $p=0,0004$ e para os grupos G2 e G4 o valor de p foi de 0,019 e 0,049, respectivamente. Tanto aos 15 quanto aos 30 dias, foi observado maior atividade de reabsorção para o grupo G1 em relação aos demais grupos, mesmo que nenhum grupo tenha se mostrado estatisticamente superior ou inferior quando comparado aos outros, dentro de um mesmo período de observação (figura 08).

5 *Discussão*

A utilização da calota craniana como área doadora, nos mais diversos tipos de reconstruções faciais, tem se tornado cada vez mais comum.^{3,4,6,19} Esta região doadora tem se mostrado superior ao enxerto de crista ilíaca em virtude da ausência de cicatriz visível, do menor tempo de hospitalização, de causar menos dor pós-operatória e por apresentar uma menor morbidade.^{3,4} Além disso, o enxerto de calvária apresenta a mesma origem embrionária da região maxilofacial (intramembranosa) e também uma arquitetura com predominância de osso cortical, sendo este último o principal responsável pela manutenção ou sobrevivência do tecido ósseo enxertado.^{6,25} Por estes motivos, foi optado, nesta pesquisa, pela escolha da calota craniana como região doadora.

De acordo com alguns autores, o ideal seria que o enxerto ósseo autógeno, retirado de qualquer área doadora, fosse imediatamente colocado no leito receptor.^{9,13,15,18,21,23} Contudo, nas extensas reconstruções maxilofaciais, sejam voltadas ou não para a posterior instalação de implantes osseointegráveis, torna-se muito difícil fazer a remoção do enxerto concomitantemente ao acesso e preparo do leito receptor, portanto, fica claro que este enxerto ósseo deverá ser armazenado de alguma forma, por certo período de tempo, que poderia variar de minutos a horas.^{5,9,18,19}

Pouco se conhece sobre a influência do tipo de armazenamento temporário do enxerto ósseo autógeno no processo de incorporação e remodelação óssea. Alguns pesquisadores têm sugerido que a viabilidade dos osteócitos^{19,21,22,26} e osteoblastos^{13,15,22,26} diminui com o passar do tempo, fato este que pode ser minimizado quando este tecido é mantido em um adequado meio de armazenamento.^{5,9,13,15,18,19,21,22,26}

Com o intuito de simular o que ocorre durante a maioria dos procedimentos que utilizam enxertos ósseos autógenos, foi utilizada, neste estudo, a temperatura ambiente da sala cirúrgica para armazenar todos os enxertos removidos da calota craniana. Sugere-se que a temperatura do meio de armazenamento poderia exercer influência sobre a viabilidade das células.¹³ Contudo, Gray e Elves²⁷ não observaram diferenças

na viabilidade celular após armazenar enxertos ósseos por 4 horas sob a temperatura de 4, 25 ou 37 °C. Tanaka²² também não verificou diferenças quando analisou a expressão de proteínas no enxerto ósseo armazenado em meio seco a temperatura ambiente e resfriado a 3 °C. Já McNulty¹⁸ observou uma maior quantidade de células viáveis dos enxertos ósseos quando armazenados em soluções resfriadas a 2 °C.

Quando avaliado a espessura do ângulo mandibular com o enxerto fixado, nos mais diversos períodos e grupos, foi constatado que o comportamento do enxerto no decorrer dos períodos não demonstrou variação significativa, apesar do enxerto mantido em meio seco apresentar um maior índice de reabsorção no período de 60 dias. Este fato pode ser explicado pela condição isquêmica que as células do enxerto foram submetidas, retardando consideravelmente a taxa de revascularização e alterando a remodelação de todo o enxerto ósseo.^{7,16}

A análise histométrica da área e extensão linear de neoformação óssea entre o enxerto e o leito receptor só pôde ser realizada nos períodos iniciais de 7 e 15 dias, em virtude de que no período de 30 e 60 dias ser impossível delimitar a interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor, principalmente no grupo do enxerto imediato.

Neste trabalho não foi observado nenhuma alteração significativa na formação de trabéculas ósseas na interface do enxerto e leito receptor em relação aos grupos nos mesmos períodos de 7 e 15 dias, apesar de numericamente o enxerto imediato e o armazenado em soro fisiológico apresentarem os melhores resultados de neoformação óssea em relação ao enxerto mantido em meio seco. Este tipo de comportamento foi constatado por diversos estudos *in vitro* que evidenciaram uma maior viabilidade e metabolismo celular nos grupos de enxerto imediato em relação aos mais variados tipos de armazenamento.^{13,18,19,21,22}

Apesar da similaridade dos resultados quantitativos, no que se refere à interface entre o enxerto e o leito receptor para todos os grupos, as diferenças do ponto de vista reparacional foram bastante significativas quando considerado a análise de todo o enxerto e interface.

O enxerto imediato, o armazenado em solução fisiológica e em solução de Euro Collins[®] apresentaram consideráveis quantidades de vasos sanguíneos neoformados adentrando na superfície inferior do fragmento em meio a canais de nutrição e início de

atividade osteogênica, observados nos períodos iniciais de avaliação, estes fatos condizem com achados literários que mencionam que os canais vasculares pré-existent são penetrados por vasos sanguíneos e células reabsortivas, o que permite a revascularização do tecido e posterior substituição óssea.^{25,28,29} Entretanto, no grupo em que o enxerto foi armazenado em meio seco, a revascularização foi menos expressiva, confirmando as afirmações de Albrektsson¹⁶ que o trauma cirúrgico promove um reparo deficiente e lento, já na fase inicial de revascularização, e tende a persistir por tempos tardios.

Segundo Mayer⁶, Albrektsson,^{28,29} e Gordh e Alberius³⁰ a formação óssea é conduzida por células sobreviventes do enxerto e pela habilidade da matriz óssea em induzir diferenciação de células osteoprogenitoras na área receptora. Outros autores acrescentam ainda que a ausência de osteócitos no enxerto possivelmente não interfere com a capacidade osteocondutora do enxerto, mas compromete a osteoindução e aumenta o índice de reabsorção do enxerto.^{7,31,32} Partindo desta premissa, muitos trabalhos têm avaliado a viabilidade dos enxertos ósseos, armazenados das mais diversas formas, através da morfologia e da quantidade de osteócitos presentes no enxerto.^{19,21,22,26} Neste trabalho apesar de não ter sido realizada a contagem de osteócitos, pode-se observar a perda de vitalidade óssea em todos os grupos, demonstrada pelas lacunas vazias dos osteócitos. Esta alteração foi mais evidente no grupo em que o enxerto ósseo foi armazenado em meio seco, até mesmo no período mais tardio de 60 dias.

A marcação de proteínas observadas durante a análise imunoistoquímica fornece importantes informações a respeito do comportamento celular, de acordo com a expressão de cada proteína envolvida no metabolismo ósseo durante o processo de reparo.^{7,22,25}

Apesar de não ter sido comprovado diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, quando observados no mesmo período, houve uma maior imunomarcagem para TRAP e OC verificada no grupo do enxerto realizado imediatamente após a sua remoção, fato este que confirma uma dinâmica mais acentuada do processo de reparo neste grupo, uma vez que caracteriza a maior

presença de reabsorção e deposição mineral através da expressão celular, respectivamente.

Não se procedeu à análise imunoistoquímica no período de 60 dias, em virtude da dificuldade encontrada de delimitar a exata região do enxerto, principalmente no caso do enxerto imediato, que se apresentava em fase avançada de remodelação.

Apesar da solução de Euro Collins[®] ser utilizada como meio de estocagem hipotérmica de órgãos, antes do transplante, e mantê-los viáveis por longos períodos e ainda manter a viabilidade das células do enxerto ósseo autógeno em índices de 72,6%¹⁸ por até 30h,²² neste trabalho apresentou comportamento, frente ao processo de reparo ósseo, muito semelhante a solução fisiológica em todos os períodos analisados. Este fato poderia ser explicado pelo pouco tempo de armazenamento temporário utilizado, uma vez que a solução fisiológica mantém taxas de viabilidade celular muito próxima a solução de Euro Collins[®] em curto período de tempo.¹⁸

Assim, os resultados obtidos neste trabalho experimental reafirmam a maioria das pesquisas com relação à inferioridade do processo de reparo do enxerto autógeno armazenado em meio seco, quando em comparação com o enxerto autógeno realizado imediatamente após a sua remoção e até mesmo aqueles armazenados em solução fisiológica e de Euro Collins[®].^{5,9,13,15,18,19,21,22}

6 Conclusão

Com base nos resultados observados a partir das condições metodológicas experimentais deste trabalho, torna-se possível concluir que:

- A solução fisiológica e de Euro Collins[®] utilizadas como meio de armazenamento temporário por 2 horas, demonstraram influenciar de forma semelhante na biocompatibilidade do enxerto ósseo autógeno, apresentando uma dinâmica no processo de reparo muito próxima a do enxerto realizado de forma imediata.

- O grupo do enxerto ósseo armazenado em meio seco mostrou deficiência no processo de remodelação, apesar de estar incorporado.

Referências¹

1. Kay JF. Tissue-engineered bone products. In: Lanza R, Langer R, Vacanti, J. Principles of tissue engineering. San Diego: Academic Press, 2007:1225-1236.
2. Konttinen YT, Waris E, Xu JW et al. Bone grafting. Current Orthopaedics 1998;12:209-215.
3. Jackson IT, Helden G, Marx R. Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1986;44:949-955.
4. Jackson IT, Adham M, Bite U, Marx R. Update on cranial bone grafts in craniofacial surgery. Ann Plast Surg 1987;18:37-40.
5. Steiner M, Ramp W. Short-term storage of freshly harvested bone. J Oral Maxillofac Surg 1988;46:868-871.
6. Mayer MH. Clinical perspectives on bone grafting – Avoiding the complications of developmental malformations. Clin Plast Surg 1994;21:365-376.
7. Zerbo IR, Lange GL, Joldersma M, Bronckers ALJJ, Burger EH. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. Clin Oral Impl Res 2003;14:759-766.
8. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Phil Trans R Soc Lond A 2004;362:2821-2850.
9. Gray JC, Elves MW. Osteogenesis in bone grafts after short-term storage and topical antibiotic treatment. J Bone Joint Surg 1981;63:441-445.
10. Garg AK. Grafting materials in repair and restoration. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering – Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence, 1999:17-53.

¹Normalização segundo a Revista The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants (Anexo B).

11. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:543-551.
12. Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. *J Orthop Res* 2002;20:772-778.
13. Laursen M, Christensen FB, Bunker C, Lind M. Optimal handling of fresh cancellous bone graft – Different preoperative storing techniques evaluated by in vitro osteoblast-like cell metabolism. *Acta Orthop Scand* 2003;74:490-496.
14. Khan NS, Cammisa Jr. FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:77-86.
15. Maus U, Andereya S, Gravius S et al. How to store autologous bone graft perioperatively: an in vitro study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128:1007-1011.
16. Albrektsson T. The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma – A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1980;62:403-410.
17. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone grafts substitutes. *Clin Orthop* 1999;15:71-86.
18. McNulty JF. Effect of various short-term storage methods on viability of cancellous bone fragments. *Am J Vet Res* 1999;60:63-67.
19. Dechichi P, Moura CCG, Santana SI, Zaneta-Barbosa D. Histomorphometric analysis of rabbit calvarial bone: storage in saline solution versus storage in platelet-poor plasma. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:905-910.
20. Berggren A, Weiland AJ, Dorfman H. The effect of prolonged ischemia time on osteocyte and osteoblast survival in composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg* 1982;69:290-298.
21. Moura CCG, Dechichi P. Análise histomorfométrica de tecido ósseo mantido em solução fisiológica. *Cienc Odontol Bras* 2005;8:23-27.

22. TANAKA, F. Y. Estudo da viabilidade celular comparando os meios de conservação para enxerto ósseo de calota craniana. Análise microscópica e imunoistoquímica em ratos. 2005. 87f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2005.
23. Piermattei DL, Flo GL. Bone grafting. In: Piermattei DL, Flo GL. Small animal orthopedics and fracture repair. Philadelphia: Saunders, 1997:147-153.
24. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margomar R, Pereira-Filho VA, Garcia-Junior IR. Evaluate of imediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: imunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. J Oral Maxilofac Surg. 2008;66:1233-1240.
25. Chen NT, Golwacki J, Bucky LP, Hong HZ, Kim WK, Yaremchuk MJ. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. Plast Reconstr Surg 1994;93:714-724.
26. Berggren A, Weiland AJ, Ostrup LT, Dorfman H. The effects of storage media and perfusion on osteoblast and osteocyte survival in free composite bone grafts. J Microsurgery. 1981;2:273-82.
27. Gary JC, Elves MW. Donor cell's contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. Clin Orthop. 1982;87:261-71.
28. Albrektsson, T. In vivo studies of bone grafts. Acta Orthop Scand. 1980;51:9-17
29. Albrektsson T. Repair of bone grafts – A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. Scand J Plast Reconstr Surg 1980;14:1-12.
30. Gordh M, Alberius P. Some basic factors essential to autogeneic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. Scand J Plast Reconstr Hand Surg 1999;33:129-146.
31. Kamijou T, Nakajima T, Ozawa H. Effects of osteocytes on osteoinduction in the autogenous rib graft in the rat mandible. Bone. 1994;15:629-637.

32. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;7:1095-1101.

Figuras

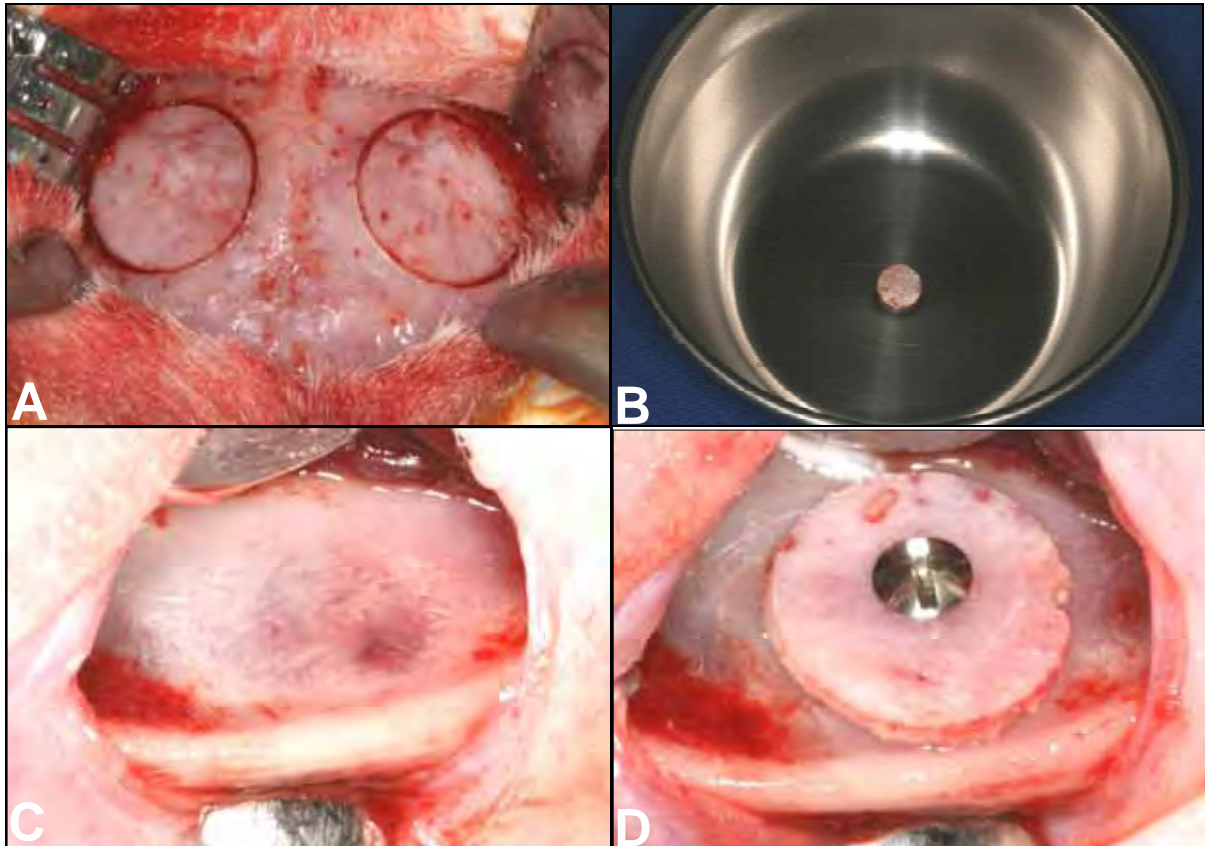


Figura 01

- A. Remoção dos enxertos ósseos autógenos da calota craniana com trefina;
- B. Enxerto ósseo autógeno armazenado em cuba metálica estéril;
- C. Preparo do leito receptor com uma leve decorticação;
- D. Fixação do enxerto ósseo autógeno no ângulo mandibular esquerdo com parafuso de titânio.

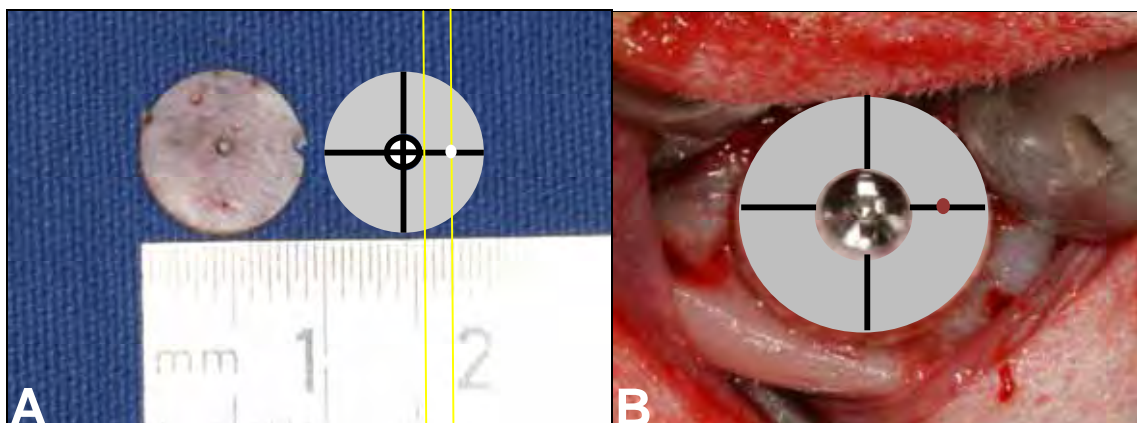


Figura 02

- A. Esquema comparativo do enxerto e guia cirúrgico evidenciando o local de medição;
- B. Guia cirúrgico posicionado sobre o enxerto ósseo já fixado, notar posicionamento das marcações e relação ao formato cruciforme da cabeça do parafuso de fixação.

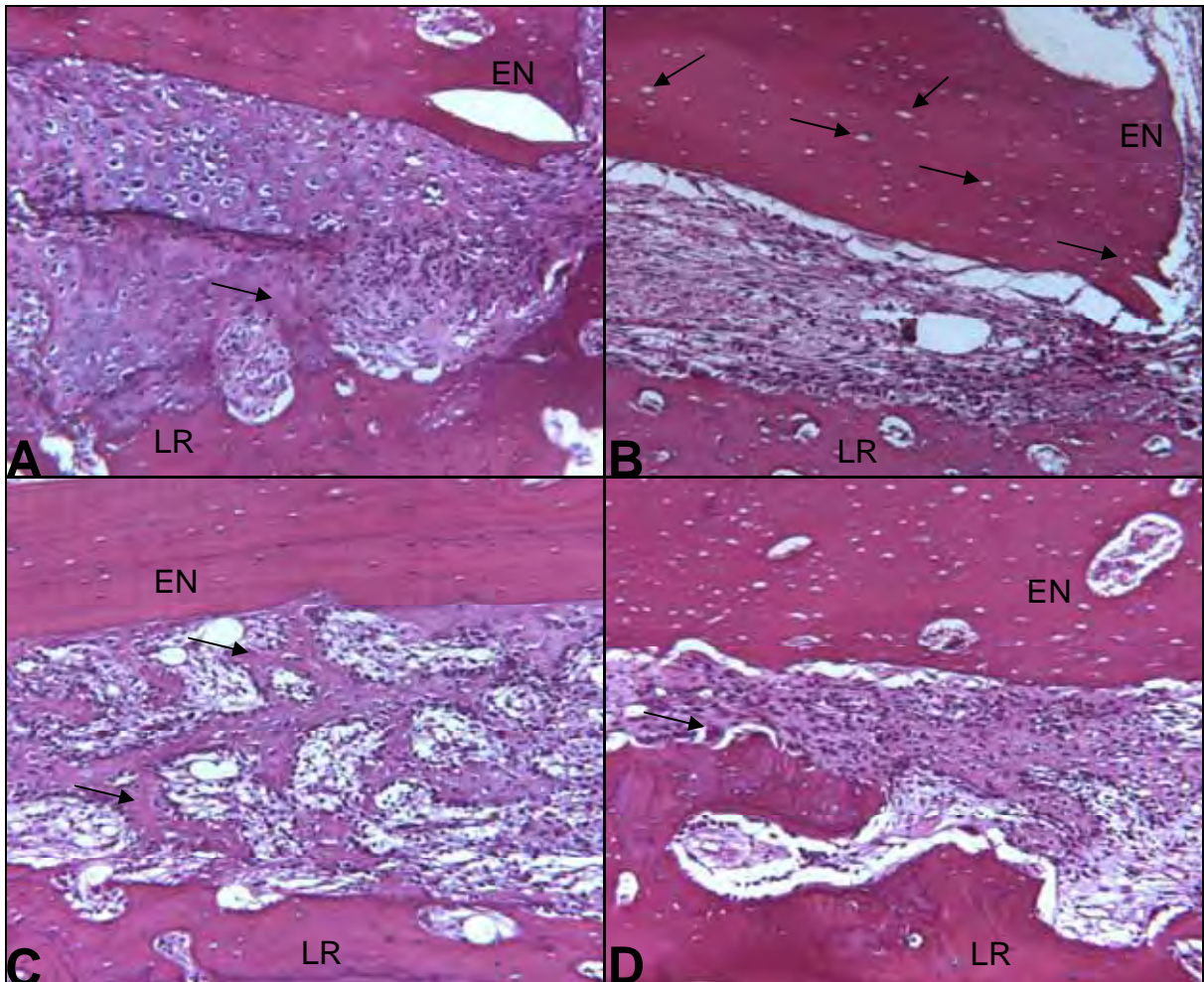


Figura 03

- A. Grupo enxerto imediato 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR). Tecido osteóide na interface em meio a tecido conjuntivo (seta);
- B. Grupo meio seco 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), com presença de tecido conjuntivo na interface. Região do enxerto sem viabilidade celular (setas);
- C. Grupo soro fisiológico 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), exibindo trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (setas);
- D. Grupo Euro Collins® 7 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), evidenciando trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta).

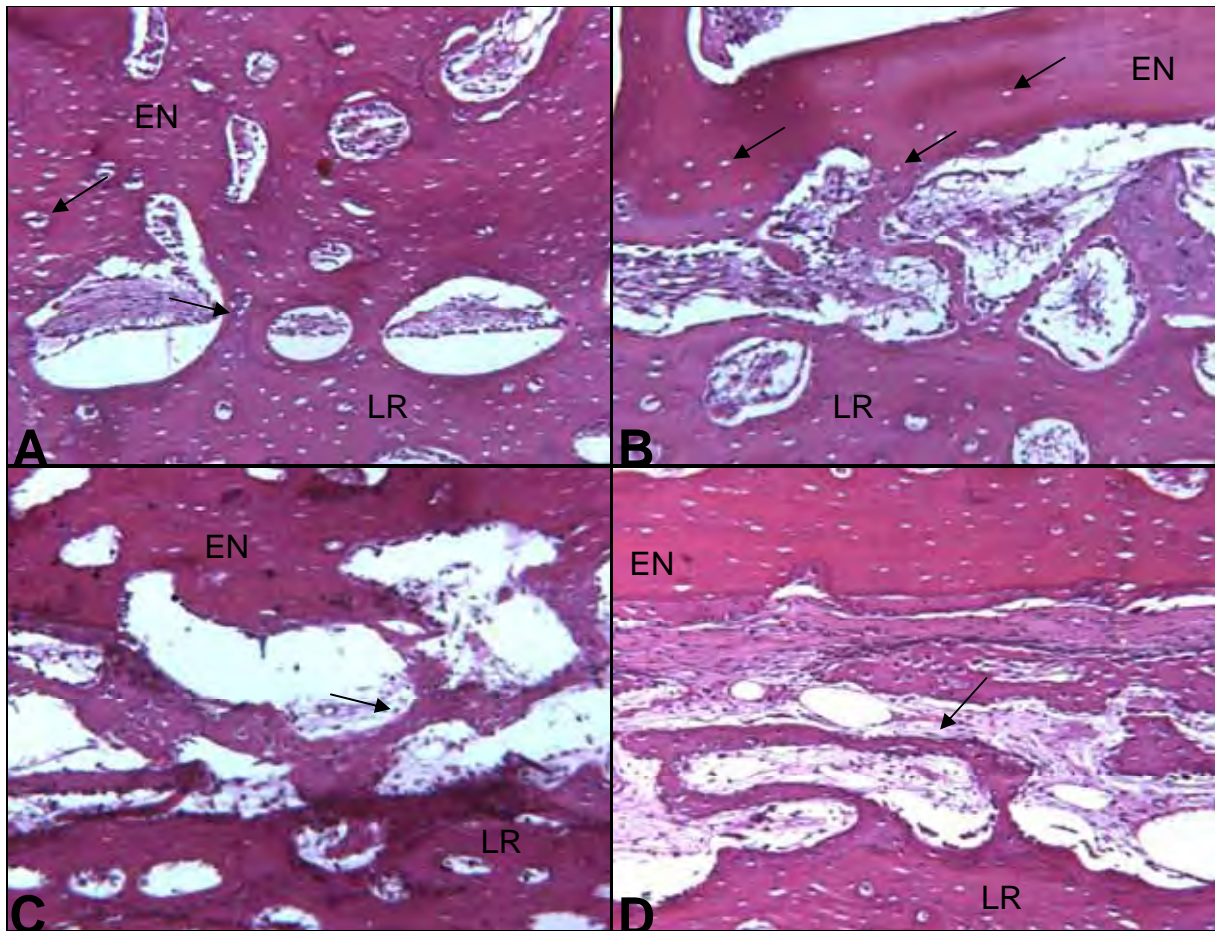


Figura 04

- A. Grupo enxerto imediato 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR). Trabéculas ósseas mais espessas na interface e pontos de revascularização (setas);
- B. Grupo meio seco 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), com presença trabéculas ósseas delgadas e tecido conjuntivo na interface. Notar lacunas dos osteócitos vazias (setas);
- C. Grupo soro fisiológico 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), exibindo delgadas trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta);
- D. Grupo Euro Collins® 15 dias – HE 160X. Enxerto (EN) posicionado sobre o leito receptor (LR), evidenciando delgadas trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta).

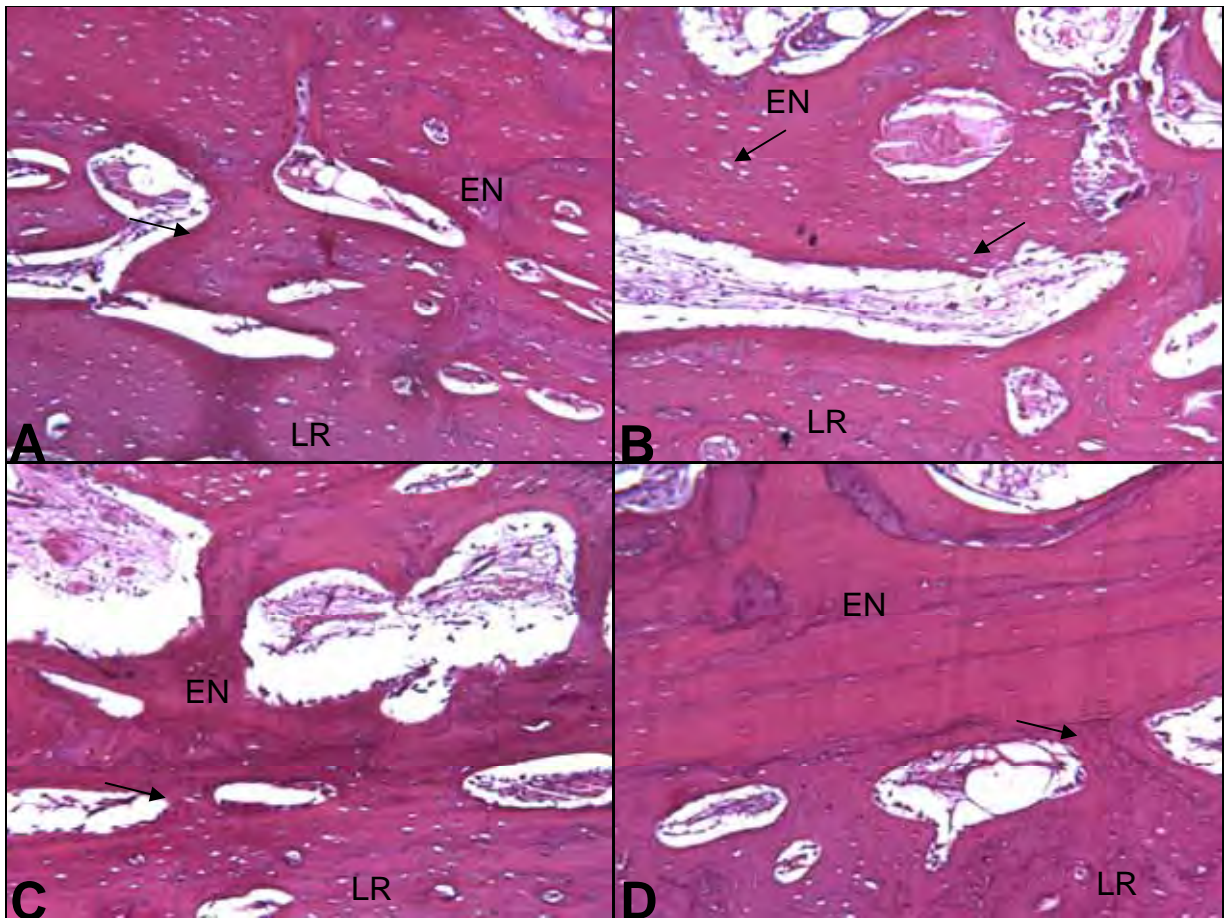


Figura 05

- A. Grupo enxerto imediato 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), com presença de trabéculas ósseas espessas na interface (seta);
- B. Grupo meio seco 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) parcialmente incorporado ao leito receptor (LR), com presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea na interface. Região do enxerto sem viabilidade celular (setas);
- C. Grupo soro fisiológico 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), exibindo trabéculas ósseas bem desenvolvidas na interface em meio a pouco tecido conjuntivo (seta);
- D. Grupo Euro Collins® 30 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado ao leito receptor (LR), evidenciando trabéculas ósseas extensas na interface em meio a pouco tecido conjuntivo (seta).

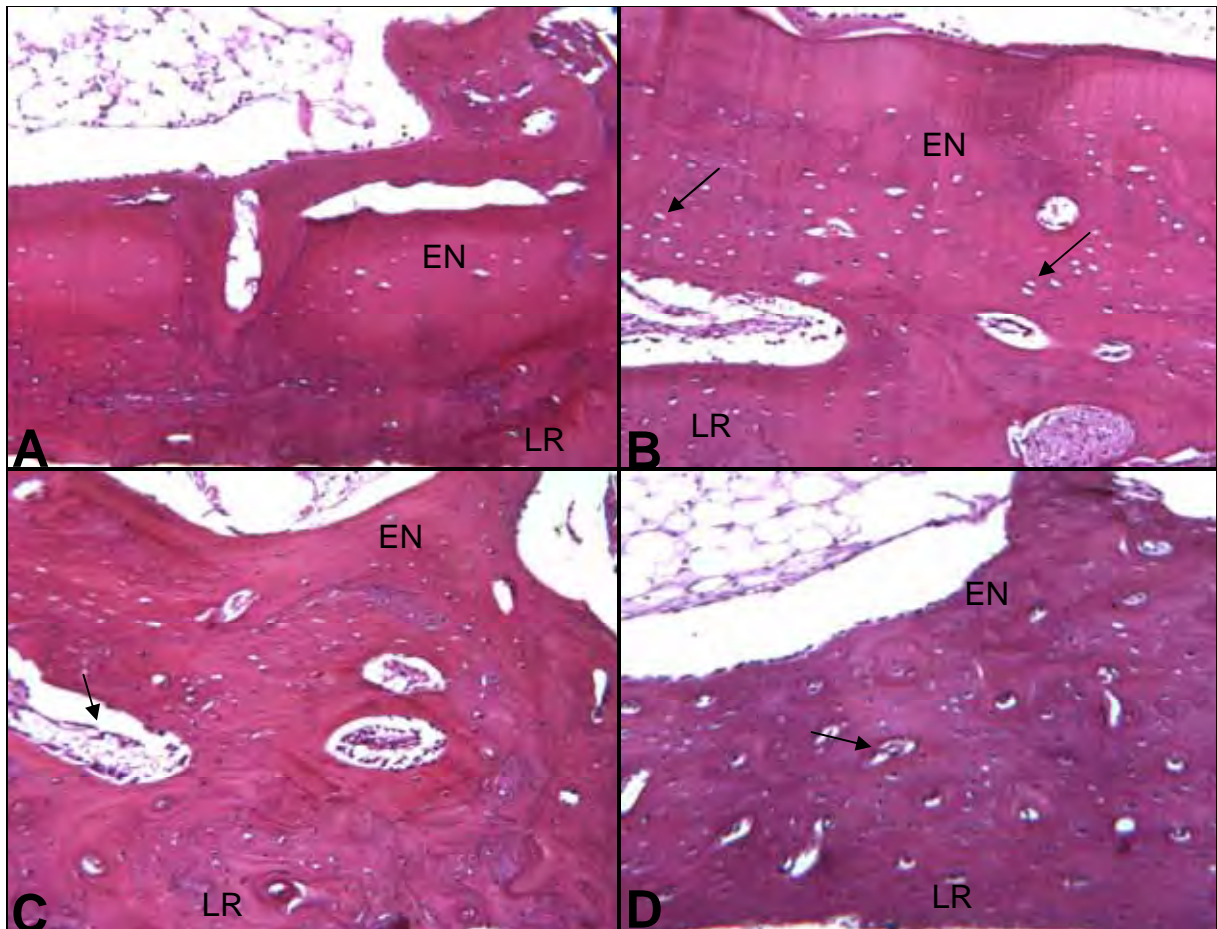


Figura 06

- A. Grupo enxerto imediato 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado e bem vascularizado ao leito receptor (LR);
- B. Grupo meio seco 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado e pouco vascularizado ao leito receptor (LR); ainda com presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Notar a presença de lacunas de osteócitos vazias (setas);
- C. Grupo soro fisiológico 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado e vascularizado ao leito receptor (LR), exibindo poucas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (seta);
- D. Grupo Euro Collins® 60 dias – HE 160X. Enxerto (EN) incorporado e vascularizado (seta) ao leito receptor (LR).

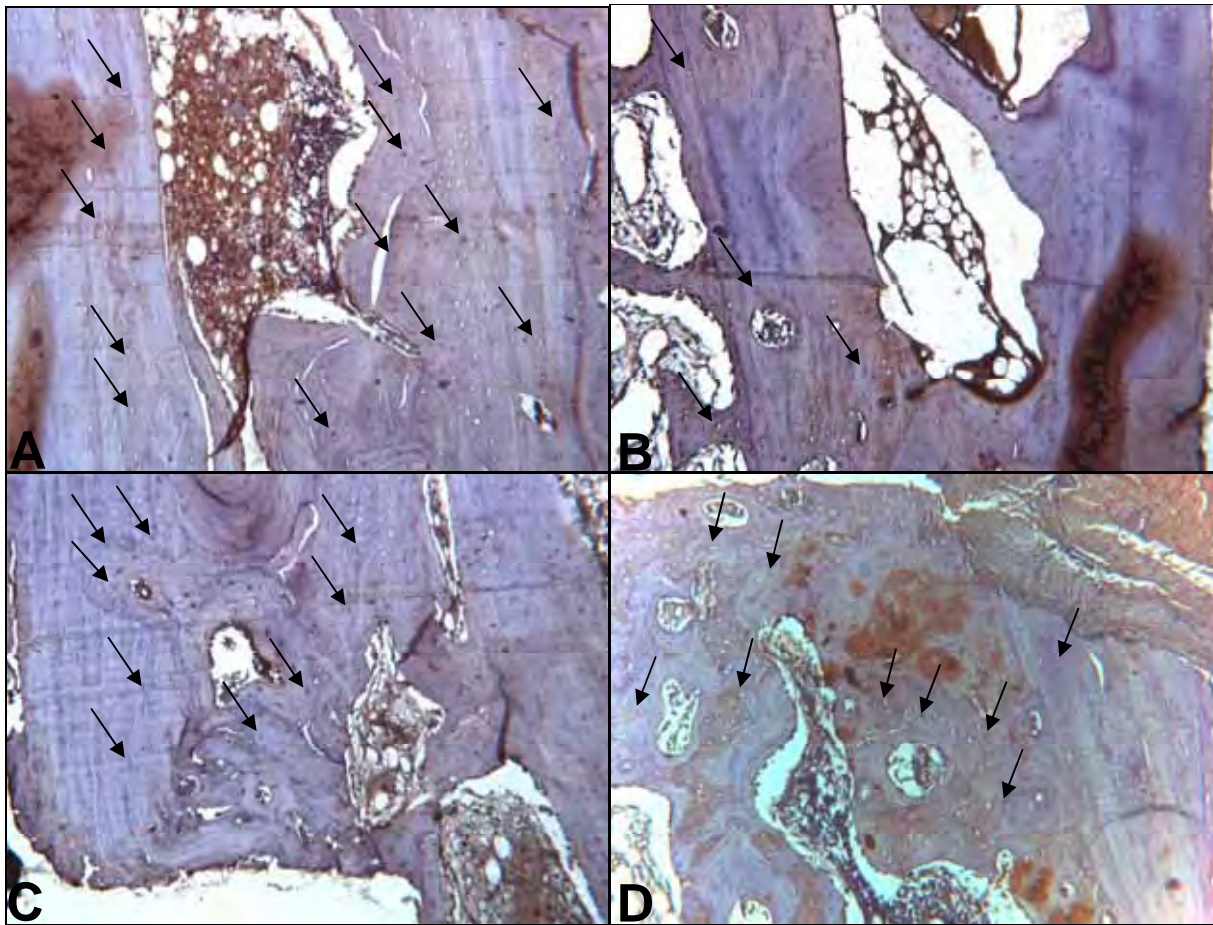


Figura 07

- A. Grupo enxerto imediato – 30 dias 160X. Marcação imunoistoquímica hiper positiva para a OC (setas);
- B. Grupo meio seco – 15 dias 160X. Marcação imunoistoquímica positiva para a OC (setas);
- C. Grupo soro fisiológico – 30 dias 160X. Marcação imunoistoquímica super positiva para OC (setas);
- D. Grupo Euro Collins® – 30 dias 160X. Marcação imunoistoquímica super positiva para OC (setas).

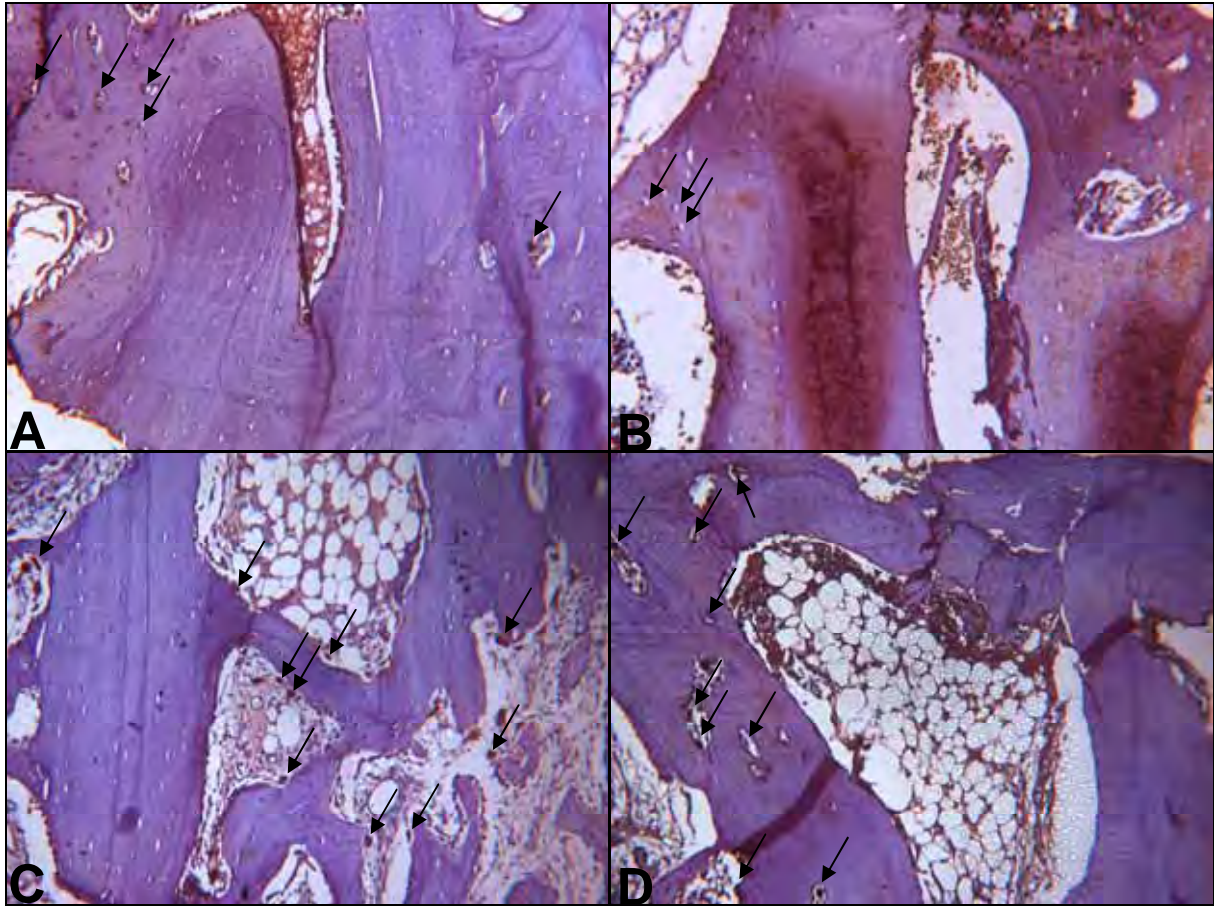


Figura 08

- A. Grupo enxerto imediato – 30 dias 160X. Marcação imunohistoquímica para a TRAP. Poucos osteoclastos marcados (setas);
- B. Grupo meio seco – 30 dias 160X. Marcação imunohistoquímica para a TRAP. Pouca evidência de osteoclastos marcados (setas);
- C. Grupo soro fisiológico – 15 dias 160X. Marcação imunohistoquímica para a TRAP. Grande quantidade de osteoclastos marcados (setas);
- D. Grupo Euro Collins® – 15 dias 160X. Marcação imunohistoquímica para a TRAP. Grande quantidade de osteoclastos marcados (setas).

Tabelas

Tabela 1- Valores (mm) e desvio padrão da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, durante o período trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final).

Grupo	Período							
	7 dias		15 dias		30 dias		60 dias	
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>
G1	1,64±0,40	1,96±0,36	1,50±0,16	2,06±0,15 ^a	2,00±0,31	2,02±0,32	2,40±0,23	2,02±0,25 ^b
G2	2,10±0,25	2,12±0,18	1,74±0,11	1,86±0,11	2,10±0,07	1,90±0,25	2,42±0,36	1,66±0,70
G3	1,82±0,18	1,96±0,23	1,52±0,29	1,94±0,44	2,02±0,11	1,90±0,12	1,88±0,24	1,62±0,16
G4	1,90±0,25	2,00±0,25	1,80±0,19	2,32±0,51	1,84±0,09	1,62±0,28	2,02±0,11	1,48±0,19 ^a

(a) Diferença entre espessura óssea inicial e final, no mesmo grupo e período, $p < 0,001$ e (b) $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins[®].

Tabela 2- Valores (mm) e desvio padrão da variação da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, entre o momento trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final).

Grupo	Período			
	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias
G1	0,12±0,52	0,52±0,15 ^a	0,02±0,28	-0,38±0,11 ^a
G2	0,02±0,26 ^b	0,12±0,15 ^a	-0,20±0,22	-0,76±0,38 ^{ab}
G3	0,14±0,11	0,42±0,39 ^b	-0,12±0,18	-0,26±0,23 ^b
G4	0,28±0,36 ^b	0,52±0,55 ^c	-0,22±0,33	-0,54±0,19 ^{bc}

(a) Diferença, *dentro de um mesmo grupo*, entre os períodos assinalados, $p < 0,001$. (b) Diferença, *dentro de um mesmo grupo*, entre os períodos assinalados, $p < 0,05$. (c) Diferença, *dentro de um mesmo grupo*, entre os períodos assinalados, $p < 0,05$. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins[®].

Tabela 3 - Valores (%) e desvio padrão da área de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto.

Grupo	Período	
	7 dias	15 dias
G1	4,09±2,06	35,50±1,60 ^a
G2	3,78±3,54	28,43±3,66 ^a
G3	5,78±2,05	29,43±5,66 ^a
G4	3,99±0,44	28,17±5,89 ^a

(a) Diferença, *dentro de um mesmo grupo*, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins[®].

Tabela 4 - Valores (%) e desvio padrão do perímetro de osso neoformado na interface entre o leito receptor e o enxerto.

Grupo	Período	
	7 dias	15 dias
G1	7,45±3,06	34,10±2,99 ^{ab}
G2	5,52±4,12	28,20±4,50 ^a
G3	8,73±1,56	28,92±3,52 ^a
G4	6,07±0,70	25,93±3,88 ^{ab}

(a) Diferença, *dentro de um mesmo grupo*, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t.
 (b) Diferença, *dentro de um mesmo período de observação*, entre os grupos assinalados, $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins[®].

Gráficos

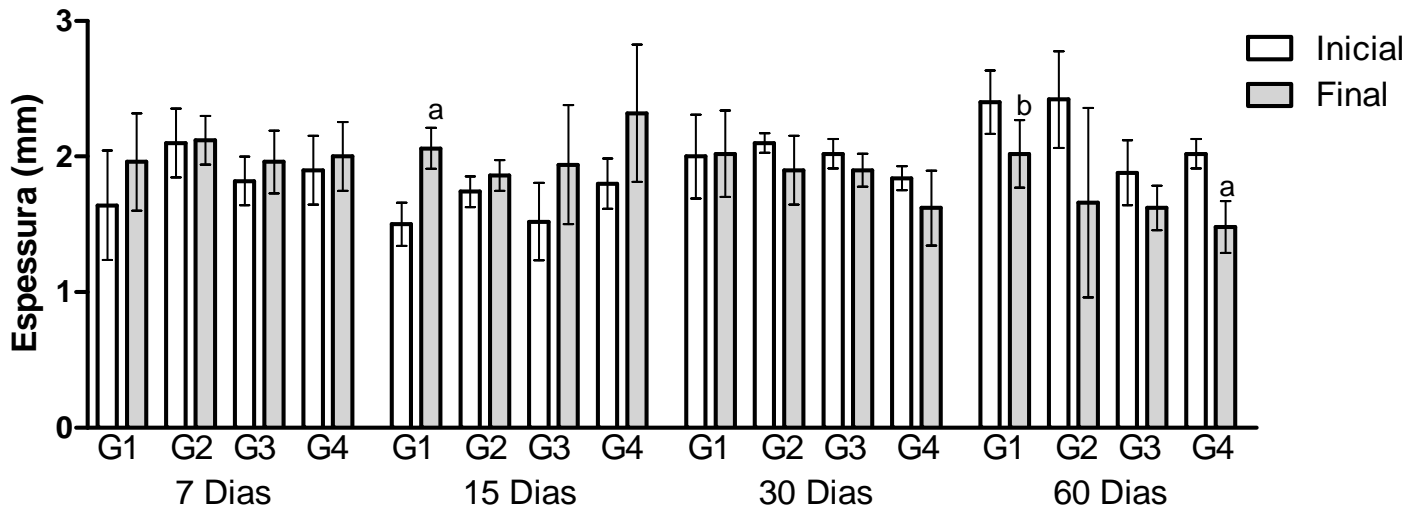


Gráfico 1 - Valores (mm) e desvio padrão da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, durante o período trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final), de acordo com os grupos e períodos. (a) Diferença entre espessura óssea inicial e final, no mesmo grupo e período, $p < 0,001$ e (b) $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

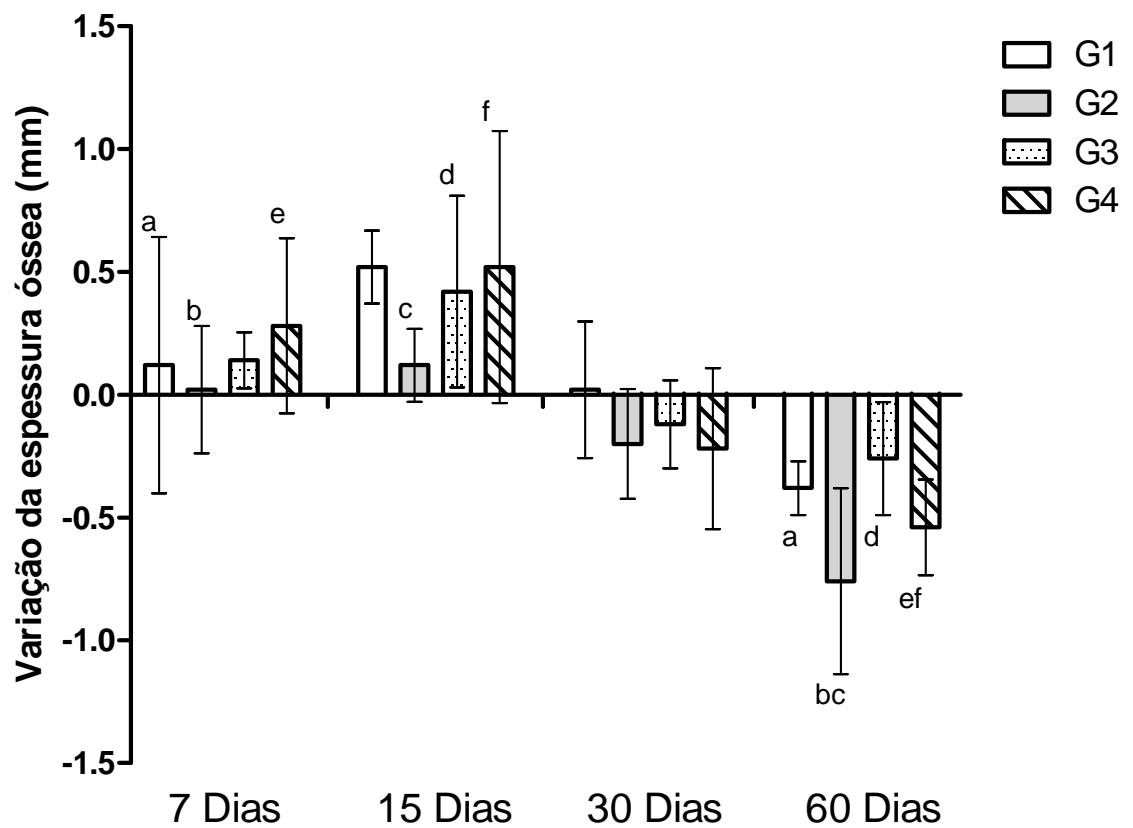


Gráfico 2 - Valores (mm) e desvio padrão da variação da espessura óssea do rebordo com o enxerto fixado, entre o momento trans-operatório (inicial) e pós-operatório (final). (a) $p < 0,001$. (b) $p < 0,05$. (c) $p < 0,001$. (d) $p < 0,05$. (e) $p < 0,05$. (f) $p < 0,05$. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

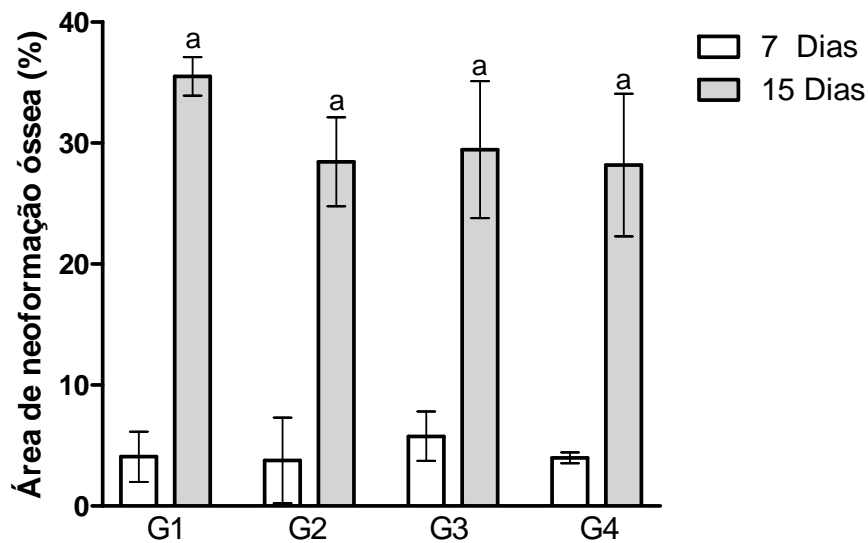


Gráfico 3 - Valores (%) e desvio padrão da área de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

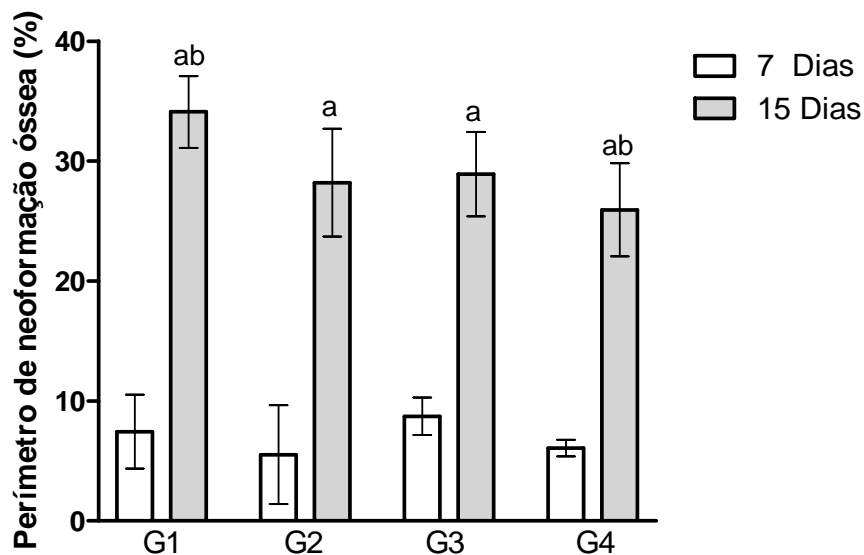


Gráfico 4 - Valores (%) e desvio padrão do perímetro de neoformação óssea na interface entre o leito receptor e o enxerto. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,0001$ – ANOVA – teste t. (b) Diferença, dentro de um mesmo período de observação, entre os grupos assinalados, $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

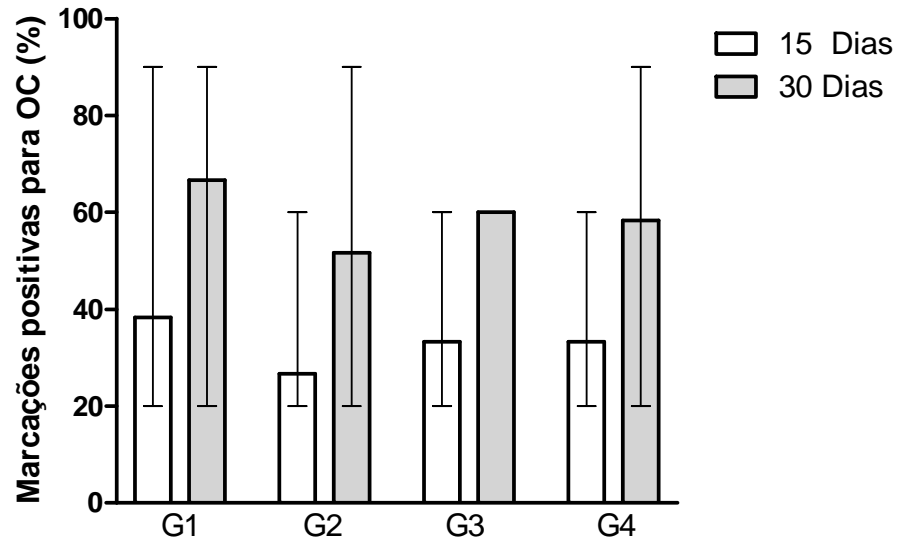


Gráfico 5 – Medianas da positividade para OC (%) e seu valor máximo e mínimo. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

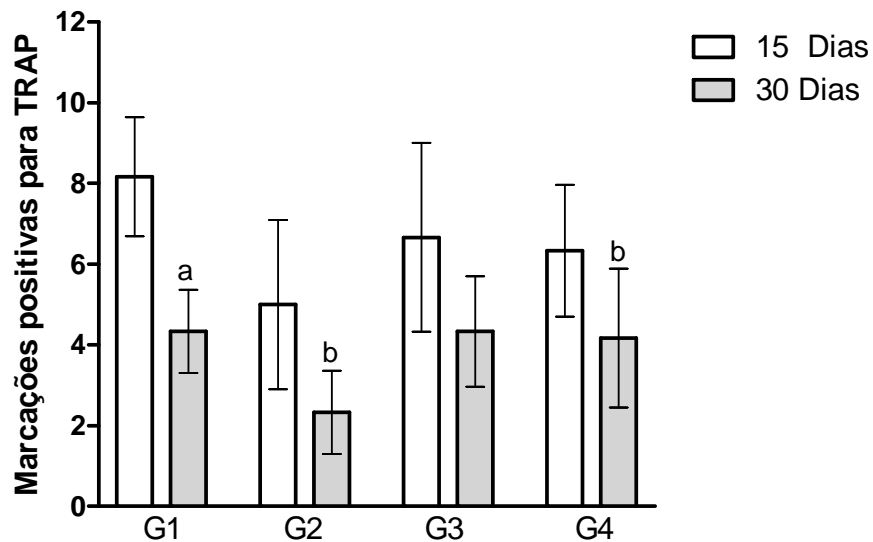


Gráfico 6 – Número de marcações positivas para TRAP e seu desvio padrão. (a) Diferença, dentro de um mesmo grupo, entre os períodos assinalados, $p < 0,001$ – ANOVA – teste t. (b) Diferença, dentro de um mesmo período de observação, entre os grupos assinalados, $p < 0,05$ – ANOVA – teste t. G1 – enxerto imediato, G2 – enxerto armazenado em meio seco, G3 – enxerto armazenado em solução fisiológica e G4 – enxerto armazenado em solução de Euro Collins®.

Anexos

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "INFLUÊNCIA DO MEIO DE CONSERVAÇÃO NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS "ONLAY". ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA E HISTOMORFOMÉTRICA EM COELHOS" sob responsabilidade do Prof. Dr. OSVALDO MAGRO FILHO e colaboração de PAULO ALMEIDA JÚNIOR e ROBERTA OKAMOTO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 01 de junho de 2007 de acordo com o protocolo no. 2007-004005.

Araçatuba, 30 de julho de 2008



Prof^ª Dr^ª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOAUNESP

ANEXO B - Normas da revista The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

Author Guidelines

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. *No paper version is required.*

Acceptable material.

Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors.

Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts.

Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted

manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines.

Manuscripts that are not prepared according to these guidelines will be returned to the author before review.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See www.icmje.org.
- **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
- **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- **Abstract/key words.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.
- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.

- **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.
- **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.

- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.*

Black & white—Submit three sets of high-quality glossy prints. Should the quality prove inadequate, negatives will be requested as well. Photographs should be unmounted and untrimmed.

Radiographs—Submit the original radiograph as well as two sets of prints.

Color—Color is used at the discretion of the publisher. No charge is made for such illustrations. Original slides (35-mm transparencies) must be submitted, plus two sets of prints made from them. When a series of clinical images is submitted, tonal values must be uniform. When instruments and appliances are photographed, a neutral background is best.

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

Electronic Files—May be accepted if original figures (as specified above) are unavailable. Resolution must be at least 300 dpi; files saved in .tiff or .eps format are preferred.

Legends—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (published in issues 1 and 4 and accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634)

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

ANEXO C - Ilustração da fase cirúrgica



Figura 09 – Incisão de 2 cm na região fronto-parietal.

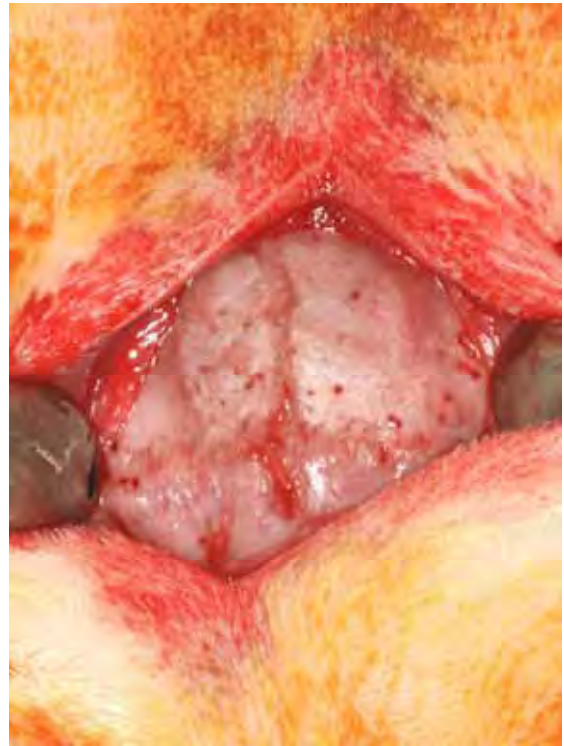


Figura 10 – Acesso à região parietal (área doadora).



Figura 11 – Remoção do enxerto com uso de trefina.

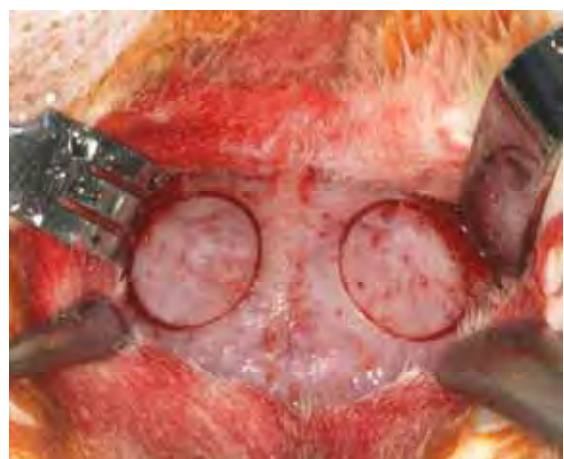


Figura 12 – Remoção do enxerto ósseo autógeno de calota craniana bilateralmente.



Figura 13 – Descolamento delicado da dura mãe, visando à remoção do enxerto.



Figura 14 – Exposição da dura mãe após a remoção do enxerto.



Figura 15 – Meio de armazenamento temporário utilizado - Solução de Euro Collins®.



Figura 16 – Meio de armazenamento temporário utilizado - Soro fisiológico estéril.



Figura 17 – Enxerto ósseo acondicionado em cuba metálica estéril (meio seco).



Figura 18 – Ponto de referência para medição da espessura do enxerto após fixado, realizada 1,5 mm da perfuração central da cabeça do parafuso.

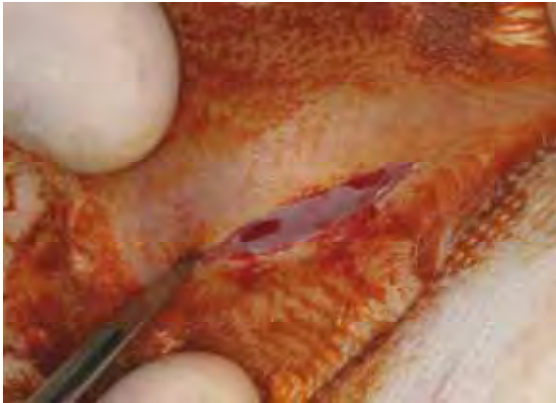


Figura 19 – Acesso submandibular lado esquerdo.



Figura 20 – Região de ângulo mandibular esquerdo (leitor receptor).



Figura 21 – Preparo do leito receptor com utilização de broca esférica diamantada.



Figura 22 – Leito receptor após leve decorticação.



Figura 23 – Enxerto ósseo posicionado após adaptação e fixação com parafuso de titânio no ângulo mandibular esquerdo.



Figura 24 – Parafuso de titânio utilizado para fixação dos enxertos ósseos.



Figura 25 – Medição da espessura do ângulo mandibular esquerdo após a fixação do enxerto ósseo autógeno de calota craniana.



Figura 26 – Drogas utilizadas para sedação – Cloridrato de Cetamina e Xilazina.



Figura 27 – Antibiótico administrado no pós-operatório dos animais – Pentabiótico.



Figura 28 – Analgésico administrado no pós-operatório dos animais – Dipirona sódica.

ANEXO D - Ilustração da Análise Histométrica (área)

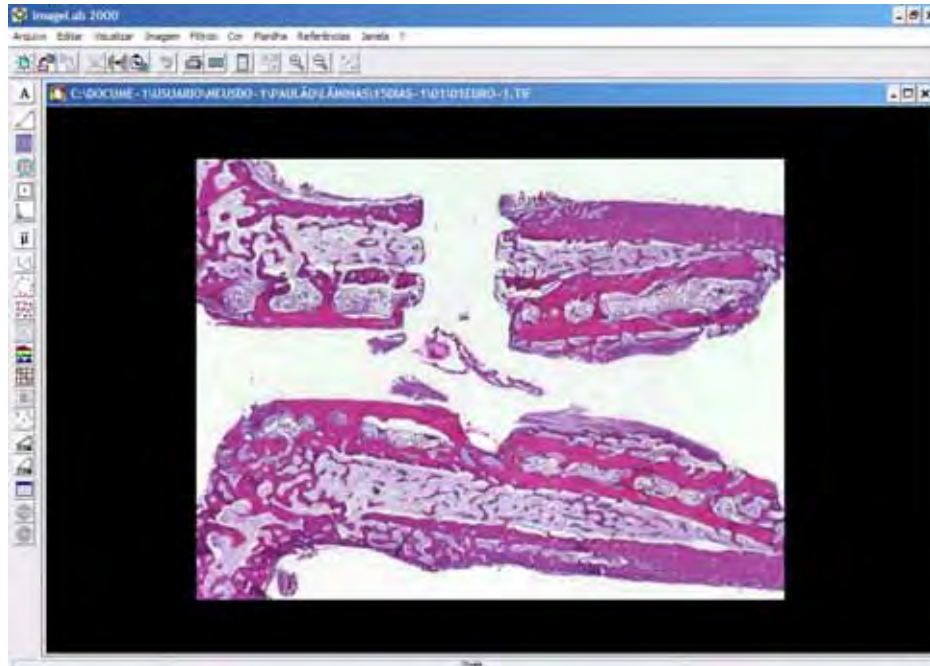


Figura 29 – Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor - Programa ImageLab 2000.

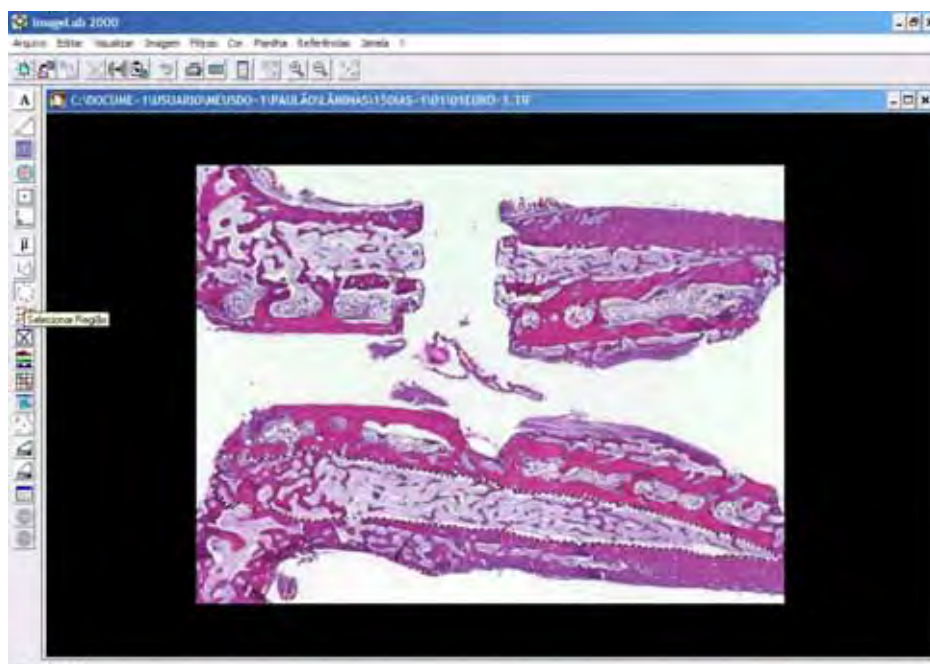


Figura 30 – Seleção de toda a interface entre o enxerto e o leito receptor, através da ferramenta "selecionar região".

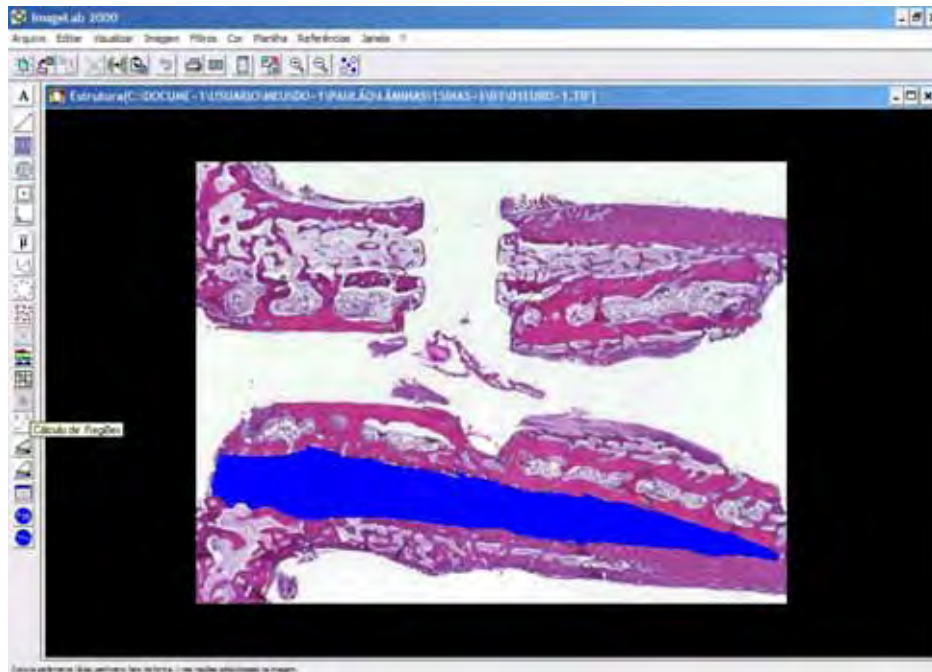


Figura 31 – Cálculo da região selecionada, através da ferramenta “cálculo de regiões”.

Dados Estatísticos									
MORFOMETRIA									
	Área	Perímetro	Volume de Massa	ABSORÇÃO DE COR			Densidade de estruturas	DIÂMETROS	
			I	II	III		Diâm. Transv.	Diâm. Max.	
14 Número									
15 Soma	481195.000	8237.151	0.000	93260704.000	76135632.000	96465480.000	100.121	0.000	2507.407
16 Média	481195.000	8237.151	#DIV/0!	93260704.000	76135632.000	96465480.000	100.121	#DIV/0!	2507.407
17 Desvio Padrão	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18 Valor Máximo	481195.000	8237.151	0.000	93260704.000	76135632.000	96465480.000	100.121	0.000	2507.407
19 Valor Mínimo	481195.000	8237.151	0.000	93260704.000	76135632.000	96465480.000	100.121	0.000	2507.407
20 Significância 95%	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
21 Significância 99%	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
22									
23									
24									
25									
26									
27	1	481195.000	8237.151		93260704.000	76135632.000	96465480.000	100.121	2507.407
28									
29									
30									
31									
32									
33									
34									
35									
36									

Figura 32 – Planilha evidenciando a soma total da área selecionada, através da ferramenta “planilha de cálculo”.

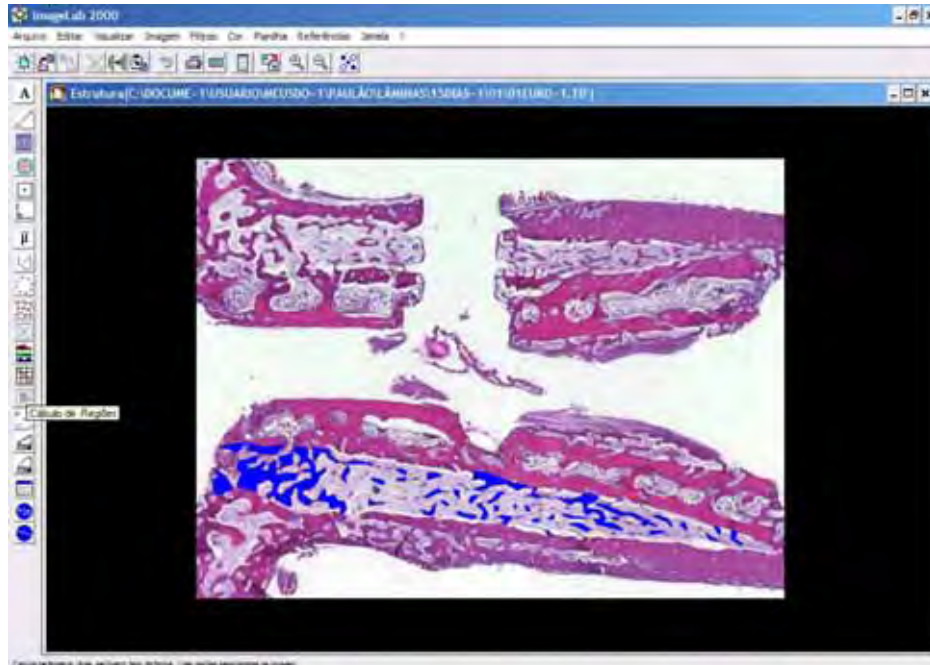


Figura 33 – Seleção e cálculo das regiões de neoformação óssea na interface entre o enxerto e o leito receptor.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Data: Dia: 7/8/109 Hora: 0.39.49									
2										
3	Estrutura[C:\DOCUME~1\USUARIO\MELISSO~1\PALEÃO\LÁMINAS\ASBRAS-101101EURO-1.TIF]									
4	Largura		Área		Sub-região		2,4%			
5	2524		1336		em relação a		área total da imagem			
6										
7	Fixad				Densidade		N			153,127
8	Unidade		Largura		Área		d			90,300
9	ps		1,000000		1,000000		#			155,935
10					médias		Módic			175,500
11	Dados Estatísticos									
12										
13										
14	MORFOMETRIA									
15	Área									
16	Perímetro									
17	Fator de forma									
18	H									
19	G									
20	B									
21	Densidade									
22	Diam. Trans									
23	Diam. Max									
24	Módicos									
25	Módicos									
26	Módicos									
27	Módicos									
28	Módicos									
29	Módicos									
30	Módicos									
31	Módicos									
32	Módicos									
33	Módicos									
34	Módicos									
35	Módicos									
36	Módicos									
37	Módicos									
38	Módicos									
39	Módicos									
40	Módicos									
41	Módicos									
42	Módicos									

Figura 34 – Planilha evidenciando a soma das áreas onde ocorreu neoformação óssea na interface entre o enxerto e o leito receptor.

Planilha Histograma Área alta - Microsoft Excel

GRUPO 1 - IMEDIATO

		7 DIAS			15 DIAS			7 dias	15 dias	
		Área Total de Interface	Área de Díos Reafirmados	%	Área Total de Interface	Área de Díos Reafirmados	%			
COELHO 17	corte 1	217884,500	3653,500	1,67	corte 1	806477,500	106200,000	34,65	Coelho 17	1,47
	corte 2	138201,500	3507,500	1,47	corte 2	334225,500	111486,000	36,35	Coelho 18	1,46
	corte 3	224519,500	1877,500	1,28	corte 3	328790,500	103405,000	31,45	Coelho 19	4,32
	MEDIA				MEDIA				Coelho 20	6,71
COELHO 18	corte 1	327120,500	8815,500	2,11	corte 1	270859,000	85547,500	31,58	Coelho 21	34,15
	corte 2	318666,000	4763,500	1,50	corte 2	298258,000	114482,000	38,38	Coelho 22	27,68
	corte 3	360442,000	7897,500	1,97	corte 3	294611,000	116057,500	39,39	Coelho 23	23,80
	MEDIA				MEDIA				Coelho 24	38,36
COELHO 19	corte 1	240586,500	3740,000	4,05	corte 1	548186,500	126450,000	36,21	Coelho 300	35,50
	corte 2	240864,000	13015,500	5,43	corte 2	349765,500	114472,500	32,73		
	corte 3	238203,500	12521,000	5,30	corte 3	335673,000	115094,000	31,36		
	MEDIA				MEDIA					
COELHO 20	corte 1	217329,500	13695,000	6,30	corte 1	438807,500	170784,000	38,81		
	corte 2	195538,000	14253,000	7,29	corte 2	463406,500	149633,500	32,29	MEDIA FINAL	1,00
	corte 3	223207,500	14829,500	6,35	corte 3	434628,500	172533,500	37,95		
	MEDIA				MEDIA					
COELHO 24	corte 1	250725,500	8498,000	3,39	corte 1	341337,625	124741,375	36,55		
	corte 2	248507,375	4884,375	3,38	corte 2	361412,625	115014,500	34,59		

Figura 35 – Planilha na qual os dados obtidos foram digitados (Programa Excel).

ANEXO E - Ilustração da Análise Histométrica (perímetro)

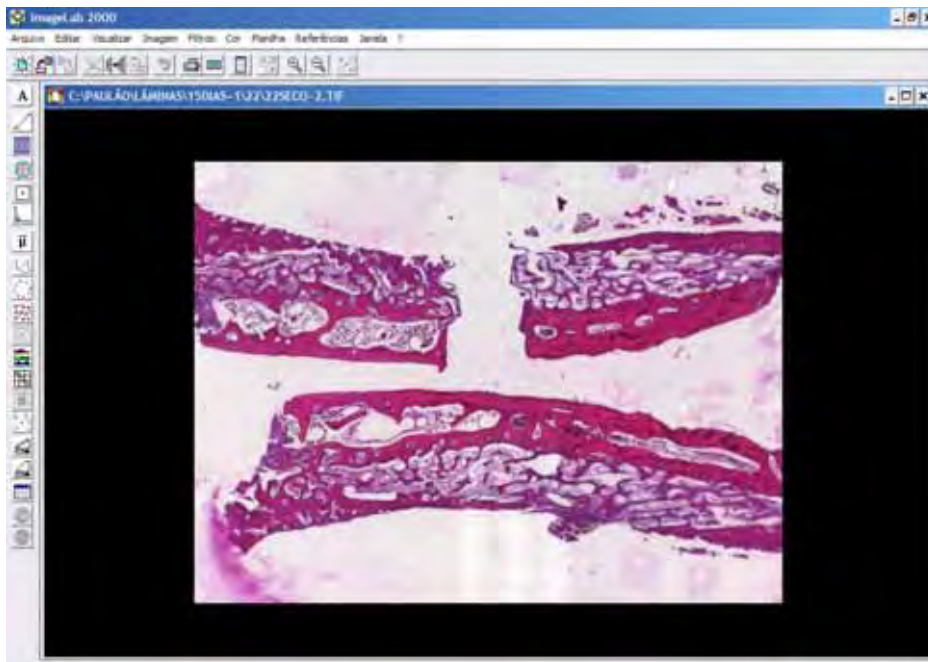


Figura 36 – Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor - Programa ImageLab 2000.

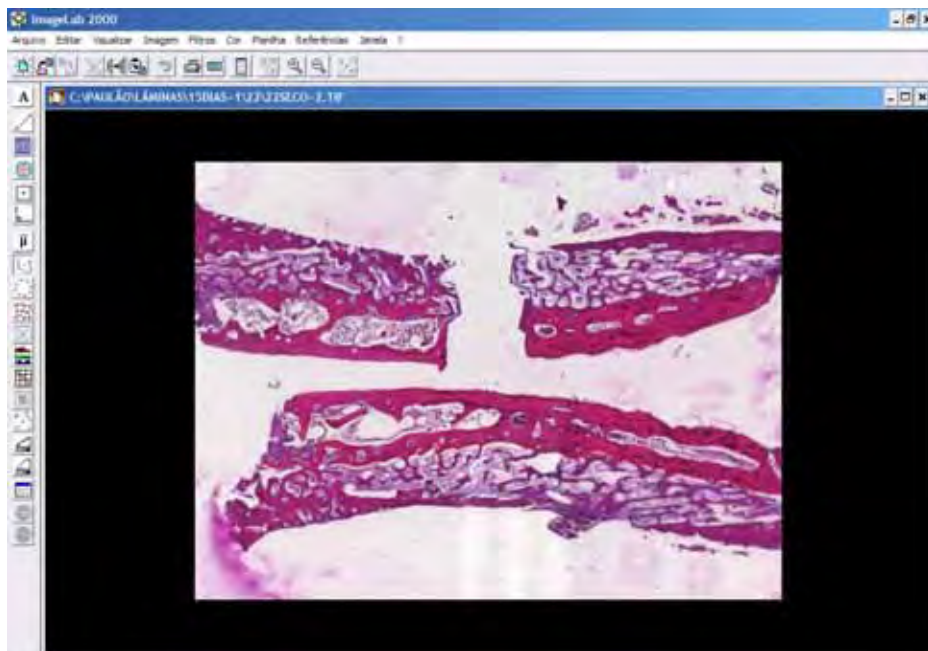


Figura 37 – Seleção de toda a extensão do enxerto voltada para o leito receptor.

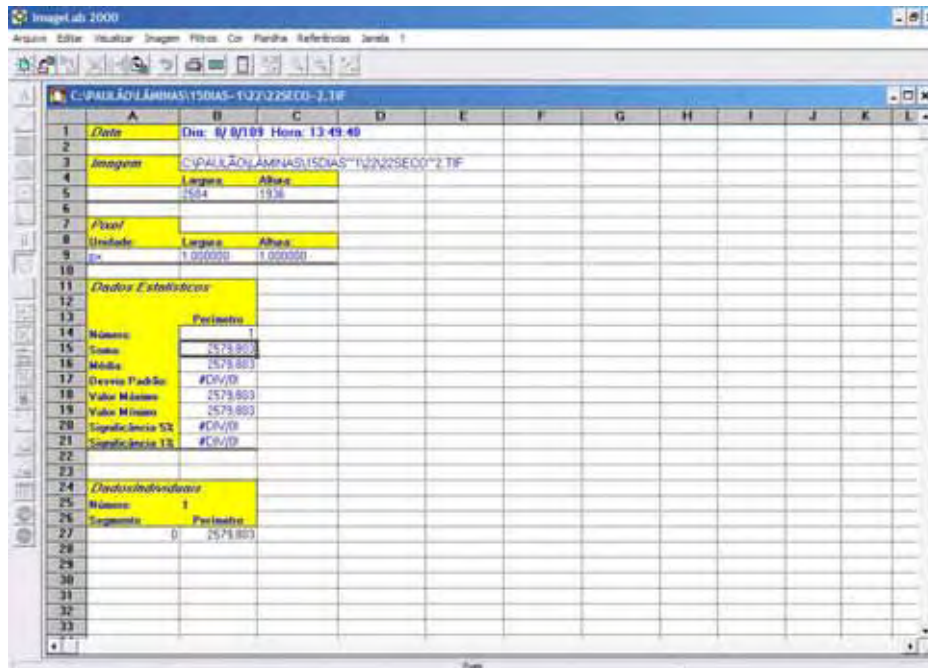


Figura 38 – Cálculo do perímetro de toda a extensão selecionada, através da ferramenta “planilha de cálculo”.

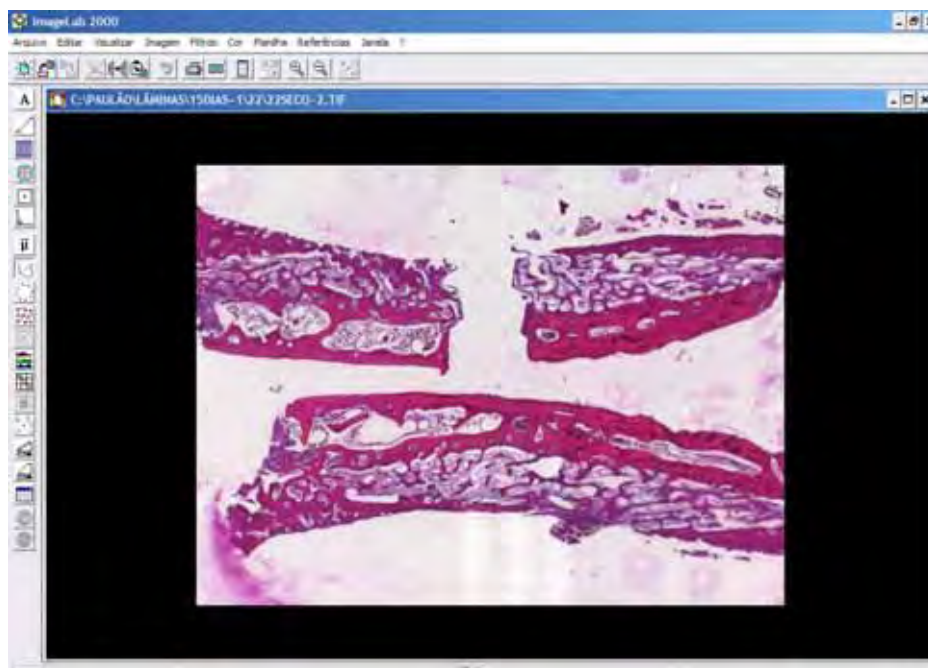


Figura 39 – Seleção da extensão linear apenas das trabéculas ósseas formadas do enxerto em direção ao leito receptor.

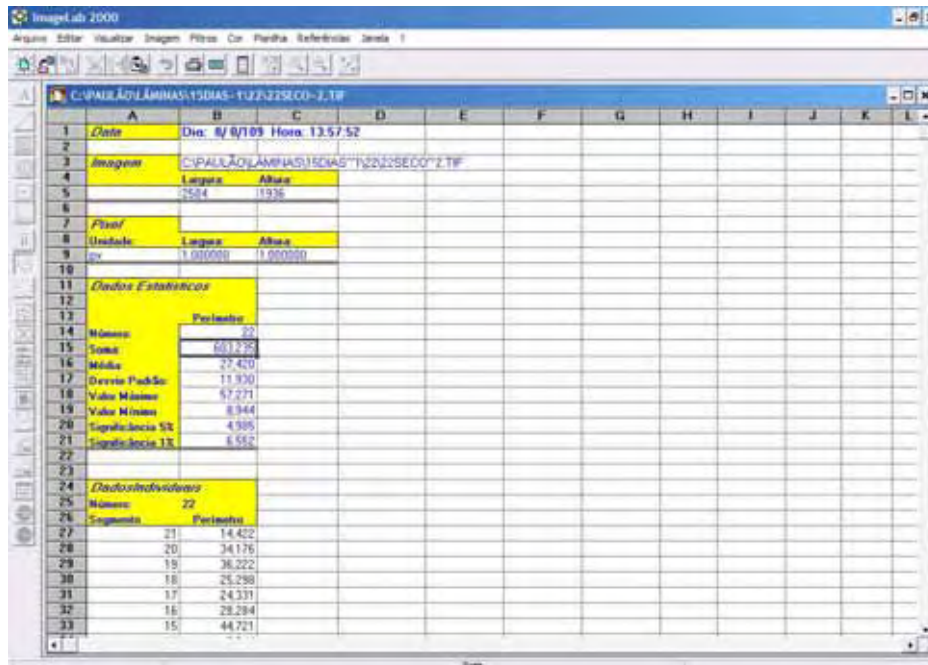


Figura 40 – Cálculo do perímetro apenas das trabéculas ósseas formadas do enxerto em direção ao leito receptor, através da ferramenta “planilha de cálculo”.

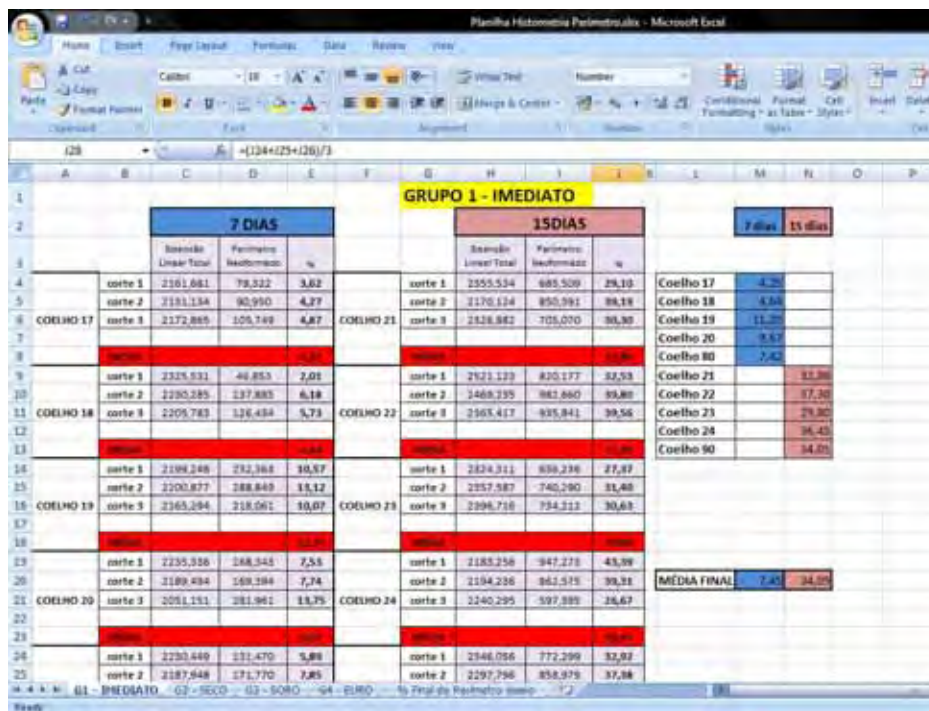


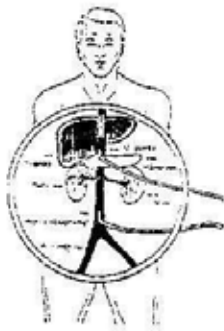
Figura 41 – Planilha na qual os dados obtidos foram digitados (Programa Excel).

ANEXO F - Instruções de Uso - Solução Euro Collins®

INSTRUÇÕES DE USO

SOLUÇÃO EURO COLLINS

Solução eletrólitos



Para perfusão de rins em transplante

INSTRUÇÕES DE USO - LEIA COM ATENÇÃO

A solução Euro Collins é composta de um frasco de 1000 ml de solução de glicose 3,57% e uma ampola de 20 ml de solução de eletrólitos que são misturados antes de sua utilização, uma seringa e um equipo de perfusão renal.

1.2 - INDICAÇÃO, FINALIDADE OU USO A QUE SE DESTINA O PRODUTO,

Para perfusão gravitacional e/ou estocagem hipotérmica de rins para transplante.

CONTRA-INDICAÇÕES, EFEITOS COLATERAIS, REAÇÕES ADVERSAS:

Não são conhecidos contra-indicações.

Se usando conforme o recomendado, não são esperados efeitos colaterais ou reações adversas.

Solução I

glicose 3,57%

1000 ml contem:

glicose monohidratada para injeção..... 39,27 g

= glicose anidra para injeção (35,7 g)

água para injeção q.s.p..... 1000 ml

Solução II

Solução de eletrólitos

20 ml contem:

Fosfato monobásico de potássio.....	2,09 g
Fosfato bibásico de potássio.....	7,55 g
Cloreto de potássio	1,14 g
Bicarbonato de sódio.....	0,86 g
Água para injeção q.s.p.	20 ml

COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PRONTA PARA USO EM PERFUSÃO (SOLUÇÕES I E II)

Misturar 1000 ml de solução de glicose 3,57% com 20 ml de solução de eletrólitos, antes do uso.

isto perfaz 1020 ml de solução, dos quais, 1000 ml contêm:

Fosfato monobásico de potássio.....	2,05 g
Fosfato bibásico de potássio.....	7,40 g
Cloreto de potássio	1,12 g
Bicarbonato de sódio.....	0,84 g
Glicose monohidratada para injeção.....	38,50 g
= glicose anidra para injeção (35,0 g)	
Água para injeção q.s.p.....	1000 ml

CONTEÚDO ELETROLÍTICO:

K ⁺	115 mEq/l
Na ⁺	10 mEq/l
Cl ⁻	15 mEq/l
HCO ₃ ⁻	10 mEq/l
H ₂ PO ₄ ⁻	15 mEq/l
HPO ₄ ⁻	85 mEq/l
Osmolaridade teórica:.....	529 mosm/l

MÉTODO DE ESTERILIZAÇÃO

Sol. Glicose: temperatura 106 °C por 40 minutos
1 kg de pressão

Ampola: temperatura 121 °C por 10 minutos
1,7 kg pressão

Esterilizado em auto-clave de contrapressão (spray d'água)

VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E /OU MODO DE USAR

Retirar a tampa flip-off do frasco de vidro

Fazer assepsia da ampola de eletrólitos

Retirar com a seringa o conteúdo de 20 ml da ampola (solução II) e injetar pela rolha do frasco de plástico contendo a Solução de Glicose 3,57% (solução I)

Agite o frasco energicamente até obter homogeneidade do conteúdo.

Conectar equipo estéril para perfusão com a tampa do frasco, colocar o equipo no adaptador e ligar na respectiva artéria do rim a ser perfundido, conforme técnica adotada pela equipe médica

ADVERTÊNCIAS E/OU PRECAUÇÕES**RESTRICÇÕES OU CUIDADOS QUE DEVEM SER CONSIDERADOS:**

A solução de Euro-Collins é uma solução para perfusão de rins.
Não deve ser usada depois de expirado o prazo de validade.

Cuidado: a solução não deve ser usada para infusão parenteral.
Não use se houver turvação, depósito ou violação do recipiente.

CUIDADOS ESPECIAIS DE CONSERVAÇÃO:

Guardar em temperaturas que não ultrapassem 25 °C.

CUIDADOS DE ARMAZENAGEM E TRANSPORTE

- O transporte deve ser feito de modo que não ocorra modificação brusca de temperatura em relação ao produto.
- O acondicionamento deverá ser o melhor possível durante o transporte para evitar danos físicos no produto.

Registro ANVISA n.º 1.00041.00066

RESPONSÁVEL TÉCNICO: Jean Gomes de Souza CRF SP- 6023

FRESENIUS KABI BRASIL LTDA.

Rua Francisco P. Coutinho, 347

Campinas • SP - Indústria Brasileira

C.N.P.J. 49.324.221/0001-04

SAC 0800 7073855

Autorizo a reprodução deste trabalho
Araçatuba, Fevereiro de 2009

Paulo Almeida Júnior