

LUÍS GUILHERME SCAVONE DE MACEDO

**REPARAÇÃO ÓSSEA EM ENXERTO ALÓGENO FRESCO
CONGELADO NA CALVÁRIA DE COELHOS: análises
histológica e histomorfométrica**



2011

LUÍS GUILHERME SCAVONE DE MACEDO

**REPARAÇÃO ÓSSEA EM ENXERTO ALÓGENO FRESCO
CONGELADO NA CALVÁRIA DE COELHOS: análises histológica e
histomorfométrica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Titular Marco Antonio Bottino

São José dos Campos
2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. MARCO ANTONIO BOTTINO (Orientador)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Adj. LAFAYETTE NOGUEIRA JR.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Tit. WILSON ROBERTO SENDYK
Faculdade de Odontologia
Univ de Santo Amaro - UNISA

Prof. Tit. MÁRCIA CARNEIRO VALERA GARAKIS
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Assist. Dr. RENATA FARIA
Faculdade de Odontologia
UNIP – Universidade Paulista

São José dos Campos, 06 de junho de 2011.

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Maria Angélica e meus filhos João Gabriel e Giovana pelo amor, companheirismo, por dividir as alegrias e os desafios, pela dedicação, pelo convívio, pela paciência nos momentos em que precisamos estar ausentes, e pelo estímulo que serviu de base para que pudéssemos concluir mais essa etapa. Amo vocês.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nelson e Silvia, pessoas pelas quais tenho grande admiração e amor, e que não mediram esforços em minha educação e formação, proporcionando condições para que pudesse chegar até aqui. Meus sinceros agradecimentos.

Aos meus irmãos Fernando e Gustavo pela grande amizade, alegria e convívio durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Titular Marco Antonio Bottino, coordenador do Programa de pós-graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos pela orientação deste trabalho, pela amizade e convívio durante esses anos, pela confiança empregada na coordenação das atividades clínicas, pelos esforços empregados para realização de nossas atividades e pelas oportunidades proporcionadas durante esses anos. Ao amigo meus sinceros agradecimentos. Ao Professor, minha grande admiração pela responsabilidade, seriedade e profissionalismo com que coordena as atividades. Serei eternamente grato.

Ao Professor Titular Wilson Roberto Sendyk, coordenador dos programas de pós-graduação em Periodontia e Implantodontia da Universidade de Santo Amaro (UNISA) pela grande amizade, pela confiança no desenvolvimento das primeiras pesquisas, pelas oportunidades proporcionadas e por compartilhar momentos agradáveis durante os anos. Expresso minha extrema admiração ao conhecimento e dedicação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues, e seu Vice-Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli por ter disponibilizado toda a estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Adjunto Lafayette Nogueira Jr., chefe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, pelos ensinamentos transmitidos, oportunidades, pelo convívio agradável e pela amizade durante esses anos.

Ao Prof. Ivan Balducci, da Disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, UNESP, pelo auxílio nos resultados e interpretação estatística.

Aos funcionários do Biotério desta Faculdade Lourival Jacobs e Marco Antonio Corrêa pelo grande apoio e serviços prestados na fase experimental deste trabalho.

À Prof^a Adjunto Mônica Fernandes Gomes do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos por proporcionar condições para análise dos resultados histológicos e histomorfométricos.

Aos Coordenadores do Banco de Tecidos Músculo-esquelético da Universidade de Marília, UNIOSS, Dr. Eduardo Accetturi e Dr^a. Karla Bachega, pelo incentivo, cooperação e por proporcionarem condições para o desenvolvimento experimental deste trabalho.

À secretária do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos, Eliane Wenzel, pelo convívio, amizade, por não nos deixar esquecer nossos compromissos e pelo auxílio nos momentos em que precisamos durante esses anos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças, pela responsabilidade e atenção no desenvolvimento de nossas atividades.

Aos colegas Luiz Antonio Mazzucchelli Cosmo, André Antonio Pelegrine e Carlos Eduardo Sorgi da Costa, grandes amigos com quem produzimos as primeiras pesquisas no assunto.

Ao técnico Walter Cruz do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela dedicação e auxílio na preparação dos materiais histológicos.

Ao colega Humberto de Castro Lago do curso de pós-graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração em Prótese Dentária, pela colaboração no desenvolvimento das atividades clínicas durante o programa e pelos trabalhos que realizamos juntos.

Ao colega Alecsandro de Moura do curso de pós-graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração em Prótese Dentária, pela colaboração e auxílio no desenvolvimento das atividades clínicas durante o programa.

À colega Sabrina Alves Feitosa do curso de pós-graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração em Prótese Dentária, pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

À Fernanda Alves Feitosa, aluna da graduação desta Universidade pela dedicação e auxílio na parte experimental e no preparo das lâminas histológicas deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Monteiro, Professora do Curso de Atualização em Implantodontia desta Universidade pela colaboração e dedicação na realização deste trabalho.

A todos os colegas do Programa de pós-graduação em Odontologia Restauradora, área de concentração em Prótese Dentária, aqueles que conviveram conosco durante esses anos e que dividiram as alegrias e dificuldades, que se tornaram amigos e que farão parte de nossas vidas. Meus sinceros agradecimentos.

Aos alunos do Curso de Especialização em Implantodontia desta Faculdade com quem convivemos nos últimos anos e que, além da companhia, serviram de estímulo para que pudéssemos melhorar e nos esforçar cada vez mais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE QUADROS E TABELAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	1
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Biologia dos enxertos ósseos	24
2.2 Enxertos ósseos autógenos	29
2.3 Enxertos ósseos alógenos	43
3 PROPOSIÇÃO	63
4 MATERIAL E MÉTODO	64
4.1 Animais e grupos experimentais	64
4.2 Procedimentos cirúrgicos	64
4.3 Material biológico	70
4.4 Períodos de sacrifício	71
4.5 Análise histológica e histomorfométrica	71
4.6 Análise estatística	72
5 RESULTADOS	74
5.1 Análise histológica	75
5.1.1 Grupo A (osso autógeno) – 15 dias	75
5.1.2 Grupo A (osso autógeno) – 30 dias	76
5.1.3 Grupo A (osso autógeno) – 60 dias	77
5.1.4 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 15 dias	79
5.1.5 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 30 dias	81
5.1.6 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 60 dias	84

5.2	Análise histomorfométrica e estatística	86
6	DISCUSSÃO.....	91
7	CONCLUSÃO	108
8	REFERÊNCIA.....	109
	ANEXOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Animal de estudo: a) coelhos machos raça *New Zealand*; b) colocação dos campos cirúrgicos após a tricotomia para assepsia do campo operatório..... 65
- Figura 2 - Esquema cirúrgico: a) área preparada para incisão sagital; b) após incisão dos planos profundos, divulsão e exposição do tecido ósseo da calvária..... 66
- Figura 3 - Esquemas do procedimento cirúrgico: a) exposição e delimitação da calvária do animal; b) perfurações corticais promovendo sangramento local na região receptora em ambos os lados e delimitação da região doadora de enxerto autógeno..... 67
- Figura 4 - Esquema cirúrgico: a) remoção bloco autógeno e fixação do mesmo com parafuso de fixação; b) adaptação do bloco e fixação do lado direito com parafuso de fixação; c) colocação de barreira de PTFE para exclusão dos tecidos moles durante a reparação inicial; d) sutura dos planos profundos com fio absorvível..... 68
- Figura 5 - Procedimento cirúrgico: a) adaptação e fixação dos blocos autógeno e alógeno nos leitos receptores; b) colocação e estabilização da barreira de PTFE sobre os blocos, interposta entre os tecidos moles..... 69
- Figura 6 - Análise histológica em 15 dias com osso autógeno em montagem panorâmica mostrando o bloco enxertado em toda sua extensão. Nessa imagem já podemos notas presença de pontes de tecido ósseo formando na interface com o leito receptor. HE - 25x..... 76
- Figura 7 – Análise histológico em 30 dias com osso autógeno. Nota-se o bloco enxertado do lado esquerdo da imagem contendo

inúmeros osteoblastos (setas pretas). Há pontes de tecido ósseo na interface e presença de osteócitos em grande parte da matriz do enxerto. HE em 100x. 77

Figura 8 - Análise histológica em 60 dias com osso autógeno na região central do bloco ósseo mostrando extensa área de tecido mineralizado. Nota-se regiões com grande número de osteoblastos (seta amarela) entre as porções medulares e a porção mineralizada. Coloração HE com aumento de 50x. 78

Figura 9 - Análise histológica em 60 dias com osso autógeno. Nota-se, no interior da matriz, inúmeros osteócitos preenchendo as lacunas (seta preta). Podemos notar osteoblastos ao redor das áreas medulares do tecido (seta amarela). HE - 100x..... 79

Figura 10 - Análise histológica em 15 dias com osso alógeno mostrando interface com pontos de fusão entre o enxerto e o leito receptor onde nota-se células osteoblásticas alinhadas em atividade (setas pretas). Há presença de osteócitos na matriz próxima a interface (setas brancas). Coloração HE com aumento de 100x. 80

Figura 11 - Análise histológica em 15 dias com osso alógeno mostrando interface com pontos de fusão entre o enxerto e o leito receptor onde nota-se células osteoblásticas alinhadas em atividade (setas pretas). Há presença de osteócitos na matriz próxima a interface (setas brancas). Coloração HE com aumento de 200x..... 81

Figura 12 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno em uma das extremidades do bloco enxertado mostrando aumento dos pontos de fusão na interface. Coloração de HE com aumento de 50x. ... 82

Figura 13 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno em maior aumento na extremidade do bloco mostrando incorporação do enxerto em alguns pontos (seta preta). Nota-se ainda presença de

- inúmeros osteócitos no interior da matriz do tecido enxertado (seta amarela). Coloração HE com aumento de 100x. 83
- Figura 14 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno mostrando um aumento maior da figura anterior onde nota-se fusão entre o leito receptor e o enxerto sem linha de continuidade. Percebe-se presença de osteócitos na matriz na região enxertada (seta preta). Coloração HE com aumento de 200x. 84
- Figura 15 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando integração do enxerto na interface com inúmeras áreas de tecido medular entremeadas com tecido mineralizado. Coloração HE com aumento de 50x. 85
- Figura 16 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando integração do enxerto na interface. Nota-se presença de intensa atividade osteoblástica (seta preta). Coloração HE com aumento de 100x. 85
- Figura 17 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando presença de inúmeros osteoblastos alinhados tangenciando a superfície externa do enxerto (setas pretas). Nota-se ainda presença de osteócitos no interior da matriz mostrando vitalidade no tecido (setas brancas). Coloração HE com aumento de 200x. 86

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Cronograma da pesquisa.....	74
Tabela 1 - Média \pm Desvio padrão entre os grupos experimentais com relação à presença de osteócitos nas lacunas na interface dos enxertos.	87
Tabela 2 - Média \pm Desvio padrão entre os grupos experimentais com relação à presença de osteócitos nas lacunas na região mediana dos enxertos.	87
Tabela 3 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para presença de osteócitos na interface dos enxertos.	88
Tabela 4 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para presença de osteócitos na região mediana dos enxertos.	88
Tabela 5 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos dentro do grupo autógeno nos diferentes períodos, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença entre as médias.	89
Tabela 6 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos dentro do grupo alógeno nos diferentes períodos, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença entre as médias.	89
Tabela 7 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos entre os grupos estudados, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença média.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATB	= <i>American Association of Tissue Bank</i>
BMP	= Proteína morfogenética óssea
CDC	= <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
EDTA	= Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	= <i>Food and Drug Administration</i>
FDBA	= Osso alógeno seco e congelado
HIV	= Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	= <i>Human T lymphotropic virus type 1</i>
MDAF	= Fator angiogênico derivado do macrófago
MDGF	= Fator de crescimento derivado do macrófago
MHC	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PDGF	= Fator de crescimento derivado de plaqueta
PRP	= Plasma rico em plaquetas
PTFE	= Politetrafluoretileno
ROG	= Regeneração óssea guiada
UNIOSS	= Banco de tecido músculo-esquelético - Universidade de Marília

Macedo LGS. Reparação óssea em enxerto alógeno fresco congelado na calvária de coelhos: análise histológica e histomorfométrica. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A utilização de enxerto ósseo autógeno previamente à instalação de implantes osseointegráveis tem apresentado bons resultados, entretanto, a necessidade de uma segunda área cirúrgica como fonte doadora e o grau de morbidade da técnica têm direcionado a busca por alternativas seguras para a reconstrução óssea. O propósito desta pesquisa foi avaliar o efeito do enxerto de osso alógeno fresco congelado, oriundo de Banco de Tecido, em comparação ao autógeno no processo de reparação de enxertos na calvária de coelhos. Foram utilizados 15 coelhos adultos, nos quais foram realizados 2 enxertos em blocos nos ossos parietais, divididos aleatoriamente nos seguintes grupos de acordo com o tratamento: autógeno (A – enxerto com osso autógeno) e alógeno (B – enxerto com osso alógeno processado em Banco). Decorridos 15, 30 e 60 dias, 5 animais foram sacrificados por período, sendo as peças contendo os enxertos processadas para análises histológica e histomorfométrica. Os resultados foram submetidos ao teste RM ANOVA e de comparação múltipla de Tukey, demonstrando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e entre os tempos estudados. Concluímos que o enxerto alógeno promove formação óssea, porém em menor quantidade e de forma mais lenta em comparação ao enxerto autógeno.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Transplantes ósseos. Implantes dentários. Bancos de ossos. Enxerto alogênico. Homoenxerto.

Macedo LGS. *Repair of fresh frozen bone allograft in the calvaria of rabbits: histologic and histomorphometry analyses. [thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.*

ABSTRACT

The use of autogenous bone graft prior to installation of dental implants has shown good results, however, the need for a second surgical site and donor source and degree of morbidity of the technique have led the search for safe alternatives to bone reconstruction. The purpose of this study was to evaluate the effect of allogeneic bone graft, fresh frozen from Bank of tissue, as compared to autograft in the repair of calvarial grafts in rabbits. A total of 15 adult rabbits, in which grafts were performed in two blocks in the parietal bone were divided randomly into four groups according to treatment: autogenous (A - with autogenous bone graft) and allogeneic (B - allogeneic bone graft processed in Bank Bone). After 15, 30 and 60 days, five animals were sacrificed by period, and the pieces containing the grafts were processed for histology and histomorphometry. The results were submitted to the RM ANOVA and Tukey's multiple comparison, statistically significant differences between groups and between time points. We conclude that allograft promotes bone formation, but fewer and more slowly compared to autografts.

Keywords: Bone graft. Bone transplantation. Dental implants. Bone Banks. Allogeneic graft. Homograft.

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação de pacientes desdentados parciais e/ou totais, com a utilização de implantes osseointegrados, tem demonstrado bons resultados longitudinais desde a descoberta do processo da osseointegração e apresentação dos resultados dos trabalhos de Adell et al. (1981). Contudo para a correta instalação dos implantes faz-se necessária a presença de tecido ósseo remanescente em espessura e altura suficientes para a reconstrução estética e funcional do paciente.

Após a perda dental o tecido ósseo remanescente começa a ser reabsorvido em virtude da perda de estímulo proveniente do esforço funcional da mastigação, anteriormente transmitido ao tecido através das fibras do ligamento periodontal. A extração dental leva à formação de defeitos ósseos residuais que muitas vezes impossibilitam a colocação dos implantes, não só pela diminuição do volume, mas também pela alteração de qualidade do tecido. Além disso, patologias ósseas, trauma local e doenças periodontais podem ocasionar não somente a perda do elemento dental, como também do tecido ósseo remanescente (Barber, 1993; Breine, 1980). Esses mesmos autores demonstraram haver um grau de atrofia da ordem de 20 a 30% nos primeiros seis meses após a extração do elemento dental, podendo alcançar valores próximos a 60% de perda de volume em um período de 3 e 5 anos.

As técnicas de reconstrução do rebordo ósseo residual com os procedimentos de enxertos ósseos autógenos, descritas na literatura, têm sido bem sucedidas, com ganho ósseo em volume que permite a instalação dos implantes de maneira adequada, promovendo a reabilitação funcional e estética dos pacientes (Ebraheim et al., 1997). No entanto, os procedimentos com enxertos autógenos, mesmo sendo os

mais utilizados e considerados biologicamente o padrão ouro, requerem algumas particularidades como a necessidade de uma segunda área cirúrgica para a doação tecidual, que, dependendo da quantidade de material necessário para a reconstrução, podem ser de fontes intra ou extraorais. Além disso, os enxertos autógenos ainda necessitam de um tempo cirúrgico adicional para o tratamento em vista das duas ou mais áreas envolvidas no mesmo procedimento (Misch, 1992).

Os enxertos ósseos provenientes de fontes intra-orais são considerados como fontes de escolha durante o planejamento das reconstruções dos defeitos ósseos, apresentando facilidade de acesso, boa quantidade de material, possibilidade de se realizar o procedimento em âmbito ambulatorial, além de apresentarem baixas taxas de reabsorção, em torno de 12 a 19% segundo Scivittaro (2005) e ainda podendo alcançar até 25% segundo Misch (1997). Entretanto, dependendo da extensão do procedimento e necessidade de reconstrução, as fontes intra-orais tornam-se insuficientes para doação necessitando de material complementar que pode ser obtido a partir de uma fonte mais distante extraoral.

Os enxertos ósseos de fontes extraorais, principalmente provenientes das cristas ilíacas anterior e posterior, têm sido muito utilizados nas grandes reconstruções na reabilitação dos pacientes (Ebraheim et al., 1997; Harbon et al., 1991). Além da crista ilíaca, outras áreas também têm sido usadas como a tíbia, a calota craniana e ainda a epífise femural, relatada recentemente na literatura (Vos, 2009). No entanto, essas situações necessitam de um ambiente hospitalar, uma equipe médica composta por anestesistas, ortopedistas e neurologistas, e muitas vezes o procedimento é realizado sob anestesia geral, o que pode ser um desconforto para grande parte dos pacientes, além de acarretar um custo adicional.

As desvantagens descritas na literatura em relação aos enxertos autógenos, principalmente os provenientes de fonte extraoral

são as complicações trans e pós-operatórias relatadas, como parestesias temporárias, disestesias, infecções, fratura de crista ilíaca, hemorragias, dores e desconforto na locomoção (Neo et al., 2000). Dessa maneira, segue-se a busca pela utilização de algum material que possa substituir o osso autógeno na técnica de reconstrução do rebordo ósseo, possibilitar a formação de uma estrutura adequada para o crescimento e a reparação óssea e permitir a posterior instalação de implantes (Cosmo et al., 2007; Macedo et al., 2007).

A utilização dos enxertos alógenos com osso fresco congelado humano tem sido descrita nos procedimentos ortopédicos em defeitos na coluna vertebral, pseudoartroses, artroplastias, reconstruções articulares e na área da oncologia para o tratamento de lesões extensas em pacientes portadores de osteomielites e tumores ósseos (Schreurs et al., 1998).

Na década de 90, Perrott et al. (1992) apresentaram um estudo onde foi utilizada a reconstrução óssea com osso humano fresco congelado isoladamente e em combinação com osso autógeno para posterior reabilitação com implantes osseointegrados. Os resultados encontrados não mostraram diferenças estatisticamente significantes, demonstrando um percentual de sobrevivência de 96,5% com implantes já submetidos à carga funcional.

Outros autores demonstraram a eficácia da utilização do enxerto ósseo com utilização de osso alógeno congelado previamente à instalação de implantes osseointegrados, mostrando ausência de processos infecciosos, volume de tecido ósseo adequado e boa densidade do tecido após remodelação, permitindo estabilidade inicial dos implantes e sucesso com implantes submetidos à carga funcional (Petrungaro, 2005).

Em um estudo multicentro Keith et al. (2006) realizaram 82 procedimentos de reconstrução óssea maxilomandibular em 73 pacientes com a utilização de blocos de osso alógeno. Os pacientes

receberam implantes osseointegrados após 4 a 6 meses de realização dos enxertos e foram acompanhados por até 36 meses após a instalação das próteses. No momento da colocação dos implantes, 69% dos blocos não apresentavam sinais de reabsorção, enquanto 31% mostraram valores variando até 2 mm. Histologicamente, os enxertos apresentaram sinais avançados de remodelação e incorporação após 6 meses. Os autores concluíram que apesar dos excelentes resultados obtidos, clínica e histologicamente, ainda são necessários mais estudos para entender melhor os processos de reparação e remodelação, inclusive com um tempo mais longo de avaliação para comprovar a eficácia do material.

Buscando avaliar o comportamento em longo prazo de implantes em maxila e mandíbula previamente reconstruídas com uso de enxerto alógeno fresco congelado, alguns estudos mostraram altos índices de sucesso, aproximadamente 99% utilizando 133 implantes (Viscioni, 2009) e 96,8% em outro estudo com 63 implantes (Carinci, 2009).

Alguns autores como Shafiei (2009) mostraram a formação óssea em nível histológico e radiográfico do osso alógeno em animais, comparando-o com o uso do enxerto autógenos. Nesse estudo mostraram que há formação óssea com material alógeno, porém, mais lenta quando comparada ao enxerto autógeno.

A eficácia do biomaterial alógeno tem sido comprovada recentemente. D´Aloja (2011) avaliaram pelo período médio de 20 meses, os resultados de 14 casos clínicos de enxertos ósseos alógenos congelados e posterior instalação de implantes osseointegrados. Os resultados mostraram satisfação no volume ósseo alcançado e na reabilitação com os implantes instalados.

Apesar dos bons resultados demonstrados em vários estudos, a literatura ainda apresenta inúmeros questionamentos sobre o comportamento do material alógeno, e poucos são os estudos científicos demonstrando a conduta do osso fresco congelado durante o processo de

reparação e incorporação dos enxertos, formação óssea e análises de reabsorção do material.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biologia dos enxertos ósseos

Em meados de 1975, Enneking et al. (1975). expressaram dúvidas com relação à aceitação dos enxertos autógenos por parte dos pacientes receptores. Sendo assim demonstraram que os enxertos têm seu processo de cicatrização fundamentado em dois aspectos: a primeira teoria mostra a formação óssea através das células osteogênicas que permanecem vivas no enxerto como os osteoblastos da superfície, além do conteúdo da medula óssea. O restante do enxerto passa por um processo de necrose e remodela. Dessa forma, as células são as responsáveis pelo início do processo, o que já demonstra o atraso no início da reparação dos enxertos alógenos. A segunda teoria explicaria a formação óssea dos enxertos autógenos e alógenos não dependentes do início mediado por células, mas, sim através de um processo de metaplasia das células dos tecidos ao redor do enxerto, ou seja, há uma conversão irreversível das células. O processo, ocorrendo simultâneo à liberação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) promove a nova formação óssea, deixando a estrutura dos enxertos autógenos e alógenos funcionando como um arcabouço.

No início de 1983, Burchardt (1983) publicou sobre o processo biológico que envolve o procedimento de enxerto ósseo. Relatou a importância do sítio receptor para a incorporação do enxerto, dando ênfase aos seguintes fatores: proliferação de células indiferenciadas, diferenciação celular em células osteogênicas, osteoindução, osteocondução e propriedades biomecânicas do enxerto. O autor demonstrou que a incorporação do enxerto ocorre por meio de *creeping substitution*, ou seja, a substituição gradual do osso necrótico

por novo osso, mostrando as diferenças entre a incorporação dos enxertos com osso esponjoso e osso cortical. O enxerto com característica esponjosa apresenta rápida vascularização, cerca de algumas horas, devido às anastomoses existentes entre os vasos do sítio receptor, podendo estar completamente revascularizado em duas semanas. O processo de remodelação ocorre primeiramente à custa de osteoblastos, formando osso ao redor do osso necrótico e o enxerto se remodela completamente, tendo sua resistência mecânica aumentada com o passar do tempo, à medida que vai sendo incorporado. Já o enxerto cortical, mostrou revascularização lenta devido à sua estrutura, sendo que a fase inicial necessita da presença de osteoclastos para criar cavidades, reabsorvendo osso, que permitam a invasão de vasos e posteriormente de células no interior do enxerto. Segundo o estudo esse processo permaneceu nas primeiras duas semanas, quando então teve início a fase de atividade de osteoblastos. O enxerto cortical não remodelou completamente, permanecendo durante anos uma mistura de osso viável e osso residual. Com relação à resistência mecânica nos enxertos corticais, houve uma diminuição com o passar do tempo devido às porosidades criadas no seu interior pela presença de osteoclastos, podendo chegar a 40% em seis semanas e normalizando em seis meses. Ressaltou ainda que para obter sucesso com enxertos, há necessidade de contribuição tanto das células provenientes do enxerto como do leito receptor.

Comparando os enxertos autógenos com os enxertos alógenos, Goldberg e Stevenson (1987) demonstraram que independente do tipo de enxerto a ser realizado, as fases de reparação foram semelhantes. Basicamente a reparação é composta por cinco fases: reação inflamatória aguda, onde há chegada de células durante as primeiras semanas. A segunda fase é a vascularização, na qual células provenientes do leito receptor, juntamente com nutrientes chegam ao local do enxerto. A terceira fase é a osteoindução, onde há diferenciação de

células indiferenciadas em osteoblastos, que irão produzir matriz óssea. Essa fase é mediada pelas BMPs presentes no enxerto. A quarta fase, a osteocondução, na qual há invasão de vasos e células no interior do enxerto, que serve de arcabouço para a formação do novo osso. Esse processo pode demorar até alguns anos para se completar, dependendo do tipo de enxerto. Por último, tem-se a fase de remodelação do enxerto. Nos casos dos enxertos alógenos, os autores demonstraram haver demora a partir da fase de osteoindução, pois além da falta de disponibilidade de BMPs para estimular a diferenciação celular, houve a presença de reação imunológica local que não impediu, mas atrasou a sua incorporação.

Marx e Garg (1998) estudaram o metabolismo do tecido ósseo frente à instalação e reconstrução com enxertos ósseos autógenos, descreveram as fases de reparação e incorporação dos enxertos. Quando um enxerto autógeno é instalado, células osteogênicas e fatores de crescimento são transplantados ao local. Em razão da condição de hipóxia do enxerto (3 a 10 mmHg) e do pH ácido criado no local (4 a 6), cria-se uma condição para quimiotaxia dos macrófagos, os quais são estimulados a secretar o fator angiogênico derivado do macrófago (MDAF) e o fator de crescimento derivado do macrófago (MDGF). Algumas horas após, há liberação do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e, posteriormente, ocorre degeneração das mesmas. Com esses fatores de crescimentos liberados, inicia-se a vascularização através de novos capilares e dos adjacentes, os quais podem ser vistos no interior dos enxertos após o terceiro dia. Com isso, diminui a liberação dos fatores de crescimento PDGF e a liberação dos MDGF. Durante os primeiros cinco dias há sobrevivência dos osteoblastos e células tronco da medula óssea pela absorção de nutrientes dos sítios receptores, o que não ocorre com os osteócitos que começam a morrer. Após 7 dias, começou a produção de matriz osteóide pelas células tronco da medula e osteoblastos e entre 10 e 14 dias a rede vascular do enxerto estava

completa. Começou a aumentar a tensão de oxigênio local e com isso maior produção de matriz osteóide. Com 3 a 4 semanas, o enxerto estava totalmente vascularizado, ilhas de matriz osteóide puderam ser vistas no interior da estrutura do enxerto, caracterizando a sua utilização como um arcabouço para a formação de novo osso - processo que tem sido denominado de osteocondução. Entre 4 e 6 meses, estava praticamente regenerado, com bastante produção de matriz osteóide e mineralização. Após esse período, houve a regeneração do perióstio que se encontrava com suas funções já normalizadas, permitindo que o enxerto pudesse ser colocado em função, ou seja, os implantes já podem ser instalados a partir desse momento.

Visando entender melhor o comportamento dos vários tipos de enxertos ósseos frente a um processo de fratura, Stevenson et al. (1998) avaliaram alguns conceitos em enxertia óssea. Citaram que um enxerto deve apresentar a somatória de alguns fatores para compor sua atividade biológica própria, entre os quais a presença de células e seus produtos, a capacidade de ativar os tecidos circunvizinhos, a propriedade osteoindutiva mediada por fatores de crescimento e a habilidade de suportar a invasão celular e vascular através do processo de osteocondução. Revisaram os conceitos de osteogênese, ou seja, processo de formação de novo tecido ósseo em virtude da presença de células no interior do enxerto ou no tecido vizinho. A osteoindução, que caracteriza a capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas dos tecidos vizinhos e estimular a formação óssea. A osteocondução, que corresponde à capacidade do enxerto em permitir a invasão de vasos e células durante o processo de reparação orientada por sua arquitetura tridimensional. Comentaram ainda sobre o fato dos enxertos autógenos possuírem rápida vascularização e incorporação devido à presença de células e fatores de crescimento em seu interior, não dependendo do sítio receptor para obtenção de sucesso. No entanto, enxertos alógenos não possuem

células e nem componentes proteicos que foram perdidos durante o seu processamento, apresentando somente osteocondução e com reparação e incorporação mais lenta. No entanto, como o processo de incorporação dos enxertos alógenos não apresentou fase de reabsorção, eles não perdem resistência mecânica durante a reparação. Concluíram, reenfatizando, que um enxerto pode falhar se apresentar um dos seguintes fatores: falta de vascularização, deficiências de estabilidade e resistência à micromovimentação durante a fase de reparação.

Procurando elucidar melhor um dos processos de reparação de enxertos ósseos, Cornell et al. (1998) demonstraram ser a osteocondução um processo em que a arquitetura tri-dimensional do tecido ósseo através de suas porosidades possibilita a invasão de células e vasos, permitindo a formação óssea no interior das porosidades. A influência desse fenômeno foi descrita pelos autores quando compararam a reparação dos ossos medular e cortical. No osso cortical, houve uma fase inicial de reabsorção para abertura de canais ou porosidades para permitir a invasão vascular e celular, com uma formação óssea de forma mais lenta. Já nos enxertos esponjosos, o processo ocorre de forma mais rápida uma vez que não há necessidade de reabsorção inicial. Demonstraram ainda os resultados satisfatórios com biomateriais sintéticos que apresentaram porosidades de dimensões semelhantes ao tecido ósseo humano. Os autores concluíram que o processo de osteocondução foi extremamente importante para a formação óssea e dependente principalmente da estrutura física do tecido ou material.

Em razão da importância da busca por uma alternativa ao material autógeno para a reconstrução de defeitos ósseos, Smiler (2006), enfatizaram que, para se alcançar um bom resultado, a avaliação de três fatores se faz necessária durante o planejamento: o material a ser utilizado, a técnica cirúrgica e o local receptor. Fazendo essa análise os autores enfatizaram a necessidade de um bom material osteocondutor para permitir a invaginação vascular e celular nas primeiras fases da

reparação. Portanto, chamaram a atenção para a necessidade de osso esponjoso medular, que apresenta 8 vezes mais área de superfície em comparação ao autógeno cortical e que, portanto, foi responsável por 60% do potencial de reparação óssea. Ressaltaram ainda que, é de extrema importância o potencial de vascularização do sítio receptor, uma vez que a reparação depende da vascularização, fonte de nutrientes e células para a formação do ciclo. Ainda em relação à vascularização, chamaram a atenção para a importância da estabilidade do material, uma vez que o caminho a ser percorrido por vasos e células é o coágulo de fibrina que deverá estar íntegro e estável. A mesma integridade e estabilidade foi recomendada nos tecidos moles, tanto para proteção dos enxertos quanto para a reparação, uma vez que o periósteo intacto pode representar até 10% do potencial de reparação de um enxerto ósseo. Dessa forma, os autores concluíram que não se pode selecionar uma técnica ou então um material para todos os casos e a qualidade do sítio receptor consiste em um fator primordial no planejamento da reconstrução óssea.

2.2 Enxertos ósseos autógenos

Na tentativa de solucionar problemas de rebordos reabsorvidos em desdentados, Breine (1980) mostraram uma técnica de reconstrução do tecido ósseo perdido simultâneo à instalação de implantes osseointegrados que pudesse distribuir as forças da mastigação para o tecido ósseo e evitar a reabsorção dos enxertos. Foram tratados 18 pacientes que receberam enxertos provenientes da região da tíbia e implantes com comprimentos variados entre 7 e 10mm. Dos implantes inicialmente instalados, somente 25% permaneceram integrados, tendo sido colocados novos implantes, os quais apresentaram sucesso de 75%.

Os autores concluíram que apesar das perdas iniciais de implantes, o enxerto possibilitou a instalação de outros para a reabilitação dos pacientes, além dos implantes servirem para proteção de sua reabsorção.

Avaliando a crista ilíaca anterior como uma importante área doadora de enxertos para reconstruções de defeitos, Brazaitis (1994) relataram algumas das complicações existentes com esse tipo de procedimento. Entre as mais comuns citaram a dor, infecções e hematomas. Outras não tão comuns foram relatadas como possíveis de se encontrar nesse tipo de procedimento como fratura, neuropatias e parestesias. Os autores ainda relataram um caso clínico de ocorrência de hemorragia retroperitoneal severa que levou o paciente a morte. Apesar das complicações existentes, os autores relataram ser a crista ilíaca uma importante área doadora de enxerto.

Buscando descrever alguns conceitos de enxertos ósseos, Triplett (1996) demonstraram os diversos tipos de reconstrução dos defeitos ósseos e suas experiências com as referidas técnicas. Chamaram a atenção para a necessidade de se instalar implantes sobre os enxertos com a finalidade de promover estímulo e diminuir a reabsorção dos mesmos. Preconizaram os enxertos *inlay* para pequenos defeitos de rebordo alveolar, enxertos *veneer* para os defeitos de espessura óssea, enxertos *onlay* para regiões onde se necessita reconstruir espessura e altura ósseas. Demonstraram ainda resultados de 129 enxertos autógenos realizados em 99 pacientes, apresentando índice de sucesso nos enxertos de 90,7%. Concluíram que os procedimentos de enxertos ósseos autógenos mostraram resultados satisfatórios, no entanto, houve maior índice de fracasso com enxertos *onlay*, o que foi atribuído à dificuldade de recobrimento com tecidos moles, provocando exposição e infecção do mesmo. Concluíram ainda que implantes instalados simultaneamente aos enxertos fracassaram mais que implantes instalados tardiamente.

Misch (1997) relatando a necessidade da reconstrução óssea tipo *onlay* em algumas regiões da cavidade oral, comparou a utilização de enxertos provenientes da sínfise mentoniana e da região retromolar. Foram tratados 50 pacientes que necessitavam de enxertos ósseos, e a área doadora escolhida de acordo com a morfologia e tamanho dos defeitos. Os enxertos foram avaliados clinicamente nos quesitos tamanho, morfologia, incorporação, reabsorção, complicações pós-operatórias e instalação de implantes. Após o período de cicatrização de 4 a 6 meses, os resultados mostraram maior quantidade de enxerto proveniente da região de sínfise mentoniana, osso córtico-medular, em comparação ao osso cortical do ramo mandibular. Houve maiores complicações pós-operatórias nos enxertos provenientes da sínfise mentoniana, entre elas o edema, hematomas e alterações de sensibilidade. Todos os 50 enxertos foram incorporados com índice aproximado de 25% de reabsorção, mantendo qualidade óssea classificada entre tipo I nos enxertos de ramo e tipo II nos enxertos de sínfise. O autor concluiu que os enxertos provenientes da mandíbula apresentaram rápida incorporação, baixa taxa de reabsorção e com a região de ramo mandibular oferecendo maiores vantagens em comparação aos enxertos removidos de sínfise mentoniana.

Verhoeven (1997) publicaram um estudo clínico longitudinal sobre a utilização de reconstrução óssea de mandíbulas edêntulas reabsorvidas com técnica combinada de enxerto ósseo proveniente da crista ilíaca e a instalação simultânea de implantes. Foram tratados 13 pacientes de ambos os sexos que apresentavam maxila e/ou mandíbula atróficas necessitando de reabilitação. Enxerto do tipo córtico-medular foi removido da parede medial de crista ilíaca, adaptado de forma *onlay* para aumento vertical dos rebordos e estabilizado através da utilização de dois implantes rosqueados. Após 4 a 8 semanas, os pacientes foram reabilitados com próteses tipo sobredentaduras com encaixe por sistema de barra e clipe. Os enxertos foram avaliados

cl clinicamente pelos sinais e sintomas pós-operatórios, como deiscência de sutura, complicações após a cirurgia, reabsorção e perimplantite. Foram realizadas radiografias cefalométricas laterais para mensurar a região anterior de mandíbula e radiografias cefalométricas oblíquas para mensuração da região posterior da mandíbula. Durante o pós-operatório, 3 pacientes apresentaram deiscências de sutura e apenas 1 paciente apresentou sequestro ósseo no enxerto. Após 877 dias acompanhamento, 7 implantes mostraram sinais de perimplantite que não ocasionou a perda de implantes. Os resultados mostraram média de reabsorção de 48% na região anterior de mandíbula e de 37% na região posterior. Os autores concluíram que a técnica combinada de enxerto ósseo *onlay* e instalação simultânea de implante somente deve ser utilizada em casos bem selecionados em razão da quantidade de reabsorção demonstrada.

Para a reconstrução de maxila atrófica, Garg (1998) apresentaram um trabalho mostrando as vantagens, desvantagens e a técnica para utilização de enxerto ósseo proveniente da região mentoniana. Relataram a necessidade de se reconstruir a região anterior de maxila por causa do padrão ântero-posterior de reabsorção da arcada, presença de acidentes anatômicos como o canal nasopalatino e assoalho da fossa nasal, e ainda a necessidade de se instalar implantes de diâmetros e comprimentos ideais, compatíveis com a região a ser reconstruída. Apresentaram como vantagens da utilização da sínfise mentoniana a possibilidade de se realizar o procedimento em ambiente de consultório, acesso facilitado, quantidade de osso disponível e condição de se obter tecido ósseo cortico-medular, com baixo potencial de morbidade e de complicações pós-operatórias. No entanto, lesões do nervo mentoniano, e nos dentes anteriores inferiores podem ocorrer. Concluíram por um planejamento meticuloso para a avaliação da quantidade de enxerto necessário para reconstrução dos defeitos, fator determinante na escolha da região doadora.

Buscando entender a relação existente entre a origem embriológica e a reabsorção dos enxertos ósseos, Ozaki (1998) estudaram a diferença entre a configuração arquitetural dos tecidos provenientes de origem endocondral e membranosa. Mediante uma forma de separação dos tecidos cortical e esponjoso foram realizados três tipos de enxertos diferentes em 25 coelhos. Foram utilizados enxertos corticais membranosos, corticais e esponjosos endocondrais. Os resultados apresentados em 3, 8 e 16 semanas demonstraram um volume maior dos enxertos corticais, independente da origem embriológica. No entanto, os enxertos esponjosos de origem endocondral apresentaram maior grau de reabsorção. Os resultados mostraram diferença estatística significativa entre enxertos corticais e esponjosos e não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os enxertos corticais. Os autores concluíram que não existe diferença entre os enxertos no que diz respeito à origem embriológica, mas sim na sua arquitetura.

Miller (1999) em experiências com enxertos ósseos autógenos para reconstruções alveolares, avaliaram a necessidade de se reconstruir a área doadora, devido à extensão do defeito que permanece após a remoção de grandes volumes de tecido ósseo. Para isso, apresentaram um estudo comparativo entre duas técnicas diferentes de regeneração de áreas doadoras de enxertos autógenos. Nos defeitos apresentados utilizaram membranas absorvíveis, *Resolut*, de um lado e *Guidor*, de outro. Os resultados mostraram regeneração total dos defeitos com os dois tipos de membranas, formação óssea com resistência à sondagem e, histologicamente, os fragmentos demonstraram osso vital, desenvolvido, mineralizado e ausência de inflamação. Baseado nos resultados obtidos nesse estudo e nos resultados de outros, os autores concluíram que a regeneração dos defeitos após remoção dos enxertos deveria ser utilizada sempre em grandes defeitos. A não utilização de técnicas regenerativas pode ocasionar a cicatrização incompleta da região.

Zeiter (2000), percebendo a necessidade de se reconstruir defeitos ósseos alveolares para possibilitar a instalação de implantes, descreveram a técnica de enxerto ósseo com utilização da região de sínfise mentoniana como área doadora de escolha. Descreveram simultaneamente o processo de cicatrização que ocorre após a instalação de um enxerto ósseo. No processo de remoção do tecido ósseo da região mentoniana, os autores enfatizaram as vantagens de se realizar uma incisão horizontal perpendicular ao longo eixo dos dentes para se ter acesso à região. As incisões intra-sulculares poderiam levar a dificuldade de acesso, alterações nos tecidos moles ao redor dos dentes, principalmente, nos casos de presença de tábuas ósseas vestibulares delgadas, ou ainda, a presença de deiscências e fenestrações. Os autores recomendaram a utilização de uma membrana absorvível para fechamento da área doadora e a sutura do local em dois planos, diminuindo a probabilidade de ruptura de sutura, exposição e infecção do local. Durante o processo de cicatrização, ressaltaram a necessidade de boa adaptação e estabilização do enxerto, permitindo a vascularização pelos tecidos vizinhos e a neoformação óssea. Relataram ainda que os enxertos corticais levam muito tempo para se remodelar e ser substituído por novo osso, processo que dependerá do tipo de estímulo a que esse tecido estará sendo submetido.

Nkenke (2001) trataram 20 pacientes para realização de procedimentos de enxertos ósseos com a utilização de tecido ósseo proveniente da região mentoniana. O objetivo do estudo foi avaliar o grau de morbidade desse tipo de procedimento pela utilização de testes de função sensorial do nervo alveolar inferior e de vitalidade nos dentes 35 e 45 nos períodos pré-operatório, 7 dias, 1, 3, 6 e 12, no pós-operatório. Os resultados mostraram 8 áreas com parestesia parcial e 1 área com hiperestesia do nervo alveolar inferior após 1 semana e 1 mês no pós-operatório. A parestesia parcial foi encontrada após 12 meses de controle em apenas 02 pacientes, demonstrando ter ocorrido regeneração na

maior parte dos casos após 12 meses. Os resultados também mostraram a falta de sensibilidade no lábio inferior, no entanto, a regeneração e o retorno da sensibilidade ocorreram antes da regeneração da região da sínfise mentoniana. Houve sensibilidade pulpar nos dentes localizados mais distalmente, no entanto, a função total de polpa dental não foi afetada. Os autores concluíram que, apesar da região de sínfise mentoniana ser considerada durante os procedimentos de reconstruções ósseas, complicações podem ocorrer da mesma forma que ocorrem em outras áreas doadoras.

Proussaefs (2002) apresentaram um estudo de avaliação clínica, radiográfica, histológica, histomorfométrica e de reabsorção após utilização de enxerto ósseo autógeno em blocos, proveniente da região mandibular, para reconstrução vertical do rebordo ósseo, com a utilização de mistura de osso autógeno e matriz inorgânica mineral bovina (Bio-Oss) na periferia do enxerto. Após um período de 4 a 8 meses após a realização dos enxertos ósseos, os 8 pacientes foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para a instalação de implantes. Nesse momento, um fragmento de 2mm de tecido ósseo foi colhido para a avaliação histológica e histomorfometria. Em seus resultados, os autores encontraram deiscência de sutura com conseqüente exposição dos enxertos em 3 dos 8 casos realizados, sendo que em apenas 1 caso houve necessidade de remoção de parte do enxerto por motivo de necrose. Clinicamente, todos os enxertos foram classificados em tipo I e II (classificação de Lekholm e Zarb 1985) em relação à qualidade e a porção onde houve mistura de osso autógeno e bovino se apresentava clinicamente incorporada. Histologicamente, os fragmentos mostraram sinais de tecido ósseo vitalizado, mineralizado e com sinais de remodelação, no entanto, em todos os casos houve fragmentos de partículas do osso mineral bovino (Bio-oss). Somente nos casos onde houve exposição parcial do enxerto o resultado histológico demonstrou sinais de inflamação e necrose. Radiograficamente, os resultados

mostraram aumento de 6,12 mm após 1 mês da realização dos enxertos e 5,12 mm após 6 meses. Após análise dos resultados, os autores concluíram pela viabilidade de se utilizar osso proveniente da região de ramo mandibular para aumentos verticais, com ganho médio de 5,12 mm e taxa de reabsorção média de 17%.

Kainulainen (2002) descreveram uma técnica de remoção de osso da região zigomática para a reconstrução de defeitos ósseos alveolares com a apresentação de 3 casos clínicos. Após as técnicas anestésicas infiltrativas, realizou-se uma incisão 5 mm acima da junção mucogengival, na região entre primeiro e segundo molares estendendo até região de pré-molares para obter acesso até a metade inferior do corpo do osso zigomático. Com a utilização de brocas tipo trefina para remoção do osso, inclinando-a em 45° com o plano oclusal, coletou-se o tecido ósseo, não estendendo mais que 14 mm em comprimento, coletando osso cortical e, posteriormente, o osso medular com curetas. Concluíram que a utilização de enxertos provenientes da região zigomática pode ser considerada como uma boa alternativa para a reconstrução de pequenos defeitos, cerca de 1 a 2 dentes, utilizados em combinação com outras áreas doadoras, e além disso, apresenta acesso facilitado com baixos índices de complicações pós-operatórias.

Em vista dos índices de sucessos descritos na literatura com a utilização de implantes osseointegrados, McCarthy (2003) avaliaram o sucesso de implantes instalados em região anterior de maxilas previamente reconstruídas com enxertos ósseos tipo "onlay". Foram avaliados 17 pacientes após 02 procedimentos de enxertos simultâneos à instalação dos implantes e 15 enxertos que foram deixados em cicatrização por um período médio de 19,7 semanas. Os pacientes foram submetidos à instalação de 35 implantes que depois de reabilitados com próteses, seguiram acompanhados por um tempo médio de 153,6 semanas. Os resultados mostraram apenas uma falha em implante que foi instalado simultaneamente ao procedimento de enxerto ósseo.

Concluíram ser a técnica de enxerto necessária para instalar implantes, melhorando a estética, e que a taxa de sucesso de implantes colocados em maxilas previamente enxertadas foi similar àquela descrita na literatura.

Kaufman (2003) apresentaram um relato de caso clínico utilizando enxertos autógenos de fonte intraoral para o aumento vertical de rebordo em regiões estéticas. Relataram a importância da classificação do rebordo de acordo com a perda óssea horizontal e/ou vertical no prognóstico do caso clínico. Após a extração dental, a localização do rebordo residual se encontrava a 7 mm da junção esmalte-cimento dos dentes vizinhos, de um lado, e 6 mm do lado oposto. Foram removidos dois cones de osso coletados da região da sínfise mentoniana e posicionados nos locais receptores juntamente com osso alógeno congelado desidratado e desmineralizado (DFDBA) e membrana com reforço de titânio. Após 5 meses conseguiram um ganho ósseo de 5 mm do lado direito e 4 mm do lado esquerdo. Baseados nos resultados obtidos concluíram que se consegue até 5 mm em altura com utilização de enxertos autógenos.

Orsini (2003) apresentaram um trabalho com avaliação clínica e histológica do uso de enxertos ósseos provenientes da calvária para reconstrução de defeitos ósseos em região de maxila. Foram utilizados dois casos clínicos, nos quais realizaram enxertos provenientes da calvária, deixando um tempo de cicatrização de 4 meses antes da instalação dos implantes. Instalaram 15 implantes que permaneceram submersos durante 5 meses, tendo sido reabilitados inicialmente com próteses provisórias por 3 meses, e, posteriormente, com próteses definitivas. Os implantes foram acompanhados durante 15 meses após terem sido colocados em função. Os resultados não mostraram sinais de infecção, sangramento, dores, ou problemas neurológicos na área doadora de enxerto. Os enxertos apresentaram sinais de reabsorção após 4 meses, no entanto, mantiveram dimensões suficientes para instalação

dos implantes. Histologicamente, os tecidos mostraram sinais de osso trabecular mais denso que a porção preexistente, totalmente vascularizado, com sistema Harversiano e osteócitos no interior das lacunas. A histomorfometria demonstrou tecido ósseo em torno de 54,88% na região do enxerto contra 46,42% na região preexistente. Os autores concluíram ser a região da calvária uma excelente área doadora de enxerto devido a sua menor reabsorção, baixa morbidade em relação às outras regiões doadoras e rápida vascularização e incorporação em 4 meses.

Alt (2003) fizeram um estudo para avaliar a tibia de cadáveres humanos frescos como área doadora potencial de enxerto ósseo mediante a investigação da quantidade de volume conseguido. Após a remoção dos tecidos, as tíbias foram submetidas a testes de compressão e tensão para determinar o potencial de fratura dos ossos. Os autores conseguiram em média 5,35 cm³ de tecido ósseo, concluindo que a tibia pode ser usada como área doadora de enxerto considerável, sem grandes problemas aos pacientes e sem aumento no risco de fratura na área doadora.

O padrão de morbidade e as complicações pós-operatórias foram avaliados por Clavero (2003), em um estudo comparativo de enxertos ósseos provenientes de duas regiões intraorais diferentes: sínfise mentoniana e ramo mandibular. Foram utilizados 53 pacientes que receberam enxertos para aumento de rebordo ósseo e procedimentos de elevação do assoalho do seio maxilar. Todos os pacientes receberam um questionário para responder a 20 questões sobre dor pós-operatória, intensidade da dor, função, parestesias, dificuldade ao falar, abertura de boca, alimentação, ingestão de líquidos e outros sinais e sintomas. Os resultados dos questionários demonstraram maior sensibilidade dolorosa nos pacientes que receberam enxertos ósseos provenientes da região de sínfise. Com relação à alimentação, não houve diferença entre os grupos. Dificuldade de abertura de boca foi

mais encontrada nos casos de enxertos provenientes do ramo mandibular. Vinte e dois pacientes que receberam enxertos provenientes da sínfise mentoniana relataram maior alteração de sensibilidade contra 9 pacientes do grupo dos enxertos provenientes do ramo mandibular. Levando em consideração as questões respondidas pelos pacientes e, de acordo com considerações anatômicas de acesso, quantidade de osso disponível, os autores concluíram que ambas as áreas foram consideradas satisfatórias para os procedimentos de enxertos ósseos, no entanto, menores complicações foram encontradas nos pacientes que receberam enxertos provenientes da região de ramo mandibular.

Simion (2004) publicaram uma revisão da literatura sobre a utilização de enxertos ósseos para reconstruções alveolares da maxila e mandíbula usando osso autógeno e material xenógeno. Reforçaram em seu artigo os conceitos de osteogênese, que corresponde ao processo de formação óssea pela presença de osteoblastos, células vitais; osteoindução, que corresponde ao processo de estimulação para formação óssea através de fatores de crescimento e células mesenquimais indiferenciadas. E a osteocondução, relacionada ao processo de formação de um arcabouço, criando condições para que células e vasos sanguíneos penetrem no enxerto. Ressaltaram ainda que somente o osso autógeno apresentou essas propriedades. Com relação à utilização de enxertos xenógenos, afirmaram que eles possuem características físicas e estruturais que assemelham muito ao tecido ósseo, podendo ser utilizados para inúmeros casos de reconstruções ósseas.

Hernandez-Alfaro (2005) apresentaram um trabalho clínico demonstrando a possibilidade de se utilizar osso autógeno proveniente da região anterior do palato para reconstrução de defeitos de apenas um dente. Foram utilizados 17 pacientes que apresentaram defeitos horizontal, vertical ou combinados em rebordo que necessitavam de instalação de apenas 1 implante. Usando uma broca tipo trefina para

remoção do enxerto conseguiram obter, em média, enxertos de 5 a 9 mm de diâmetro por 9 a 14 mm de comprimento. Após a remoção dos enxertos, não houve relatos de desconforto por parte dos pacientes e não ocorreram complicações pós-operatórias. Existe a possibilidade de se lesar as raízes dos dentes vizinhos nesse tipo de procedimento, entretanto, o fato não ocorreu graças a margem de segurança deixada pelos autores e pelo paralelismo da broca trefina com as raízes dentais vizinhas, o que relataram ser de extrema importância com esse tipo de técnica. Os autores concluíram que a utilização de enxertos autógenos provenientes do palato pode ser uma alternativa interessante quando houver necessidade de reconstrução de pequenos defeitos, com baixa morbidade aos pacientes.

Perry (2005) apresentaram um estudo comparativo em cães, com a finalidade de se avaliar o contato osso-implante em regiões que receberam enxertos ósseos *onlay*, distração osteogênica e um grupo controle que não recebeu nenhum tipo de procedimento para aumento de rebordo ósseo. O estudo foi realizado em três fases: na fase 1 foram extraídos dentes pré-molares, segundos e terceiros molares dos animais e defeitos foram criados para simular a reabsorção do rebordo ósseo. Na fase 2, realizaram os enxertos ósseos *onlay* e no lado contralateral a técnica de distração osteogênica. Na fase 3, foram instalados os implantes 12 semanas após os procedimentos de aumento de rebordo. Após 8 semanas da instalação dos implantes, os animais foram sacrificados para a coleta de material para a avaliação histomorfométrica e apenas 1 cão foi perdido devido à exposição do dispositivo distrator. Os resultados mostraram não haver diferenças estatísticas significantes no contato osso-implante nas áreas que receberam distração osteogênica, enxertos *onlay* e grupo controle, com valores de $54\% \pm 14,6\%$, $53,8\% \pm 11,8\%$ e $51,2\% \pm 14,4\%$, respectivamente, demonstrando que ambas as técnicas podem ser consideradas previsíveis quanto à ancoragem de implantes.

Scivittaro (2005) apresentaram uma análise da reabsorção de enxertos ósseos tipo *onlay* em procedimentos de reconstrução de rebordo alveolar previamente à instalação de implantes osseointegrados, utilizando duas áreas diferentes intrabucais: a sínfise mentoniana e a região retromolar. Foram utilizados no estudo 20 pacientes divididos em dois grupos conforme a área doadora de enxerto. As avaliações foram realizadas no trans-operatório em dois pontos distintos do rebordo alveolar: a 1 mm e a 5 mm da crista óssea. As mensurações foram realizadas após a fixação dos enxertos e, após um período médio de 4 meses e meio, foram realizados os procedimentos para instalação dos implantes, momento em que realizaram novas mensurações. Após a avaliação dos resultados e análise estatística, os autores encontraram uma taxa média de reabsorção de 7,46% com enxertos provenientes da sínfise mentoniana e 12% nos enxertos de região retromolar. Não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos, quando avaliados a 1 mm da crista óssea, no entanto, houve diferença estatisticamente significativa quando avaliados a 5mm. Concluíram que, apesar das diferenças entre os pontos e entre as áreas doadoras, tanto a região mentoniana quanto a retromolar apresentaram resultados favoráveis nos procedimentos de reconstrução óssea.

Schwartz-Arad (2005), avaliaram as regiões intraorais doadoras de enxertos nas reconstruções de defeitos ósseos alveolares tipo *onlay*. Foram utilizados 56 pacientes, nos quais foram realizados 64 procedimentos de enxertos ósseos provenientes de diferentes áreas intraorais. Os enxertos foram acompanhados durante um período médio de $5,2 \pm 1,1$ meses, tempo em que os implantes foram instalados. Somente 8 enxertos foram classificados como falhas, por causa da exposição e remoção dos mesmos. Em 9 enxertos, foram encontradas complicações na região doadora durante o período de cicatrização. Mais complicações foram encontradas nos enxertos verticais, em comparação com os horizontais. Os resultados apresentaram média de aumento de

5,6% nos defeitos verticais, sendo 6,12% no primeiro mês e 5,12% nos 4 a 6 meses posteriores. Os autores concluíram que as regiões intraorais constituem áreas excelentes para doação de enxertos ósseos, sendo rapidamente vascularizadas e incorporadas aos tecidos preexistentes.

Buscando quantificar a disponibilidade de osso para a utilização de enxertos ósseos na região de ramo mandibular, Verdugo (2009) fizeram uma análise comparativa entre a mensuração clínica e os resultados obtidos com o software AutoCAD, usando as imagens de tomografia computadorizada. Foram analisados resultados comparativos de 10 pacientes e os mesmos foram significativamente diferentes. Os resultados mostraram que a região compatível com os segundos e terceiros molares apresentaram a maior espessura de cortical, aproximadamente 2,8 mm, e que a mesma região apresentou cerca de 2,5 ml de material particulado mensurado clinicamente, contra 0,8 ml do obtido com software. Os autores concluíram que a utilização de software de imagem para o planejamento de remoção de osso para enxerto não deveria ser indicado.

Como opção aos enxertos ósseos autógenos de fonte extra-oral, Amrani (2010), publicaram um estudo clínico, onde 12 pacientes foram reabilitados com enxertos ósseos autógenos provenientes de fonte intraoral combinada, ou seja, ramo mandibular e processo coronóide. Mostraram ser possível remover uma quantidade extensa de enxerto, aproximadamente o que se consegue obter da calvária, 19 x 18 x 26 mm e 6 mm de espessura. Os resultados mostraram bom volume ósseo formado, com apenas 1 caso de infecção pós-operatória que foi tratada. Em todos os casos os implantes foram instalados em duas fases, com aproximadamente 4 meses de realização dos enxertos. Quarenta e um implantes foram colocados e acompanhados após a reabilitação por um período médio de 59,6 meses. Os autores concluíram que a combinação das duas áreas doadoras promoveu uma

quantidade considerável de material que permitiu uma reconstrução extensa, evitando a busca em áreas mais distantes.

Mantendo a mesma metodologia do estudo anterior, os mesmos autores, Verdugo (2010), avaliaram a quantidade disponível de osso para enxertos ósseos quando o sítio doador foi a região de sínfise mentoniana. Realizaram análises clínicas e digitalizadas com utilização de software AutoCAD baseando-se nas imagens de tomografias computadorizadas em 40 pacientes. Os resultados clínicos mostraram a possibilidade de se remover até 2,3 ml de material contra 1,4 ml do mensurado digitalmente. Os resultados mostraram ser estatisticamente significantes e os autores concluíram, novamente, ser o software dispensável nos planejamentos para a seleção das áreas doadores de enxertos.

2.3 Enxertos ósseos alógenos

Visando buscar alternativas para a reconstrução óssea, Lane (1972) compararam clínica, radiográfica e histologicamente os enxertos ósseos autógenos e alógenos secos congelados no tratamento de defeitos mandibulares em macacos durante períodos de 16 e 22 semanas. Ambos mostraram sinais clínicos de incorporação, ausência de limites com osso residual, preenchimento de todo o defeito em comparação ao controle onde houve a manutenção da deformidade. Ao exame radiográfico, não constataram diferenças entre os enxertos antes de 10 semanas, entretanto, após esse período, os enxertos autógenos se apresentaram com bordas menos delimitadas e uniformemente menos radiopacos do que o material alógeno. Depois de 16 semanas as radiografias mostraram os enxertos autógenos com uma radiopacidade mais uniforme, enquanto, histologicamente encontraram sinais de

reabsorção e remodelação com atividades osteoblástica e osteoclástica, além da presença de células osteogênicas formando novo osso. Os enxertos alógenos mostraram sinais de reabsorção em algumas áreas, incorporação ao sítio residual, formação de novo osso, porém, com atraso no processo de remodelação. Os autores concluíram ser o osso alógeno seco congelado uma alternativa para o preenchimento de defeitos ósseos, sugerindo a não utilização dos dois tipos de enxertos no mesmo paciente porque as reações imunogênicas geradas por ele poderiam atrasar a incorporação do enxerto autógeno.

Na tentativa de evitar a amputação total dos membros, Parrish (1973) utilizou osso alógeno congelado a -20°C , lavados com antibióticos, na reconstrução de 21 casos de tumor extenso em ossos longos, submetidos ao procedimento cirúrgico de remoção parcial do membro e com manutenção de suas extremidades. Quando da avaliação dos pacientes por um período que variou de 17 a 148 meses os resultados mostraram a manutenção das extremidades em 16 casos. Um caso apresentou fratura do enxerto e a sua perda após 30 meses, outro paciente faleceu durante o estudo sete meses após o enxerto e três pacientes foram submetidos aos procedimentos de amputação. O autor concluiu que apesar da ocorrência de alguns resultados insatisfatórios, ainda se justifica a sua utilização em casos selecionados antes de se optar pela amputação do membro.

Um método de estudo comparativo foi realizado por Weiland (1984) que avaliaram radiográfica, histológica e biomecanicamente os enxertos autógenos, autógenos vascularizados e alógenos em defeitos criados no fêmur de 45 cães. As avaliações radiográficas foram realizadas nos períodos de uma semana, três e seis meses, quando os autores mostraram a incorporação em 25 dos 26 enxertos autógenos realizados e em dois dos cinco alógenos. Não observaram sinais de reabsorção nos materiais autógenos, ao contrário do que ocorreu nos alógenos durante o período de seis meses. Os testes

mecânicos mostraram maior resistência à fratura no fêmur controle, seguido pelos enxertos autógenos vascularizados, autógenos e com resultado mais baixo para os enxertos alógenos. Histologicamente os resultados foram semelhantes em todos os grupos experimentais, evidenciando-se áreas de necrose e formação óssea na periferia. Em relação à vascularização, os enxertos autógenos vascularizados com anastomoses cirúrgicas apresentaram incorporação total, enquanto nos avasculares autógenos a vascularização ocorreu em 6 meses. Nos alógenos não houve total vascularização em 6 meses, o que aconteceu somente nas porções superficiais dos enxertos. Os autores concluíram que os enxertos vascularizados cirurgicamente apresentaram melhores resultados que os outros tipos de materiais em decorrência da manutenção da viabilidade celular pela vascularização, o que não ocorreu nos demais tipos de enxertos.

Com o propósito de procurar um material que pudesse substituir o osso autógeno em reconstruções ósseas, Marx (1984) compararam a utilização de ossos particulados autógeno com o alógeno seco congelado mineralizado (FDBA) em 22 cães que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para a criação de defeitos na região do palato. Seis cães foram utilizados como controle, enquanto 16 receberam enxertos particulados autógeno num lado e FDBA no outro. Houve formação óssea no grupo controle, com sinais histológicos de osso vital mineralizado. Após seis meses, no grupo do osso autógeno particulado, em todos os defeitos, ocorreu formação óssea, comprovados histologicamente pela imagem de osso vital mineralizado, maduro e contendo osteócitos nas lacunas. No grupo alógeno, neste mesmo período, encontraram pouca formação óssea que ocupava radiograficamente apenas 30% do defeito, com grandes áreas de partículas do biomaterial não absorvidas. Quanto à densidade, o tecido ósseo normal apresentou $41\% \pm 0,9\%$, contra $38\% \pm 1,4\%$ do autógeno e $12,6\% \pm 2,9\%$ do FDBA..

Em razão da importância das propriedades físicas dos enxertos ósseos, Pelker et al. (1984) estudaram as influências da liofilização e do congelamento em diferentes temperaturas na resistência dos enxertos ósseos nas vértebras e nos fêmures de ratos. Os animais foram divididos em cinco grupos: ossos frescos, liofilizados, congelados a -20°C , congelados a -70°C e a -196°C em nitrogênio líquido. Nos resultados dos testes de torção e de compressão do osso, somente houve diferença estatística significativa com o processo de liofilização que apresentou queda de resistência com valores baixos de torque para provocar falhas. Os processos de congelamento em baixas temperaturas não influenciaram diferenças na resistência à torção ou compressão quando comparados com o osso fresco. Os autores concluíram que apesar do estudo não ter sido realizado em humanos, a avaliação do processamento foi válida para demonstrar que as reconstruções estruturais grandes, que receberão grandes cargas, devem ser tratadas com osso fresco, ou então, com osso congelado a baixas temperaturas sem remoção de água.

A influência dos vários tipos de esterilização dos enxertos sobre as suas propriedades osteoindutivas foi estudada por Munting (1988), em ratos. Os métodos utilizados foram a radiação gama com 2,5 Mrads, imersão em 0,18% de mertiolate, imersão em 15 ml de solução de glutaraldeído a 2%, embalados e expostos à formaldeído, embalados e expostos ao óxido de etileno. Os resultados mostraram que houve menor alteração no peso seco dos enxertos nos grupos controle e do mertiolate. Histologicamente, não houve formação óssea nos grupos do glutaraldeído e do formaldeído, somente nos grupos controle, óxido de etileno e da irradiação gama. Os melhores resultados foram encontrados com enxertos imersos em mertiolate porque não ocorreu alteração na sua capacidade indutiva. No entanto, os autores não recomendam a sua utilização pelo fato do mertiolate não ser efetivo contra esporos, portanto, um agente esterilizador inadequado. Os resultados com óxido de etileno

mostraram destruir a capacidade osteoindutora do enxerto, enquanto a irradiação com 2,5 Mrads demonstrou sinais histológicos de osteoindução por haver formação óssea na avaliação dos enxertos. Os autores concluíram que um método que pode ser utilizado como complementar na esterilização de enxertos foi a irradiação com doses de 2.5 Mrads, por não eliminar todo o potencial indutor dos tecidos.

Em vista do aumento do número de procedimentos reconstrutivos ortopédicos, Czitrom et al. (1988) comentaram sobre a importância do desenvolvimento e utilização de Bancos de Tecidos Ósseos. Comentaram sobre o valor do uso dos enxertos alógenos em casos de preenchimento de cavidades, tumores benignos e malignos, como também a combinação com o osso autógeno para aumentar a quantidade de osso disponível.

Buscando avaliar as alterações biomecânicas em diferentes tipos de enxertos ósseos, Itoman (1991) compararam, em ratos, as alterações ocorridas nos enxertos após diferentes tipos de processamento e intervalos de tempo. Foram comparados os enxertos autógenos frescos, alógenos frescos, alógenos congelados a -80°C , alógenos liofilizados e alógenos descalcificados. Os resultados mostraram uma diminuição da resistência à compressão após oito semanas em todos os enxertos e com aumento de 60 a 80% em 16 semanas. Radiograficamente os enxertos autógenos apresentaram melhores resultados, com ausência de limites definidos depois de 16 semanas. Com relação à análise histológica, em 24 semanas os enxertos autógenos mostraram os melhores resultados de incorporação óssea, seguido pelos enxertos congelados a -80°C , enxertos liofilizados e enxertos descalcificados. Os enxertos alógenos frescos apresentaram os piores resultados. Os autores concluíram que todos os enxertos ofereceram uma queda inicial de resistência e um aumento proporcional à sua incorporação, mostrando os melhores resultados com osso autógeno pela ausência de reação imunológica.

O potencial dos enxertos alógenos frescos congelados foi estudado por Perrott et al. (1992) em reconstruções na maxila e mandíbulas atróficas de 10 pacientes que receberam enxertos ósseos alógenos com ou sem a combinação com osso autógeno. Num período médio de $8,3 \pm 3,4$ meses de reparação dos enxertos, 29 implantes foram instalados, permanecendo submersos e reabilitados após $7,4 \pm 3,7$ meses. Os pacientes foram acompanhados durante $26,3 \pm 5,4$ meses e não mostraram sinais de complicações ou perda óssea ao redor dos implantes. Três casos apresentaram deiscência de sutura que não prejudicou o progresso do tratamento, um implante foi deixado submerso e outro foi removido, levando a reinstalação de um novo implante no local. Os resultados mostraram taxa de sucesso de 96,5% dos implantes e os autores concluíram ser o material uma excelente alternativa para a substituição do osso autógeno, entretanto, preconizaram a realização de estudos com avaliações em longo prazo.

O potencial de incorporação do osso alógeno fresco congelado foi testado por Thorén (1995) em coelhos após o uso do metanol e clorofórmio para a remoção da gordura do interior dos tecidos e diminuição da reação imunológica dos enxertos. A avaliação histomorfométrica e os testes biomecânicos mostraram que a remoção do tecido gorduroso melhorou a invasão de vasos e células no interior dos enxertos facilitando a incorporação do material alógeno e fazendo com que o processo de formação e reabsorção dos tecidos se iniciasse mais precocemente. Com relação aos testes biomecânicos, os resultados demonstraram não haver diferenças entre os enxertos com ou sem remoção do tecido gorduroso. Os autores concluíram que os enxertos alógenos congelados foram melhores e mais rapidamente incorporados quando da remoção do tecido gorduroso, no entanto, nos autógenos a remoção do tecido gorduroso não influenciou os resultados.

Na tentativa de demonstrar o potencial de transmissão de doenças pelos enxertos alógenos, Tomford (1995) publicou uma revisão

apresentando as possíveis infecções atribuídas aos materiais alógenos, o potencial de risco de infecção dos transplantes ósseos e a maneira de minimizar os eventuais riscos. Relatou que a grande dificuldade em se eliminar todas as possíveis infecções se deve ao período de incubação de alguns vírus que não apresentaram níveis detectáveis em testes sanguíneos. O autor declarou ainda que para a segurança desse tipo de material para enxertos deve-se seguir o protocolo elaborado pela *American Association of Tissue Bank (AATB)* em 1992, que determina normas de seleção de doadores, captação, processamento e utilização dos tecidos para transplantes. Assim sendo, concluiu que o risco de infecções com enxertos alógenos pode existir, porém, é extremamente pequeno.

Em um estudo realizado, Ott (1997) compararam a reconstrução de defeitos criados na tíbia de coelhos com utilização de osso alógeno fresco e osso alógeno irradiado com 25 kGy gama. Os defeitos foram avaliados após quatro, oito, 12 e 16 semanas radiograficamente e por microscopia de fluorescência utilizando marcadores ósseos. Os resultados radiográficos não mostraram diferenças entre os dois tipos de enxertos testados, no entanto, a microscopia de fluorescência demonstrou maior atividade óssea nos enxertos que foram irradiados. Os autores concluíram que os enxertos irradiados apresentaram uma alternativa mais segura por diminuírem o risco de transmissão de infecções e, conseqüentemente, menor reação imunológica durante a reparação.

Devido ao aumento no número de casos de reconstruções ósseas, Boyce (1999) reportaram sobre o histórico, a utilização e como o processamento dos enxertos alógenos influenciava na segurança e no comportamento do material. Descreveram que segundo o *Center of Disease Control (CDC)* dos Estados Unidos, há somente dois casos relatados com possibilidade de transmissão de HIV com o uso de enxertos alógenos, entretanto, não houve critérios de seleção dos

pacientes doadores. Os protocolos desenvolvidos pela AATB e, posteriormente, pela *Food and Drugs Administration* (FDA) diminuíram consideravelmente o risco de infecções após transplantes ósseos. Mostraram que a probabilidade de contaminação com transplantes ósseos é menor do que a encontrada em procedimentos rotineiros de transfusões de sangue. Com relação ao comportamento biomecânico dos enxertos, os autores mostraram que o congelamento com temperaturas até -147°C praticamente não altera a resistência à fratura e o módulo de elasticidade do material, no entanto, nos processos de liofilização há grande perda de resistência do material, assim como nos enxertos que sofreram altas doses de irradiação gama. Em decorrência dos protocolos de seleção dos doadores, dos testes sorológicos e o processamento realizados, concluíram que a utilização dos enxertos ósseos alógenos pode ser considerada uma alternativa segura e eficaz nos tratamentos de deformidades ósseas.

Para avaliar o risco de transmissão de HIV com o uso de transplantes ósseos, Campbell (1999) fizeram um estudo para verificar o método de irradiação gama como agente secundário de esterilização dos ossos alógenos. Os tecidos foram submetidos às cargas de 0 – 40 kGy de irradiação gama, com intervalos de 5 kGy, e analisados quanto às alterações citológicas presentes e por imunofluorescência. Os autores verificaram que a dose de inativação do HIV nos ossos foi de 35 kGy, porém, a dose para total esterilização do HIV nos tecidos foi de 89 kGy, o que ultrapassou os limites preconizados para produtos médicos. Concluíram que a dose de irradiação pode ser um método complementar para evitar contaminação dos enxertos e ressaltaram a importância dos critérios de seleção dos doadores.

Entendendo que a irradiação pode causar alterações biomecânicas nos enxertos alógenos, Hammer (1999) avaliaram os métodos de se diminuir a produção de radicais livres originados no processo de irradiação que deixariam o tecido menos resistente e mais

friável. Foram preparados 30 anéis de fêmur, provenientes de três pacientes e que foram divididos em dois grupos, sendo um mantido a temperatura ambiente e o outro congelado a -78°C . Ambos os grupos foram submetidos a doses de 30,2 kGy de irradiação gama e, posteriormente, submetidos a testes biomecânicos. Os resultados mostraram que a irradiação do osso congelado a -78°C produziu menor alteração biomecânica nos tecidos, mantendo-os mais resistentes. Os autores concluíram que o processo de irradiação dos tecidos é importante para inativação do HIV e deve ser realizado com o tecido em temperaturas abaixo de -70°C .

Fazendo um histórico dos enxertos ósseos alógenos, Tomford (2000) relatou a sua utilização por mais de 120 anos. Nos primeiros anos, o grande problema de se utilizar os enxertos alógenos foi a viabilidade do material e não havia legislação que desse suporte à técnica. Entre 1980 e 2000 os enxertos alógenos passaram a ser mais utilizados, pois o intuito na época foi evitar as transmissões de doenças com o desenvolvimento de testes realizados pelos Bancos de Tecidos para mantê-los limpos. O autor afirmou que no futuro, apesar da segurança com a utilização do material, há necessidade de se acompanhar os resultados em longo prazo, pesquisar mais sobre o material para poder determinar a real eficácia do enxerto, sua incorporação, sua remodelação e saber como o enxerto irá se comportar quando estiver sendo submetido às funções do sistema músculo-esquelético.

A avaliação do potencial de indução dos enxertos liofilizados por Lohmann (2001) procurou mostrar a diferença entre os processos de desmineralização e não do tecido ósseo e as suas implicações quando do uso dos enxertos. Realizaram o procedimento em lotes provenientes de doadores com até 42 anos de idade em um grupo e, no outro, de pacientes com mais de 70 anos. Baseando-se nos conceitos de indução óssea, os enxertos foram instalados em uma área ectópica e

avaliados histologicamente. Os resultados mostraram que somente houve algum potencial de indução nos enxertos liofilizados provenientes do grupo de doador com no máximo 42 anos de idade, independente do processo de desmineralização. Concluíram que a capacidade de indução dos enxertos foi relacionada ao potencial do doador e não do processo de desmineralização.

Tentando acelerar o processo de incorporação de enxertos alógenos nas tíbias de ovelhas, Delloye (2002) estudaram comparativamente a reparação de enxertos alógenos em grupos sem e com perfurações corticais de 1 mm de diâmetro e com distância de 5 mm entre elas. Após seis meses de reparação os resultados dos fragmentos enxertados foram avaliados, mostrando que dos 18 enxertos realizados, somente em 25% não houve união com o osso residual e não ocorreram diferenças estatísticas significantes entre as densidades ósseas nos dois grupos. A avaliação histomorfométrica mostrou haver três vezes mais formação de novo osso no grupo teste. Baseado nesses resultados os autores chamaram a atenção para o processo de osteocondução, ou seja, as porosidades criadas pelas perfurações permitiram maior vascularização e penetração celular, aumentando a remodelação do enxerto e, conseqüentemente, sua incorporação aos tecidos vizinhos.

Em função do aumento dos casos de cirurgias em defeitos da coluna vertebral, Malloy e Hilibrand (2002) apresentaram uma revisão da literatura comparando a biologia dos enxertos autógenos e alógenos. Os enxertos autógenos apresentaram um processo de reparação mais rápido por causa da presença de BMPs que aumentaram as propriedades osteoindutivas. Os alógenos por não apresentarem BMPs serviram apenas como uma matriz ou arcabouço para as invasões vascular e celular no interior do enxerto. Além desse fato, durante a fase de vascularização os enxertos alógenos provocaram reações imunológicas dos tipos I e II que atrasaram a reparação, fato que não aconteceu com os enxertos autógenos. Com relação à biomecânica dos

enxertos, houve diferenças relacionadas à área anatômica, idade do paciente, tipo de técnica de preservação e o método de esterilização. Enxertos alógenos frescos praticamente não apresentaram redução de resistência, ao passo que os enxertos liofilizados mostraram uma diminuição da resistência variando de 55% até 90%. Os autores concluíram que apesar dos melhores resultados mostrados com os enxertos autógenos, os alógenos frescos congelados foram considerados uma alternativa satisfatória em cirurgias reconstrutivas.

Foi nas reconstruções de defeitos em coluna vertebral cervical, torácica e lombar que Vaccaro (2002) mostraram a utilização de enxertos alógenos. Os enxertos autógenos apresentaram mais rápida incorporação e fusão das vértebras, por serem osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores, no entanto, os problemas relacionados às condições dos pacientes, a morbidade e o volume de enxertos os levaram à utilização de materiais alternativos. Os enxertos alógenos frescos congelados mostraram ser o material de escolha por apresentarem a mesma resistência do osso autógeno e por não perderem as BMPs durante o processamento, tornando-os osteoindutores e osteocondutores. Apesar dos enxertos alógenos apresentarem mais lenta incorporação e fusão das vértebras, os autores concluíram que a combinação de cortical alógena com osso medular autógeno compensou os problemas relacionados aos enxertos e foram utilizados com frequência em fraturas de coluna vertebral.

Leonetti (2003) apresentaram um estudo clínico no qual realizaram quatro casos clínicos de reconstrução maxilomandibular com osso alógeno congelado previamente à instalação de implantes osseointegráveis. Em três casos os implantes foram instalados seis meses após a reparação dos enxertos e num caso esperou-se um tempo de cinco meses. Não houve complicações pós-operatórias e infecções nos enxertos, sendo que durante a instalação dos implantes o material alógeno usado se apresentou com pouca reabsorção e boa densidade

óssea o que permitiu a estabilidade primária dos implantes. Não houve perda de implantes durante o tempo examinado e os autores concluíram ser o enxerto ósseo de osso alógeno uma possível alternativa ao enxerto autógeno.

Para reconstruir defeitos maxilomandibulares sem a utilização de osso autógeno Petrunaro (2005) relataram três casos clínicos nos quais trataram defeitos ósseos com a utilização de blocos de osso humano congelado misturado ao plasma rico em plaquetas (PRP). Os tratamentos foram avaliados clínica e histologicamente após um período que variou de quatro a seis meses. Os resultados mostraram boa incorporação dos enxertos e densidade óssea adequada que possibilitaram a estabilidade primária dos implantes, com evidências histológicas de remodelação e formação de novo osso sobre o tecido ósseo original. Os autores mostraram uma nova perspectiva de reconstrução de tecidos, recomendando mais estudos para a confirmação dos resultados e avaliação em longo prazo.

Com a preocupação de se avaliar o risco de complicações com os enxertos alógenos, Mankin (2005) revisaram o risco de infecções em reconstruções de tumores ósseos em consequência do uso de enxertos ósseos alógenos provenientes de cadáveres. Após a avaliação de 945 pacientes que foram tratados nos períodos de 1971 a 2001, conseguiram um índice de sucesso superior a 75%, entretanto, encontraram um risco médio de infecção em torno de 12,8% nos pacientes. Os autores citaram infecções de pacientes por vírus da hepatite C e três deles tiveram contaminação pelo vírus HIV. No entanto, também comentaram o fato de vários procedimentos terem sido realizados antes da criação dos protocolos da AATB (1992), que eliminaram bastante os riscos de infecções dos pacientes em função do rigoroso exame de seleção dos doadores. Os autores ainda citaram o fato de terem ocorrido infecções em decorrência de fraturas dos enxertos, que não foram atribuídas ao material em si.

Na busca de um substituto para os enxertos autógenos, Keith et al. (2006) publicaram um estudo multicentro no qual realizaram 82 procedimentos de reconstrução óssea maxilomandibular em 73 pacientes com utilização de blocos de osso alógeno. Os pacientes receberam implantes osseointegrados após quatro a seis meses de realização dos enxertos e foram acompanhados por até 36 meses após a instalação das próteses. Os resultados demonstraram que 99% dos implantes apresentaram sucesso até o tempo estudado. No momento da instalação dos implantes, 69% dos blocos não apresentaram sinais de reabsorção, ao passo que 31% apresentaram valores variando até 2mm. Histologicamente, os enxertos apresentavam sinais avançados de remodelação e incorporação após seis meses. Os autores concluíram que apesar dos excelentes resultados obtidos clínica e histologicamente ainda são necessários estudos com um tempo mais longo de avaliação para comprovar a eficácia do material.

Na tentativa de simplificar os procedimentos de reconstrução óssea, Jacotti (2006) apresentou uma técnica onde os blocos alógenos são preparados previamente em um protótipo esterilizado e depois fixados nos defeitos ósseos. Além de simplificar o procedimento cirúrgico, tornando-o mais rápido e menos agressivo ao paciente, o intuito da técnica foi diminuir a possibilidade de clivagem dos blocos durante a instalação dos implantes através da perfeita adaptação dos mesmos ao leito receptor.

Para justificar o uso de temperaturas aproximadas de 70°C negativos em criopreservação de tecidos ósseos, Laitinen et al. (2006) apresentaram um estudo onde demonstraram que os tecidos ósseos possuem células gordurosas no seu interior, lipídeos, que sofrem oxidação com o tempo aumentando a toxicidade do material. Demonstraram que temperaturas em torno de -40°C promoveram rápida oxidação dos lipídeos e nos casos em que os tecidos foram mantidos em

temperaturas de -70°C , não encontraram oxidação dos lipídios em períodos de até três anos, garantindo a qualidade dos enxertos.

Questionando um possível potencial de osteoindução em relação aos enxertos ósseos homólogos, Wildemann (2007) realizaram um estudo no qual as amostras de tecido ósseo fresco congelado foram submetidas a testes para análise de presença de BMPs e outros fatores de crescimento. Para a extração dos fatores de crescimento foram utilizados três métodos: colagenase I, a incubação em um coquetel proteico enzimático e a utilização de guanidina HCL (GndHCL). Dos oito fatores de crescimento avaliados, sete deles foram encontrados nas amostras em quantidades diferentes e expressos, em diferentes porcentagens pelos diversos métodos de extração. Os autores concluíram que apesar da presença desses fatores de crescimento, não se pode atribuir uma capacidade indutiva ao material uma vez que não se avaliou o potencial desses enxertos, ou seja, se a quantidade dos fatores de crescimento encontrada poderia influenciar o processo de reparação e formação óssea.

Na busca por diversos materiais para substituir os enxertos ósseos autógenos, Stacchi et al. (2008) avaliaram o comportamento clínico, histológico e histomorfométrico do uso de osso humano fresco congelado em procedimentos de elevação do assoalho do seio maxilar. Foram realizadas mensurações tomográficas em dez pacientes previamente à realização dos enxertos e cinco meses no pós-operatório. Nesse período foram colhidas amostras para avaliações histomorfométricas, as quais demonstraram resultados de $48,15\% \pm 14,32\%$ de tecido ósseo, ausência de infiltrado inflamatório, osso novo formado em completa integração com o osso preexistente, e, os 22 implantes instalados nas regiões enxertadas se apresentaram clinicamente integrados. Concluíram ser o biomaterial uma alternativa segura para enxertos ósseos sem interferir no processo de reparação óssea.

Na tentativa de comparar o uso de partículas de osso esponjoso autógeno com partículas de osso alógeno fresco congelado para fechamento de defeitos em ossos do antebraço, Piotrowski (2008) realizaram o procedimento em 56 pacientes. Os resultados demonstraram, ao contrário do que os autores esperavam, fechamento dos defeitos em 72,3% nos casos de enxertos autógenos e, em 61,9% dos casos onde o aloenxerto foi utilizado. Esses resultados não foram estatisticamente significantes, concluindo os autores que o uso do biomaterial alógeno pode ser uma alternativa eficaz ao tratamento desse padrão de defeito ósseo, sem a necessidade de sítio doador.

Um estudo para avaliar o comportamento morfológico e as alterações histológicas ocorridas pelo congelamento a baixas temperaturas foi realizado por Andrade et al. (2009). Os autores avaliaram duas temperaturas diferentes para congelamento, sendo -20°C e -70°C , e quatro períodos diferentes de congelamento, sendo 30, 60, 90 e 120 dias. Para o estudo os autores utilizaram quatro fragmentos de tecido ósseo de crista ilíaca de 12 coelhos divididos nos diversos grupos. Os resultados mostraram que o comprometimento de 100% da morfologia somente ocorre após 90 dias de congelamento a temperaturas de -70°C , garantindo ausência de imunogenicidade. Nesse período alterações na estrutura de colágeno, na porção medular dos tecidos e a morte celular por ruptura das membranas garantiram a segurança dos tecidos para realização de enxertos.

Avaliando o efeito do congelamento prolongado na resistência mecânica do osso alógeno fresco congelado, Rozen et al. (2009) submeteram 100 cilindros de tecido ósseo provenientes do úmero ao congelamento durante os períodos de um, dois, três e quatro anos e realizaram testes de compressão de três pontos para a avaliação de seu comportamento. As avaliações, feitas em comparação a cilindros de osso fresco, sem congelamento, não demonstraram resultados diferentes significativamente, o que levou os autores a concluir que os enxertos

congelados a baixas temperaturas por períodos prolongados não perderam sua resistência mecânica.

Tentando avaliar o comportamento de implantes osseointegrados instalados em regiões previamente enxertadas com osso humano fresco congelado, Viscioni (2009) publicaram um estudo retrospectivo no qual 133 implantes de diâmetro padrão (3,75mm), variando o comprimento entre 10 e 15mm foram acompanhados durante aproximadamente 23 meses. Os resultados demonstraram altos índices de sucesso (99,2%) com apenas uma falha de implante, resultado esse comparado pelos autores aos resultados encontrados com áreas não enxertadas. Concluíram que a utilização de enxertos alógenos previamente a instalação de implantes deve ser considerada uma realidade.

Relatando a escassez de estudos com acompanhamento de implantes instalados em mandíbulas previamente enxertadas com osso alógeno fresco congelado proveniente de crista ilíaca, Carinci (2009) estudaram, de forma retrospectiva, a realização de 28 enxertos ósseos *onlay*, e a utilização de 63 implantes instalados nessas regiões. Os implantes foram instalados seis meses após a realização dos enxertos e os mesmos foram reabilitados proteticamente após mais seis meses. Após o acompanhamento de 20 meses apenas dois implantes falharam, o que demonstrou um índice de sucesso de 96.8%. Os autores concluíram que o enxerto ósseo alógeno prévio à instalação de implantes pode ser considerado uma opção segura.

Na necessidade de se buscar uma alternativa aos enxertos ósseos autógenos, Shafiei (2009) publicaram os resultados de um estudo comparativo entre o osso cortical autógeno e alógeno no reparo de defeitos ósseos criados na porção mediana do rádio de coelhos, pela análise dos dados radiológicos, histopatológicos e biomecânicos. Os dados radiológicos demonstraram similaridade no 14^o dia, com 25% de formação óssea em ambos os grupos. No 28^o houve diferença estatística

em relação ao grupo I (autógeno) o que permaneceu até o 56^o dia de estudo, onde os autores encontraram 100% de osso formado no grupo autógeno contra 75% no grupo alógeno. No quesito histopatológico, os resultados não mostraram significância estatística, com ausência de reação inflamatória intensa em ambos os grupos, e similaridade quanto ao osso cortical, esponjoso e formação medular. Os testes biomecânicos realizados mediante à avaliação de carga pelo teste dos três pontos, não demonstraram diferenças estatísticas, mostrando ser o material alógeno apto a suportar cargas. Os autores concluíram não haver diferença estatística entre os dois tipos de enxertos ósseos, nos três quesitos avaliados, no período de avaliação de oito semanas.

Buscando alternativas ao enxerto ósseo autógeno para reconstrução dos maxilares atróficos Peleg et al. (2010) avaliaram a eficácia de blocos córtico-esponjosos de osso humano fresco congelado proveniente de crista ilíaca previamente à instalação de implantes. Foram realizados 57 enxertos em 41 pacientes e instalados 84 implantes, acompanhados pelo período de 26 meses. Os enxertos mostraram resistência durante a instalação dos implantes, baixa reabsorção, não apresentando problemas clínicos, e apenas um implante falhou durante o processo de osteointegração. Os autores consideraram ser essa uma boa alternativa ao enxerto autógeno apesar do período curto de avaliação do estudo.

Preocupado com as respostas imunológicas dos transplantes ósseos e o potencial de incorporação dos mesmos que Reikerás (2010) analisaram o impacto do processo de congelamento nas respectivas situações. Realizaram um estudo em ratos nos quais defeitos de 8,0 mm foram criados na tíbia e devidamente reconstruídos com enxertos homólogos. As análises foram baseadas nas quantidades de anticorpos séricos encontrados contra as moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) dos enxertos no primeiro dia após os enxertos e após dois e quatro meses. Os resultados não mostraram diferenças em

relação às respostas de anticorpos além do considerado normal após procedimentos como o realizado. Além disso, as comparações realizadas com o osso fresco autógeno, sem congelamento, demonstraram sinais de similaridade nos testes radiográficos e biomecânicos. Os autores concluíram que o biomaterial congelado homólogo não apresentou respostas imunológicas expressivas que pudessem levar a rejeição do enxerto, com resultados de incorporação similares aos enxertos autógenos durante o tempo estudado.

Mantendo a mesma metodologia, Reikerás (2010) avaliaram apenas o comportamento biomecânico dos enxertos homólogos em comparação aos autógenos. Os mesmos defeitos de 8,0 mm foram criados na tíbia de ratos para análises radiográficas e de resistências dos tecidos formados. Após análise nos períodos de dois e quatro meses, os autores encontraram formação óssea em padrão de fases semelhantes em ambas as situações. Os enxertos autógenos apresentaram 50% da resistência do osso intacto contra apenas 25% do osso homólogo, porém, após o período de quatro meses os resultados foram semelhantes com ambos os enxertos incorporados e com 70% de resistência do osso intacto. Concluíram que o osso homólogo pode ser uma alternativa viável nas reconstruções de defeitos ósseos, sem alterações nos parâmetros radiográficos e mecânicos.

Analisando a segurança dos enxertos ósseos congelados provenientes de Bancos de Tecidos, Kappe (2010) publicaram um estudo prospectivo onde 160 pacientes foram acompanhados por um período médio de 32 meses. Foram realizados 188 procedimentos de enxertos ósseos homólogos e os resultados mostraram que, durante o período do estudo, apenas 11 pacientes apresentaram processos infecciosos, ou seja, uma taxa de 6,9%. Entretanto, na análise crítica desses resultados negativos, não houve correlação entre as infecções e o biomaterial utilizado. Além disso, nenhum caso de HIV e infecções por hepatite foi encontrado, demonstrando e concluindo que o biomaterial, quando

processado e utilizado conforme os critérios da AATB, foi considerado seguro.

Um estudo científico comparando os resultados dos enxertos tipo *onlay*, autógeno e alógeno fresco congelado em blocos, foi publicado por Sendyk (2010). Os autores utilizaram 15 animais que foram divididos em três grupos e avaliados após quatro, oito e 12 semanas no pós-operatório. Após os enxertos realizados na mandíbula dos animais, os autores mostraram que ambos os enxertos promoveram formação óssea, porém, a atividade foi mais intensa nos enxertos autógenos. No grupo homólogo demonstraram pouca atividade osteoblástica/osteoclástica, o que significa pouca atividade de remodelação. Em relação à vascularização e celularidade, foi visto que ocorrem a partir das áreas de contato com a interface dos enxertos e mais intensa nos enxertos autógenos. Após 12 semanas, os enxertos alógenos ainda encontravam-se parcialmente celularizados. Concluíram que o material alógeno promove a formação óssea, porém, no tempo estudado a vascularização, a celularidade e a incorporação foram parciais.

Para demonstrar a eficácia do biomaterial alógeno, D'Aloja (2011) publicaram em estudo onde avaliaram pelo período médio de 20 meses, os resultados de 14 casos clínicos de enxertos ósseos homólogos congelados e posterior instalação de implantes osseointegrados. Os pacientes aguardaram um período que variou de quatro a oito meses para a instalação dos implantes e nenhuma complicação foi encontrada, períodos em que alguns fragmentos do osso formado foram removidos para a análise histopatológica. Os resultados mostraram boa formação óssea, com tecido desenvolvido mineralizado, sem sinais de reação imunológica inflamatória ou necroses teciduais. Os pacientes foram orientados a realizarem novos exames para avaliação de possível contaminação por HIV ou hepatite, tendo apresentado resultado negativo em todos os casos. Os autores concluíram que o biomaterial,

além dos resultados apresentados, pode ser considerado seguro para uso, e apresenta algumas vantagens como a sua disponibilidade.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o processo de reparação do osso alógeno, processado em Banco de Tecidos Músculo-Esquelético, em comparação ao autógeno em enxertos ósseos do tipo *onlay* na calvária de coelhos, mediante análises histológica e histomorfométrica.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais e grupos experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP (FOCSJC-UNESP), sob nº 18/2008-PA/CEP .

Foram utilizados no estudo 15 coelhos adultos, machos, da raça *New Zealand*, com peso médio de 3,5 kg, fornecidos pelo Biotério da FO-CSJC-UNESP, os quais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração balanceada (Probiotério Moinho Primor S.A.) e água *ad libitum*.

Dois enxertos ósseos do tipo *onlay*, em bloco, foram realizados em cada animal e divididos em grupos: autógeno (A – enxerto com osso autógeno) e alógeno (B – enxerto com osso alógeno processado em Banco).

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de cirurgia do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP. Antes do procedimento os animais foram pesados

para a quantificação da dosagem de anestésico. Os animais foram anestesiados por via intramuscular, sendo o sedativo analgésico e relaxante muscular (Cloridrato de xilazina - Anasedan - Sespo - Divisão Vetbrands Saude Animal - Jacareí, SP) aplicado 5 minutos antes da administração do anestésico geral (cloridrato de ketamina - Dopalen, Sespo - Divisão Vetbrands Saude Animal – Jacareí, SP) na proporção de 1 ml/kg e 0,5 ml/kg de peso corpóreo, respectivamente.

Após a depilação e assepsia com clorexidina 0,2% (Terapêutica – Farmácia de manipulação – São José dos Campos, SP) no crânio, uma incisão foi realizada com lâmina intercambiável nº 15, montada em bisturi tipo Bard-Parker nº 3 no plano sagital mediano, seguida de divulsão muscular e incisão dos planos profundos. Em seguida, foi realizado o descolamento do tecido com descolador de perióstio e curetas tipo Molt para permitir a visualização dos ossos parietais e fixação dos enxertos.



a



b

Figura 1 - Animal de estudo: a) coelhos machos raça *New Zealand*; b) colocação dos campos cirúrgicos após a tricotomia para assepsia do campo operatório.

Para a retirada do osso autógeno doador, após a divulsão muscular e acesso aos ossos parietais, foi removido um bloco de osso de forma circular, com uma fresa tipo trefina de 5,0 mm de diâmetro e um

motor cirúrgico elétrico (Asseptico (AEU-707-MGF Asseptico Inc., USA) usando redução 1/16, ponta reta, velocidade de 1000 rpm e irrigação constante com cloreto de sódio a 0,9% estéril. Esse bloco foi adaptado e fixado sobre o osso parietal esquerdo no grupo A.

No grupo B os blocos foram obtidos de osso proveniente de outro animal, porém de mesma espécie, previamente processado e congelado a -80°C pelo Banco de Tecidos Músculo-esquelético da Universidade de Marília (UNIOSS) conforme normas preconizadas pela AATB (1992) e portaria 1.686 do Ministério da Saúde, utilizado como enxerto alógeno e fixado no osso parietal direito.

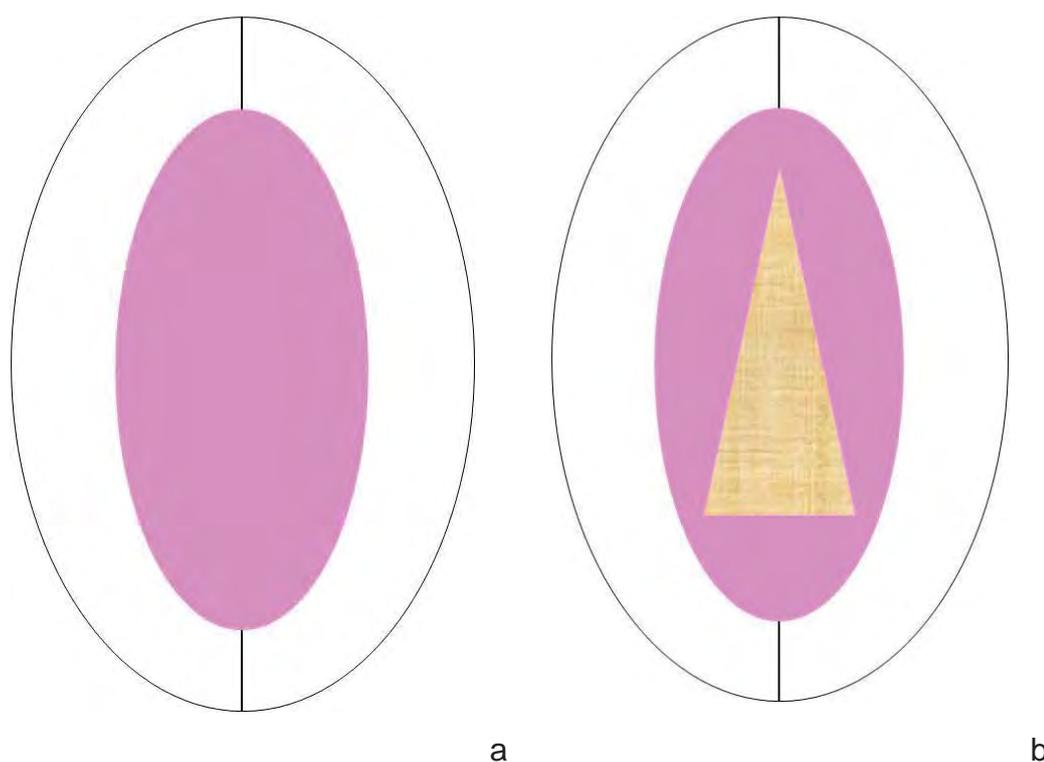


Figura 2 - Esquema cirúrgico: a) área preparada para incisão sagital; b) após incisão dos planos profundos, divulsão e exposição do tecido ósseo da calvária.

Antes da adaptação dos enxertos, os ossos parietais receberam pequenas perfurações com broca circular nº ¼ para aumentar a vascularização na interface com os enxertos, processo denominado

decorticação, e os blocos foram fixados com microparafusos de 1,5 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento, instalados com auxílio de fixador de parafuso e chave manual (Neodent, Curitiba, PR).

Ambos os blocos foram recobertos com uma barreira física de politetrafluoretileno (PTFE) para evitar a interferência de tecido não osteogênico na reparação dos enxertos. A película não-porosa de PTFE (Tecnoflon-Brasflon, Ind. & Com. Plásticos - São Paulo, S.P.), com espessura de 0,13 mm apresenta características e biocompatibilidade adequadas para o uso em cirurgias com a técnica da regeneração óssea guiada (ROG) (de Macedo et al. 2003). Em seguida, as estruturas dos planos profundos e superficiais foram suturadas com fio absorvível Vicryl (ETHICON, Johnson & Johnson 6-0) e de seda (ETHICON, Johnson & Johnson 4-0), respectivamente.

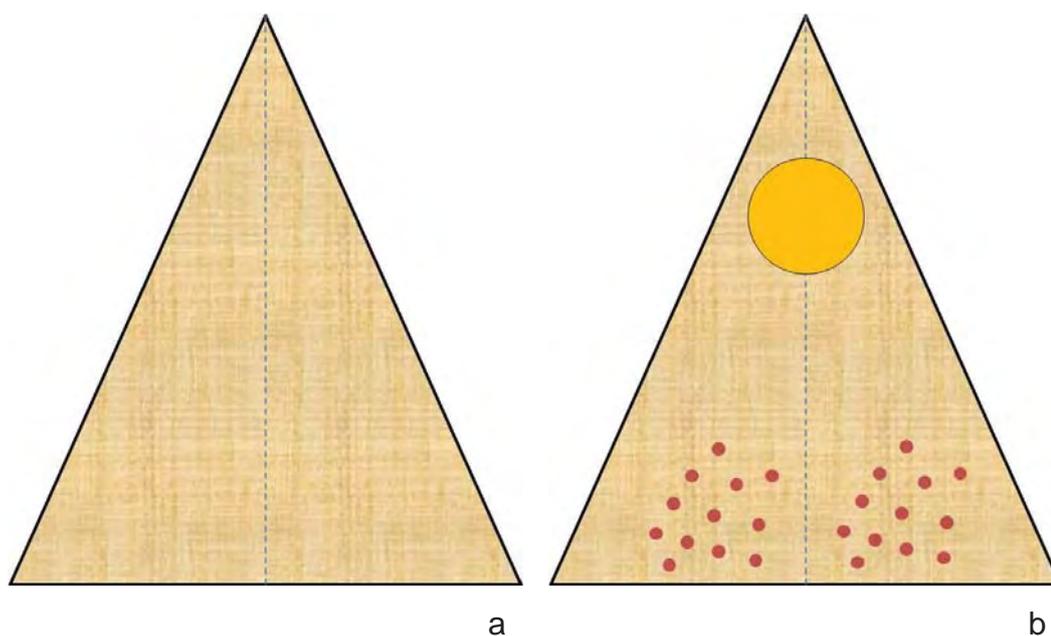


Figura 3 - Esquemas do procedimento cirúrgico: a) exposição e delimitação da calvária do animal; b) perfurações corticais promovendo sangramento local na região receptora em ambos os lados e delimitação da região doadora de enxerto autólogo.

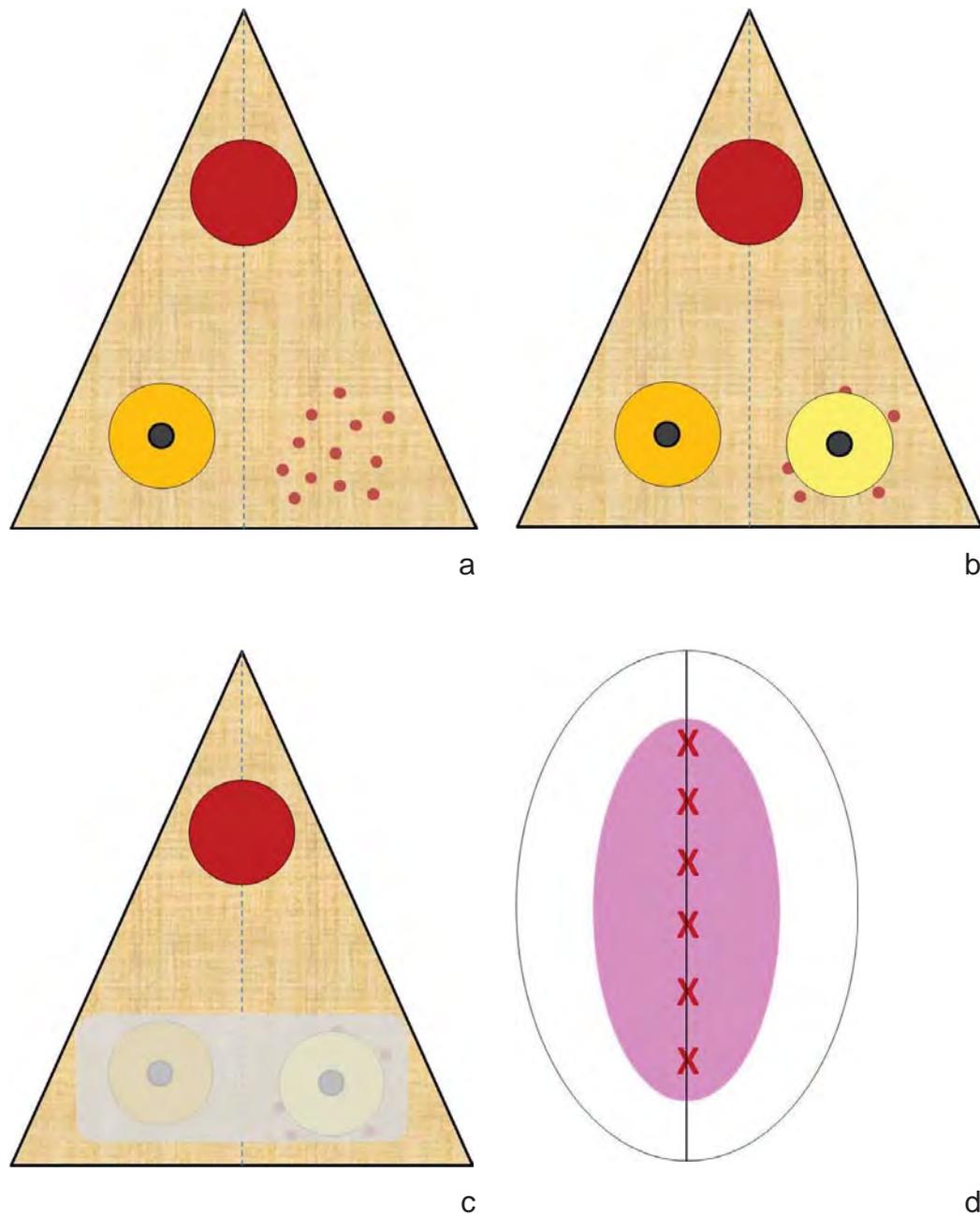


Figura 4 - Esquema cirúrgico: a) remoção bloco autógeno e fixação do mesmo com parafuso de fixação; b) adaptação do bloco e fixação do lado direito com parafuso de fixação; c) colocação de barreira de PTFE para exclusão dos tecidos moles durante a reparação inicial; d) sutura dos planos profundos com fio absorvível.

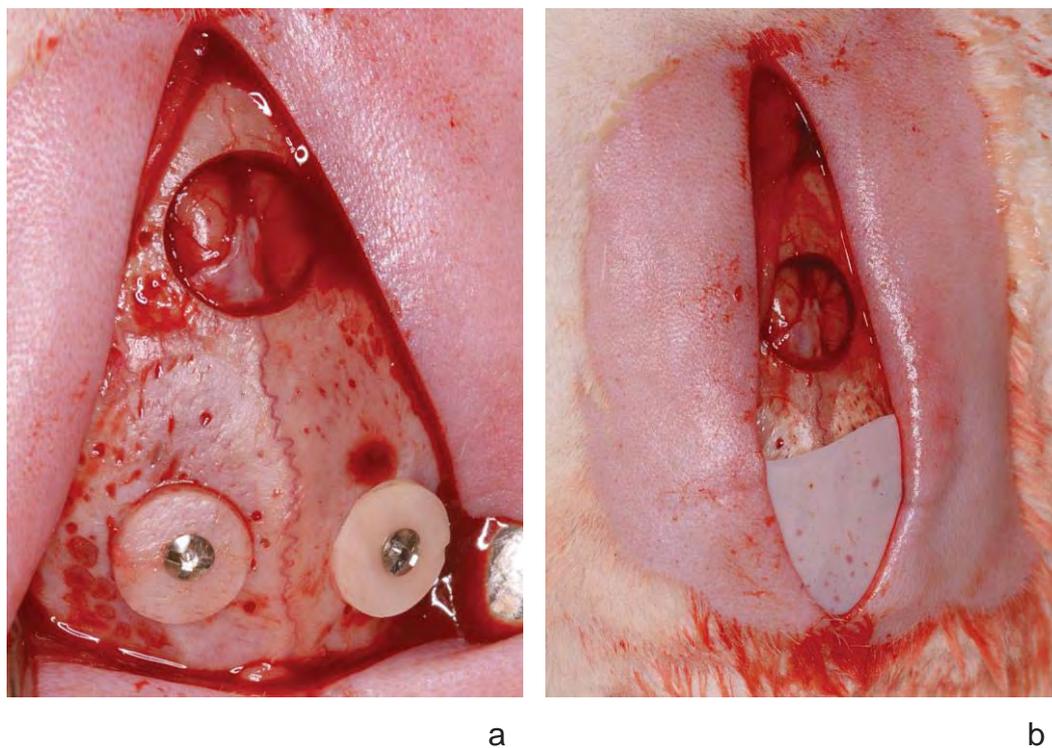


Figura 5 - Procedimento cirúrgico: a) adaptação e fixação dos blocos autógeno e alógeno nos leitos receptores; b) colocação e estabilização da barreira de PTFE sobre os blocos, interposta entre os tecidos moles.

Os cuidados pós-operatórios foram realizados para cada animal, administrando-se, por via intramuscular, o antibiótico Pentabiótico veterinário para animal de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e antiinflamatório Voltaren 75 mg solução injetável (Parker-Davis, São Paulo, Brasil) nas dosagens de 0,1 ml/kg e 0,6 ml/kg do peso corporal, respectivamente. O antibiótico e o anti-inflamatório foram administrados 1 hora antes dos procedimentos cirúrgicos, prolongando o uso do anti-inflamatório por mais um dia. Os animais, ainda anestesiados foram colocados em gaiolas individuais e mantidos até o período de sacrifício.

4.3 Material biológico

Para a obtenção do enxerto alógeno, material proveniente de animal diferente e de mesma espécie, um coelho macho com peso médio aproximado de 3,5 kg foi sacrificado com dose letal de anestésico para a remoção dos fragmentos ósseos, de acordo com as normas preconizadas na portaria 1.686, de 20 de setembro de 2002, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre a captação, processamento e armazenamento dos ossos com a finalidade de transplante. O material obtido em condições estéreis foi colocado em embalagem tripla de poliamida número 6, esterilizadas, resistente ao congelamento e devidamente encaminhado ao Banco de Tecido Músculo-esquelético da Universidade de Marília (UNIOSS). No Banco de Tecido o material foi submetido a testes sorológicos para comprovar a ausência de contaminação do material durante o processo de remoção. Os testes, de acordo com as normas internacionais preconizadas pela AATB (1992) são: sífilis, chagas, HIV (dois testes), Hepatite A,B,C, HTLV-1, cultura para fungos e para bactérias aeróbias. Após a negativa dos testes o material foi processado, recortado e congelado a temperatura de -80°C até o tempo do transplante.

Na preparação para o transplante o osso foi descongelado, seguindo as recomendações do UNIOSS, colocando a embalagem interna estéril sobre um campo esterilizado para que o tecido ósseo pudesse ser removido e lavado três vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% a $37 - 40^{\circ}\text{C}$ para retirar algum antibiótico residual e completar o seu descongelamento. O osso foi deixado 1 a 2 horas em temperatura ambiente até o momento de ser transplantado para o local experimental.

4.4 Períodos de sacrifício

Os animais foram sacrificados com alta dose do anestésico (Tiopental-Thiopentax– Cristália Brasil) nos períodos pós-operatórios de 15, 30 e 60 dias, em número de cinco para cada tempo, para remoção do fragmento ósseo contendo a região tratada. As peças contendo os enxertos ósseos foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10% (Merck S.A. Indústrias Químicas) por 48 h, processadas no laboratório e, posteriormente, desmineralizadas em solução de ácido etilendinetriilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA- Titriplex® P.A – Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de sódio P.A. (Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 4,13%, tendo sido agitada três vezes ao dia e substituída a cada três dias, por um período de aproximadamente 90 dias. Esses fragmentos foram processados e incluídos em parafina. Os cortes microscópios foram feitos com 6 µm de espessura e as lâminas histológicas preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras para coloração com hematoxilina e eosina e tricrômico de Mallory. Para a análise histológica em microscopia de luz convencional foram avaliados a reação inflamatória presente e os aspectos gerais da reparação óssea. Posteriormente, essas lâminas foram analisadas para estudo histomorfométrico para quantificação dos componentes teciduais encontrados.

4.5 Análise histológica e histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros

quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos através da geometria e estatística. Os métodos estereológicos se baseiam em princípio geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade das imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidirem com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal nesses métodos está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem, realizado por meio da aplicação de procedimentos de escolha aleatória em todos os estágios do experimento, tais como: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas, dos cortes e campos microscópicos.

Cortes histológicos semi-seriados foram realizados nos espécimes para obter 10 lâminas histológicas por animal em cada grupo. Dentre essas lâminas, três foram separadas aleatoriamente, obtidas longitudinalmente na região central do defeito, e avaliadas pelo programa Axiovision 4.5 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha). Para a mensuração da densidade da matriz óssea foi utilizada objetiva 20 x 0,45 (A-PLAN, Carl Zeiss) e ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens de cinco campos histológicos por lâmina foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha), correspondendo a uma área de 439,28 x 329,12 μm^2 .

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos da histomorfometria foram submetidos à análise de variância (RM ANOVA) de dois fatores de medidas repetidas. Foi avaliado um fator dentro dos grupos, que é o tempo de tratamento e um fator entre os grupos, que é o tipo de tratamento realizado. O nível de significância adotado foi de $\alpha < 0,05$. No

caso de obtenção de resultados com significância estatística, os mesmos foram submetidos ao teste de comparação múltipla de *Tukey*.

5 RESULTADOS

Dos animais utilizados na pesquisa, 01 animal do grupo de 15 dias, 01 animal do grupo de 30 dias e 02 animais do grupo de 60 dias foram perdidos. Outros 04 animais foram operados e divididos nos grupos de acordo com a necessidade do estudo para completar os dados necessários para avaliação, como demonstrado no cronograma abaixo.

Quadro 1 - Cronograma da pesquisa

<u>GRUPO</u>	<u>DATA CIRURGIA</u>	<u>DATA SACRIFICAR</u>	<u>PERDA DE ANIMAL</u>
Grupo 15 dias (05 animais)	02/10/2008 (5ª feira)	17/10/2008 (6ª feira)	01 animal (Reoperado em Janeiro 2009) <u>11/02/2009</u> - <u>SACRIFÍCIO</u>
Grupo 30 dias (05 animais)	30/10/2008 (5ª feira)	28/11/2008 (6ª feira)	01 animal (Reoperado em Janeiro 2009) <u>27/02/09</u> - <u>SACRIFÍCIO</u>
Grupo 60 dias (05 animais)	09/10/2008 (5ª feira)	08/12/2008 (2ª feira)	02 animais (Reoperados em Janeiro 2009) <u>27/03/2009</u> - <u>SACRIFÍCIO</u>

Durante o sacrifício dos animais e preparo do fragmento para análise histológica, pode-se observar o volume formado em ambos os lados sobre o osso parietal do animal nos três grupos, demonstrando a formação de tecido ósseo vertical e ausência de reabsorção completa do material.

5.1 Análise histológica

5.1.1 Grupo A (osso autógeno) – 15 dias

Os resultados mostraram baixa reabsorção do enxerto, presença de tecido ósseo mineralizado, com grande quantidade de células (osteócitos) no interior das lacunas, tanto no interior do enxerto como na interface do mesmo, demonstrando manutenção da viabilidade no enxerto nos primeiros dias do processo de reparação. Nota-se presença de canais vasculares no interior da matriz dos enxertos mostrando sinais de vascularização dos mesmos. Na interface com o leito receptor pode-se observar presença de células osteogênicas (osteoblastos) tangenciando a base do enxerto e a superfície do leito receptor, mostrando que há suprimento para formação óssea no local. Ainda na interface podemos observar grande presença de pontes de tecido ósseo neoformado com presença de osteócitos no seu interior, demonstrando haver início de incorporação nos enxertos e vitalidade no tecido neoformado. Há ausência de infiltrado inflamatório agudo.

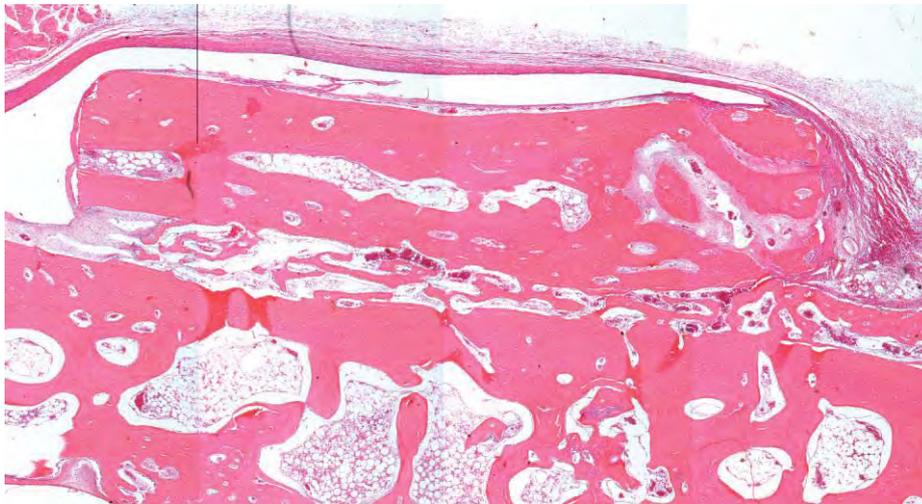


Figura 6 - Análise histológica em 15 dias com osso autógeno em montagem panorâmica mostrando o bloco enxertado em toda sua extensão. Nessa imagem já podemos notas presença de pontes de tecido ósseo formando na interface com o leito receptor. HE - 25x

5.1.2 Grupo A (osso autógeno) – 30 dias

Os resultados histológicos mostram intensa atividade celular na interface enxerto-leito receptor devido à presença de quantidade significativa de células (osteoblastos) tangenciando a base do enxerto e a superfície do leito receptor. Nota-se maior quantidade de pontes de tecido ósseo neoformado interligando o enxerto ao leito receptor demonstrando sua incorporação, com vitalidade devido à presença de canais vasculares e osteócitos preenchendo as lacunas da matriz. Também podemos notar nesse período várias regiões onde há fusão do enxerto com o tecido formado e o leito receptor, ficando imperceptível a distinção entre uma região e a outra. No local do enxerto, há maior quantidade de canais vasculares e grande quantidade de células no interior das lacunas (osteócitos), mostrando que parte do enxerto já se encontrava incorporado. Há ausência de infiltrado inflamatório agudo.

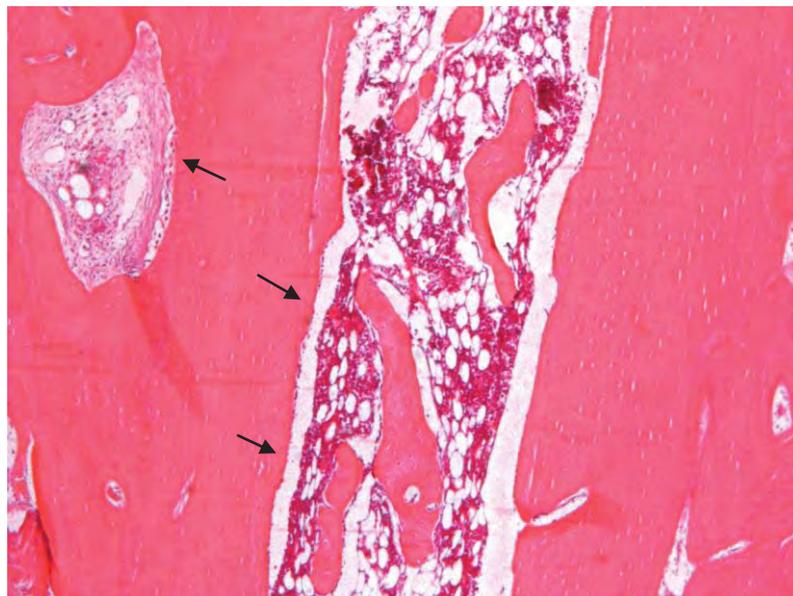


Figura 7 – Análise histológica em 30 dias com osso autógeno. Nota-se o bloco enxertado do lado esquerdo da imagem contendo inúmeros osteoblastos (setas pretas). Há pontes de tecido ósseo na interface e presença de osteócitos em grande parte da matriz do enxerto. HE em 100x.

5.1.3 Grupo A (osso autógeno) – 60 dias

Os resultados histológicos demonstram presença de um tecido mineralizado desenvolvido contendo grande quantidade de células no interior das lacunas na matriz óssea, osteócitos, mostrando que o tecido formado apresenta vitalidade. Nesse período ainda notamos presença de grande quantidade de canais vasculares e ausência de infiltrado inflamatório agudo. Com 60 dias de reparação fica imperceptível a distinção do local de interface com o leito receptor em vista da fusão entre os tecidos e incorporação dos enxertos. Notamos ainda que, tangenciando a superfície do tecido formado há grande quantidade de osteoblastos, mostrando alta atividade osteogênica no local.

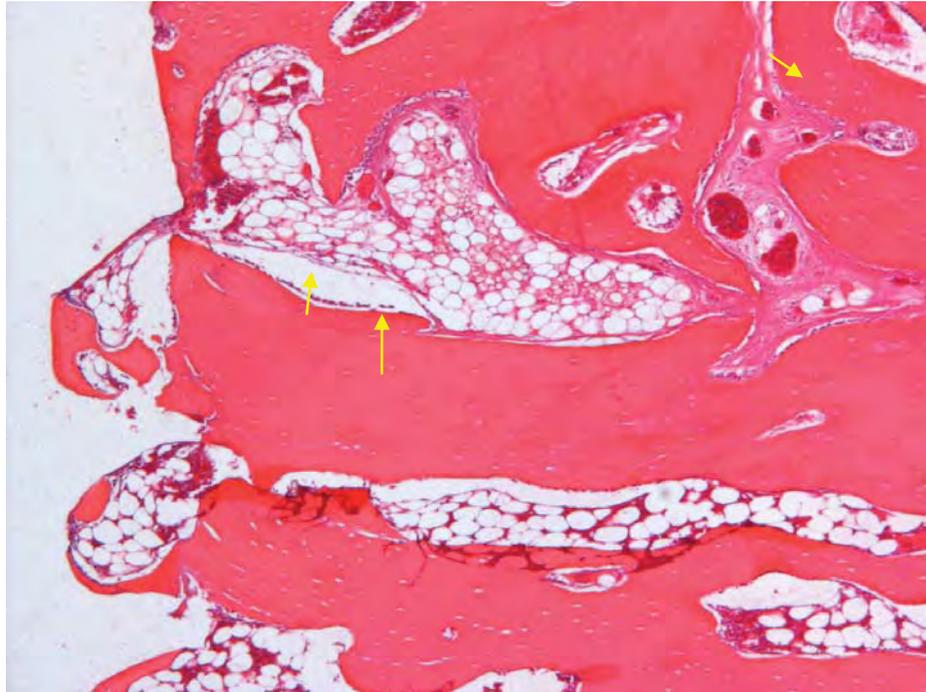


Figura 8 - Análise histológica em 60 dias com osso autógeno na região central do bloco ósseo mostrando extensa área de tecido mineralizado. Nota-se regiões com grande número de osteoblastos (seta amarela) entre as porções medulares e a porção mineralizada. Coloração HE com aumento de 50x.

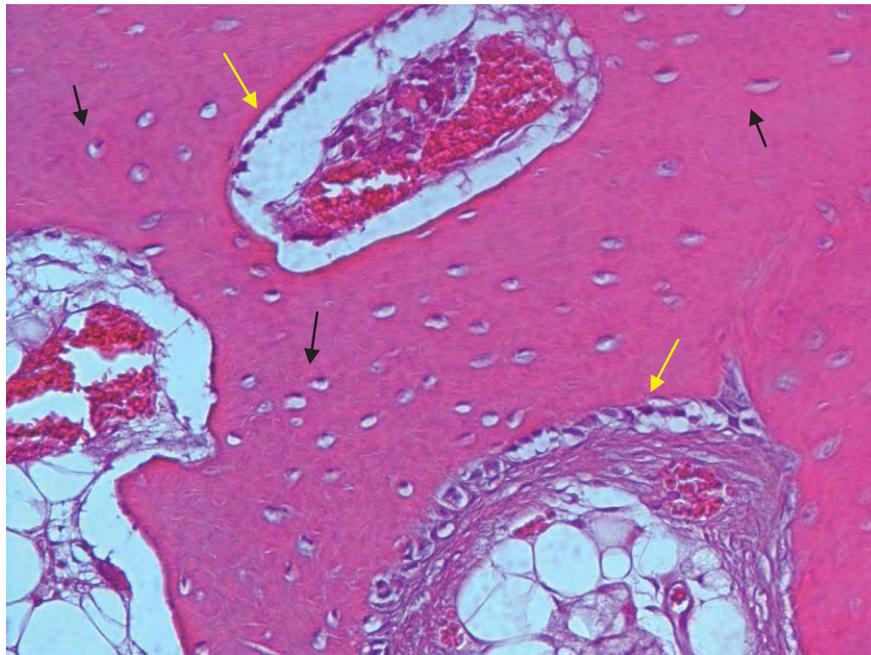


Figura 9 - Análise histológica em 60 dias com osso autógeno. Nota-se, no interior da matriz, inúmeros osteócitos preenchendo as lacunas (seta preta). Podemos notar osteoblastos ao redor das áreas medulares do tecido (seta amarela). HE - 100x.

5.1.4 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 15 dias

Os resultados mostraram baixa reabsorção do enxerto, presença de tecido ósseo mineralizado, porém, na grande extensão do enxerto há ausência de células (osteócitos) no interior das lacunas, demonstrando falta de viabilidade no enxerto. Nota-se presença de canais vasculares no interior da matriz dos enxertos mostrando sinais de vascularização dos mesmos. Na interface com o leito receptor pode-se observar presença de células osteogênicas (osteoblastos) tangenciando a base do enxerto e a superfície do leito receptor, mostrando que há estímulo para formação óssea no local. Ainda na interface podemos observar presença de pontes de tecido ósseo neoformado com presença

de osteócitos no seu interior, demonstrando haver início de incorporação nos enxertos e vitalidade no tecido neoformado. Há ausência de infiltrado inflamatório agudo.

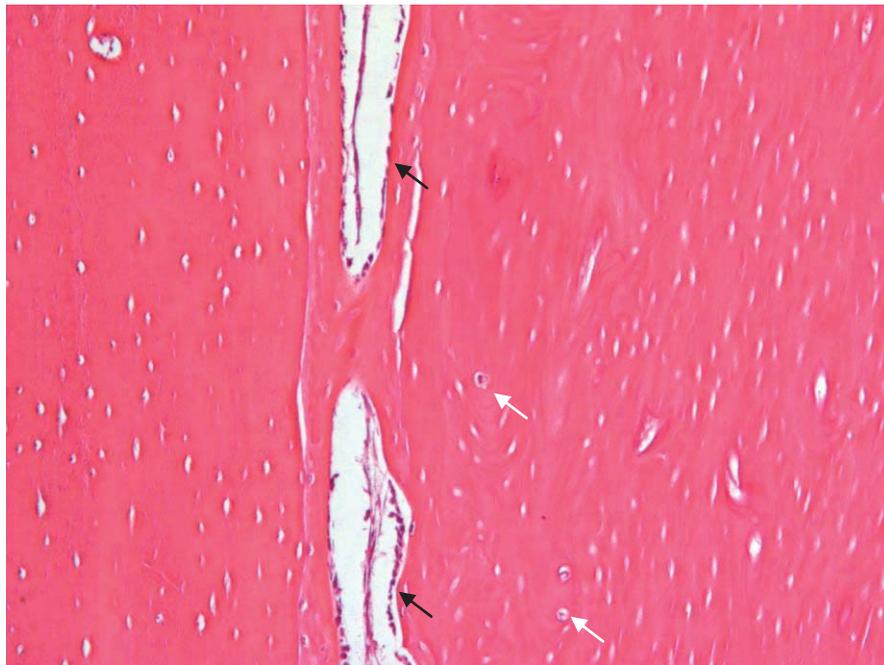


Figura 10 - Análise histológica em 15 dias com osso alógeno mostrando interface com pontos de fusão entre o enxerto e o leito receptor onde nota-se células osteoblásticas alinhadas em atividade (setas pretas). Há presença de osteócitos na matriz próxima a interface (setas brancas). Coloração HE com aumento de 100x.

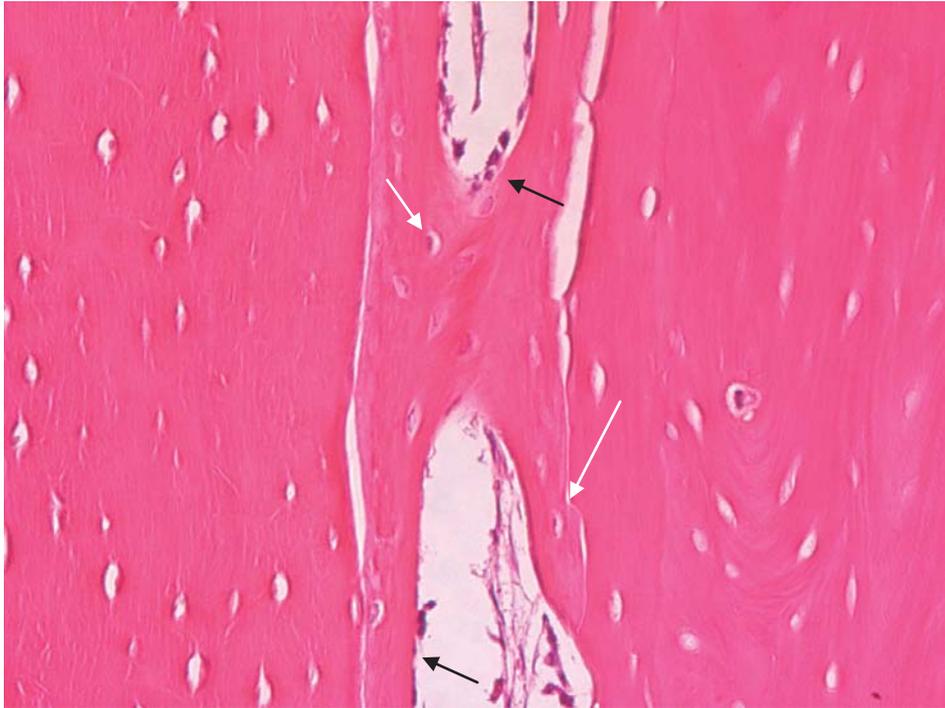


Figura 11 - Análise histológica em 15 dias com osso alógeno mostrando interface com pontos de fusão entre o enxerto e o leito receptor onde nota-se células osteoblásticas alinhadas em atividade (setas pretas). Há presença de osteócitos na matriz próxima a interface (setas brancas). Coloração HE com aumento de 200x.

5.1.5 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 30 dias

Os resultados histológicos mostraram intensa atividade celular na interface enxerto-leito receptor em razão da presença de quantidade significativa de células (osteoblastos) tangenciando a base do enxerto e a superfície do leito receptor. Nota-se maior quantidade de pontes de tecido ósseo neoformado interligando o enxerto ao leito receptor demonstrando sua incorporação, com vitalidade graças à presença de canais vasculares e osteócitos preenchendo as lacunas da matriz. Também podemos notar nesse período regiões onde há fusão do enxerto com o tecido formado e o leito receptor, ficando imperceptível a distinção entre uma região e a outra. No local do enxerto, há maior

quantidade de canais vasculares e já podemos notar a presença de maior quantidade de células no interior das lacunas (osteócitos), principalmente ao redor dos canais vasculares, demonstrando que parte do enxerto já estava em processo de substituição. Há ausência de infiltrado inflamatório agudo.

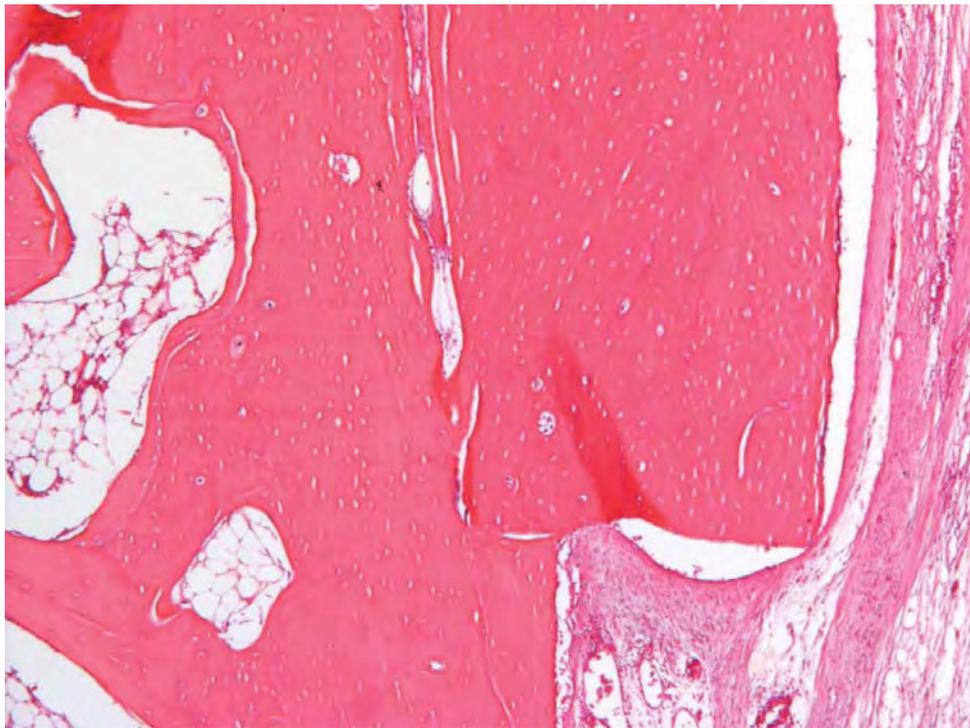


Figura 12 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno em uma das extremidades do bloco enxertado mostrando aumento dos pontos de fusão na interface. Coloração de HE com aumento de 50x.

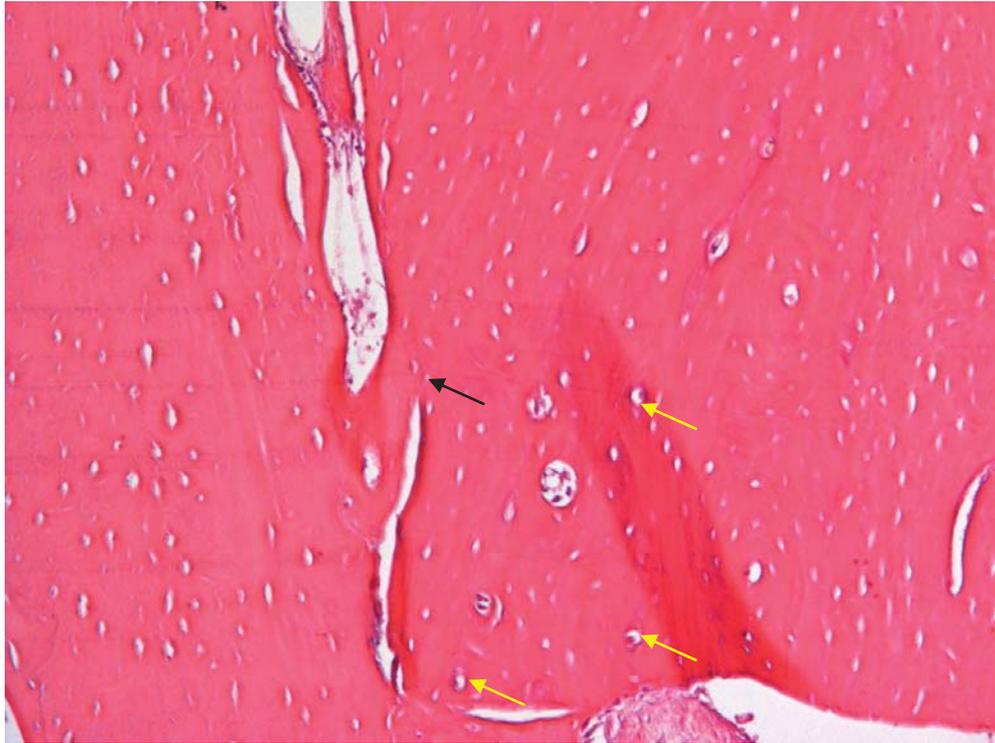


Figura 13 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno em maior aumento na extremidade do bloco mostrando incorporação do enxerto em alguns pontos (seta preta). Nota-se ainda presença de inúmeros osteócitos no interior da matriz do tecido enxertado (seta amarela). Coloração HE com aumento de 100x.

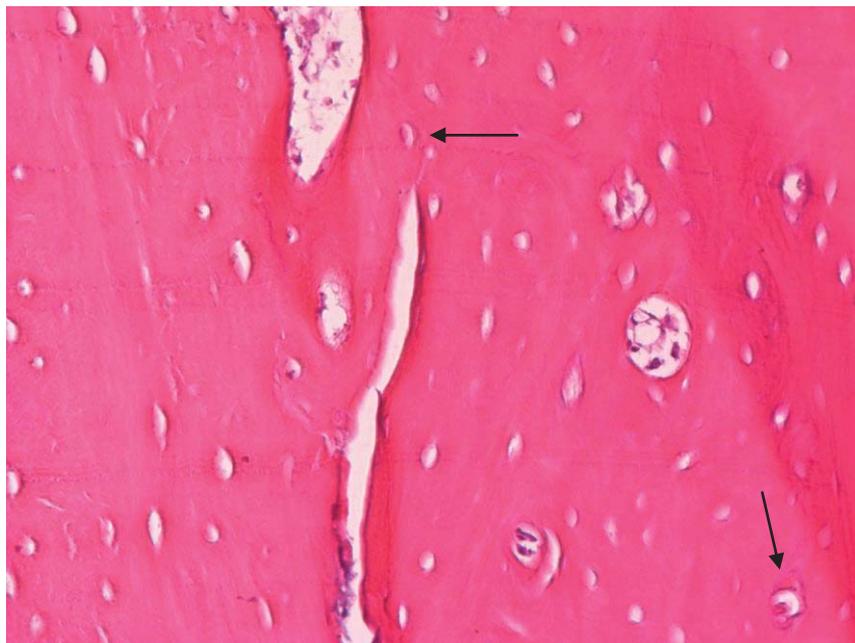


Figura 14 - Análise histológica em 30 dias com osso alógeno mostrando um aumento maior da figura anterior onde nota-se fusão entre o leito receptor e o enxerto sem linha de continuidade. Percebe-se presença de osteócitos na matriz na região enxertada (seta preta). Coloração HE com aumento de 200x.

5.1.6 Grupo B (osso alógeno fresco congelado) – 60 dias

Os resultados histológicos demonstraram presença de um tecido mineralizado contendo grande quantidade de células no interior das lacunas na matriz óssea, osteócitos, mostrando que o tecido formado apresentava vitalidade. Nesse período ainda notamos a presença de grande quantidade de canais vasculares e ausência de infiltrado inflamatório agudo. Com 60 dias de reparação fica imperceptível a distinção do local de interface com o leito receptor em vista da fusão entre os tecidos e incorporação dos enxertos. Notamos ainda que, tangenciando a superfície externa dos enxertos há grande quantidade de osteoblastos, mostrando alta atividade osteogênica no local, o que significando que a reparação do enxerto ocorre não apenas na interface com o leito receptor, mas também à distância do mesmo.

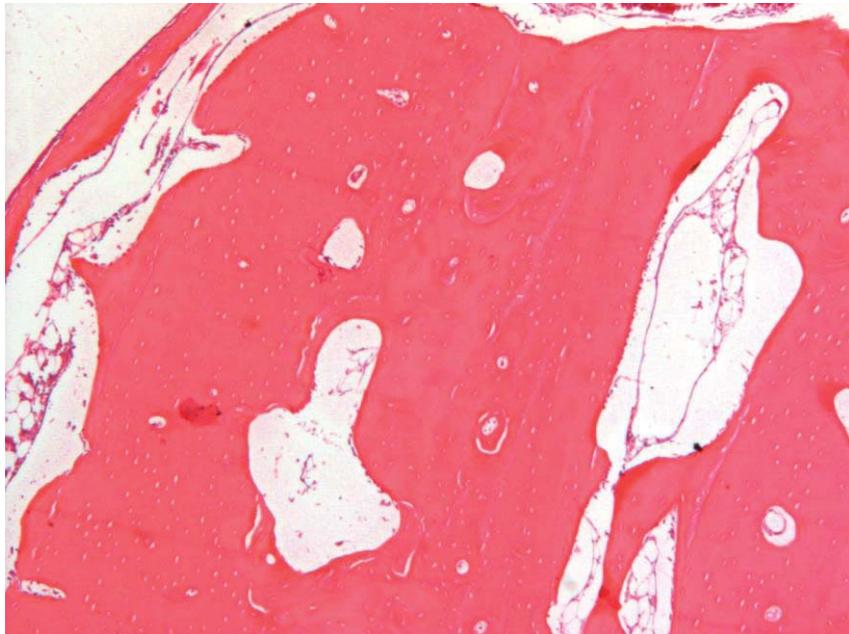


Figura 15 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando integração do enxerto na interface com inúmeras áreas de tecido medular entremeadas com tecido mineralizado. Coloração HE com aumento de 50x.

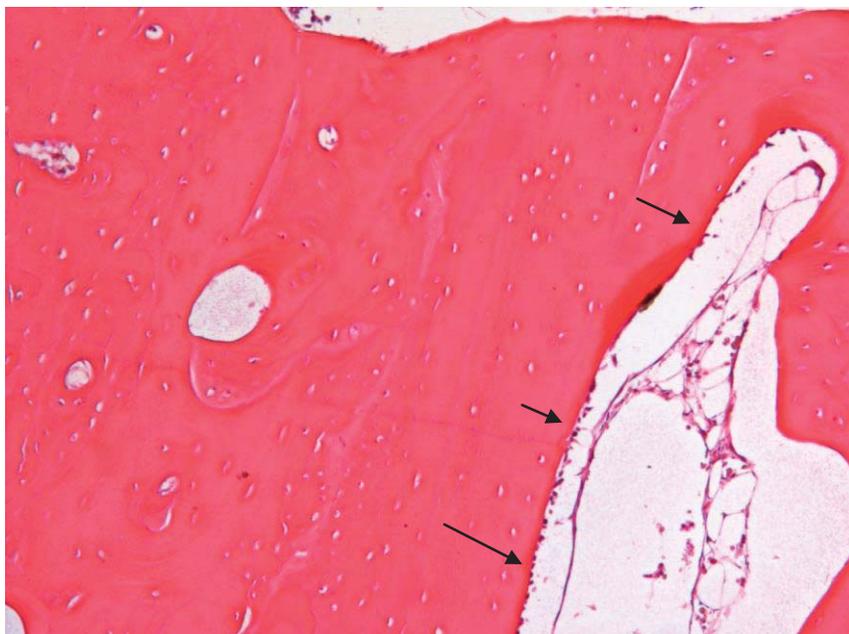


Figura 16 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando integração do enxerto na interface. Nota-se presença de intensa atividade osteoblástica (seta preta). Coloração HE com aumento de 100x.



Figura 17 - Análise histológica em 60 dias com osso alógeno mostrando presença de inúmeros osteoblastos alinhados tangenciando a superfície externa do enxerto (setas pretas). Nota-se ainda presença de osteócitos no interior da matriz mostrando vitalidade no tecido (setas brancas). Coloração HE com aumento de 200x.

5.2 Análise histomorfométrica e estatística

As contagens foram realizadas baseadas na quantidade de osteócitos presentes na matriz óssea, o que caracteriza a vitalidade da mesma, configurando característica de tecido ósseo normal. As análises foram realizadas na interface dos enxertos ósseos e na porção mediana dos blocos ósseos enxertados em vista das diferenças expressas nas imagens histológicas. Os valores, expressos em porcentagem foram analisados quanto ao tempo de tratamento, ou seja, 15, 30 e 60 dias, e

ainda em relação ao material utilizado para enxerto ósseo, ou seja, osso autógeno (A) e osso alógeno (B).

As médias de presença e ausência de osteócitos no interior das lacunas encontram-se presentes na tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Média \pm Desvio padrão entre os grupos experimentais com relação à presença de osteócitos nas lacunas na interface dos enxertos.

GRUPOS	PRESENTES	AUSENTES
Autógeno 15d	60,60 \pm 21,19	39,40 \pm 21,19
Autógeno 30d	57,87 \pm 16,09	42,13 \pm 16,09
Autógeno 60d	45,67 \pm 19,79	54,34 \pm 19,79
Alógeno 15d	30,45 \pm 14,62	69,55 \pm 14,62
Alógeno 30d	40,32 \pm 23,26	59,68 \pm 23,26
Alógeno 60d	41,06 \pm 17,18	58,94 \pm 17,18

Tabela 2 - Média \pm Desvio padrão entre os grupos experimentais com relação à presença de osteócitos nas lacunas na região mediana dos enxertos.

GRUPOS	PRESENTES	AUSENTES
Autógeno 15d	33,85 \pm 15,47	66,15 \pm 15,47
Autógeno 30d	54,26 \pm 15,64	45,74 \pm 15,64
Autógeno 60d	58,62 \pm 19,57	41,38 \pm 19,57
Alógeno 15d	32,85 \pm 14,56	67,15 \pm 14,56
Alógeno 30d	26,69 \pm 17,17	73,31 \pm 17,17
Alógeno 60d	47,44 \pm 20,71	52,56 \pm 20,71

Analisando os dados da região da interface dos enxertos ósseos pela análise de variância (ANOVA), podemos notar que houve diferença estatística significativa dentro dos grupos, ou seja, quando relacionamos o tempo de tratamento, pelo valor de $p < 0,05$ (nível de significância) encontrado, porém, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para presença de osteócitos na interface dos enxertos.

FONTE DE VARIAÇÃO	P
Grupo	0,3765
Período	0,0000037

Analisando os dados da região mediana dos enxertos ósseos pela análise de variância (ANOVA), podemos notar que houve diferença estatística significativa dentro dos grupos estudados e entre os grupos estudados, pelo valor de $p < 0,05$ (nível de significância) encontrados (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado da análise de variância (ANOVA) para presença de osteócitos na região mediana dos enxertos.

FONTE DE VARIAÇÃO	P
Grupo	0,002
Período	0,000000089

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou que existe diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos estudados, independente do grupo avaliado (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos dentro do grupo autógeno nos diferentes períodos, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença entre as médias.

PERÍODOS	Dms	DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	CONCLUSÃO ESTATÍSTICA
15d x 30d	9,4	20,41	Existe Diferença
15d x 60d	9,4	24,47	Existe Diferença
30d x 60d	9,4	4,36	NÃO existe

Tabela 6 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos dentro do grupo alógeno nos diferentes períodos, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença entre as médias.

PERÍODOS	Dms	DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS	CONCLUSÃO ESTATÍSTICA
15d x 30d	9,4	6,16	NÃO EXISTE
15d x 60d	9,4	14,59	Existe Diferença
30d x 60d	9,4	20,75	Existe Diferença

O teste de comparação múltipla de Tukey revelou que existe diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado do teste de Tukey para os dados de presença de osteócitos entre os grupos estudados, na região mediana dos enxertos. Valores com a diferença média

<i>PERÍODOS</i>	<i>Dms</i>	<i>DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS</i>	<i>CONCLUSÃO ESTATÍSTICA</i>
A15d x B15d	9,4	1	NÃO existe
A15d x B30d	9,4	7,16	NÃO existe
A15d x B60d	9,4	13,59	Existe Diferença
A30d x B15d	9,4	21,41	Existe Diferença
A30d x B30d	9,4	27,57	Existe Diferença
A30d x B60d	9,4	6,82	NÃO existe
A60d x B15d	9,4	25,77	Existe Diferença
A60d x B30d	9,4	31,93	Existe Diferença
A60d x B60d	9,4	11,18	Existe Diferença

6 DISCUSSÃO

O sucesso demonstrado com a utilização de implantes osseointegrados na reabilitação de pacientes desdentados parciais ou totais, aliados à divulgação da técnica e de seus avanços pela mídia, fez com que a busca por esta forma de tratamento aumentasse significativamente nos últimos anos (Adell et al. 1990). No entanto, não são todas as situações que são consideradas aptas à receber implantes para sua posterior reabilitação, existindo, ainda, casos onde não é possível colocá-los em sua posição protética ideal em um primeiro procedimento, fazendo com que algumas vezes tenhamos que preparar o local previamente à instalação dos implantes. Devemos sempre avaliar durante o planejamento as alterações que ocorrem após a perda do elemento dental, as modificações nos tecidos ósseos, que necessitam de reconstrução antes da instalação dos implantes (Barber, 1993; Branemark, 1975; Breine, 1980).

A necessidade de reconstrução dos tecidos através dos procedimentos de enxertos ósseos, geralmente utilizados com osso autógeno tem mostrado altos índices de sucesso, chegando a mais de 90% de sucesso segundo autores como Triplett (1996), permitindo à instalação dos implantes de modo a reabilitar os pacientes de maneira estética e funcional ideal. Nesses casos, a literatura é vasta em demonstrar que o fragmento de tecido a ser enxertado pode ser obtido de uma região do próprio paciente através de uma fonte doadora que pode ser intraoral ou extraoral, dependendo do tipo de planejamento e da quantidade de osso necessária para a reconstrução (Branemark, 1975; Fonseca, 1980; Garg, 1998; Hernandez-Alfaro, 2005; Kainulainen, 2002;

McCarthy, 2003; Proussaefs, 2002; Rocuzzo, 2004; Sethi, 2001; Zeiter, 2000).

Em nossa pesquisa foi feita a avaliação da utilização do osso homólogo fresco congelado, ou seja, material biológico obtido de animais diferentes, porém de mesma espécie, para a realização de enxertos ósseos verticais tipo *onlay*, avaliando não somente a qualidade histológica de formação óssea, mas também a quantificação de componentes celulares nos tecidos formados. O osso homólogo fresco congelado é utilizado em procedimentos de reconstruções ortopédicas desde a década de 40, principalmente da coluna vertebral, artroplastias, reconstrução do acetábulo e ainda, na recuperação da morfologia óssea após remoção de tumores (Tomford, 2000; Vaccaro, 2002). Seguindo na esfera ortopédica, alguns autores têm demonstrado bons resultados na literatura utilizando enxertos alógenos com índices de sucesso superiores a 90% após 10 anos de avaliação, mostrando que os enxertos sobrevivem em longo prazo quando submetidos a estímulos controlados (Rajan et al., 2006).

Em nosso estudo foram realizados 30 enxertos ósseos em blocos, em 15 animais, os quais receberam dois enxertos cada, um autógeno e outro alógeno. Os animais foram divididos em três grupos contendo cinco animais cada, para que pudéssemos avaliar as reações pós-operatórias em três tempos diferentes, aos 15, 30 e 60 dias no pós-operatório. No momento da preparação das peças histológicas, pudemos observar, todavia sem mensurações, o volume dos tecidos na região enxertada, que independente do material usado, mostrou um crescimento ósseo vertical e a ausência de reabsorção completa dos enxertos.

Optamos por realizar as análises em duas localizações diferentes em relação aos enxertos ósseos realizados em vista das apreciações das imagens histológicas. Por essa razão, a região de interface dos enxertos recebeu uma análise de contagem e estatística independente, onde comparamos os dados entre os diferentes grupos

estudados e o tempo de cicatrização pós-operatória. O mesmo foi realizado na região mediana dos blocos enxertados para que pudéssemos avaliar o comportamento dos enxertos de uma forma completa.

Os resultados mostraram que na interface dos blocos enxertados houve pouca diferença em nosso estudo, sendo que dentro do grupo do enxerto autógeno ocorreu uma diminuição na quantidade de osteócitos presentes no interior da matriz, ou seja, $60,60 \pm 21,19$ em 15 dias, e $44,75 \pm 19,79$ em 60 dias, mostrando maior quantidade de células no início da reparação, fato que corrobora os estudos de biologia óssea encontrados na literatura (Burchardt, 1983; Marx, 1998). Portanto, temos células provenientes do enxerto autógeno e do leito receptor, isto é, de duas fontes doadoras, além das células que se diferenciam em osteogênicas pelo estímulo indutor do enxerto e que ficam aprisionadas na matriz durante a secreção da mesma. Já nos enxertos alógenos vimos que os resultados foram diferentes, uma vez que não houve disponibilidade de células no interior do enxerto acelular, sem estímulo indutor, porque a preparação do material altera a quantidade de proteínas morfogenéticas ósseas. Portanto, observamos que a quantidade de células é baixa em um período de 15 dias, $30,45 \pm 14,62$ e $41,06 \pm 17,18$ aos 60 dias. Isso denota um processo de incorporação do material de forma mais lenta na interface.

Quando avaliamos a região mediana dos blocos enxertados, pudemos notar um comportamento diferente do que ocorre na interface. Segundo alguns estudos (Smiler, 2006), um dos fatores importantes para que alcancemos sucesso com os enxertos é manter a integridade do coágulo de fibrina, pois nesse local é que os nutrientes irão veicular para alcançar a região do bloco. Esses nutrientes poderão ter origem no leito receptor e estarão disponíveis a partir das pequenas perfurações corticais recomendadas. Dessa forma, a qualidade do tecido formado na interface é melhor do que o tecido formado na região mediana

dos blocos, uma vez que a distância dos nutrientes é maior, o que também demonstra que o processo de reparação dos enxertos irá ocorrer a partir da interface com o leito receptor, o que corrobora com a conclusão de alguns estudos (Smiler, 2006).

O fato de termos resultados semelhantes entre os grupos na região de interface mostrou que a atividade de osteocondução do material enxertado foi de extrema importância na reparação de um enxerto ósseo, concordando com estudos os quais mostraram que nessas situações o fator indutor, quando ausente no biomaterial utilizado, pode ser encontrado no próprio leito receptor. Contudo, não podemos referir os créditos de sucesso dos nossos enxertos a esse fato, uma vez que, a ocorrência de fusão na interface com tecido ósseo neoformado contendo vitalidade pela presença de lacunas preenchidas com osteócitos e canais vasculares, somente nos mostrou a incorporação inicial dos blocos enxertados, mas não demonstrou que estarão aptos a receberem carga. Para que possamos aplicar carga sobre enxertos, seja através de implantes osseointegrados, os blocos ósseos precisam se apresentar vitais em sua grande parte para que possa remodelar à custa do estímulo gerado.

Quando analisamos a região mediana dos blocos enxertados no período de 15 dias, vimos que o osso autógeno apresentou resultados semelhantes em relação à quantidade de osteócitos presentes na matriz do enxerto alógeno, sendo $33,85 \pm 15,47$ e $32,85 \pm 14,56$, respectivamente. Podemos associar esta semelhança ao tempo avaliado, uma vez que a literatura tem mostrado que o metabolismo do animal é aproximadamente 3 vezes mais rápido que do ser humano. Nesse período teríamos aproximadamente 45 dias de reparação de enxerto, ou seja, os osteócitos que vieram presentes no interior dos enxertos autógenos já não se encontram mais presentes, portanto, aqueles visualizados nas imagens histológicas correspondem aos provenientes da interface dos enxertos. Isto está em acordo os estudos de biologia óssea

(Burchardt, 1983; Marx, 1998) os quais mostraram que nesse período a rede vascular está completa e que o processo de reparação óssea encontra-se na fase dependente da osteocondução.

Entretanto, nas análises de 30 dias, pudemos observar que, nossos resultados concordavam com outros autores (Boyan, 2006; Lohmann, 2001; Stevenson, 1998), ou seja, os valores de osteócitos presentes no interior da matriz mostraram diferenças estatísticas significantes entre os grupos, de $54,26 \pm 15,64$ no grupo autógeno e $26,69 \pm 17,17$ no alógeno. Vemos que a discrepância se faz entender porque nessa fase há estímulo proveniente dos fatores de crescimento presentes no interior dos enxertos ósseos autógenos, mais precisamente as BMPs que promovem maior quimiotaxia e diferenciação de células. Dessa forma, com um número maior de células temos uma quantidade maior de matriz viável secretada. Nesse momento podemos dizer que o enxerto autógeno está apto a receber carga e se remodelar uma vez que grande parte dos blocos encontra-se vital. Os blocos pertencentes ao grupo alógeno, com valores baixos, demonstraram que a falta de um estímulo de indução direto, ou seja, proveniente do próprio material, foi um fator de interferência no processo de reparo dos enxertos, como podemos ver pelas análises estatísticas, que não houve diferença entre 15 e 30 dias no grupo. Portanto, na correspondência metabólica com o ser humano, teríamos aproximadamente 90 dias, tempo em que os enxertos alógenos ainda não se encontram aptos a receber estímulo pelos implantes osseointegrados.

Quando o tempo avança um pouco mais, nas análises de 60 dias pudemos observar que o processo de reparação do enxerto ósseo autógeno já se encontrava em menor atividade uma vez que os valores não mostraram diferenças com o período anterior, isto é, $58,62 \pm 19,57$ em 60 dias e $54,26 \pm 15,64$ aos 30 dias. Entretanto, quando vamos avaliar os enxertos alógenos notamos que houve diferença estatística significativa em comparação ao enxerto autógeno. Os valores de $47,44 \pm 20,71$

mostraram que ainda estão abaixo dos resultados vistos nos enxertos autógenos, porém, assim como os resultados encontrados na literatura (Shafiei, 2009), nossas análises demonstraram que o processo de formação nos enxertos alógenos ocorreu, porém, de forma mais lenta. Apenas em 60 dias de reparação no animal, correspondendo à aproximadamente 6 meses nos humanos, os enxertos alógenos se encontravam histologicamente vitalizados, com a presença de osteócitos de forma mais aleatória pela matriz do tecido. Mesmo dessa forma, os resultados nesse período em comparação aos enxertos autógenos foram menores estatisticamente.

O fato de termos encontrado osteócitos presentes na matriz dos enxertos autógenos e alógenos em região mais superficial dos blocos poderia ser explicado pela literatura (Delloye, 2002; Smiler, 2006) pela participação do perióstio na reparação dos enxertos. O perióstio, quando intacto, apresenta células osteogênicas em sua camada voltada ao tecido ósseo, o que poderia servir como fonte de nutrientes ao bloco enxertado como demonstrado por alguns autores (Delloye, 2002; Smiler, 2006). Esses autores mostraram que o perióstio pode responder por cerca de 10% do potencial de reparação dos enxertos. Entretanto, em nosso estudo, podemos afirmar que os resultados encontrados não tiveram relação com o perióstio, uma vez que uma barreira física de PTFE foi interposta entre os tecidos, impedindo, portanto, a ação do perióstio.

Em relação à origem embriológica dos enxertos realizados, nos cabe fazer alguns comentários uma vez que a literatura credita aos diferentes resultados de formação e reabsorção óssea, o fato de que alguns dos trabalhos foram realizados com enxertos de fontes doadoras diferentes, portanto, quantidades de porções cortical e medulares diferentes e origem embriológica distintas, o que torna difícil a comparação entre eles (Ozaki, 1998). Entretanto, podemos observar que há uma escassa quantidade de estudos científicos que utilizaram

metodologias de comparação entre ambos os enxertos, sendo a grande maioria, estudos clínicos onde as diferentes taxas de reabsorção e incorporação foram creditadas apenas à origem embriológica do material. Em nosso estudo utilizamos o material alógeno obtido de distintas regiões do animal, como a tíbia, o fêmur, a calvária e a crista ilíaca, portanto, algumas áreas com origens embriológicas diferentes da calvária que usamos como local receptor dos enxertos.

Dessa forma, houve variabilidade nos enxertos realizados, mas, o que pudemos notar foi que, em vista da espessura do tecido utilizado em ambos os enxertos, os mesmos mostraram quantidades de osso cortical semelhantes, com pouca, ou nenhuma quantidade de tecido esponjoso medular, e mesmo dessa forma conseguimos resultados semelhantes aos obtidos com os enxertos autógenos. O fato de encontrarmos bastante osso cortical pode explicar a baixa taxa de reabsorção encontrada durante o período do estudo. Ainda podemos julgar que, pelas análises histológica e histomorfométrica, as diferenças encontradas em nossos resultados foram em razão das características inerentes ao material e não a sua fonte doadora. Nesse quesito podemos fazer um comparativo com alguns resultados encontrados na literatura (Sendyk, 2010), em desacordo com os nossos, que não encontraram presença de osteócitos na matriz dos enxertos alógenos, mesmo após 12 semanas de avaliação. Entretanto, nesse estudo os autores compararam enxertos autógenos de crista ilíaca, rico em células mesenquimais indiferenciadas e BMPs na sua porção esponjosa, com enxertos alógenos de cabeça de fêmur, que pela sua dimensão era composto apenas por tecido cortical, portanto, de reparação bastante lenta.

Esse fato também foi explicado por autores como Burchardt, 1983, Marx e Garg, 1998, Ozaki e Buchman, 1998, os quais mostraram que a reparação do osso cortical foi mais lenta, podendo levar até alguns anos, por consistir de uma estrutura muito densa que necessita da presença de osteoclastos inicialmente para remoção de tecido e

abertura de canais para que células e vasos possam invadir o tecido e iniciar o processo de reabsorção e formação de novo osso (Burchardt, 1983; Marx, 1998; Ozaki, 1998). Por essa razão, pudemos verificar que os enxertos formados, tanto provenientes da calvária autógena, como do Banco de Tecidos eram caracterizados por osso neoformado e porções de osso residual contendo áreas com lacunas vazias, como descrito por outros autores que utilizaram enxertos autógenos corticais (Smolka et al., 2006; Zeiter, 2000; Zerbo, 2003).

Alguns autores relataram que o enxerto proveniente de região onde o processo de formação é endocondral apresentava maior taxa de reabsorção e levava um tempo maior para a reparação (Alt, 2003; Burchardt, 1983; Triplett, 1996; Whitaker, 1989). Entretanto, estudos demonstraram que o processo de formação do osso da região doadora não afetou a reparação ou influenciou na reabsorção dos enxertos, mas, sim o padrão estrutural do tecido ósseo, ou seja, se o osso a ser enxertado é de característica esponjosa ou cortical (Ozaki, 1998).

Esses autores, comparando enxertos corticais com processos de formação diferentes e esponjosos com processos de ossificação distintos, demonstraram que os enxertos corticais, independente do tipo de processo de ossificação, demoraram mais para serem incorporados, não havendo diferenças estatísticas entre os diferentes tipos de ossificação (Ozaki, 1998). O fato está de acordo com outros estudos que demonstraram a importância do tecido medular esponjoso no processo de reparação. A presença de uma área de superfície maior torna o tecido esponjoso um melhor osteocondutor em comparação ao tecido cortical, permitindo maior e melhor penetração vascular e celular, mantendo, através de sua arquitetura física, o tecido formado (Boyan, 2006; Smiler, 2006). Além disso, cabe ressaltar que o potencial osteogênico dos tecidos ósseos encontram-se nas células mesenquimais indiferenciadas localizadas nos tecidos medulares (Boyan, 2006; Smiler, 2006).

Os mesmos estudos ressaltaram a importância desse tipo de osso para a reparação dos enxertos ósseos, enfatizando que o tecido esponjoso apresenta cerca de 8 vezes mais área de superfície disponível para o crescimento celular e vascular, sendo responsável por aproximadamente 60% do potencial regenerador do tecido (Smiler, 2006). Sendo assim, podemos pensar que o osso alógeno, por apresentar-se como um material acelular, apresenta um potencial regenerador mais baixo, o que nos faz julgar que sua utilização com componente medular esponjoso se faz necessário.

Com base nos resultados de nosso estudo e nas considerações discutidas acima pela literatura, julgamos que os enxertos alógenos utilizados em nosso estudo continuariam a se remodelar por alguns meses, o que poderia alterar o grau de vitalidade em longo prazo, fazendo com que o número de células presentes no interior da matriz aumentasse, talvez tornando os enxertos mais semelhantes aos autógenos. Contudo, após o período de tempo estudado, os resultados que obtivemos mostraram que os enxertos alógenos apresentaram comportamento muito semelhante aos autógenos, porém, em velocidades diferentes.

Outro ponto que talvez possa levantar alguma discussão seria com relação ao potencial de osteoindução dos tecidos. A osteoindução foi atribuída ao fato de proteínas não-colágenas denominadas BMPs, constituintes de uma família de fatores de crescimento presentes na matriz óssea, estimularem as células indiferenciadas dos tecidos vizinhos, do leito receptor, a chegarem ao local do enxerto, se diferenciarem em osteoblastos e, conseqüentemente, formar matriz óssea (Marx, 1998; Urist, 1965). Alguns autores citam que o osso alógeno fresco congelado possa ser considerado como um material osteoindutor, pois o processo de congelamento não altera as BMPs, que somente seriam alteradas se fosse realizada a esterilização adicional com

irradiação gama (Leonetti e Koup, 2003; Perrott et al., 1992; Simpson, 2007; Wildemann, 2007).

Pelos resultados que foram encontrados em nosso estudo, podemos concordar parcialmente com essa afirmação, pois sabemos que um dos fatores de importância para o sucesso dos enxertos é a vascularização do mesmo. Enxertos *onlay* para aumentos verticais têm apresentado o maior índice de insucesso dentre todos os tipos de enxertos realizados uma vez que o enxerto sobreposto ao rebordo ósseo torna-se de difícil vascularização (McCarthy, 2003; Rocuzzo, 2004; Triplett, 1996). Aliado a esse fato, em nosso estudo utilizamos o coelho como modelo animal para análise de formação óssea, o que está em acordo com a literatura, entretanto, devemos ressaltar que apesar da semelhança fisiológica entre o metabolismo ósseo do animal com o humano, o tecido cortical animal apresenta menor quantidade de canais harvesianos e menor quantidade de ósteons, denotando uma densidade maior no tecido cortical, e conseqüentemente, menor disponibilidade vascular. Por essa razão foram realizadas pequenas perfurações na cortical do leito receptor para proporcionar maior vazão de sangue e nutrientes ao local do enxerto, buscando acelerar o processo de vascularização, como também preconizado por outros autores (Delloye, 2002; Greenstein et al., 2009). Todavia, se as BMPs estivessem presentes sem alterações nos tecidos alógenos frescos congelados, como sustentado por alguns estudos, os resultados seriam bastante semelhantes entre ambos, uma vez que as características e o potencial de formação óssea de ambos seriam praticamente os mesmos. Os resultados mostraram que apesar do processo ocorrer nos dois tipos de enxertos, a velocidade foi desigual denotando diferenças morfológicas e bioquímica entre ambos.

Esse mesmo pensamento que expusemos está em acordo com alguns estudos que buscaram quantificar a presença de BMPs e outros fatores de crescimento no tecido ósseo alógeno. Esses

estudos mostraram que, apesar de ser possível detectar a presença desses componentes, a quantidade expressa não seria suficiente para influenciar na reparação dos enxertos ósseos (Reikerás, 2008; Shafiei, 2009; Simpson, 2007; Wildemann, 2007).

A importância do preparo do leito receptor pela decorticação recomendada na literatura também foi percebida em nossos resultados uma vez que, independentemente do tempo avaliado e do material utilizado, vimos, histologicamente, que as pontes ósseas formadas e a quantidade de tecido ósseo com vitalidade na interface dos enxertos foram bastante semelhantes. O mesmo não ocorreu quando analisamos os enxertos em sua porção mediana ou pela superfície. Isso demonstrou que os tecidos apresentavam maior potencial de reparação nos locais onde houve maior disponibilidade de nutrientes. Assim, podemos pensar que os enxertos alógenos, por falta ou ineficiência de indução, devem buscar esses nutrientes no leito receptor, o que demonstra a importância da análise criteriosa da região em questão, previamente ao planejamento desse tipo de enxerto. Uma vez havendo falta de nutrientes no leito receptor, os enxertos alógenos não deverão ser indicados e, se assim o forem, estarão fadados ao insucesso.

Durante o estudo, verificou-se que no momento da manipulação dos enxertos antes de sua fixação, os mesmos demonstraram resistência e densidade muito semelhante ao osso autógeno, o que facilitou a sua adaptação - similar aos resultados encontrados por autores que utilizaram o osso alógeno fresco congelado em defeitos maxilomandibulares (D'Aloja, 2011; Leonetti e Koup, 2003). Essa densidade garantiu não somente a boa fixação do enxerto como diminuiu o risco de trincas e afrouxamento durante as fases iniciais da reparação. O fato encontra-se de acordo com os resultados mostrados por alguns autores, que demonstraram que o processo de congelamento a temperaturas abaixo de -78°C não alterou as propriedades

biomecânicas do enxerto, mantendo as condições para a utilização em blocos (Pelker et al., 1984).

Durante o período de 60 dias de controle pós-operatório não ocorreram situações com grandes complicações. Houve apenas 04 perdas de animais atribuídas ao estresse cirúrgico e superdosagem de anestésico, portanto, foram intercorrências sem relação com o tipo de material utilizado no estudo. Novos animais foram incluídos no estudo e devidamente distribuídos nos grupos que tiveram perdas. Além disso, não observamos durante todo o período de estudo quaisquer sinais ou sintomas de processo infeccioso no local, que pudesse comprometer a reparação natural, o que demonstrou a biocompatibilidade dos materiais utilizados para enxertos.

Apesar de não ser o objetivo do estudo e por essa razão não nos utilizamos de metodologia para tais análises, algumas questões são importantes discutir a respeito do osso alógeno fresco congelado. Primeiramente, há uma grande dúvida por parte de profissionais e pacientes quanto ao risco de transmissão de doenças através dos enxertos (Boyce, 1999; Mankin, 2004; Mankin, 2005). O osso alógeno fresco somente passa pela imersão em soluções antibióticas, limpeza externa e lavagem para a remoção de todo o tecido gorduroso e sanguíneo de seu interior. Esse processo é importante tanto na fase de reparação, pois melhora a característica de osteocondução, uma vez que a presença de gordura no tecido impede a penetração de vasos e células por falta de espaço, quanto no processo de armazenamento, uma vez que os lipídios sofrem degradação ao longo tempo, alterando as características dos tecidos (Laitinen, 2006). Os autores também demonstraram que o processo de congelamento não eliminava toda a carga viral do HIV, caso estivesse presente nos tecidos, fazendo com que alguns Bancos de tecidos buscassem outras formas de esterilização como a irradiação gama (Campbell, 1999; Joyce, 2005; Mankin, 2004; Mankin, 2005; Munting, 1988; Tomford, 1995).

A irradiação gama nos tecidos pode não somente atenuar a quantidade de vírus presente, diminuindo a capacidade para transmitir a doença, como pode esterilizar os tecidos pela eliminação total do vírus. No entanto, avaliando os resultados publicados por Tomford (1995) e por Mankin et al., (2005) vimos que valores até 25 kGy de irradiação não esteriliza os tecidos, mas diminui a quantidade de vírus presente nos tecidos, inativando-o. No entanto outros estudos, apesar de estarem de acordo com os autores citados demonstraram que a irradiação pode alterar as propriedades biomecânicas dos enxertos, tornando-os mais frágeis, o que poderia prejudicar o tratamento, uma vez que os enxertos que perderam a resistência precocemente sofreram deslocamentos, necessitando de remoção na maior parte dos casos (Boyce, 1999).

Ainda com relação à transmissão de doenças, autores demonstraram por dados do *Center of Disease Control* (CDC) dos Estados Unidos, que somente houve quatro possíveis casos de transmissão de HIV atribuídas aos transplantes ósseos; no entanto, cabe ressaltar que foram procedimentos realizados antes da aplicação e utilização dos protocolos criados pela AATB. Os critérios de seleção de doadores desenvolvidos pela AATB e, posteriormente, regulamentados também pela FDA dão segurança aos receptores de transplantes, praticamente zerando a possibilidade de contaminação através dos transplantes ósseos. Para que possamos fazer uma comparação, a taxa de risco de contaminação pelo HIV com transplantes ósseos atualmente gira em torno 1 para 1,6 milhões, ao passo que, para o risco de contaminação com a transfusão sanguínea, um procedimento corriqueiro, gira em torno de 1 para 450.000 (Joyce, 2005).

Tentando entender um pouco mais sobre o processo de congelamento e suas consequências nos tecidos, alguns estudos histológicos e histomorfométricos nos mostraram que os tecidos frescos e congelados com temperaturas entre -78 e -80 graus negativos sofreram alterações morfológicas que alteraram a sua imunogenicidade. As

alterações foram dilatações térmicas nas células por modificações de temperatura e presença de microcristais de gelo em seu interior, o que leva à ruptura da membrana celular. Associado a isso, na região da medula óssea também ocorreram alterações, causando um desarranjo no colágeno nessa área. Assim, os componentes que poderiam causar algum tipo de reação imunológica nos receptores, que seriam o sangue e a célula, foram inutilizados pelo processamento, conferindo biocompatibilidade do material (Andrade et al., 2009).

Ainda com relação à importante questão imunológica, uma vez que o foco de nosso estudo foi o transplante de tecido ósseo, nossos resultados demonstraram acordo com a teoria do estudo acima citado e com outros estudos (Reikerás, 2010; Reikerás, 2008; Reikerás, 2010) que mostraram análises de histocompatibilidade e de contagem de anticorpos. Esses estudos, assim como o nosso, demonstraram que a incorporação do enxerto ocorreu de forma mais lenta; todavia, esses resultados não sofreram interferência da resposta imunológica, mas sim da sua composição. A resposta imunológica não interferiu nos resultados, assim que, 4 meses após as análises, os tecidos congelados e autógenos apresentaram resultados semelhantes, ponto esse em desacordo com os resultados que encontramos. Entretanto, cabe salientar que nosso estudo utilizou coelho como animal de estudo, enquanto os estudos de imunologia utilizaram ratos que apresentavam um metabolismo aproximadamente 6 vezes mais rápido do que o humano, o que poderia explicar a semelhança entre os resultados (Reikerás, 2010; Reikerás, 2008; Reikerás, 2010).

Os enxertos ósseos autógenos representam o procedimento de eleição em termos de reconstrução de defeitos ósseos, pois, segundo alguns autores, consistem no transplante de células vivas e fatores de crescimento de uma determinada área para outra do mesmo indivíduo (Marx, 1984). Pela presença de células no interior do enxerto apresentam a propriedade de formar tecido ósseo, sendo, portanto

osteogênico. Além disso, apresentam grandes quantidades de BMPs que são glicoproteínas não colágenas presentes na matriz óssea, com função estimuladora para que as células indiferenciadas presentes no leito receptor penetrem na estrutura interna do enxerto e se diferenciem em osteoblastos, células formadoras de matriz óssea (Marx, 1984; Roberts, 1987). Essa propriedade de osteoindução, seguida pela osteocondução, que corresponde ao arcabouço formado pela estrutura física do enxerto, permite a invasão vascular e celular para o seu interior, fazendo com que o enxerto vascularize mais rapidamente e seja melhor incorporado do que outras alternativas de enxertia (Burchardt, 1983; Cornell, 1998; Herr, 1996; Urist, 1965).

Cabe enfatizar como alternativa aos enxertos autógenos, consagrados nas literaturas médica e odontológica, que optamos por estudar uma nova opção de reconstrução óssea na área da Odontologia - o enxerto alógeno fresco congelado. O material demonstrou características muito semelhantes aos enxertos autógenos quanto às propriedades biomecânicas, forma e densidade de manuseio, formação óssea, padrão de reabsorção óssea, adaptação e fixação dos mesmos. No entanto, nosso embasamento inicial para a aplicação do material foram os bons resultados em longo prazo encontrados nos estudos de reconstruções da área médica, defeitos em coluna vertebral, reconstruções do acetábulo e defeitos em ossos longos (Buckley et al., 2005; Malloy e Hilibrand, 2002). O nosso estudo fez uma avaliação em curto prazo, com bons resultados e semelhantes ao de outros autores que utilizaram os enxertos alógenos frescos congelados para a reabilitação de defeitos ósseos maxilomandibulares (Carinci, 2008; D'Aloja, 2008; Gapski, 2008; Leonetti e Koup, 2003).

Podemos discutir alguns pontos importantes sobre os estudos da área médica, principalmente, aqueles que demonstraram reconstruções da coluna vertebral, acetábulo e artroplastias, os quais serviram de base para demonstrar a segurança da utilização dos enxertos

alógenos e suas vantagens em relação aos autógenos; no entanto, os defeitos ortopédicos apresentam características diferentes dos defeitos maxilomandibulares (Buckley et al., 2005; Hamer et al., 1996; Malloy e Hilibrand, 2002). Defeitos da coluna vertebral ou reconstruções do acetábulo e enxertos ósseos ao redor de próteses de fêmur se comportam de maneiras diferentes. Quando se reconstrói um defeito em coluna vertebral, o enxerto fica interposto, portanto recebe carga total, ou seja, constantemente a coluna recebe carga para que seja mantida a postura do indivíduo (Vaccaro, 2002). No caso de procedimentos de artroplastias, o enxerto ósseo é realizado ao redor das próteses de fêmur, e os enxertos realizados nas reconstruções de acetábulo recebem carga constantemente proveniente do peso do corpo do indivíduo (Buckley et al., 2005). Já nos casos de defeitos maxilomandibulares, os enxertos realizados recebem uma carga não constante e somente ocorre durante o processo da mastigação. Além disso, os enxertos realizados com a finalidade de instalação de implantes não recebem toda carga, pois o implante fica inserido parte em enxerto, parte em osso remanescente, evitando a sobrecarga dos enxertos. Por essa razão, e levando-se em consideração que a região maxilomandibular apresenta um complexo vascular mais abundante, podemos imaginar que os enxertos ósseos realizados para instalação de implantes osseointegrados apresentem longevidade maior que as reconstruções ortopédicas.

Complementando a idéia de nosso estudo, não utilizamos o osso alógeno congelado seco desmineralizado (DFDBA), pois o processamento desse tipo de material envolve a remoção de praticamente toda a água de seu interior mediante um processo de sublimação que deixa cerca de 5% de água somente (Goldberg, 1987; Hammer, 1999; Joyce, 2005). Isso faz diminuir o risco de contaminação através do enxerto e o tecido pode ser embalado a vácuo e mantido armazenado em temperatura ambiente. No entanto, a remoção da água dos tecidos os deixa desidratado e o tecido tem sua resistência alterada, não podendo

ser utilizado sob a forma de blocos, mas, sim particulados, o que dificulta as reconstruções do tipo *onlay*. São mais indicados para as reconstruções onde existam remanescentes de paredes ósseas que possam dar sustentação e estabilidade ao material, como defeitos de cavidades e associado às técnicas de regeneração óssea guiada. Além disso, há desnaturação de todo o componente proteico dos tecidos o que eliminaria o possível potencial de indução do mesmo (AATB, 1992; Boyce, 1999).

Com relação à utilização do osso proveniente de Bancos de tecidos obtidos de doadores, vale lembrar que o comércio de órgãos no Brasil é ilegal, configurando crime baseado na lei 9.434 de fevereiro de 1997, portanto, não se pode cobrar o tecido obtido para finalidade de transplante. No entanto, verificamos que os seis Bancos de Tecidos Músculo-esqueléticos existentes e devidamente regulamentados no país não são subsidiados pelo Governo, o que faz os Bancos terem custos elevados de captação de órgãos, deslocamento das equipes de captação, realização de testes sorológicos, processamento e armazenamento de tecidos e de documentos dos doadores e receptores, que devem ser mantidos pelas entidades por até 20 anos. Sendo assim, é conveniente alertar que os custos cobrados atualmente pelos Bancos de tecidos são referentes aos custos obtidos com o processamento e armazenamento dos tecidos e não ao tecido em questão.

7 CONCLUSÃO

A metodologia empregada e os resultados histológicos e histomorfométricos obtidos nos permitiu concluir que:

- 1) O material alógeno fresco congelado não promoveu a formação de infiltrado inflamatório agudo que pudesse levar à reabsorção do enxerto, comprovando a sua biocompatibilidade;
- 2) O material alógeno fresco congelado permitiu a incorporação em sua interface de maneira semelhante ao material autógeno, não havendo diferença estatística significativa entre ambos;
- 3) O material alógeno fresco congelado permitiu a formação óssea para a reconstrução vertical tipo *onlay*, porém em um processo mais lento e estatisticamente significativo;
- 4) O material alógeno fresco congelado apresentou quantidade celular menor, estatisticamente significativo, em relação ao material autógeno.

8 REFERÊNCIAS*

AATB. General standards for tissue banking, technical manual for muscle-skeletal tissue banking. 1992.

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15 years study of osseointegrated implants en the treatment of the edentulous jaw. . Int J Oral Surg. 1981 Dec;10(6):387-416.

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark P-I, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. Int J Oral Maxillofac Implants. 1990;5:347-59.

Alt V, Meeder PJ, Seligson D, Schad A, Atienza Jr C. The proximal tibia metaphysis: a reliable donor site for bone grafting. Clin Orthop and Related Research. 2003;414:315-21.

Amrani S, Anastassov GE, Montazem AH. Mandibular ramus/coronoid process grafts in maxillofacial reconstructive surgery. J Oral Maxillofac Surg. 2010;68(3):641-6.

Andrade MG, Sa CN Marchionni AM, dos Santos Calmon de Bittencourt TC, Sadigursky M. Effctcs of freezing on bone morphology. Cell and Tissue Banking. 2009;9(4):279-87.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barber HD, Betts NJ. Rehabilitation of maxillofacial trauma patients with dental implants. *Implant Dent.* 1993;2:191-3.

Boyan BB, Ranly DM, McMillian J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive Ability of Human Allograft Formulations. *J Periodontol.* 2006;77(9):1555-63.

Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin of North America.* 1999 October;30(4):571-81.

Branemark PI, Lindstrom J, Hallen O, Breine U, Jeppson PH, Ohman A. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1975;9(2):116-28.

Brazaitis MP, Mirvis SE, Greenberg J, Ord RA. Severe retroperitoneal hemorrhage complicating anterior iliac bone graft acquisition. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994;52(3):314-6.

Breine U, Branemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1980;14(1):23-48

Buckley SC, Stockley I, Hamer AJ, Kerry RM. Irradiated allograft bone for acetabular revision surgery. Results at a mean of five years. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(3):310-3.

Burchardt H. The Biology of Bone Graft Repair. *Clin Orthop and Related Research.* 1983 Apr;(174):28-42.

Campbell DG, Li, P. Sterilization of HIV with irradiation: relevance to infected bone allografts. *The Australian & New Zealand Journal of Surgery*. 1999 July;69(7):517-21.

Carinci F, Brunelli G, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R et al. A Retrospective Study on 287 Implants Installed in Resorbed Maxillae Grafted with Fresh Frozen Allogeneous Bone. *Clin Implant Dent Res*. 2008(3).

Carinci F, Brunelli G, Zollino I, Franco M, Viscioni A, Rigo L et al. Mandibles grafted with fresh-frozen one: An evaluation of implant outcome. *Implant Dentistry*. 2009;18:86-95.

Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dentistry and Related Research* 2003;5(3):154-60.

Cornell CN, Einhorn TA, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop* 1998 Oct;355S:267-73.

Cosmo LAM, Macedo LGS, Pelegrine AA, Macedo NL. Enxerto ósseo em levantamento de seio maxilar com osso humano fresco congelado. *Implant News*. 2007;4(3):249-53.

Czitrom AA, Gross AE, Langer F, Sim FH. Bone banks and allografts in community practice. *Instr Course Lect*. 1988;37:13-24. Reviews

D'Aloja C, D'Aloja E, Santi E, Franchini M. The use of fresh-frozen bone in oral surgery: a clinical study of 14 consecutive cases. *Blood Transfus*. 2011;9:41-5.

D'Aloja E, Santi E, Aprili G, Franchini M. Fresh frozen homologous bone in oral surgery: case reports. *Cell Tissue Bank* 2008;9:41-6.

de Macedo NL, de Macedo LG, Matuda FS, Ouchi SM, Monteiro AS, Carvalho YR. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. *Braz Dent J.* 2003;14(2):119-24.

Delloye C, Simion P, Nyssen-Behets C, Banse X, Bresler F, Schmitt D. Perforations of cortical bone allografts improve their incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(396):240-7.

Ebraheim NA, Yang H, Lu J, Biyani A, Yeasting RA. Anterior iliac crest bone graft. Anatomic considerations. *Spine.* 1997 April 15;22(8):847-9.

Enneking WFB, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Br.* 1975;57(2):237-52.

Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes EJ, Baker RD. Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *Ann Plast Surg.* 1980;23(8):39-48.

Gapski R, Misch C, Stapleton D, Mullins S, Cobb C, Vansanathan A et al. Histological, Histomorphometric, and Radiographic Evaluation of a Sinus Augmentation With a New Bone Allograft: A Clinical Case Report. *Implant Dent.* 2008;17(4):430-8.

Garg AK, Morales MJ, Navarro I, Duarte F. Autogenous mandibular bone grafts in the treatment of the resorbed maxillary anterior alveolar ridge: rationale and approach. *Implant Dent.* 1998;7(3):169-76.

Goldberg VM, Setevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clinical Orthop*. 1987;(225):7-16.

Greenstein G, Greenstein B, Cavallaro J, Tarnow D. The Role of Bone Decortication in Enhancing the Results of Guided Bone Regeneration: A Literature Review. *J Periodontol*. 2009;80(2):175-89.

Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA. Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br*. 1996 May;78(3):363-8.

Hamer AJ, Stockley I, Elson RA. Changes in allograft bone irradiated at different temperatures. *The Bone and Joint Surgery - British Volume*. 1999 March;81-B(2):342-4.

Harbon S, Chartouni M, Ricbourg B. Morbidity of iliac bone grafts. A study apropos of 100 consecutive cases. *Ann Chir Plast Esthet* 1991;36(1):45-50.

Hernandez-Alfaro F, Pages CM, Garcia E, Corchero G, Arranz C. Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(5):777-83.

Herr G, Hartwig CH, Boll C, Kusswetter W. Ectopic bone formation by composites of BMP and metal implants. *Acta Orthop Scand*. 1996;67(6):606-10.

Itoman M, Nakamura S. Experimental study on allogenic bone grafts. *International Orthopaedics*. 1991;15(2):161-5.

Jacotti M. Simplified onlay grafting with a 3-dimensional block technique: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Jul-Aug;21(4):635-9.

Joyce MJ. Safety and FDA regulations for musculoskeletal allografts. *Clin Orthop and Related Res*. 2005;(435):22-30. Review

Kainulainen VT, Sandor GKB, Oikarinen KS, Clokie CML. Zygomatic bone: an additional donor site for alveolar bone reconstruction. Technical Note. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(5):723-8.

Kappe T, Cakir B, Mattes T, Reichel H, Flores M. Infections after bone allograft surgery: a prospective study by a hospital bone bank using frozen femoral heads from living donors. *Cell Tissue Bank*. 2010;11(3):253-9.

Kaufman E, Wang P. Localized vertical maxillary ridge augmentation using symphyseal bone cores: a technique and case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(3):293-8.

Keith JJ, Petrungaro P, Leonetti JA, Elwell CW, Zeren KJ, Caputo C. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006 Aug;26(4):321-7.

Laitinen M, Kivikari R, Hirn M. Lipid oxidation may reduce the quality of a fresh-frozen bone allograft. Is the approved storage temperature too high? *Acta Orthop*. 2006;77(3):418-21.

Laitinen M, Kivikari R, Hirn M. Lipid oxidation may reduce the quality of a fresh frozen bone allograft. Is the approved storage temperature too high. *Acta Orthopaedica*. 2006;77(3):418-21.

Lane SW, Guggenheim B, Egyedi P. Comparison of homogenous freeze-dried and fresh autogenous bone grafts in the monkey mandible. *J Oral Surgery*. 1972 September;30(9):649-55.

Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue integrated protheses. Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence. 1985;199-209.

Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent*. 2003;12(3):217-26.

Leonetti JA, Koupp R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent*. 2003;12(3):217-26.

Lohmann CH, Andreacchio D, Koster G, Carnes DL, Cochran DL., Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001 Nov;121(10):583-90.

Macedo LGS, Monteiro ASF, Macedo NL. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. *Implant News*. 2007 jan/fev;4(1):49-55.

Malloy KM, Hilibrand AS. Autograft versus allograft in degenerative cervical disease. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Jan;394:27-38.

Mankin HJ, Hornicek FJ. The use of massive allografts in the treatment of knee tumors. *Techniques in Knee Surgery*. 2004;3(3):170-9.

Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin, KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop and Related Res.* 2005;(432):210-6.

Marx RE, Garg AK. Bone Structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4):267-76.

Marx RE, Miller RI, Ehler WJ, Hubbard G, Malinin TI. A comparison of particulate allogeneic and particulate autogenous bone grafts into maxillary alveolar clefts in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984;42(1):3-9.

McCarthy C, Patel, RR, Wragg PF, Brook IM. Dental implants and onlay bone grafts in the anterior maxilla: analysis of clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(2):238-41.

Miller NA, Penaud J, Kohler C, Ambrosini P. Regeneration of bone graft donor sites. *Clin Oral Implant Res.* 1999 August 1999;10(4):326-30.

Misch CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(6):767-76.

Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants. A preliminary reports. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7(3):360-6.

Munting E, Wilmart JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. Effect of sterilization on osteoconduction: comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand.* 1988;59(1):34-8.

Neo M, Matsushita M, Morita T, Nakamura T. Pseudoaneurysm of the deep circumflex iliac artery: a rare complication at an anterior iliac bone graft donor site. *Spine.* 2000 Jul;25(14):1848-51.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F. Morbidity if harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implant Res.* 2001 October 2001;12(5):495-502.

Orsini G, Bianchi AE, Vinci R, Piatelli A. Histologic evaluation of autogenous calvarial bone in maxillary onlay bone grafts: a report of 2 cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(4):394-8.

Ott K, Metak G, Gussregen B, Henke J, Ascherl R, Langhammer H. Evaluation of fresh and irradiated allogenic cortical bone for defect reconstruction in connection with a titanium implant and bone cement-an experimental study in rabbits. *The Bone and Joint Surgery - British Volume.* 1997 March;79-B(Supplement I):5.

Ozaki W, Buchman S. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102(2):291-9.

Parrish FF. Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor. *J Bone Joint Surg Am.* 1973 Jan;55(1):1-22.

Peleg M, Sawatari Y, Marx RN, Santoro J, Cohen J, Bejarano P. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks for augmentation of alveolar bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 Jan-Feb;25(1):153-62.

Pelker RR, Friedlaender GE, Marlhan TC, Panjabi MM, Moen CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res.* 1984;1(4):405-11.

Perrott DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Oct;21(5):260-5.

Perry M, Hodges N, Hallmon DW, Ress T, Opperman LA. Distraction Osteogenesis versus autogenous onlay grafting. Part I: Outcome of implant integration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(5):695-702.

Petrungaro PS, Amar S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histological evaluation. *Implant Dent*. 2005;14(2):139-48.

Piotrowski M, Pankowski R, Luczkiewicz P, Markowicz A. A comparison of the effect of autogenous vs. frozen homogenous grafts on the healing of non-union of forearm bones. *Traumatologia*. 2008;10(2):146-51.

Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD. The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation and implant placement: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(2):238-48.

Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R. Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial. *J Trauma*. 2006 June;60(6):1322-9.

Reikerás O. Impact of freezing on bone graft incorporation biomechanical evaluation in rat. *Clinical Biomechanics*. 2010;25(2):177-80.

Reikerás O, Shegarfi H, Naper C, Reinholt FP, Rolstad B. Impact of MHC mismatch on bone incorporation: an experimental study in rats. *J Orthop Res*. 2008;26:925-31.

Reikerás O, Sigurdson UW, Shegarfi H. Impact of freezing on immunology and incorporation of bone allograft. *J Orthop Res*. 2010;28(9):1215-9.

Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Bone physiology and metabolism. J Calif Dent Assoc. 1987;15(10):54-61. Review

Roccuzzo M, Ramieri G, Spada MC, Bianchi SD, Berrone S. Vertical alveolar ridge augmentation by means of a titanium mesh and autogenous bone grafts. Clin Oral Impl Res. 2004;15(1):73-81.

Rozen B, Brosh T, Salai M, Herman A, Dudkiewicz I. The effects of prolonged deep freezing on the biomechanical properties of osteochondral allografts. Cell Tissue Bank. 2009 Feb;10(1):27-31.

Schreurs BW, Sloof TJ, Buma P, Gardeniers JW, Huiskes R. Acetabular reconstruction with impacted morsellised cancellous bone graft and cement. A 10- to 15-year follow-up of 60 revision arthroplasties. J Bone Joint Surg Br. 1998 May;80(3):391-5.

Schwartz-Arad D, Levin L, Sigal L. Surgical success of intraoral autogenous block onlay bone grafting for alveolar ridge augmentation. Implant Dent. 2005;14(2):131-8.

Scivittaro GB, Bueno RBL, Giglio FPM, Sant'Ana E. Análise da reabsorção de enxertos ósseos onlay de duas áreas intrabucais sobre o rebordo alveolar. Implant News. 2005;2(4):385-90.

Sendyk WR, Querido MRM, Silva CEXSR. Avaliação histológica da reparação de enxertos ósseos autógenos e alógenos frescos congelados em coelhos. Implant News. 2010;7(3a-PBA):27-34.

Sethi A, Kaus T. Ridge augmentation using mandibular block bone grafts: preliminary results of an ongoing prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001;16:378-88.

Shafiei Z, Bigham AS, Dehghani, SN, Nezhad ST. Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2009;10(1):19-26.

Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration: a literature review. *Minerva Stomatol*. 2004;53(5):191-206.

Simpson D, Kakarala G, Hampson K, Steele N, Ashton B. Viable cells survive in fresh frozen human bone allografts. *Acta Orthopaedica*. 2007;78(1):26-30.

Smiler D, Soltan M. The Bone Grafting Decision Tree: a systematic methodology for achieving new bone. *Implant Dentistry*. 2006;15(2):122-8.

Smolka W, Bosshardt DD, Mericske-Stern R, Liguka T. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Apr;17(2):149-55.

Stacchi C, Orsini G, Di Iorio D, Breschi L, Di Lenarda R. Clinical, histologic, and histomorphometric analyses of regenerated bone in maxillary sinus augmentation using fresh frozen human bone allografts. *J Periodontol*. 2008 Sept;79(9):1789-96.

Stevenson S, Einhorn T, Lane J. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):239-46.

Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone: bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop and Related Res*. 1995;(311):232-46.

Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg.* 1995 Nov;77-A(11):1742-54.

Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank.* 2000;1(2):105-9.

Triplett RG, Schow SR. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996;54(4):486-94.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Clin Orthop and Related Research.* 1965 February(395):4-10.

Vaccaro AR, Cirello J. The use of allograft bone and cages in fractures of the cervical, thoracic, and lumbar spine. *Clinical Orthop and Related Res.* 2002 January;(394):19-26. Review

Verdugo F, Simonian K, Smith McDonald R, Nowzari H. Quantitation of mandibular ramus volume as a source of bone grafting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009(Suppl 1):e32-7.

Verdugo F, Simonian K, Smith McDonald R, Nowzari H. Quantitation of mandibular symphysis volume as a source of bone grafting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010;12(2):99-104.

Verhoeven JW, Cune MS, Terlouw M, Zoon MAO, De Putter C. The combined use of endosteal implants and iliac crest onlay grafts in the severely atrophic mandible: a longitudinal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;26:351-7.

Viscioni A, Franco M, Rigo L, Guidi R, Spinelli G, Carinci F. Retrospective study of standard diameter implants inserted into allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(2):387-93.

Vos MD, Raghoobar GM, Van der Wal JE, Kalk WW, Vissink A. Autogenous femoral head as grafting material for mandibular augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(12):1320-3.

Weiland AJ, Phillips TW, Randolph MA. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plastic Reconstr Surg*. 1984 Sep; 74(3):368-79.

Whitaker LA. Biological boundaries: a concept in facial skeletal restructuring. *Clin Plast Surg* 1989;16(1):1-10.

Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Hass NP, Schmidmaier G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):107-14.

Zeiter DJ, Ries WL, Sanders JJ. The use of a bone block graft from the chin for alveolar ridge augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20(6):619-27.

Zerbo IR, De 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(6):759-66.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José dos Santos, 777 - Jd. São Diniz - São José dos Campos, SP - 13506-900
Fone: (12) 3947-9000 - Fax: (12) 3947-9223 / 9207
E-mail: cepa@foc.usp.br / www.foc.usp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **18/2008-PA/CEP**, sobre
"Reparação óssea em enxerto alógeno fresco congelado na calvária de coelhos: Análise histológica e histomorfológica", sob responsabilidade de **LUÍS GUILHERME SCAVONE DE MACEDO** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de agosto de 2008.



Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora