



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

VINÍCIUS FRANZÃO GANZAROLI

**Reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo
particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico. Estudo
histomorfométrico, imunoistoquímico e microtomográfico
em ratos**

**ARAÇATUBA, SP
2024**

VINÍCIUS FRANZÃO GANZAROLI

**Reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo
particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico. Estudo
histomorfométrico, imunoistoquímico e microtomográfico
em ratos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Cirurgia e
Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Dr^a. Daniela
Ponzoni

Coorientador: Prof. Assoc. Dr. Edilson
Ervolino.

ARAÇATUBA, SP

2024

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

G211r Ganzaroli, Vinícius Franzão.
Reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto
ósseo particulado obtido por meio de ultrassom cirur-
gico : estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e
microtomográfico / Vinícius Franzão Ganzaroli. -
Araçatuba, 2024
46 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Daniela Ponzoni
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Transplante ósseo 2. Piezocirurgia 3. Ultrassom
I. T.

Black D7
CDD 617.6

Dedico este trabalho à minha família, a qual me ensinou princípios, os quais me constituem e delimitam meus caminhos, mostrando que as dificuldades podem ser superadas e com esforço e dedicação os objetivos podem ser alcançados.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e do senhor vice-diretor **Prof. Tit. Luciano Tavares Angelo Cintra**, por ter me proporcionado um ensino superior de qualidade e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À minha orientadora, **Prof. Assoc. Daniela Ponzoni**, sou grato por toda orientação e ensinamentos. Obrigado por me acolher em seu grupo de pesquisa e por proporcionar grandes oportunidades. Agradeço também por todos os ensinamentos transferidos durante as clínicas de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. A senhora é um exemplo de profissional, demonstrando que com muita calma e destreza consegue ensinar e transmitir grande conhecimento.

A todo grupo de pesquisa da **Profª Daniela Ponzoni**, pela receptividade, amizade e apoio. Agradeço pelos momentos gratificantes que passamos juntos, onde um sempre ajuda o outro, sem vocês não conseguiria realizar este trabalho. Aprendi muito com este grupo, o qual sempre estive disposto a compartilhar novas experiências e conhecimentos.

Ao meu coorientador, **Prof. Assoc. Edilson Ervolino**, sou grato por ter me recebido de braços abertos. O senhor é um exemplo de competência e dedicação à docência e à pesquisa científica. Obrigado por depositar grande confiança em mim, permitindo que pudesse desenvolver grande parte desta pesquisa em seu laboratório, sou grato por todos os materiais que o senhor me forneceu, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

À **Profª. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto**, por ser um exemplo de profissional e competência, acrescentando junto a essas qualidades um bom humor inigualável. Muito obrigado pela sua atenção e carinho durante esses anos e por permitir que utilizasse seu laboratório para construir este trabalho.

À **Profª. Assoc. Ana Paula Farnezi Bassi**, por toda orientação, cuidado e competência dedicados ao ambulatório de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, durante esses anos pude aprender muito. Agradeço por todo conhecimento clínico e ensinamentos, você é um exemplo a ser seguido.

Ao **Prof. Assoc. Dr. Leonardo Perez Faverani**, por ser exemplo de dedicação, docente e profissional, junto a Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Muito obrigado pela sua atenção e carinho durante estes anos da pós-graduação.

Ao **Prof. Assoc. Dr. Osvaldo Magro Filho**, por todo ensinamento durante os plantões realizados e pela oportunidade de poder participar de várias cirurgias ortognáticas. Agradeço por todo conhecimento que você transmitiu a mim e a meus colegas, sem dúvidas você transforma a vida de seus pacientes e alunos.

Ao **Prof. Dr. Luan Felipe Toro**, agradeço por toda amizade e ensinamento durante todos os anos de iniciação científica e pós-graduação, muito dos conhecimentos que você ensinou foram aplicados neste trabalho. Você é um exemplo de profissional e um grande histologista.

Aos meus amigos e amigas que a FOA proporcionou. Agradeço em especial aqueles que desde o início do mestrado estiveram ao meu lado **Laura, Carol, Harrisson, Luana, Izabella, João Matheus, Stefany, Ana Maria, Olavo, Melissa, Luan Toro**, sou grato pelas risadas, brincadeiras, conhecimentos compartilhados e pelo dia-a-dia no ambulatório e nos plantões.

À minha **família**, pelo total apoio, atenção, carinho e compreensão. Agradeço minha mãe **Antonia**, meu pai **José Carlos**, minha tia **Shirlei** e minha irmã **Jessica**. Vocês me passaram princípios os quais levarei por toda minha vida, são meus exemplos, onde me espelho para construir quem eu sou.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante os dois anos de pós-graduação.

"Odontologia é uma profissão que requer, dos que a ela se dedicam, o senso estético do artista, a destreza manual do cirurgião, o conhecimento científico do médico e a paciência de um monge".

Papa Pio XII

GANZAROLI, V. F. **Reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico. Estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e microtomográfico em ratos.** 2023. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2023.

RESUMO

A piezocirurgia é uma técnica inovadora de osteotomia que vem sendo amplamente utilizada no meio odontológico. Este trabalho teve por objetivo avaliar o reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos preenchidos com enxerto ósseo autógeno particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico. Em quarenta e cinco ratos foi confeccionado um defeito ósseo crítico de 6mm na calvária, preenchido de acordo com os grupos: osso autógeno raspado com ultrassom cirúrgico (GAU), osso autógeno raspado com raspador ósseo (GAR) e osso autógeno triturado com pilão manual (GAT). Todos defeitos foram recobertos por membrana reabsorvível. Os animais foram eutanasiados aos 7, 30 e 60 dias. Foram realizadas análises histológicas, histométricas para porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO-NF), imunoistoquímica (TRAP) e microtomográfica. Houve neoformação óssea parcial em todos os grupos. O grupo GAT apresentou maior PTO-T aos 7 e 30 dias em relação aos demais grupos. O tempo de reabsorção está relacionado diretamente com o tamanho da partícula óssea enxertada. O grupo GAT, apresentou partículas maiores e reabsorção mais lenta em relação aos grupos GAR e GAU. Aos 30 dias o grupo GAT apresentou menor quantidade de tecido ósseo neoformado em relação ao grupo GAU e GAR no mesmo período. A imunomarcagem para células TRAP-positivas foi moderada em todos os grupos aos 7 dias e aos 30 e 60 dias prevaleceu um baixo padrão de imunomarcagem. Os resultados microtomográficos, indicaram que os grupos GAU, GAR e GAT tiveram maior neoformação óssea e remodelação óssea aos 60 dias. Conclui-se que o método de obtenção de enxerto ósseo particulado por meio de raspador manual, ultrassom cirúrgico e triturado promoveram reparo semelhante das cavidades críticas. O ultrassom cirúrgico e o raspador manual fornecem partículas menores e de mais rápida reabsorção.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Piezocirurgia. Ultrassom

GANZAROLI, V. F. Repair of bone defects filled with particulate bone graft obtained through surgical ultrasound. Histomorphometric, immunohistochemical and microtomographic study in rats. 2023. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Piezosurgery is an innovative osteotomy technique that has been widely used in dentistry. This work aimed to evaluate the bone repair of critical defects in rat calvarias filled with particulate autogenous bone graft obtained through surgical ultrasound. In forty-five rats, a 6mm critical bone defect was created in the calvaria, filled according to the groups: scraped autogenous bone with surgical ultrasound (GAU), manually scraped autogenous bone (GAR) and crushed autogenous bone (GAT). All defects were covered with a resorbable membrane. The animals were euthanized at 7, 30 and 60 days. Histological, histometric analyzes for percentage of total bone tissue (PBT-T) and percentage of newly formed bone tissue (PBT-NF), immunohistochemistry (TRAP) and microtomography were performed. The GAT group showed higher PBT-T at 7 and 30 days compared to the other groups. The resorption time is directly related to the size of the grafted bone particle. The GAT group presented larger particles and slower reabsorption compared to the GAR and GAU groups. At 30 days, the GAT group showed a smaller amount of newly formed bone tissue compared to the GAU and GAR groups in the same period. Immunostaining for TRAP-positive cells was moderate in all groups at 7 days and at 30 and 60 days, with a low pattern of immunostaining prevailing. The microtomographic results indicated that the GAU, GAR and GAT groups had greater bone formation and bone remodeling at 60 days. It is concluded that the method of obtaining particulate bone graft using a manual scraper, surgical ultrasound and grinding promoted similar repair of critical cavities. Surgical ultrasound and manual scraper provide smaller, faster-resorbing particles.

Keywords: Bone graft. Piezosurgery. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Grupos experimentais e distribuição de animais por período de eutanásia	14
Figura 2 –	Resumo do protocolo experimental ao qual foram submetidos os diferentes grupos	15
Figura 3 –	Defeito ósseo de tamanho crítico	16
Figura 4 –	Posicionamento e adaptação da membrana	17
Figura 5 –	Procedimento cirúrgico	19
Figura 6 –	Regiões do defeito ósseo crítico, capturadas para análise histométrica e histológica	22
Figura 7 –	Fotomicrografias panorâmicas do defeito ósseo crítico de 6mm	28
Figura 8 –	Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito	29
Figura 9 –	Porcentagem de tecido ósseo total	31
Figura 10 –	Porcentagem de tecido ósseo neoformado	31
Figura 11–	Imunomarcacão para TRAP	33
Figura 12–	Fotomicrografias da imunomarcacão para TRAP	34
Figura 13–	Resultados das análises microtomográficas nos grupos experimentais	36
Figura 14–	Reconstruções microtomográficas demonstrando a estruturação e arquitetura do tecido ósseo na região de defeito ósseo crítico em calvaria de ratos	37

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
+	Mais
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
BRA	Brasil
BSA	Soro albumina bovino, bovine serum albumine
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	Grama
GAR	Grupo Autógeno Raspado com raspador ósseo
GAT	Grupo Autógeno Triturado
GAU	Grupo Autógeno Raspado com Ultrassom cirúrgico
GC	Grupo Coágulo Sanguíneo
HE	Hematoxilina-eosina
KHz	Quilohertz
mg/Kg	Miligrama por quilograma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
PBS	Tampão fosfato salino
PTO-NF	Porcentagem de tecido ósseo neoformado
PTO-T	Porcentagem de tecido ósseo total
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
TG	Tricrômico de Goldner
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato, tartrate-resistant acid phosphatase
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Animais	13
2.2	Delineamento do experimento	14
2.2.1	Habituação dos animais	14
2.2.2	Grupos experimentais	14
2.2.3	Confecção do defeito ósseo de tamanho crítico em calvária	15
2.2.4	Membrana reabsorvível	16
2.2.5	Anestesia	17
2.2.6	Protocolo para cirurgia experimental	17
2.2.7	Eutanásia e obtenção das amostras	19
2.3	Processamento histológico	20
2.4	Processamento imunoistoquímico	20
2.5	Análise da condição geral de saúde e da ferida cirúrgica	21
2.6	Análise histopatológica, histométrica da PTO-T e PTO-NF e imunoistoquímica para TRAP	21
2.7	Microtomografia computadorizada (MICRO CT)	23
2.8	Análise estatística	24
3	Resultados	24
3.1	Condição geral de saúde e aspecto da ferida cirúrgica	24
3.2	Aspecto histológico nos diferentes grupos experimentais	24
3.2.1	Grupo Autógeno Raspado com Ultrassom cirúrgico (GAU)	24
3.2.2	Grupo Autógeno Raspado com Raspador ósseo (GAR)	25
3.2.3	Grupo Autógeno Triturado (GAT)	26
3.3	Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) na região de defeito ósseo crítico	30
3.4	Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO-NF) na região de defeito ósseo crítico	30
3.5	Imunomarcção TRAP	32
3.6	Resultado das análises microtomográficas	35
4	Discussão	38
5	Conclusão	41
	Referências	42
	Anexos	46

1- INTRODUÇÃO

A piezocirurgia é uma técnica inovadora de osteotomia que utiliza vibrações ultrassônicas piezoelétricas e vem sendo amplamente utilizada na cirurgia oral e buco-maxilo-facial^{1,2}. Em 1880, os irmãos Curie, Jacques e Pierre⁴, descobriram a piezoeletricidade, fenômeno que deu origem à piezocirurgia, desenvolvida em meados do século XX^{3,4}. Contudo, em 1988, o cirurgião oral Tomaso Vercelloti², desenvolveu um dispositivo de osteotomia piezoelétrico e proporcionou o uso clínico difundido da técnica. Atualmente, os dispositivos piezoelétricos vêm sendo amplamente utilizados para osteotomias diversas, elevação do seio maxilar, extração de terceiros molares, cirurgias ortognáticas, coleta de osso autógeno e enxertos ósseos^{2,5,6}.

Tais dispositivos convertem corrente elétrica em ondas ultrassônicas por meio de um transdutor ultrassônico, cristal piezoelétrico, ligado a uma peça de mão que é anexa a bisturi ou pontas de corte, o qual é capaz de converter um campo elétrico oscilante aplicado ao cristal em uma vibração mecânica. As vibrações mecânicas produzidas estão na frequência ultrassônica maior que 20 quilohertz (kHz)^{7,8}. Portanto, as ondas ultrassônicas, pelo fenômeno da agitação, podem induzir à desorganização e fragmentação de diversos corpos, permitindo a segmentação de interfaces de sólido a sólido por meio de vibração distinta e sólido-líquido por meio de cavitação⁷.

Frequências 25-30 quilohertz (kHz) emitidas pelo dispositivo piezoelétrico são capazes de produzir microvibrações ultrassônicas de 60-120µm, ocasionando o corte seletivo do tecido mineralizado. Desta forma, a piezocirurgia reduz o risco de danos aos tecidos moles, tais como vasos sanguíneos, nervos e mucosas, pois o dispositivo cessa sua atividade ao se aproximar destes tecidos, mantendo sua integridade, ou seja, cortando apenas tecidos mineralizados. Porém, frequências superiores a 50kHz possibilitam o corte dos tecidos moles^{5,6,9}.

A utilização do piezo tornou-se uma importante técnica alternativa à cirurgia óssea convencional, principalmente em casos em que existe o risco de comprometimento de estruturas moles adjacentes⁶. Este tipo de tecnologia tem sido utilizado nos procedimentos cirúrgicos ortopédicos, craniofaciais, otológicos, orbitários, reconstrutivos faciais e orais¹⁰, apresentando maior precisão e segurança

durante procedimentos que demandassem osteotomia em relação às técnicas disponíveis com instrumentos cirúrgicos manuais e motorizados⁵.

O uso de instrumentos manuais, tais como cinzéis, osteótomos ou alveolótomos para osteotomias de tecido duro tem um longo histórico na prática clínica dos cirurgiões dentistas. Contudo, o desenvolvimento de dispositivos motorizados de alta rotação que funcionam por meio da pressão do ar ou energia elétrica, apresentam algumas desvantagens no procedimento cirúrgico como: necrose tecidual devido ao superaquecimento ósseo, maior pressão na peça de mão para seccionamento ósseo, dificuldade em determinar profundidade do corte, maior possibilidade de ocasionar iatrogenia nos tecidos e falha no controle da velocidade dos instrumentos rotatórios¹¹.

Diferentemente dos instrumentos rotatórios, o ultrassom cirúrgico apresenta como benefícios a redução do superaquecimento decorrente do efeito de cavitação, maior hemostasia, melhor visibilidade da área cirúrgica, menor desconforto pós operatório, maior precisão no corte, melhor sensibilidade tátil e precisão, menor edema, dor e processo inflamatório devido à preservação de vasos e nervos, reparo ósseo mais rápido em comparação ao uso de instrumentos rotatórios^{2,5}. No entanto, como desvantagens apresenta custo elevado do equipamento e manutenção, necessita de tempo cirúrgico maior para realizar as osteotomias, além de habilidade cirúrgica adicional e treinamento prévio¹².

Em relação ao uso do ultrassom cirúrgico na remoção de blocos de enxertos ósseos autógenos, a piezocirurgia demonstra ser útil para coletar raspas de osso, as quais são produzidas numa granulação ideal para sua efetividade e permanência no leito receptor do enxerto. Além disso, a piezocirurgia é mais econômica durante o corte, não desperdiçando tecido ósseo na linha do defeito realizado em relação às brocas e microserras convencionais¹⁴. Por permitir cortes limpos de até 1cm de profundidade, reduz o trauma e evita desgaste desnecessário de osso adjacente, criando enxertos com excelentes dimensões¹³.

Ao comparar as técnicas convencionais realizadas com brocas de metal, a osteotomia piezoelétrica demonstrou uma remodelação óssea e reparo ósseo mais favorável. Além disso, foi observada uma redução no número de células inflamatórias e um aumento na osteogênese ao redor de implantes instalados com ultrassom piezoelétrico em comparação com sistema de brocas convencionais¹⁵. Portanto, os

benefícios da piezocirurgia associada às características do enxerto ósseo autógeno e suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas, demonstra ser promissora para coleta de enxerto ósseo¹⁶.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o reparo ósseo de defeitos críticos em calvárias de ratos preenchidos com enxerto ósseo autógeno particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico, raspador ósseo e triturado com pilão manual.

A hipótese nula é de que não há benefícios em termos de reparo ósseo em usar a técnica de remoção do enxerto autógeno com motor piezoelétrico em comparação aos métodos tradicionais.

2- MATERIAL E METÓDOS

2.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo 45 ratos machos (03 a 04 meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com aproximadamente 200 e 300g. Os ratos foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP) e, posteriormente, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia (Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) da FOA-UNESP, sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação e exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, onde tiveram livre acesso à água e à alimentação balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, BRAZIL). Foram aplicadas todas as medidas possíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP (PROCESSO nº 545/2019).

2.2 Delineamento do experimento

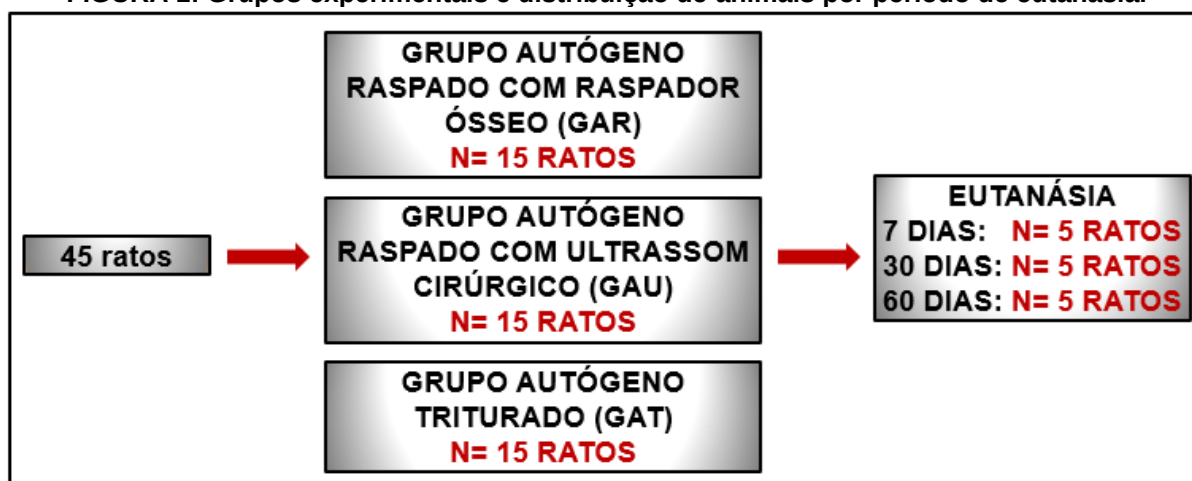
2.2.1 Habituação dos animais

Os animais ao serem trazidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA-UNESP) para o Biotério de Experimentação passaram por um período de habituação. Sendo a principal finalidade promover a sua familiarização com o ambiente e com o operador e reduzir o estresse. Tal protocolo compreendeu os 7 dias que antecederam o início do delineamento dos grupos, sendo neste período, a cada três dias, cada animal foi manuseado entre as mãos do operador durante um intervalo de 30 segundos, no qual regularmente foram aplicadas as manobras de restrição que simularam aquelas empregadas para realização da anestesia.

2.2.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos, sendo cada grupo composto por 15 animais, onde 5 animais foram eutanasiados em cada período para a análise (7, 30 e 60 dias após a cirurgia) (Figura 1).

FIGURA 1: Grupos experimentais e distribuição de animais por período de eutanásia.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Em todos os grupos foi realizado um defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de 6mm de diâmetro.

GRUPO AUTÓGENO RASPADO COM ULTRASSOM CIRÚRGICO (GAU)
n=15: o defeito foi preenchido com osso autólogo raspado utilizando ultrassom

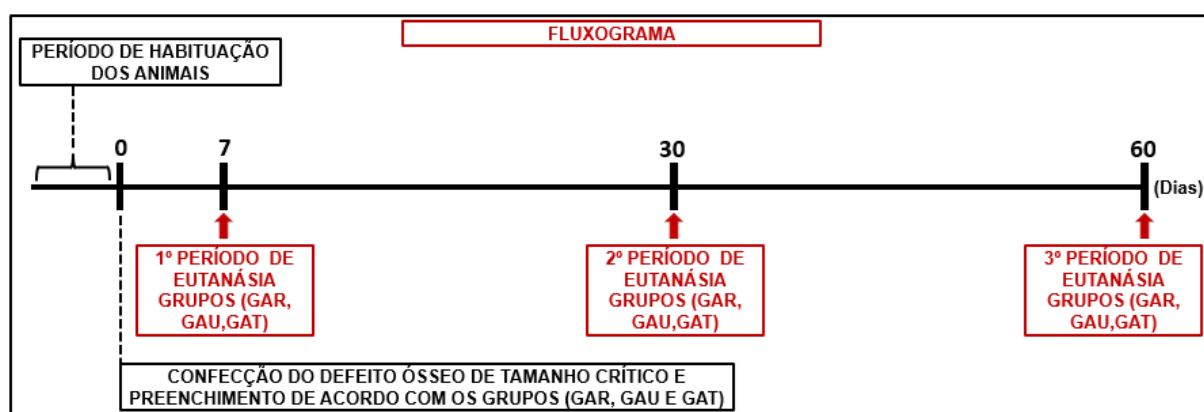
cirúrgico Driller®, cerca de 5mm distante do defeito criado.

GRUPO AUTÓGENO RASPADO COM RASPADOR ÓSSEO (GAR) n=15: o defeito foi preenchido com osso autógeno raspado com raspador ósseo (PPBUSER2/3, Hu-Friedy, Alemanha), removido cerca de 5mm distante do defeito criado.

GRUPO AUTÓGENO TRITURADO (GAT) n=15: o osso autógeno removido durante osteotomia para criação do defeito foi triturado com pilão manual e utilizado para preencher o defeito.

Todos os defeitos foram recobertos por membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (Gen Derm®, Baumer, São Paulo, Brasil).

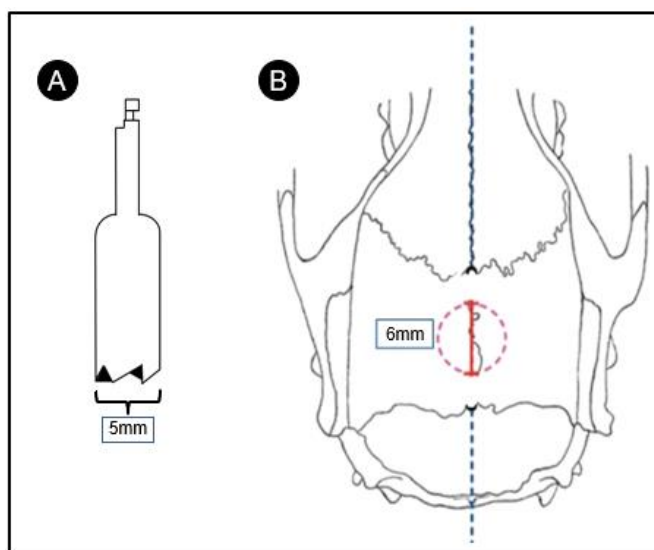
FIGURA 2: Resumo do protocolo experimental ao qual foram submetidos os diferentes grupos.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

2.2.3 Confeção do defeito ósseo de tamanho crítico em calvária

De acordo com Schmitz & Hollinger em 1986¹⁷, um defeito de tamanho crítico é definido como a menor ferida intraóssea em um determinado osso e espécie animal que não cicatriza espontaneamente durante a vida do animal¹⁷. No estudo em questão, foi realizado em cada animal um defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de 6mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, com auxílio de broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA), sendo cuidadosamente removido o córtex externo e interno da calvária evitando perfuração ou lesão da dura-máter^{18,19}. (Figura 3).

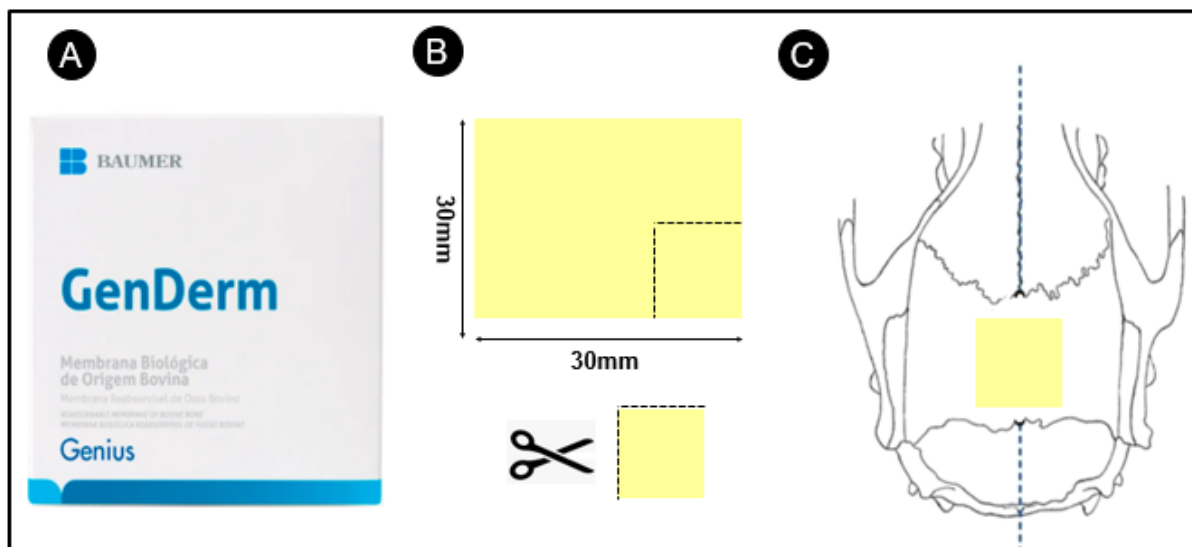
FIGURA 3: Defeito ósseo de tamanho crítico

Legenda: A – Representação gráfica de broca trefina 5mm de diâmetro interno; B – Defeito ósseo crítico de 6mm criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representado pela linha tracejada em vermelho, corte longitudinal do centro da calvária representado pela linha tracejada em azul.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

2.2.4 Membrana reabsorvível

Em cada animal após realização do defeito ósseo de tamanho crítico e preenchimento com enxerto ósseo autógeno, foi instalada uma membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (Gen Derm®, Baumer, São Paulo, Brasil) com aproximadamente 30mm x 30mm recortadas e adaptadas de forma a recobrir todo o defeito ósseo (Figura 4).

FIGURA 4: Posicionamento e adaptação da membrana

Legenda: A – Membrana reabsorvível de cortical óssea bovina (Gen Derm®, Baumer, São Paulo, Brasil); B – Esquema representando o recorte da membrana 30mm x 30mm; C – Membrana adaptada sobre o defeito ósseo crítico em calvária.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

2.2.5 Anestesia

Para a realização do defeito ósseo crítico, enxerto ósseo autógeno e adaptação da membrana, os animais foram anestesiados via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

2.2.6 Protocolo para cirurgia experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação anestésica. Foi realizado a tricotomia na região da calvária craniana, antissepsia com Polivinilpirrolidona iodo (PVPI) em solução aquosa, contendo 1% de iodo ativo (Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto) (Figura 5-A) e aposição de campos cirúrgicos estéreis.

Em seguida foi realizada uma incisão triangular no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 cm (Figura 5-B), com lâmina de bisturi nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e realizado descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy,

Alemanha). Com auxílio de broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) (Figura 5-C) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico de 6mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 5-D-E-F).

No grupo GAR os defeitos foram preenchidos com osso autógeno raspado com raspador ósseo convencional (PPBUSER2/3, Hu-Friedy, Alemanha), coletado cerca de 5mm distante do defeito ósseo crítico criado. (Figura 5-G).

No grupo GAU os defeitos foram preenchidos com osso autógeno raspado com ultrassom cirúrgico, utilizando ponta ES 001 que correspondente ao cinzel raspador trapezoidal afiado indicado para osteotomia e enxerto da Driller®, coletado cerca de 5mm distante do defeito ósseo crítico criado (Figura 5-H).

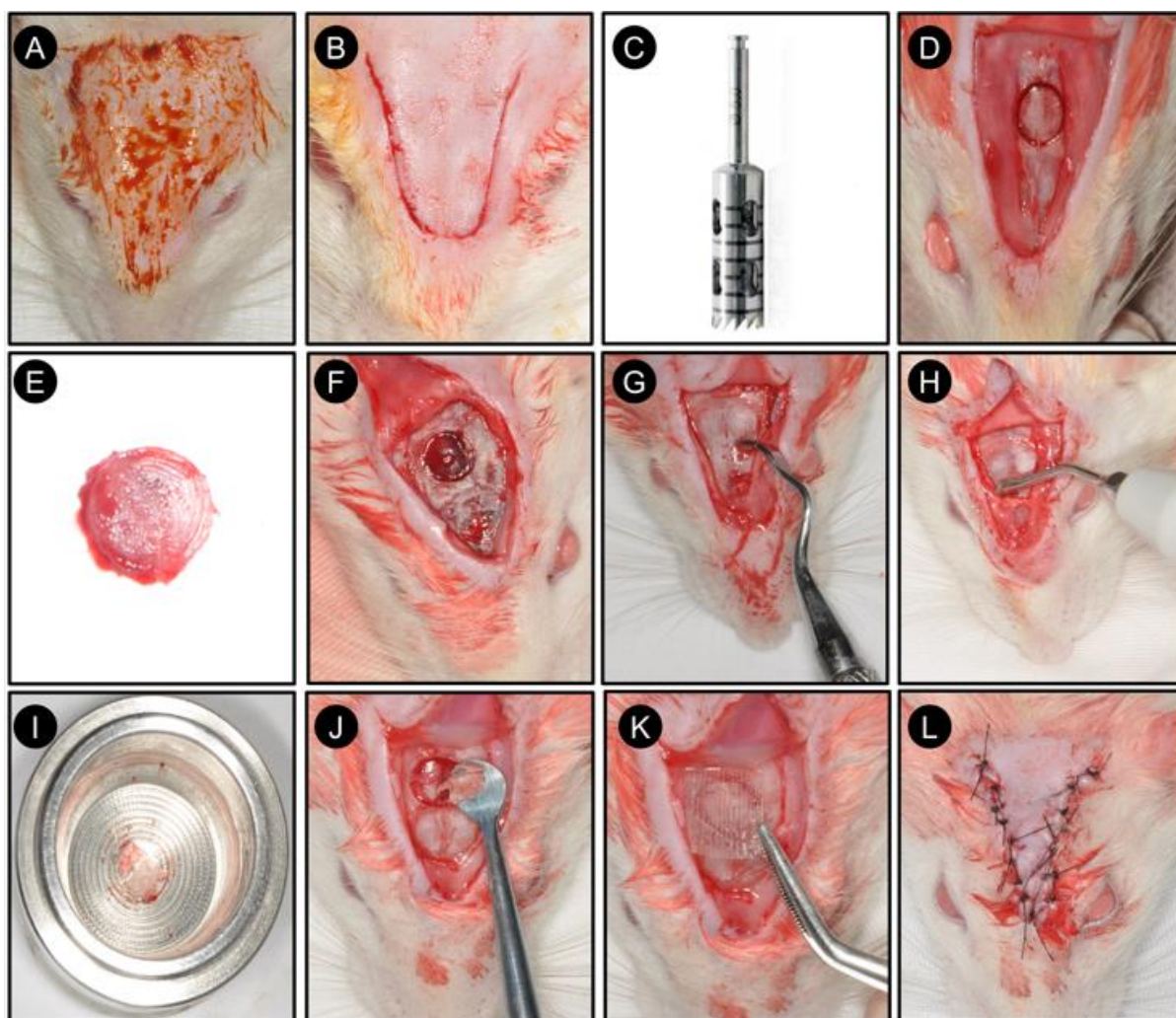
No grupo GAT defeitos foram preenchidos com osso autógeno removido com trefina 5mm e triturado com pilão manual (Figura 5-I-J).

Todos os enxertos ósseos removidos foram medidos com seringa descartável estéril afim de padronizar os volumes ósseos inseridos no defeito.

Posteriormente foram instaladas membranas de cortical óssea bovina e reabsorvível (Gen Derm®, Baumer, São Paulo, Brasil) sobre o defeito (Figura 5-k).

Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados com pontos interrompidos simples (Figura 5-L) com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil).

Imediatamente após a cirurgia os animais receberam dose única intramuscular de 0,01mL/100g de pentabiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e 50-600mg/kg de Dipirona Sódica (Analgésico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

FIGURA 5: Procedimentos cirúrgicos.

Legenda: A - tricotomia e antissepsia; B - incisão triangular; C - broca trefina de 5 mm; D - perímetro demarcado pela trefina; E - tecido ósseo removido do defeito; F - defeito cirúrgico de 6mm; G - raspador ósseo convencional; H - ultrassom cirúrgico Driller®; I - pilão manual; J - preenchimento do defeito; K - instalação da membrana; L - sutura.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

2.2.7 Eutanásia e obtenção das amostras.

Cinco animais foram eutanasiados de acordo com os períodos de 7, 30 e 60 dias em cada grupo, com sobredose anestésica via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil). Após a eutanásia, as calotas cranianas foram cuidadosamente dissecadas e submetidas à fixação em formaldeído 4% durante 48 horas. Após a fixação 3 espécimes de cada grupo experimental 30 e 60 dias foram

colocadas em álcool 70° para o escaneamento microtomográfico, sendo que após este procedimento foram direcionadas ao processamento histológico.

2.3 Processamento histológico

Após fixação em formaldeído 4%, os espécimes foram submetidos à lavagem em água por 24 horas, submetidos à desmineralização durante aproximadamente 90 dias em solução desmineralizadora composta de PBS acrescida de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) trocada periodicamente. Em seguida as peças foram lavadas novamente em água corrente por 24 horas e as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal separando o defeito ósseo crítico em lado A e lado B. Posteriormente, foram desidratadas, diafanizadas, impregnadas e incluídas em parafina. A microtomia foi realizada com 5 µm de espessura, os cortes foram montados em lâminas histológicas de forma a ficarem 3 cortes do lado A na parte superior da lâmina e 3 cortes do lado B na parte inferior da lâmina. Parte das amostras foram separadas para coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Goldner (TG), destinadas para análise histopatológica e histométrica, e outra parte foi destinada à técnica de imunistoquímica.

2.4 Processamento Imunoistoquímico

Os cortes histológicos foram desparafinizados pelo xilol, e hidratados em soluções decrescentes de álcool etílico, ao término de cada etapa da reação imunoistoquímica, foi realizado a lavagem em PBS das lâminas histológicas.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Para bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram tratados com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio por uma hora. O bloqueio da biotina endógena também foi efetuado por um período de 1 hora, com solução contendo PBS e leite em pó desnatado a 4%. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em seguida com uma solução á base de soro albumina bovino (BSA) por 12 horas.

As lâminas histológicas foram incubadas em anticorpo primário anti-fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) do rato gerado em cabra (Santa Cruz Biotechnology®). O anticorpo primário foi diluído em BSA em uma concentração de

1:100. Após 24 horas de incubação em anticorpo primário, uma segunda incubação com anticorpo secundário biotinilado universal foi realizada por 1 hora, seguida da incubação pela estreptavidina conjugada com peroxidase da raiz forte - HRP (DAKO - Carpinteria, CA, EUA) por mais uma hora.

A revelação foi realizada utilizando o cromógeno 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB-Substrate e DAB-Chromogen, DAKO - Carpinteria, CA, EUA). Para a contracoloração, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 5 minutos e lavadas em água para remoção do excesso de corante.

Para montagem, as lâminas foram desidratadas e diafanizadas, sendo recobertas pelo meio de montagem (Permount®, Fisher Scientific Company LLC.) e protegidas com lamínulas de vidro (Olen®, Kasvi Produtos Laboratoriais).

Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.5 Análise da condição geral de saúde e da ferida cirúrgica

Durante todo o período experimental, a condição geral de saúde dos animais foi observada e foi efetuado o monitoramento do peso corporal periodicamente. Já em relação a ferida cirúrgica foi realizado a inspeção visual.

2.6 Análise histopatológica, histométrica da PTO-T e PTO-NF e imunoistoquímica para TRAP

A análise histopatológica foi efetuada de forma a compreender a região periférica e central do defeito. Sendo avaliado nas lâminas histológicas em HE e TG os seguintes parâmetros: padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo marginal; padrão de celularidade e estruturação do tecido conjuntivo; presença, natureza e intensidade da resposta inflamatória local; comportamento e aspecto estruturais do material enxertado.

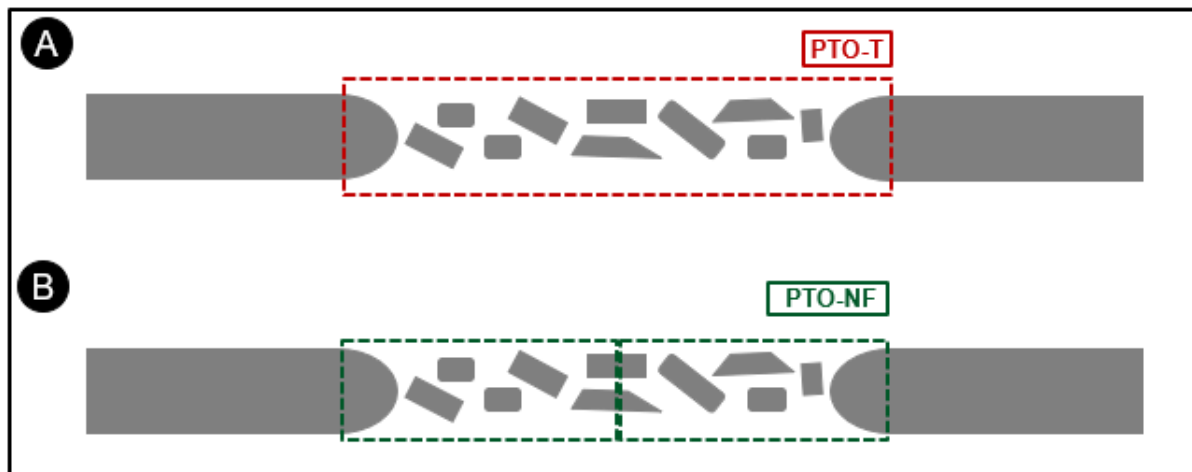
Para análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) e porcentagem de tecido neoformado (PTO-NF), as lâminas histológicas foram coradas com HE e TG, capturadas utilizando-se um scanner (MoticEasyScan One, Motic Digital Pathology). Para PTO-T foi capturada uma imagem histológica panorâmica em HE do defeito ósseo com 800nm com auxílio do software (Motic DSAssistant 4K), para

mensuração empregou-se o programa ImageJ® (versão 1.51i; National Institutes of Health, Bethesda/MD, EUA), com o auxílio da ferramenta Polygon Selections foi definido um Roi o qual compreendeu de uma extremidade a outra do defeito (Figura 6-A), equivalente a área total, esta área foi definida como 100%. Dentro desta área foi demarcado a área de tecido ósseo total.

Para a PTO-NF foram capturadas duas imagens histológicas em TG do defeito ósseo com 100nm com auxílio do software (Motic DSAssistant 4K), sendo uma imagem do coto direito ao centro do defeito e uma imagem do coto esquerdo ao centro do defeito (Figura 6-B). Cada imagem corresponde a uma área definida como 100%. Dentro desta área foi demarcado a área de tecido ósseo neoformado, caracterizado por presença de osteócitos, osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteoclastos.

A PTO-T e a PTO-NF, foram expressas sob a forma de média da porcentagem $\pm$ desvio padrão em cada um dos grupos experimentais.

FIGURA 6: Regiões do defeito ósseo crítico, capturadas para análise histométrica e histológica



Legenda: A- Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T); B- Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO-NF).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Para análise imunoistoquímica das células TRAP-positivas, foi capturada uma imagem do centro do defeito ósseo, com um aumento de 400x, obtidas empregando-se câmera digital ((AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Um

quadrado cujos lados apresentavam 1000 μ m foi posicionado no centro das imagens obtidas. A contagem de células TRAP-positivas foi efetuada nesta região e expressas como número de células por mm² $\pm$ desvio padrão em cada grupo experimental.

2.7 Microtomografia computadorizada (Micro CT)

Para avaliação microtomográfica, a calvária de três animais de cada período de eutanásia de 30 e 60 dias de cada grupo (GAR, GAU e GAT), foram fixadas em solução de formaldeído, lavadas em água corrente por 24h e mantidas posteriormente em álcool 70%. A varredura das amostras foi realizada pelo microtomógrafo computadorizado (Skyscan 1174, Bruker, Kontich, Belgium, 2003) localizado no laboratório multiusuário no campus da FOA-UNESP (Avenida Marechal Rondon s/n, Araçatuba – São Paulo). Os parâmetros utilizados para escaneamento foram: tamanho do pixel 9 μ m, 70 kV, filtro de Al 0,5mm, passo de rotação de 0,4mm, rotação do arco de 180°, resolução de 2016 x 1134 e tempo de aquisição de aproximadamente 58min. As imagens obtidas foram importadas para o software NRecon Reconstruction (Versão 1.15.4.0, Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium), sendo aplicado uma suavização de 2, correção de anel de artefato de 5, correção de endurecimento de feixe de 20% e faixa de conversão de imagem variando de 0,007 a 0,061. O Software DataViewer (Versão 1.15.4.0, Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium) foi utilizado para realizar a reconstrução em três planos (transversal, longitudinal e sagital), sendo determinado o volume de interesse (VOI). Os cortes obtidos foram importados para o Software CTan (Versão 1.15.4.0, Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium). Para a determinação da região de interesse (ROI), correspondente a área de defeito ósseo criada. Nas imagens obtidas, foram avaliados os seguintes parâmetros morfométricos: volume ósseo (Bone volume - BV), porcentagem de volume ósseo (Percent bone volume - BV/TV), espessura de trabéculas (Trabecular thickness - Tb,Th), número de trabéculas (Trabecular number - Tb,N), separação de trabéculas (Trabecular separation - Tb,Sp). Os dados foram posteriormente tabulados e analisados.

Posteriormente, para a reconstrução tridimensional (3D), as imagens foram importadas para o Software CT Voxel (Versão 1.15.4.0, Skyscan, Bruker, Kontich, Belgium).

2.8 Análise estatística

Para análise estatística da PTO-T, PTO-NF e resultados da MICRO CT, empregou-se o software BioEstat 5.3® (Instituto de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Tefé/AM, BRA). Para análise da PTO-T, PTO-NF e resultados da MICRO CT, foi aplicado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. Adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Condição geral de saúde e aspecto da ferida cirúrgica

As condições gerais de saúde dos animais se mantiveram estáveis durante todo o período experimental, tolerando bem a intervenção cirúrgica (defeito ósseo de tamanho crítico em calvária).

Em relação à ferida cirúrgica os animais apresentaram uma cicatrização favorável, não apresentando deiscência de suturas, indícios de infecção, ausência de coaptação de bordas e ou sinais de trauma ocasionados por outros animais sobre a ferida cirúrgica ao longo do pós-operatório.

3.2 Aspecto histológico nos diferentes grupos experimentais

A descrição histológica foi realizada a partir das reconstruções panorâmicas das fotomicrografias realizadas em aumento de 800um nos tecidos corados em HE e a confirmação das estruturas foram avaliadas em aumento de 100um nos tecidos corados em TG.

3.2.1 Grupo Autógeno Raspado com Ultrassom cirúrgico (GAU)

Aos 7 dias, observa-se o defeito ósseo preenchido por enxerto ósseo autógeno raspado com ultrassom cirúrgico e entremeado por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado e tecido de granulação. As linhas de osteotomia estão bem delimitadas e o início da neoformação óssea está ocorrendo próximo aos cotos. Recobrimdo toda a extensão do defeito ósseo encontra-se a membrana, a qual está adaptada sobre os cotos ósseos (Figura 7-A). Em maior aumento observa-se a

membrana sem sinais de reabsorção ou infiltrado celular em seu interior. No centro do defeito, verifica-se o enxerto ósseo raspado com ultrassom cirúrgico e acelular, com partículas menores do que o grupo GAR, ao redor tecido conjuntivo ricamente vascularizado com moderado infiltrado inflamatório, destacando-se fibroblastos e uma matriz extracelular rica em fibras colágenas (Figura 8-A).

Aos 30 dias, observa-se que o defeito ósseo se mantém preenchido por osso neoformado, enxerto ósseo e tecido conjuntivo frouxo de aspecto organizado. As linhas de osteotomia se mantêm nítidas e existe um avanço da neoformação óssea a partir dos cotos e ao redor do enxerto que está sendo reabsorvido de forma mais lenta do que no grupo GAR. A membrana em sua grande maioria apresenta-se reabsorvida ou fragmentada (Figura 7-B). Em maior aumento encontra-se uma discreta reabsorção do enxerto e neoformação óssea ao redor, com pouco infiltrado inflamatório, apresentando um osso primário rico em osteócitos e osteoblastos. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes (Figura 8-B).

Aos 60 dias, observa-se o defeito ósseo que em sua grande maioria está preenchido por tecido ósseo neoformado, as linhas de osteotomia são dificilmente visualizadas e a membrana foi completamente reabsorvida (Figura 7-C). Em maior aumento observa-se que o enxerto ósseo raspado com ultrassom foi reabsorvido e ocorreu uma neoformação óssea. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes. No entanto, não houve fechamento total do defeito (Figura 8-C).

3.2.2 Grupo Autógeno Raspado com raspador ósseo (GAR)

Aos 7 dias, observa-se o defeito ósseo preenchido por enxerto ósseo autógeno raspado e entremeado por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado. As linhas de osteotomia estão bem delimitadas e o início da neoformação óssea está ocorrendo próximo aos cotos. Recobrimo toda a extensão do defeito ósseo encontra-se a membrana, a qual está adaptada sobre os cotos ósseos (Figura 7-D). Em maior aumento observa-se a membrana sem sinais de reabsorção ou infiltrado celular em seu interior. No centro do defeito, verifica-se o enxerto ósseo raspado acelular e ao

redor tecido conjuntivo ricamente vascularizado com discreto infiltrado inflamatório, destacando-se fibroblastos e uma matriz extracelular rica em fibras colágenas (Figura 8-D).

Aos 30 dias, observa-se que o defeito ósseo se mantém preenchido por osso neoformado e tecido conjuntivo frouxo de aspecto organizado. As linhas de osteotomia se mantêm nítidas e observa-se um avanço do processo de neoformação óssea a partir dos cotos e ao redor do enxerto que apresenta sinais de reabsorção. A membrana em sua grande maioria está reabsorvida ou fragmentada (Figura 7-E). Em maior aumento encontra-se uma discreta reabsorção do enxerto e neoformação óssea ao redor, com pouco infiltrado inflamatório em sua proximidade, apresentando um osso primário rico em osteócitos e osteoblastos. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes (Figura 8-E).

Aos 60 dias, observa-se o defeito ósseo que em sua grande maioria está preenchido por tecido ósseo, as linhas de osteotomia são dificilmente visualizadas e a membrana foi completamente reabsorvida (Figura 7-F). Em maior aumento observa-se que o enxerto ósseo raspado foi reabsorvido e ocorreu uma neoformação óssea. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes. No entanto, não houve fechamento total do defeito ósseo (Figura 8-F).

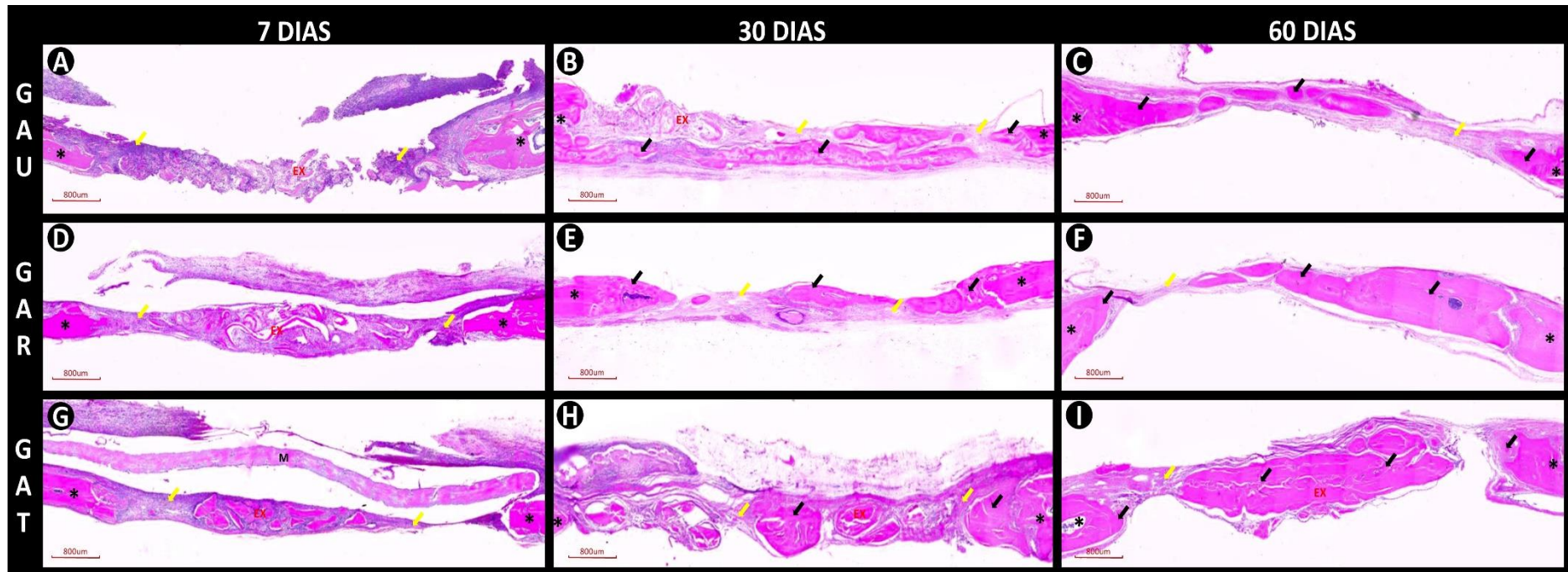
3.2.3 Grupo Autógeno Triturado (GAT)

Aos 7 dias, observa-se o defeito ósseo preenchido por enxerto ósseo autógeno triturado e entremeado por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado. As linhas de osteotomia estão bem delimitadas e o início da neoformação óssea está ocorrendo próximo aos cotos. Recobrimdo toda a extensão do defeito ósseo encontra-se a membrana, a qual está adaptada sobre os cotos ósseos (Figura 7-G). Em maior aumento observa-se a membrana sem sinais de reabsorção ou infiltrado celular em seu interior. No centro do defeito, verifica-se o enxerto ósseo triturado acelular, com partículas maiores do que o grupo GAR e GAU, ao redor tecido conjuntivo ricamente vascularizado com discreto infiltrado inflamatório, destacando-se fibroblastos e uma matriz extracelular rica em fibras colágenas (Figura 8-G).

Aos 30 dias, observa-se que o defeito ósseo se mantém preenchido por osso neoformado, enxerto ósseo triturado e tecido conjuntivo frouxo de aspecto organizado. As linhas de osteotomia se mantêm nítidas e existe um avanço da neoformação óssea a partir dos cotos e ao redor do enxerto que está sendo reabsorvido de forma lenta. A membrana em sua grande maioria apresenta-se reabsorvida ou fragmentada (Figura 7-H). Em maior aumento encontra-se uma discreta reabsorção do enxerto e neoformação óssea ao redor, com pouco infiltrado inflamatório, apresentando um osso primário rico em osteócitos e osteoblastos. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes (Figura 8-H).

Aos 60 dias, observa-se o defeito ósseo que em sua grande maioria está preenchido por tecido ósseo neoformado e remanescentes do enxerto ósseo, as linhas de osteotomia são dificilmente visualizadas e a membrana foi completamente reabsorvida (Figura 7-I). Em maior aumento observa-se que o enxerto triturado não foi completamente reabsorvido e ocorreu uma neoformação óssea ao redor. Em relação ao tecido conjuntivo este encontra-se bem vascularizado com fibras colágenas mais espessas e organizadas em feixes. No entanto, não houve fechamento total do defeito (Figura 8-I).

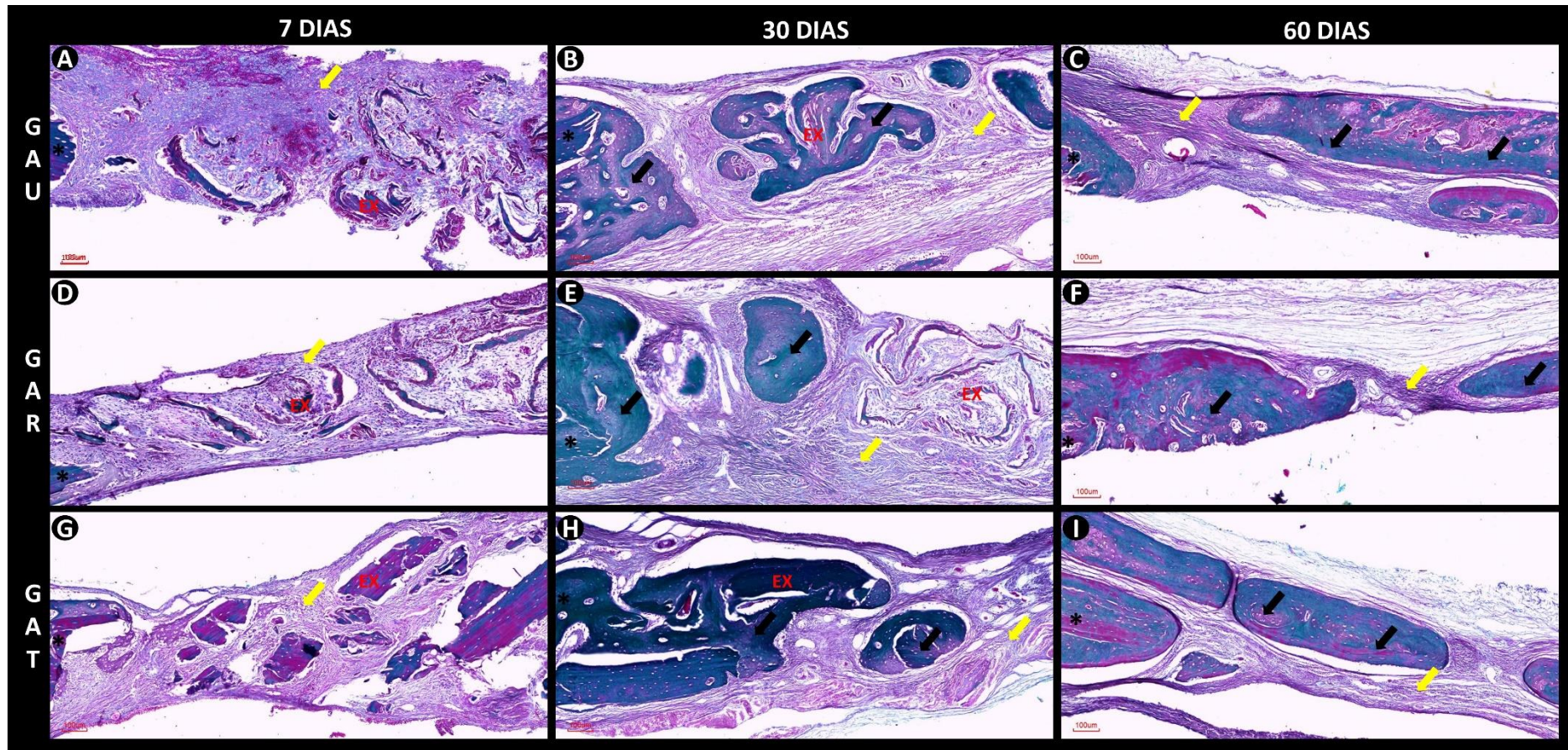
FIGURA 7: Fotomicrografias panorâmicas do defeito ósseo crítico de 6mm



Legenda: (A-L) Fotomicrografias panorâmicas do defeito ósseo crítico de 6mm de diâmetro nos grupos GAU, GAR e GAT em todos os períodos experimentais de 7, 30 e 60 dias em um aumento de 800µm. Abreviações e símbolos: asterisco, coto ósseo; M, membrana; EX, enxerto ósseo autólogo; seta amarela, tecido conjuntivo; seta preta, tecido ósseo neoformado. Coloração: HE.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

FIGURA 8: Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito



Legenda: (A-L) Fotomicrografias da região do coto ósseo e do centro do defeito nos grupos GAU, GAR e GAT em todos os períodos experimentais de 7, 30 e 60 dias em um aumento de 100um. Abreviações e símbolos: asterisco, coto ósseo; M, membrana; EX, enxerto ósseo autólogo; seta amarela, tecido conjuntivo; seta preta, tecido ósseo neoformado. Coloração: TG.

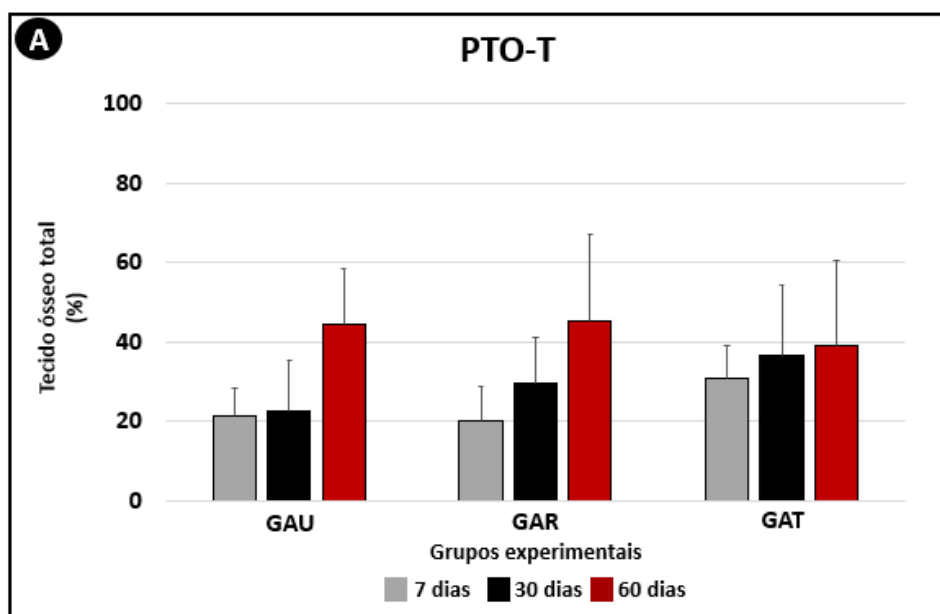
Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

3.3 Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) na região de defeito ósseo crítico

Em relação a PTO-T, não houve diferenças estatisticamente significantes intergrupos ou intragrupos nos diferentes períodos experimentais. A PTO-T nos diferentes grupos experimentais estão apresentadas na (Figura 9).

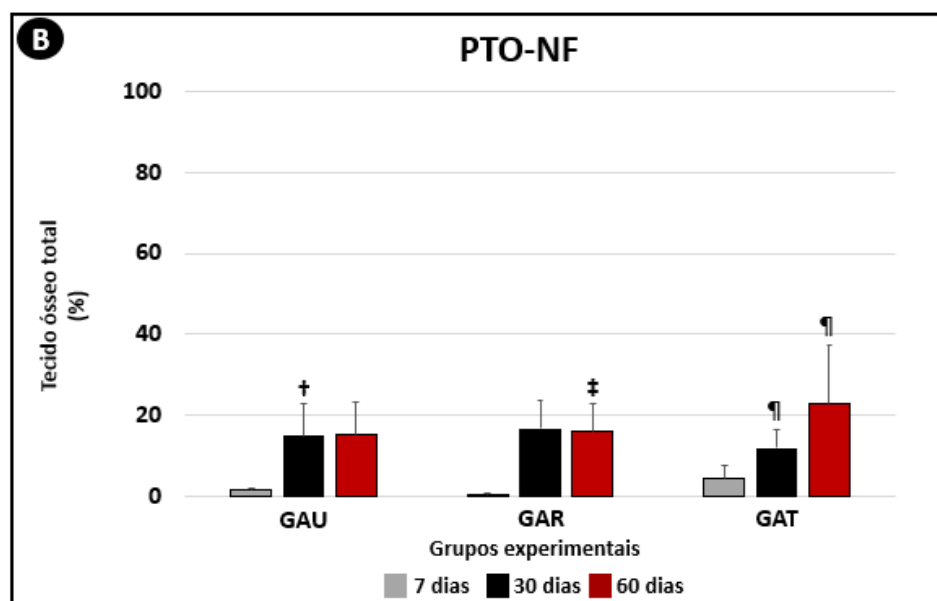
3.4 Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO-NF) na região de defeito ósseo crítico

Em relação a PTO-NF, o grupo GAU aos 07 dias apresentou menor quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado com o grupo GAU aos 30 dias ($p < 0,0365$). O grupo GAR aos 07 dias apresentou menor quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado com o grupo GAR aos 60 dias ($p < 0,0137$). No grupo GAT aos 07 dias apresentou menor quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado com o grupo GAT aos 30 dias ($p < 0,0196$) e 60 dias ($p < 0,0226$). A PTO-NF nos diferentes grupos experimentais estão apresentadas no (Figura 10).

Figura 9: Porcentagem de tecido ósseo total

Legenda: Porcentagem de tecido ósseo total (PTO-T) na região de defeito ósseo crítico nos diferentes grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 10: Porcentagem de tecido ósseo neoformado

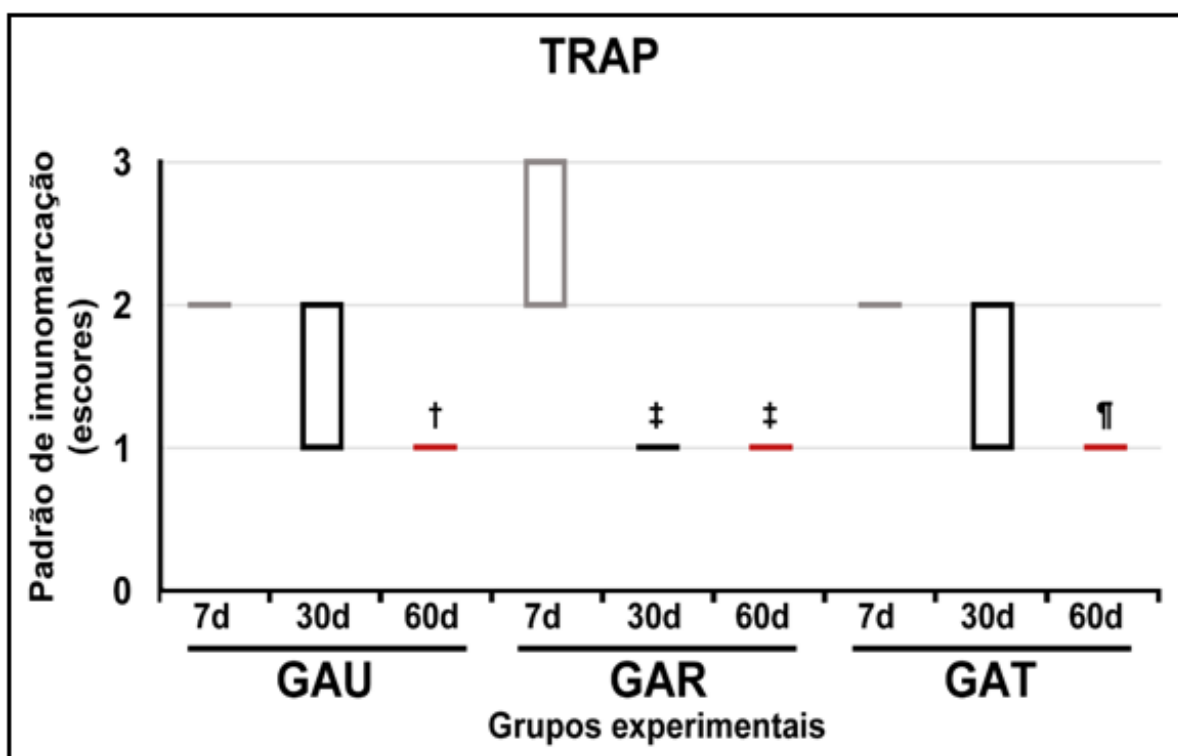
Legenda: Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTO-NF) na região de defeito ósseo crítico nos diferentes grupos experimentais. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAU aos 7 dias; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAR aos 7 dias; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAT aos 7 dias.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

3.5 Imunomarcção para TRAP

O padrão de imunomarcção para TRAP no sítio cirúrgico nos diferentes grupos experimentais está apresentado na (Figura 11). Aos 7 dias pós-operatórios a mediana e o desvio interquartis em GAU, GAR e GAT foi de 2 (2 – 3; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção) e 2 (2 – 2; prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção), respectivamente (Figura 12). Aos 30 dias pós-operatórios a mediana e o desvio interquartis em GAU, GAR e GAT foi de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 1 (1 – 2; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 1 (1 – 2; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente. Aos 60 dias pós-operatórios a mediana e o desvio interquartis em GAU, GAR e GAT foi de 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção) e 1 (1 – 1; prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção), respectivamente.

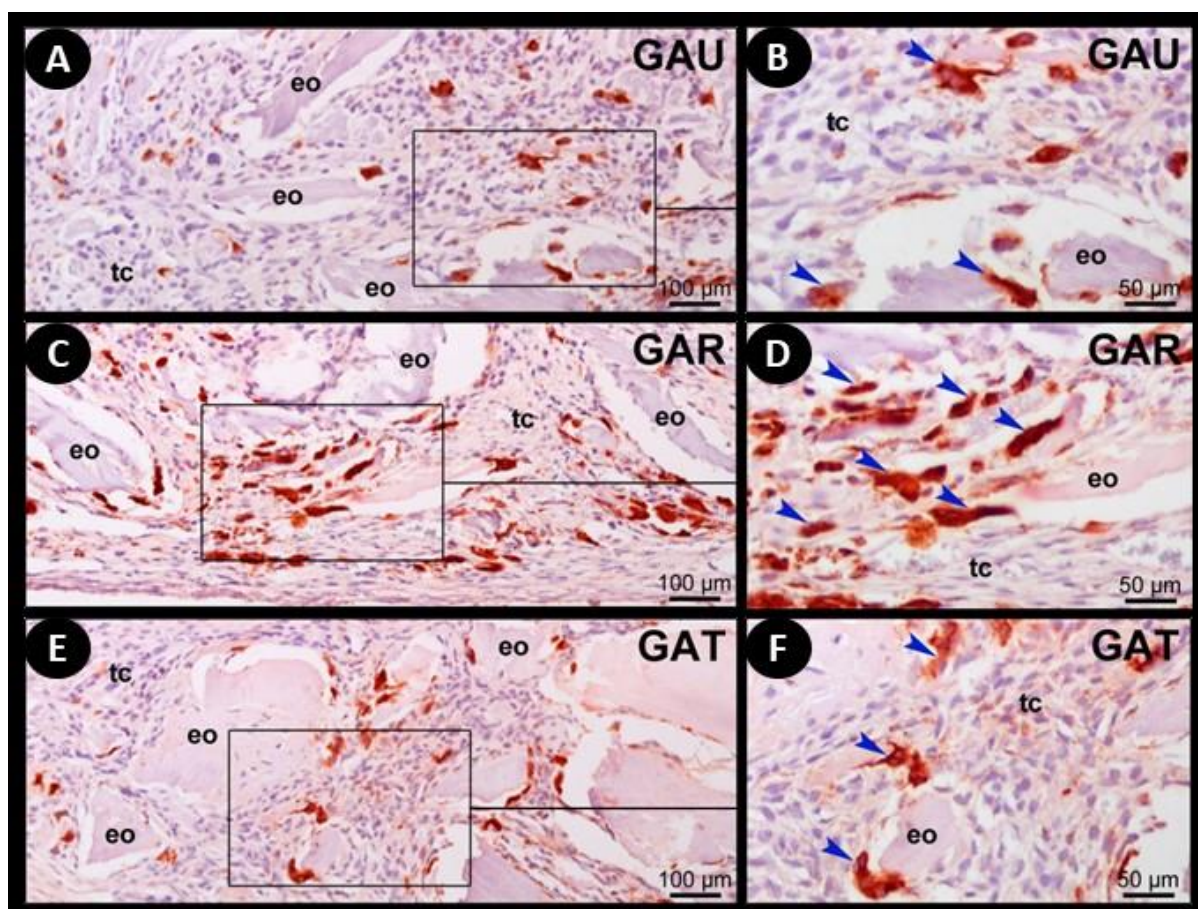
Não houve diferença intergrupo estatisticamente significativa. Com relação às diferenças intragrupos constatou-se que o padrão de imunomarcção para TRAP aos 60 dias foi menor que aos 7 dias em todos os grupos experimentais. No grupo GAR aos 30 dias ao padrão de imunomarcção para TRAP foi menor que aos 7 dias.

Figura 11: Imunomarcção para TRAP

Legenda: Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TRAP na região de defeito ósseo crítico nos diferentes grupos experimentais. Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAU aos 7 dias; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAR aos 7 dias; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAT aos 7 dias.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 12: Fotomicrografias da imunomarcção para TRAP



Legenda: (A-F) Fotomicrografias da região do centro do defeito nos grupos GAU, GAR e GAT no período experimental de 7 dias em um aumento de 100µm e 50µm. Abreviações e símbolos: tc, tecido conjuntivo; eo, enxerto ósseo; seta azul, células TRAP positivas.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

3.6 Resultado das análises microtomográficas.

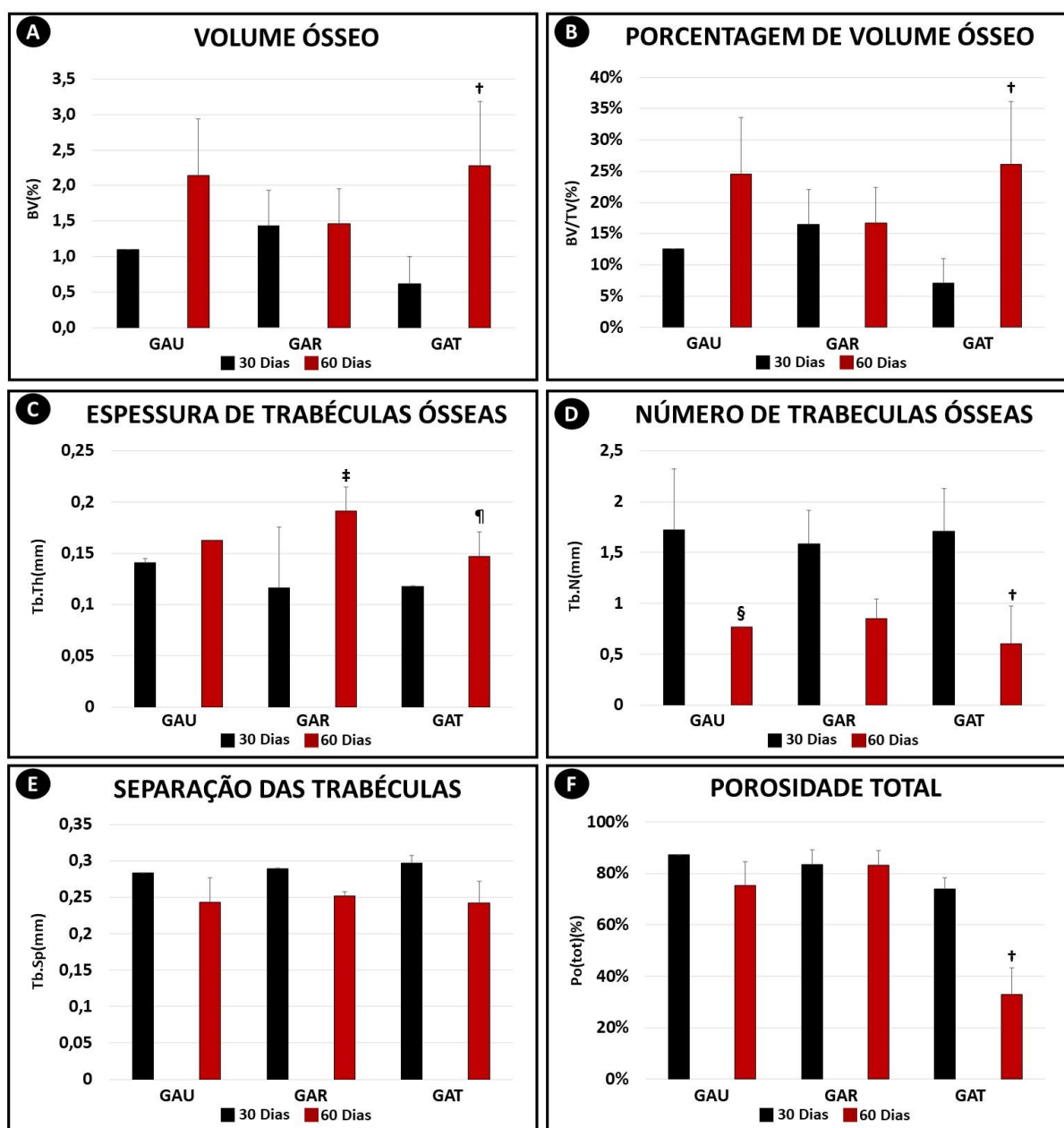
O grupo GAT aos 30 dias apresentou maior volume ósseo (BV) ($p<0,0092$), maior porcentagem de volume ósseo (BV/TV) ($p<0,0092$), maior número de trabéculas ósseas (Tb.N) ($p<0,0056$) e menor porosidade total (Po(Tot)) ($p<0,0092$) em relação ao grupo GAT aos 60 dias.

O grupo GAR aos 60 dias apresentou maior espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th) em relação ao grupo GAR aos 30 dias ($p<0,0146$) e ao grupo GAT aos 60 dias ($p<0,0176$).

O grupo GAU 30 dias apresentou maior número de trabéculas ósseas (Tb.N) em relação ao grupo GAU aos 60 dias ($p<0,0193$).

O resultado das análises microtomográficas nos diferentes grupos experimentais estão apresentadas na (Figura 13) e as reconstruções microtomográficas estão apresentadas na (Figura 14).

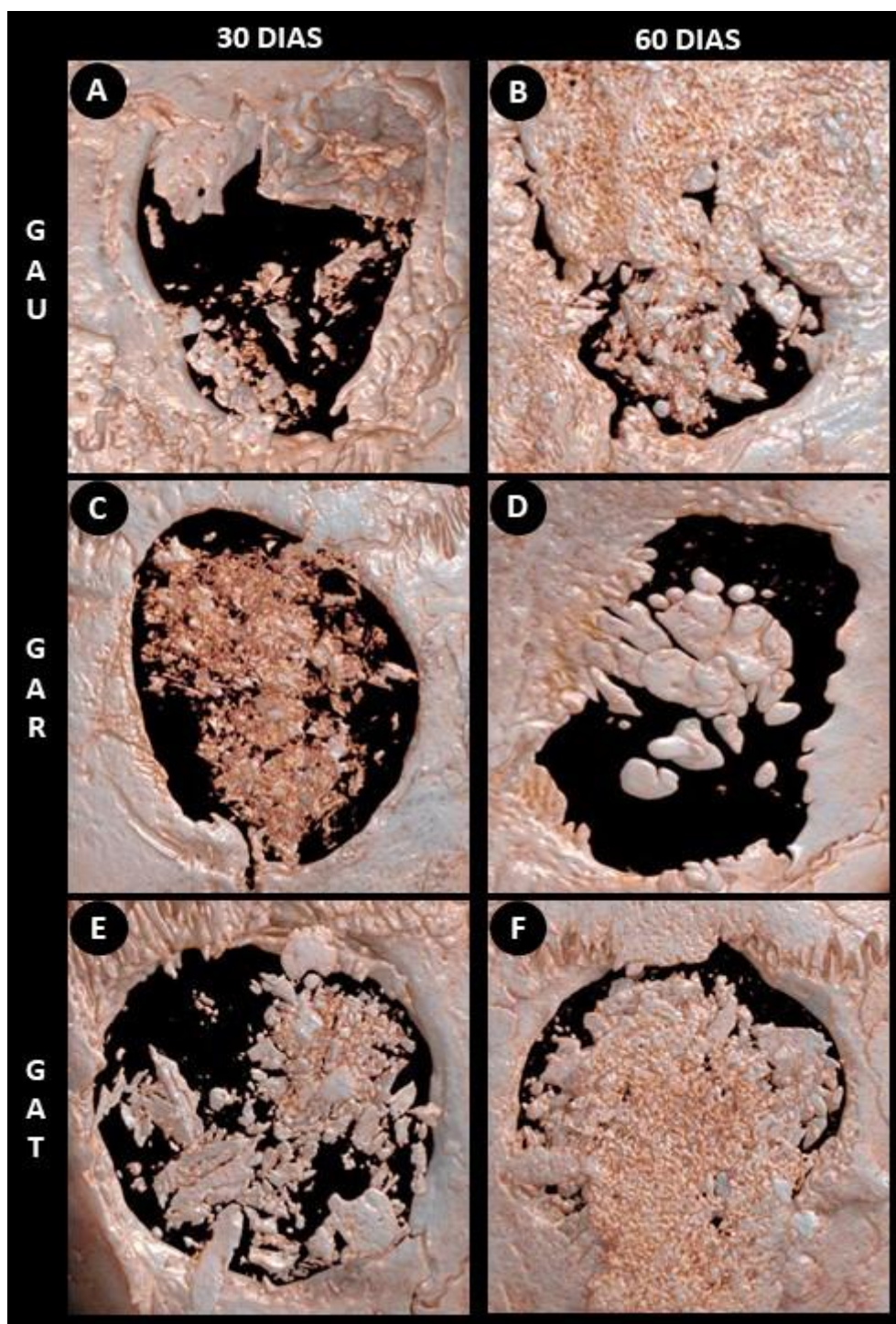
Figura 13: Resultados das análises microtomográficas nos grupos experimentais.



Legenda: Gráficos comparando as médias e desvio padrão das medidas: A- BV; B- BV/TV; C- Tb.Th; D- Tb.N; E- Tb.Sp e F- Po(tot), nos períodos de 30 e 60 dias dos grupos (GAU, GAR e GAT). Símbolos: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAT aos 30 dias; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAR aos 30 dias; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAR aos 60 dias; §, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GAU aos 30 dias.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

Figura 14: Reconstruções microtomográficas demonstrando a estruturação e arquitetura do tecido ósseo na região de defeito ósseo crítico em calvaria de ratos.



Legenda: Visão panorâmica do defeito ósseo crítico preenchido com diferentes formas de coleta de osso autógeno nos períodos de 30 e 60 dias dos grupos (GAU, GAR e GAT).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024)

4. Discussão

Este trabalho teve a expectativa positiva de que as partículas autógenas obtidas por meio de ultrassom cirúrgico oferecessem melhores condições biológicas e pudessem contribuir melhorando o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico. Nossa hipótese nula de que não haveria diferença entre o reparo dos defeitos ósseos usando diferentes técnicas de remoção de osso particulado foi aceita de acordo com os resultados obtidos.

A calvária de rato é um dos modelos experimentais mais utilizados para avaliar reparo ósseo, visto que possui origem semelhante à mandíbula humana uma vez que ambas apresentam o mesmo tipo de formação óssea intramembranosa^{20,21}. Além disso, o modelo animal garante fácil acesso e manipulação, com a calota craniana oferecendo uma anatomia adequada para confecção do defeito ósseo de tamanho crítico, permitindo o estudo de biomateriais²². Segundo Schmitz & Hollinger em 1986 um defeito de tamanho crítico é definido como a menor ferida intraóssea em um determinado osso e espécie animal que não cicatriza espontaneamente durante a vida do animal¹⁷. Contudo, Gosain et al.²³, afirmou que um defeito de tamanho crítico é aquele que não cicatriza durante a vida do animal, desta forma como a maioria dos estudos são de duração limitada, o defeito de tamanho crítico é aquele que não cicatrizará durante o estudo^{23,24}. Assim, foi definido no presente trabalho um defeito de 6 mm de diâmetro, conforme utilizado em estudos anteriores^{18,19}.

Estudos clínicos com esta finalidade são muito difíceis de serem reproduzidos e aceitos pelos comitês de ética em humanos uma vez que áreas reconstruídas geralmente são reabilitadas com implantes osseointegráveis e não permitem a coleta de material para uma análise histológica satisfatória. Modelos animais são padronizados e permitem análise em sequência temporal dos grupos¹⁸.

Associado ao defeito ósseo de tamanho crítico é sempre importante seu recobrimento com uma membrana de uso consolidado nos trabalhos de pesquisa para que todos os métodos testados, inclusive o controle, tenham a mesma condição de reparo ósseo sem interferência do tecido mole que o sobrepõe²⁵. Desta forma o presente estudo utilizou a membrana GenDerm® (Baumer S.A., São Paulo, Brasil), membrana reabsorvível de cortical óssea bovina, que apresenta como características fácil manipulação e ajuste, flexibilidade, permeabilidade seletiva e evita nova etapa

cirúrgica para remoção^{26,25}. Sendo assim, a membrana de cortical óssea bovina foi utilizada em todos os grupos.

Embora existam vários tipos de biomateriais disponíveis, osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro. Isso ocorre devido a suas propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras^{27,28,29}. Através destas propriedades o osso autógeno é capaz de auxiliar a diferenciação em osteoblastos e osteócitos, estimular e ativar as células-tronco mesenquimais do hospedeiro e servir de arcabouço para que estas células possam formar novo tecido ósseo³⁰. No entanto, existem algumas limitações, por exemplo, a necessidade de locais cirúrgicos adicionais, reabsorção imprevisível e disponibilidade limitada da área doadora²⁹. O osso autógeno pode ser usado em forma de bloco, para aumento de espessura óssea de defeito com uma parede ou particulado, usado isoladamente ou associado a biomateriais de diferentes origens, combinando a propriedade osteogênica do osso autógeno com a propriedade osteocondutora, capacidade de manutenção de volume e estabilidade do biomaterial para induzir a formação óssea^{31,32}.

A associação de uma porcentagem de osso autógeno particulado misturado aos biomateriais ou seu uso isolado permite que as partículas sejam reabsorvidas liberando fatores de crescimento, capazes de estimular as células indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos e formarem trabéculas ósseas³². Esse é um processo lento que exige a reabsorção antes da neoformação²⁹. Fato que é suposto ter ocorrido neste trabalho uma vez que aos 7 dias observou-se uma moderada quantidade de células TRAP-positivas, ou seja, osteoclastos relacionados com a reabsorção óssea local. Em contrapartida, a menor imunomarcagem para células TRAP-positivas observada aos 30 e 60 dias corrobora os achados histométricos, nos quais foi evidenciada maior quantidade de tecido ósseo, indicando menor atividade reabsortiva e, conseqüentemente, maior neoformação óssea.

Os resultados microtomográficos permitem avaliar a morfologia óssea e quantificar osso trabecular e cortical de uma forma tridimensional³³. Tais resultados, reforçam os achados histométricos e imunoistoquímicos, visto que as principais diferenças estatísticas foram observadas no grupo GAT, onde observamos que aos 60 dias houve neoformação óssea, apresentando maior volume ósseo (BV) e porcentagem de volume ósseo (BV/TV), neste mesmo grupo foi constatado um número reduzido de trabéculas ósseas (Tb.N) e uma porosidade menor (Po(tot),

indicando uma maturação óssea. De forma similar, os grupos GAR e GAU, apresentaram aos 60 dias maior espessura de trabéculas ósseas (Tb.Th) e menor número de trabéculas (Tb.N), demonstrando um estágio mais avançado de maturação óssea, similar ao grupo GAT.

O osso autógeno particulado pode ser obtido de várias formas que incluem a trituração dos blocos ósseos com um pilão ou moinho³⁴, a coleta do osso com raspador de ossos³⁵, por meio de ultrassom cirúrgico³⁶ ou coletado durante um procedimento de perfuração ou corte ósseo com um dispositivo³⁷. Tais métodos, podem apresentar diferentes propriedades, como tamanho de partícula, formato, superfície e número de células vivas, ocasionando vantagens e desvantagens. O osso particulado a partir de um bloco apresenta a porção interna preservada, pois o material que o remove entra em contato apenas na periferia de cada partícula, apresentando um benefício do ponto de vista biológico, além de facilitar o aumento de volume quando desejado. No entanto, apresenta maior dificuldade de acomodação no campo receptor. Já o osso na forma raspada, apresenta íntimo contato do material que o remove com sua superfície, podendo ocasionar lesão nas células remanescentes e prejudicando a capacidade de formação óssea. Contudo, apresenta maior facilidade de acomodação no campo receptor³⁸.

Essas propriedades das partículas de acordo com o método de obtenção ficaram evidentes neste trabalho. O grupo do osso triturado pelo pilão apresentou partículas maiores histologicamente em relação aos grupos raspado manualmente e pelo ultrassom cirúrgico. A presença de partículas maiores está relacionada diretamente com o tempo de reabsorção, uma vez que o grupo triturado, apresentou partículas maiores e reabsorção mais lenta em relação aos outros enxertos ósseos³⁹. As partículas de osso triturado garantem uma quantidade de osso total maior em relação aos grupos raspados aos 7 e 30 dias. O ultrassom cirúrgico proporcionou partículas semelhantes ao osso raspado manualmente, e ambas são menores do que as partículas obtidas do pilão. Porém o método é válido uma vez que facilita a remoção de tecido ósseo de áreas adjacentes ao próprio leito cirúrgico, de forma mais rápida e fácil em relação a instrumentos manuais e sem a possibilidade de lesar tecidos moles⁴⁰. No entanto, são partículas pequenas e de rápida reabsorção que não contribuiriam de forma consistente com o ganho de volume da área, caso fosse necessário⁴⁰. Uma opção interessante seria a remoção de blocos com motor

piezoelétrico e posterior trituração em particuladores ou pilão manual, tendo a desvantagem de um segundo leito cirúrgico.

Em relação ao tecido ósseo neoformado, observou-se que o grupo GAT aos 30 dias mostrou menor formação óssea em relação aos outros grupos uma vez que suas partículas maiores apresentam reabsorção mais lenta e estão incorporadas ao novo tecido, porém sem vitalidade, o que contribuiu para a soma total, mas não para o tecido neoformado, ou seja, estavam ocupando um espaço enquanto que nos grupos raspados a maior parte das partículas já haviam sido reabsorvidas⁴¹.

A membrana utilizada cumpriu seu papel de preservação do espaço biológico do defeito criado e permitindo neoformação óssea e evitando a presença de tecido conjuntivo mesmo que os defeitos não tenham sido preenchidos completamente no tempo de 60 dias. Esse tempo corresponde a 180 dias no homem, o que sugere que a associação de biomaterial poderia ser indicada para melhorar o processo de osteocondução no interior das cavidades⁴².

Em um momento da Odontologia em que busca-se reconstruções ósseas com previsibilidade para instalação de implantes, este trabalho traz uma informação clínica importante em relação ao uso do osso autógeno particulado para reconstruções de defeitos; mostra que partículas raspadas manualmente possuem um comportamento semelhante a partículas raspadas com ultrassom cirúrgico e que partículas trituradas ainda são melhores para obtenção de volumes.

5. Conclusão

Os métodos de obtenção de enxerto ósseo particulado por meio de raspador manual, ultrassom cirúrgico e triturado promoveram reparo semelhante das cavidades críticas. O ultrassom cirúrgico e o raspador manual fornecem partículas menores e de mais rápida reabsorção.

REFERÊNCIAS

- 1- Stübinger S, Stricker A, Berg BI. Piezosurgery in implant dentistry. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2015;11(7):115-124. doi:10.2147/CCIDE.S63466.
- 2- Otake Y, Nakamura M, Henmi A, Takahashi T, Sasano Y. Experimental Comparison of the Performance of Cutting Bone and Soft Tissue between Piezosurgery and Conventional Rotary Instruments. *Sci Rep*. 2018;8(1):17154. doi:10.1038/s41598-018-35295-6.
- 3- Rahnema M, Czupkałło L, Czajkowski L, Grasza J, Wallner J. The use of piezosurgery as an alternative method of minimally invasive surgery in the authors' experience. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2013;8(4):321-326. doi:10.5114/wiitm.2011.35144.
- 4- Jacques C, Pierre C. Development, via compression, of electric polarization in hemihedral crystals with inclined faces. *Bulletin de la Societe de Minerologie de France*. 1880;3: 90-93.
- 5- Fonseca R, Flexa Ribeiro Horta D, Vieira da Silva Gomes CE, Fernandes de Menezes SA, Almeida Machado LF. A utilização do Piezoeletricidade na odontologia: Revisão de literatura. *Braz. J. Implantol. Health Sci*. 2020;2(10):34-42. doi:10.36557/2674-8169.2020v2n10p34-42.
- 6- Ferreira Filho MJS, Pontes FB, Gonçalves BCM, de Aguiar JL, do Nascimento JR, Pimenta Y da S, Ohse DH, de Jesus GP. Comparison of conventional surgical techniques with piezosurgery: literature review. *Braz. J. Develop*. 2021;7(2):1963-16974. doi: 10.34117/bjdv7n2-361.
- 7- McKenzie WS. Principles of Exodontia. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2020;32(4):511-517. doi:10.1016/j.coms.2020.06.001.
- 8- Asfora MLK, Araújo NG, Cardoso AM, Cruz LH dos SM, Medeiros Júnior MD. Evaluation of the piezosurgery technique in the extraction of third molars. *RSD*. 2022;11(13):e539111335796. doi:10.33448/rsd-v11i13.35796.
- 9- Sendyk DI, de Oliveira NK, Pannuti CM, da Graça Naclério-Homem M, Wennerberg A, Deboni MCZ. Conventional Drilling Versus Piezosurgery for Implant Site Preparation: A Meta-Analysis. *J Oral Implantol*. 2018;44(5):400-405. doi:10.1563/aaid-joi-D-17-00091.
- 10- Consolaro MFM-O, Sant' Ana E, Moura Neto G. Cirurgia piezelétrica ou piezocirurgia em Odontologia: o sonho de todo cirurgião. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial*. 2007;12(6):17-20. doi:10.1590/S1415-54192007000600002.
- 11- Lobna Abdel Aziz Aly. Piezoelectric surgery: Applications in oral & maxillofacial surgery. *Future Dental Journal*. 2018;4(2):105-111. doi:10.1016/j.fdj.2018.09.002.
- 12- Noetzel N, Fienitz T, Kreppel M, Zirk M, Safi AF, Rothamel D. Osteotomy speed, heat development, and bone structure influence by various piezoelectric systems-an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2019;23(11):4029-4041. doi:10.1007/s00784-019-02838-8.

- 13- Eggers G, Klein J, Blank J, Hassfeld S. Piezosurgery: an ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004;42(5):451-3. doi:10.1016/j.bjoms.2004.04.006.
- 14- Giraud JY, Villemain S, Darmana R, Cahuzac JP, Autefage A, Morucci JP. Bone cutting. *Clin Phys Physiol Meas.* 1991;12(1):1-19. doi:10.1088/0143-0815/12/1/001.
- 15- Pereira CC, Gealh WC, Meorin-Nogueira L, Garcia-Junior IR, Okamoto R. Piezocirurgia aplicada à implantodontia: aspectos clínicos e biológicos. *J Oral Implantology.* 2014;40(S1):401-408. doi:10.1563/aaid-joi-d-11-00196.
- 16- Sivoilella S, Berengo M, Scarin M, Mella F, Martinelli F. Autogenous particulate bone collected with a piezo-electric surgical device and bone trap: a microbiological and histomorphometric study. *Arch Oral Biol.* 2006;51(10):883-91. doi:10.1016/j.archoralbio.2006.04.001.
- 17- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(205):299-308.
- 18- Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimdões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879-93. doi:10.1111/clr.12194.
- 19- da Silva AAF, Rinco UGR, Jacob RGM, Sakai VT, Mariano RC. The effectiveness of hydroxyapatite-beta tricalcium phosphate incorporated into stem cells from human exfoliated deciduous teeth for reconstruction of rat calvarial bone defects. *Clin Oral Investig.* 2022;26(1):595-608. doi:10.1007/s00784-021-04038-9.
- 20- de Freitas Silva L, de Carvalho Reis ENR, Barbara TA, Bonardi JP, Garcia IR Junior, de Carvalho PSP, Ponzoni D. Assessment of bone repair in critical-size defect in the calvarium of rats after the implantation of tricalcium phosphate beta (β -TCP). *Acta Histochem.* 2017;119(6):624-631. doi:10.1016/j.acthis.2017.07.003.
- 21- Cardoso GBC, Chacon EL, Maia LRB, Zavaglia CA de C, Cunha MR da. The Importance of Understanding Differences in a Critical Size Model: a Preliminary *In Vivo* Study Using Tibia and Parietal Bone to Evaluate the Reaction with Different Biomaterials. *Mat Res.* 2019;22(1):e20180491. doi:10.1590/1980-5373-MR-2018-0491.
- 22- Nagata MJ, Furlaneto FA, Moretti AJ, Bouquot JE, Ahn CW, Messoria MR, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF. Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;95(2):269-75. doi:10.1002/jbm.b.31710.
- 23- Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(2):360-71. doi:10.1097/00006534-200008000-00018.
- 24- Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685-1692. doi:10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.

- 25- Costa NM, Yassuda DH, Sader MS, Fernandes GV, Soares GD, Granjeiro JM. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;61:63-71. doi: 10.1016/j.msec.2015.12.003.
- 26- Bernabé PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(3):384-8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02166.x.
- 27- Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard?. *Injury*. 2021;52(2):S18-S22. doi: 10.1016/j.injury.2021.01.043.
- 28- Zhang S, Li X, Qi Y, Ma X, Qiao S, Cai H, Zhao BC, Jiang HB, Lee ES. Comparison of Autogenous Tooth Materials and Other Bone Grafts. *Tissue Eng Regen Med*. 2021;18(3):327-341. doi: 10.1007/s13770-021-00333-4.
- 29- Vieira VSJG, da Rosa ÂR, Montagner PG, de Campos FUF, Teixeira LN, Aura JM, Joly JC, Passador-Santos F, Martinez EF. Effect of ozone therapy on the modulation of inflammation and on new bone formation in critical defects of rat calvaria filled with autogenous graft. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2023;124(1S):101292. doi: 10.1016/j.jormas.2022.09.013.
- 30- Stern A, Barzani G. Autogenous bone harvest for implant reconstruction. *Dent Clin North Am*. 2015;59(2):409-20. doi: 10.1016/j.cden.2014.10.011.
- 31- Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(4):356-62. doi: 10.1016/j.ijom.2009.02.015.
- 32- Kim YJ, Saiki CET, Silva K, Massuda CKM, de Souza Faloni AP, Braz-Silva PH, Pallos D, Sendyk WR. Bone Formation in Grafts with Bio-Oss and Autogenous Bone at Different Proportions in Rabbit Calvaria. *Int J Dent*. 2020;2020:2494128. doi: 10.1155/2020/2494128.
- 33- Boussein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
- 34- Karaca IR, Ozturk DN, Akinci HO. Mandibular Torus Harvesting for Sinus Augmentation: Two-Year Follow-Up. *J Maxillofac Oral Surg*. 2019;18(1):61-64. doi: 10.1007/s12663-018-1135-y.
- 35- Johansson LA, Isaksson S, Lindh C, Becktor JP, Sennerby L. Maxillary sinus floor augmentation and simultaneous implant placement using locally harvested autogenous bone chips and bone debris: a prospective clinical study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(4):837-44. doi: 10.1016/j.joms.2009.07.093.
- 36- Saulacic N, Bosshardt DD, Jensen SS, Miron RJ, Gruber R, Buser D. Impact of bone graft harvesting techniques on bone formation and graft resorption: a histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(4):383-391. doi: 10.1111/clr.12357.

- 37- Berengo M, Bacci C, Sartori M, Perini A, Della Barbera M, Valente M. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol.* 2006;55(4):189-98.
- 38- Camargo Filho GP, Corrêa L, Costa C, Pannuti CM, Schmelzeisen R, Luz JG. Comparative study of two autogenous graft techniques using piezosurgery for sinus lifting. *Acta Cir Bras.* 2010;25(6):485-9. doi: 10.1590/s0102-86502010000600005.
- 39- Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res.* 2011;90(12):1428-33. doi: 10.1177/0022034511422718.
- 40- Pekovits K, Wildburger A, Payer M, Hutter H, Jakse N, Dohr G. Evaluation of graft cell viability-efficacy of piezoelectric versus manual bone scraper technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(1):154-62. doi: 10.1016/j.joms.2011.07.019.
- 41- Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(4):481-9. doi: 10.1111/j.1708-8208.2012.00440.
- 42- Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.* 2012;25(1):49-51. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0102-67202012000100011.

Anexos

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOA/UNESP)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals	
---	--	---

CERTIFICADO

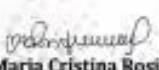
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Reparo de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo particulado obtido por meio de ultrassom cirúrgico. Estudo histomorfométrico e microtomográfico em ratos", Processo FOA nº 00545-2019, sob responsabilidade de Daniela Ponzoni apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 08 de Outubro de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 08 de Outubro de 2022. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 08 de Novembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Repair bone defects filled with particulate bone graft obtained by surgical ultrasound. Histomorphometric and microtomographic study in rats", Protocol FOA nº 00545-2019, under the supervision of Daniela Ponzoni presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 08, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 08, 2022. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 08, 2022.


Profa. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Aracatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP Fone (18) 3636-3234 E-mail CEUA: ceua@foa.unesp.br
--