

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**RENATO LIMBERTE**

**AVALIAÇÃO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO PURO E  
MISTURADO COM ENXERTO HOMÓGENO DE BANCO  
DE OSSOS ASSOCIADOS OU NÃO À TETRACICLINA EM  
CALVÁRIA DE COELHOS: ESTUDO CLÍNICO E  
HISTOMORFOMÉTRICO**

**São Paulo**

**2006**

**RENATO LIMBERTE**

**AVALIAÇÃO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO PURO E  
MISTURADO COM ENXERTO HOMÓGENO DE BANCO  
DE OSSOS ASSOCIADOS OU NÃO À TETRACICLINA EM  
CALVÁRIA DE COELHOS: ESTUDO CLÍNICO E  
HISTOMORFOMÉTRICO**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro para a obtenção do título de Mestre pelo programa de pós-graduação em Odontologia com área de concentração em Implantodontia sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Gromatzky

**São Paulo**

**2006**

B. P2012 2615  
Class. U617 69  
Cutter L711a  
Patri nº 3866  
Tipo entrada DOAÇÃO  
Nota Fiscal  
Data rec. 22.11.2006  
Preço  
Origem P2012 2615  
L711a 2006 1.00

Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I

L711a Limberte, Renato  
Avaliação de enxerto ósseo autógeno puro e misturado com enxerto homogêneo de banco de ossos associados ou não à tetraciclina em calvária de coelhos: estudo clínico e histomorfométrico/ Renato Limberte. Orientação do Prof. Dr. Alfredo Gromatzky -- São Paulo: 2006.  
Xx p.  
Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.  
1. Tetraciclina 2. Enxertos ósseos 3. Coelho  
4. Banco de ossos I Título II. Orientador

RENATO LIMBERTE

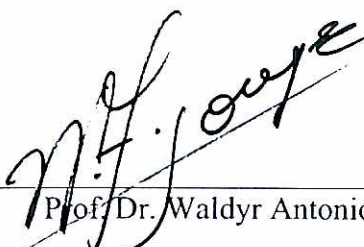
**Avaliação de enxerto ósseo autógeno puro e misturado com enxerto  
homógeno de banco de ossos associados ou não à tetraciclina em calvária  
de coelhos: estudo clínico e histomorfométrico**

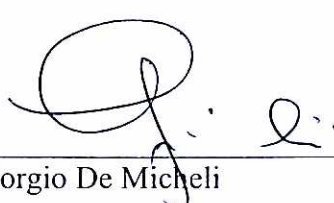
Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Implantodontia

Aprovado em: 18 / 12 / 2011

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof. Dr. Alfredo Gromatzky

  
Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge

  
Prof. Dr. Giorgio De Micheli

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais Mario Sergio Limberte e Dirce Limberte, pelo constante estímulo na minha carreira e pela formação ética e moral, e ao meu irmão André Limberte, companheiro em todas as etapas de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Alfredo Gromatzky, por sua dedicação e colaboração na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, por minha admiração em seu pioneirismo no desenvolvimento de técnicas envolvendo implantes.

À Prof. Dra. Monica Fernandes Gomes, do Centro de Biociências aplicada a Pacientes com Necessidades Especiais (CEBAPE-UNESP) de São José dos Campos, pelo carinho e pelo seu entusiasmo contagiante com pesquisa, que foi essencial para a conclusão deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria das Graças Vilela-Goulart, coordenadora do laboratório de Bioquímica e Farmacologia de experimentação animal do Centro de Biociências aplicada a Pacientes com Necessidades Especiais (CEBAPE-UNESP) de São José dos Campos, por sua ajuda incondicional nos momentos mais decisivos.

À minha amiga e colega de curso Hothir Mibsan Rodrigues pelo companheirismo e incentivo durante o período do mestrado.

Ao amigo André Pelegrine, não só pelo convívio durante o curso, mas pela participação em todos os experimentos realizados para elaboração desta tese.

À amiga Karla Lopes da F. Furtado pelo auxílio nas atividades experimentais.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lorenzo e Profa. Dra. Fátima Faraco pela colaboração no andamento deste trabalho com importantes sugestões.

Ao Prof. Marcio Faria do Departamento de Histologia da UNISA pela utilização do Laboratório de Histologia da UNISA.

À Profa. Andréa Barbosa pelos ensinamentos em cirurgias experimentais em animais e a estagiária Natássia de Andrade Cominato pela participação nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Néelson Macedo, da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNESP de São José dos Campos, que colaborou para a realização da histomorfometria.

Ao amigo e colega de mestrado Luis Guilherme Macedo, não só pela transmissão de seus conhecimentos mas por todo o auxílio que me foi necessário.

A todos os colegas de Mestrado que compartilharam momentos importantes em nossas carreiras.

À Juliana Selma de Oliveira, secretária da pós-graduação, pela presteza e disponibilidade no período dos créditos no Mestrado.

Ao José Alves Pereira pelo constante estímulo profissional e convivência fraternal.

À Christina F. Fornazari pela ajuda na introdução na especialidade de Implantodontia e pelo incentivo em todas as etapas de minha carreira.

À Paula Fernanda Caetano e à Tatiana Nunes Andrade pelos anos de convívio e pela organização do consultório no período da minha ausência.

A todos os funcionários da UNISA que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação clínica, histológica e histomorfométrica dos efeitos da associação da tetraciclina com enxertos ósseos particulados, através da técnica de regeneração óssea guiada, em coelhos. Foram utilizados 10 coelhos fêmeas *New Zealand*, com idade entre 10 e 12 meses, ao início das experiências. Na calvária de cada coelho foram fixados 4 cilindros de titânio preenchidos com enxerto ósseo, perfazendo um total de 40 cilindros. Um dos cilindros foi preenchido com enxerto ósseo autógeno particulado obtido por raspagem de osso da calota craniana, o qual serviu como controle (**grupo A**). Os outros 3 cilindros foram preenchidos por diferentes tipos de enxertos ósseos: osso autógeno particulado associado à tetraciclina (**grupo AT**); osso autógeno particulado misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado, obtido de banco de ossos (**grupo AB**) e osso autógeno particulado misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado, obtido de banco de ossos associado à tetraciclina (**grupo ABT**). Os cilindros foram fechados com tampa oclusiva rosqueada e a incisão cirúrgica foi suturada em dois planos. Após 8 e 12 semanas das cirurgias, os coelhos foram sacrificados, procedendo-se a abertura dos cilindros para avaliação volumétrica do tecido ósseo neoformado dentro de cada cilindro. Após remoção dos cilindros, realizou-se a biópsia do tecido ósseo para avaliação histológica e histomorfométrica. Os resultados da avaliação volumétrica e os da histomorfometria foram submetidos a análise de variância ANOVA e teste de Tuckey com nível de significância para  $p < 0,05$ . Os resultados mostraram que não houve significância estatística entre as variações volumétricas do osso neoformado nos grupos tratados com

tetraciclina (AT e ABT) nos dois períodos de observação. Contudo, o **grupo AB** apresentou aumento significativo de volume em relação ao **grupo A** (controle). Os resultados da análise histomorfométrica mostraram que a tetraciclina na dose utilizada (10mg/enxerto) apresentou significativa diminuição na área de densidade óssea no **grupo AT** em relação ao **grupo A** em 8 semanas, entretanto no período de observação de 12 semanas não houve diferença significativa entre os dois grupos. O **grupo ABT** apresentou um aumento significativo de área de densidade óssea quando comparado com o **grupo AB** nos dois períodos de observação.

PALAVRAS CHAVES: tetraciclina, enxertos ósseos, coelho, banco de ossos

## ABSTRACT

In this clinical animal experiment, tetracycline addition in 2 forms of bone grafts particles was clinically and histologically evaluated in guided tissue regeneration conditions. 40 titanium cylinders were fixed on the skulls of 10 New Zealand rabbit, with ages of 10 to 12 weeks, and 3 association of bone grafts were studied. Control group cylinders were filled with autogenous bone graft from the calvarium. In the other 3 cylinders, the macro and microscopical changes were evaluated in other 3 forms of bone grafts: autogenous particles mixed with tetracycline, autogenous particles mixed with homogenous fresh frozen tissue banked bone allograft and association of tetracycline in autogenous particles with homogenous fresh frozen tissue banked bone allograft.

**KEYWORDS:** tetracycline, bone grafts, rabbit, tissue bank

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Posicionamento e numeração dos dispositivos na calota craniana dos animais.	15
<b>Figura 2</b> - Descolamento do periósteo e exposição da calvária.	17
<b>Figura 3</b> - Movimentos póstero-anteriores com leve compressão no raspador para obtenção de raspas de enxerto autógeno.	18
<b>Figura 4</b> - Fêmur de coelho (osso homogêneo fresco congelado que foi processado previamente no Uni-oss da Universidade de Marília) após descongelamento em soro fisiológico.	19
<b>Figura 5</b> - A mistura de osso autógeno e homogêneo na proporção de 1:1.	19
<b>Figura 6</b> - Fracionamento do fosfato de tetraciclina em porções de 10mg.	20
<b>Figura 7</b> - Posicionamento e fixação dos cilindros de titânio na calota craniana do animal.	21
<b>Figura 8</b> - Preenchimento dos cilindros com os respectivos enxertos Ósseos.	22
<b>Figura 9</b> - Fechamento dos cilindros com uma tampa parafusada.	23
<b>Figura 10</b> - Abertura dos cilindros no período de 8 semanas de incorporação.	25
<b>Figura 11</b> - Mensuração da altura em quatro pontos do cilindro.	26
<b>Figura 12</b> - Aspecto dos enxertos após remoção dos cilindros.	26
<b>Figura 13</b> – Amostra do tecido ósseo, após biópsia.	28
<b>Figura 14</b> - Representação esquemática da análise histomorfométrica da região central da área enxertada, excluindo a região da cortical da calota craniana. (H.E.; aumento original 25x).	31
<b>Figura 15</b> - Representação esquemática da análise histomorfométrica sendo que em cada quadro foi realizada a mensuração da área com 100X de aumento.	31
<b>Figura 16</b> - Enxerto ósseo autógeno particulado no período de 8 semanas de incorporação (H.E.aumento de 100X).	39
<b>Figura 17</b> – H.E. aumento 200X da figura 16.	39

<b>Figura 18</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado com tetraciclina no período de 8 semanas(H.E. aumento de 100X).	40
<b>Figura 19</b> – H.E. aumento 200X da figura 18.	40
<b>Figura 20</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogéneo fresco congelado particulado no período de 8 semanas (H.E.aumento de 100X).	41
<b>Figura 21</b> – H.E. aumento 200X da figura 20.	41
<b>Figura 22</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogéneo fresco congelado particulado com tetraciclina no período de 8 semanas (H.E. aumento de 100X).	42
<b>Figura 23</b> – H.E. aumento 200X da figura 22.	42
<b>Figura 24</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado no período de 12 semanas de incorporação (H.E.aumento de 100X).	43
<b>Figura 25</b> – H.E. aumento 200X da figura 24.	43
<b>Figura 26</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado com tetraciclina após 12 semanas (H.E. aumento de 100X).	44
<b>Figura 27</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado com enxerto homogéneo fresco congelado particulado no período de 12 semanas (H.E.aumento de 100X).	45
<b>Figura 28</b> – H.E. aumento 200X da figura 27.	45
<b>Figura 29</b> – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogéneo fresco congelado particulado com tetraciclina no período de 12 semanas (H.E. aumento de 100X).	46
<b>Figura 30</b> – H.E. aumento 200X da figura 29.	46

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Mediana dos volumes dos materiais em 8 semanas ( $\text{mm}^3$ ). 34
- Gráfico 2** – Mediana dos volumes dos materiais em 12 semanas( $\text{mm}^3$ ). 34
- Gráfico 3** – Comparação dos volumes dos enxertos nos 2 períodos( $\text{mm}^3$ ). 35
- Gráfico 4** - Valores médios da análise histomorfométrica da área de densidade óssea ( $\text{mm}^2$ ) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos A, AT, AB e ABT no período de 8 semanas. 51
- Gráfico 5** - Valores médios da análise histomorfométrica da área de densidade óssea ( $\text{mm}^2$ ) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos A, AT, AB e ABT no período de 12 semanas. 51
- Gráfico 6** - Valores médios da análise histomorfométrica da área de densidade óssea ( $\text{mm}^2$ ) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos **A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12)**, nos diferentes períodos. 52
- Gráfico 7** - Comparação dos valores médios da área de densidade óssea ( $\text{mm}^2$ ) de tecido mineralizado da calota craniana de coelhos dos grupos **A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12)**, entre os períodos de 8 e 12 semanas. 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação dos coelhos, com a localização do material enxertado e o período de avaliação.	24
<b>Tabela 2</b> – Resultado da média das alturas (mm) mensuradas para o cálculo do volume (mm <sup>3</sup> ) do tecido ósseo neoformado.	27
<b>Tabela 3</b> – Resultados da avaliação volumétrica (mm <sup>3</sup> ) do tecido ósseo neoformado.	33
<b>Tabela 4</b> – Tabela da análise estatística de Tuckey-Kramer.	36
<b>Tabela 5</b> – Resultados da análise de variância (ANOVA) e Teste de Tuckey dos dados histomorfométricos dos grupos <b>A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12)</b> , nos Diferentes períodos de observação em 8 e 12 semanas.	49
<b>Tabela 6</b> – Análise histomorfométrica da área de densidade óssea (mm <sup>2</sup> ) dos tecidos mineralizados, obtidos com enxertos de osso autógeno particulado e de osso autógeno particulado misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado associados ou não com tetraciclina nos diversos grupos experimentais. <b>Valores expressos por Média ± SD para cada grupo (n=5).</b>	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - enxerto ósseo autógeno particulado

AT - enxerto ósseo autógeno particulado associado à tetraciclina

AB - enxerto ósseo autógeno particulado misturado com enxerto homogéneo fresco congelado particulado

ABT - enxerto ósseo autógeno particulado misturado com enxerto homogéneo fresco congelado associado à tetraciclina

b-TCP - beta fosfato-tricálcico

DFDBA - enxerto ósseo alógeno desmineralizado congelado e seco

EHFCP - enxerto homogéneo fresco congelado particulado de banco de ossos

FDDBA - enxerto alógeno congelado e seco

HA - hidroxiapatita

kg – quilogramas

mm - milímetros

mm<sup>3</sup> -milímetros cúbicos

PTFE - politetra fluor-etileno

PTFE-e - poli tetra fluor-etileno expandido

RTG - regeneração tecidual guiada

TTC - tetraciclina

## SUMARIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISTA DA LITERATURA	3
3 PROPOSIÇÃO	10
4 MATERIAL E MÉTODO	11
4.1 Materiais permanentes	11
4.2 Material de consumo	12
4.3 Material biológico	12
4.5 Drogas utilizadas	12
4.4 Método	14
4.5 Descrição do experimento	15
4.5.1 Preparo dos animais	15
4.5.2 Sedação e anestesia dos animais.	16
4.5.3 Cirurgia e colocação dos enxertos	16
4.6 Períodos de avaliação	23
4.7 Avaliação volumétrica e remoção das biópsias	25
4.8 Preparo das lâminas histológicas	28
4.9 Análise histológica e histomorfométrica	29

4. 10 Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Análise macroscópica	33
5.1.1 Estatística da verificação macroscópica	33
5.2 Análise histológica	37
5.3 Análise estatística da histomorfometria	47
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	57

## 1 INTRODUÇÃO

Desde o aparecimento dos implantes osseointegrados para reabilitação cirúrgico-protética de indivíduos com ausência de elementos dentais, os protocolos reabilitadores eram planejados e executados em indivíduos com presença de osso alveolar suficiente. Entretanto, uma anatomia óssea desfavorável e inadequada por ausência de volume ósseo, inviabilizava os procedimentos para a utilização das fixações.

Com o tempo os profissionais passaram a realizar reconstruções com o auxílio de enxertos ósseos associados a diversos biomateriais, viabilizando a possibilidade de colocação de implantes.

Uma das técnicas de reconstrução óssea, a regeneração tecidual guiada (RTG), tem como requisito a utilização de uma barreira impermeável utilizada para manter um espaço entre ela e o leito de tecido ósseo, a fim de permitir que as células potenciais que irão preencher o local sejam as mesmas do tipo de tecido a regenerar (BUSER, 1990). As técnicas de RTG foram associadas a diversos tipos de biomateriais como auxiliares na manutenção do espaço, obtendo-se então resultados mais previsíveis. A disponibilidade desses biomateriais, associados a medicamentos, ofereceram aos cirurgiões várias alternativas de escolha.

O material de eleição é o enxerto autógeno, porém, apresenta o inconveniente da necessidade de remoção cirúrgica de uma região óssea, intra ou extraoralmente para sua utilização, resultando em mais uma área cirúrgica, maior tempo operatório e incômodo pós-operatório ao indivíduo.

O enxerto homogêneo fresco congelado particulado de banco de ossos (EHFCP) surge como uma nova alternativa para cirurgias de reconstrução óssea.

A associação de tetraciclina (TTC) a enxertos ósseos vem sendo utilizada em cirurgias, tais como a cirurgia de levantamento de assoalho de seio maxilar, com a finalidade de diminuir o risco de infecção. As tetraciclina, classicamente, são antibióticos bacteriostáticos ativos contra um grande número de organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Além de sua capacidade anti-microbiana, apresentam afinidade aos tecidos mineralizados, sendo utilizadas também como marcadores ósseos para fins de avaliação de crescimento ósseo (THILANDER, 1973). A TTC, ao ser utilizada localmente em enxertos ósseos, facilita o processo regenerativo de diversas maneiras: devido aos seus efeitos antimicrobianos e a sua substantividade, a seus efeitos anti-colagenolíticos e a sua atividade de estimulação fibroblástica (KIM et al., 2004)

A importância dos conhecimentos relacionados a ação da tetraciclina em enxertos ósseos faz-se presente, já que o controle de infecção nas cirurgias de enxertos em seio maxilar é essencial para o sucesso do tratamento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os efeitos da tetraciclina na reparação de alvéolos dentais foram pesquisados por Thilander e Astrand (1973). Os autores administraram TTC na forma de solução injetável na concentração de 10mg/ml em ratos. O experimento foi dividido em 3 grupos: grupo com 1 injeção, grupo com 3 injeções e grupo controle. Os animais que foram utilizados para avaliação da reparação óssea de alvéolos de primeiros molares, utilizando a TTC como marcador ósseo foram sacrificados após 4, 8 e 16 semanas. Os autores concluíram que a TTC, nessa forma de aplicação, aparentemente não apresenta efeito na reparação óssea em alvéolos dentais.

Goodson (1979) relatou os benefícios da TTC aplicando-a diretamente dentro do sulco gengival em bolsas periodontais, mantendo-se concentrações altas no sulco periodontal, pela sua capacidade de ser secretada pelos fluidos gengivais.

Lindhe (1979) também verificou a eficácia da TTC em pacientes com doença periodontal, alterando a microbiota do sulco gengival, e tendo os parâmetros clínicos como de sangramento a sondagem e índice de placa bacteriana diminuídos.

Sanders (1983) comparou o uso do enxerto autógeno particulado com enxerto misto de FDDBA e autógeno em defeitos ósseos periodontais,

indicando melhores resultados do FDBA quando misturado a enxerto autógeno.

Golub (1984) concluiu em seus estudos envolvendo colagenases animais que a TTC inibe a atividade colagenolítica tecidual tanto *in vivo* quanto *in vitro* e cita que a TTC parece inibir a reabsorção óssea causada pelo paratormônio estimulado.

Mabry *et al.* (1985) estudaram a administração tópica e sistêmica de TTC em 16 pacientes portadores de periodontite juvenil. Em 8 pacientes, grupo I, em um hemiarco, ele inseriu no defeito ósseo o FDBA com tetraciclina (grupo Ia), e no outro hemiarco somente raspagem (grupo Ib). A tetraciclina era utilizada sistemicamente e também na forma de pó misturado ao FDBA numa proporção de 1:4. Nos pacientes 8 restantes, grupo II, ele utilizou o FDBA sem mistura de tetraciclina em um hemiarco, e no outro foi realizado somente a raspagem. No estudo foi concluído que a combinação de FDBA com administração tópica e sistêmica de tetraciclina resultou em uma melhor regeneração óssea se comparada somente ao uso do FDBA, e devido ao aumento de regeneração óssea foi verificada a diminuição na profundidade das bolsas periodontais.

Evans *et al.* (1989) realizaram experimento utilizando TTC associada ao betafosfato tricálcico (b-TCP), a hidroxiapatita (HA) e ao FDBA, indicando que enxertos ósseos combinados com TTC (localmente e sistemicamente)

promovem benefícios para alcançar reparo e preenchimento de defeitos ósseos em pacientes com periodontite juvenil.

Buser *et al.* (1990) descreveram a importância da manutenção de um espaço entre tecidos duro e mole para a utilização de técnicas regenerativas ósseas com membranas impermeáveis. Segundo os autores esse espaço deverá ser responsável pela seleção das células que irão repovoar esse sítio.

Drury *et al.* (1991) estudaram em mandíbula de macacos babuínos a associação de FDBA com tetraciclina em solução de 10µg/ml. Eram criados 4 defeitos críticos no tamanho de 2mm de comprimento por 6mm de largura. Sobre estes defeitos foram instalados câmaras de nylon, sendo elas internamente preenchidas com FDBA associados à água destilada estéril ou à solução de tetraciclina, ou deixadas vazias. Foi constatado que o grupo que foi utilizado a TTC apresentou maior quantidade de “novo osso” formado microscopicamente, e que nos grupos com 5 semanas a formação de “novo osso” era maior se comparado ao grupo de 3 semanas. Os autores relataram que aparentemente existe não só uma ação antibiótica da TTC envolvida, mas também parecem predominar aspectos bioquímicos e metabólicos. Seus achados nos estudos histométricos sugeriram que a aplicação de tetraciclina ao FDBA aumenta a formação de novo osso e parece poder ser utilizada com garantia.

Isaksson *et al.* (1992), estudaram em calvária de 14 coelhos, a reparação de defeitos ósseos criados com trefinas, removendo-se as duas

tábuas da díploe em 4 locais. Os blocos ósseos coletados com trefina eram manipulados para a obtenção de 2 tipos de material: um deles foi osso triturado com partículas ósseas de  $1\text{mm}^3$  e o outro foi uma pasta óssea obtida com fresagem da díploe com soro fisiológico. Metade dos coelhos eram sacrificados após 4 semanas e a outra após 15 semanas. Os autores concluíram que o tamanho das partículas é importante para a vascularização e vitalidade do enxerto.

Lundgreen *et al.* (1992), indicaram a possibilidade de utilização de uma membrana biodegradável de ácido polilático em calvária de coelhos em procedimento de RTG sem a utilização de enxertos ósseos.

Hammerle *et al.* (1995) estudou a dinâmica da regeneração óssea em defeitos criados na calvária de coelhos utilizando membrana de PTFE-e. Com a utilização de histologia, puderam concluir que a formação óssea ocorre em ilhas isoladas dentro do defeito ósseo contando também com o crescimento decorrente das bordas do defeito.

Deijkers *et al.* (1997) analisaram a contaminação bacteriana de enxertos ósseos captados em 200 cadáveres de doadores de osso. A maior fonte de contaminação é exógena, influenciada pela forma de captação, e as endógenas podem ser controladas pela seleção dos doadores. O banho com soluções antibióticas não foi considerado um método eficaz de descontaminação do enxerto fresco.

Utilizando enxerto ósseo bovino desmineralizado e coágulo internamente a uma abóbada semi-circular de ácido poliláctico fixada a calota craniana em coelhos, Hammerle *et al.* (1997) concluíram que a utilização de um material osteocondutivo aumenta a superfície para a deposição óssea diminuindo o tempo da reparação e resultando em áreas com densidade óssea aumentada.

Donos *et al.* (2002) estudaram membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis (PTFE-e) utilizando enxertos autógenos em bloco em diversos trabalhos em ratos, indicando que o volume de osso autógeno utilizado para aumento de rebordo pode ser mantido sob uma membrana, com bons resultados clínicos, sendo a membrana reabsorvível ou não.

Pallesen *et al.* (2002) realizaram um estudo avaliando a influência do tamanho da partícula de enxerto ósseo autógeno em calvária de coelhos e verificaram que um volume total de novo osso formado era maior e mais maturado nos defeitos preenchidos com partículas menores, comparados com defeitos preenchidos com partículas maiores, tanto em 2 como em 4 semanas.

Slotte *et al.* (2003) utilizaram 15 coelhos New Zealand de 3 a 4 quilogramas, onde foi afixado no subcutâneo na calvária 2 dispositivos cilíndricos de titânio em locais perfurados no osso cortical com a porção superior aberta permitindo a visibilidade dos ossos parietais, sendo em seguida 1 cilindro deixado vazio e o outro preenchido com osso raspado de

calota craniana ou osso mineral bovino (Bio-oss). O seu trabalho concluiu que a utilização de osso autógeno ou osso mineral bovino associado a uma barreira mantenedora de espaço promove maior formação óssea que a colocação somente da barreira.

Kim *et al.* (2004) realizaram um estudo em calvária de 72 ratos produzindo defeito crítico de 8mm de diâmetro e preenchendo com 3 tipos de enxertos mistos: DFDBA com solução salina, DFDBA misturado com 15mg de gentamicina e DFDBA misturado com 30mg de tetraciclina e disponibilizando 1 grupo sem preenchimento para controle.

Sendyk (2005) avaliou 78 cirurgias de levantamento de seio maxilar, onde em metade delas foram utilizadas enxerto autógeno ou misto, e, na outra metade das cirurgias, foi adicionado fosfato de tetraciclina no mesmo tipo de enxerto autógeno ou misto. O autor concluiu que a adição de tetraciclina ao enxerto ósseo, na técnica de levantamento de seio maxilar, tem um efeito benéfico para a cirurgia, tendo uma redução estatisticamente significativa na quantidade de abscessos e purulência no pós-operatório, e também na perda de implantes colocados na área enxertada.

Manfro (2006) utilizou dispositivos metálicos fixados em calvária de coelhos para avaliação dos substitutos ósseos xenógenos inorgânicos bovinos Bio-Oss, Bone-Fill e Genox, demonstrando ser um modelo experimental que simula técnica de regeneração tecidual guiada com utilização de membranas impermeáveis.

Masters *et al.* (2006) compararam a utilização de DFDBA em 2 grupos: com e sem solução de cloridrato de tetraciclina na concentração de 50mg/ml. O material era utilizado em defeitos ósseos causados por doença periodontal em cirurgias de retalho muco-periostal após raspagem e alisamento radicular. Os seus resultados estatísticos sugeriram que a adição de TTC com esta concentração não tem influência nos parâmetros clínicos de tecidos moles e duros.

Pelegrine (2006) realizou um estudo clínico e histomorfométrico, comparando a utilização de osso autógeno fresco e osso homogêneo fresco congelado associados ou não a medula óssea autóloga em coelhos, no período de 8 e 12 semanas. O autor não verificou diferença significativa nos grupos de sua pesquisa na quantidade de osso neoformado, tanto clinicamente quanto histomorfometricamente. Entretanto, histologicamente, verificou uma quantidade maior de partículas ósseas residuais no grupo com osso homogêneo fresco congelado.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho terá como objetivo a avaliação clínica, histológica e histomorfométrica dos efeitos da associação da tetraciclina (10mg/enxerto) com enxerto ósseo autógeno particulado, e com enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogêneo fresco congelado particulado, dispostos em cilindros de titânio fixados em calvária de coelhos, utilizando a técnica de regeneração óssea guiada. Será avaliado volumetricamente o ganho de tecido ósseo dentro de cada cilindro, e histomorfometricamente a área de densidade óssea neoformada.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Material permanente

- 1 motor cirúrgico Nouvag<sup>1</sup>
- 1 peça reta 1:1 Kavo<sup>2</sup>
- 1 jogo de irrigação de soro fisiológico<sup>3</sup>
- seringa carpule<sup>4</sup>
- cabo de bisturi Bard Parker<sup>4</sup>
- lâmina de bisturi no. 15<sup>4</sup>
- descolador de Molt 2/4<sup>4</sup>
- porta agulha tipo Castroviejo<sup>4</sup>
- fio de sutura mononylon 4.0<sup>5</sup>
- kit de fixação de enxertos Neodent<sup>6</sup>

---

<sup>1</sup> Nouvag, Rorschach - Suíça

<sup>2</sup> Kavo, Joinville – Brasil

<sup>3</sup> Dentoflex, São Paulo - Brasil

<sup>4</sup> Quinelato, Rio Claro - Brasil

<sup>5</sup> Johnson & Johnson, São Jose dos Campos – Brasil

<sup>6</sup> Neodent, Curitiba - Brasil

## 4.2 Material de consumo

- 40 dispositivos cilíndricos com tampas oclusivas
- 80 parafusos de fixação da SIN de 1,2mm X 8mm<sup>7</sup>

## 4.3 Material biológico

- osso autógeno raspado particulado proveniente da calota craniana de coelhos
- osso homogêneo fresco congelado particulado de coelhos, proveniente de banco de ossos, tratado com o mesmo protocolo do banco de ossos humanos do Uni-oss<sup>10</sup> (Unimar)

## 4.4 Drogas utilizadas

- cloridrato de ketamina<sup>11</sup>, anestésico geral, na dose de 0,2 mg/kg
- midazolam<sup>12</sup> – benzodiazepínico, ansiolítico, na dose de 0,12mg/kg
- meperidina<sup>13</sup> – analgésico opióide usado na indução da anestesia geral e sedação, na dose de 0,12mg/kg
- iodopovidona<sup>14</sup>, usado na antisepsia da área cirúrgica

---

<sup>7</sup> SIN, São Paulo, SP – Brasil

<sup>8</sup> Aster, Sorocaba, SP Brasil

<sup>10</sup> Uni-oss – Universidade de Marília – Marília, SP- Brasil

<sup>11</sup> Ketalar, Pfizer, São Paulo, SP - Brasil

<sup>12</sup> Roche, Rio de Janeiro, RJ - Brasil

<sup>13</sup> Dolantina, Sanofi-Aventis, São Paulo SP \_Brasil

<sup>14</sup> Povidine, Geyer Medicamentosoché, Porto Alegre, RS - Brasil

- cloridrato de prilocaína com felipressina, Citanest<sup>®15</sup> – anestésico local
- fosfato de tetraciclina Tetrex<sup>®16</sup>, antibiótico bacteriostático  
(10mg/enxerto)
- cloreto de sódio em solução aquosa a 0,09 % (NaCl a 0,09%)<sup>17</sup>

---

<sup>15</sup> Astra Zeneca, Cotia, SP - Brasil

<sup>16</sup> Bristol-Myers Squib – Nova York, EUA

<sup>17</sup> Baxter Brasil, São Paulo, SP - Brasil

#### 4.4 Método

Foram selecionados, 10 coelhos fêmeas da raça New Zealand, com peso entre 4 e 5 kg, idade variando entre 10 e 12 meses, provenientes de criador autorizado (Benjamin Fleider) e mantidos sob os cuidados do biotério da Universidade de Santo Amaro (UNISA).

O projeto de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro atendendo aos aspectos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais.

Os animais foram inicialmente mantidos em observação por um período de 20 dias após sua chegada ao biotério para que fossem descartadas quaisquer alterações em seu estado geral de saúde, sendo posteriormente operados no laboratório de técnicas cirúrgicas da Faculdade de Veterinária da UNISA.

Em cada animal foram instalados na calvária 4 dispositivos cilíndricos metálicos confeccionados especialmente para o experimento, sendo eles afixados com parafusos de enxerto de 1,2mm da marca SIN. Em seguida foi realizada a descorticalização da região externa da calota craniana internamente ao cilindro. Os cilindros foram preenchidos imediatamente com os seguintes materiais antes de serem fechados com uma tampa oclusiva:

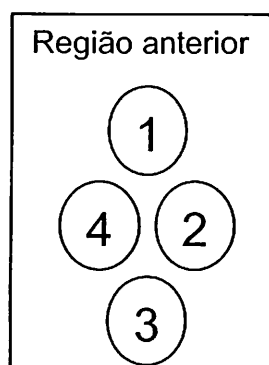
Grupo A: osso autógeno particulado obtido de raspagem de calota craniana (controle).

Grupo AT: osso autógeno particulado obtido de raspagem de calota craniana associado à tetraciclina.

Grupo AB: osso autógeno particulado obtido de raspagem de calota craniana misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado de banco de ossos.

Grupo ABT: osso autógeno particulado obtido de raspagem de calota craniana misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado de banco de ossos associado à tetraciclina.

Os dispositivos foram posicionados na calota craniana conforme figura 1



**Figura 1** - Posicionamento e numeração dos dispositivos na calota craniana dos animais.

#### 4.5 Descrição do experimento

##### 4.5.1 Preparo dos animais

Foi realizada a tricotomia da região cirúrgica da calota craniana, e em seguida, a antisepsia do campo operatório com iodopovidona. Os animais foram acomodados nas mesas cirúrgicas, isolados com campos operatórios estéreis e receberam suprimento de oxigênio através de aparelho de oxigenoterapia.

#### 4.5.2. Sedação e anestesia dos animais.

Foi utilizada para medicação pré-operatória 0,2 mg/kg de ketamina associada a 0,12mg/kg de midazolan e 0,12mg/kg de meperidina via intramuscular. Para a indução da sedação utilizou-se 0,15 mg/kg de ketamina associado com 0,1mg/kg de midazolan. A cirurgia foi realizada com oxigenoterapia, e, se fosse observada alguma reação do animal, era administrado uma dose adicional de 0,3 mg/kg de ketamina associado com 0,06mg/kg de midazolan durante a cirurgia.

Foi realizada anestesia local subperiostealmente na região da calvária, com cloridrato de prilocaína (Citanest) para um maior efeito anestésico local.

#### 4.5.3. Cirurgia e colocação dos enxertos

Optou-se por uma incisão sagital mediana retilínea de retalho total (epiderme, derme e periósteo), seguido de acesso a região cranial com descolador de Molt, rebatendo o periósteo suficiente para visualização da calota craniana para instalação dos 4 dispositivos.

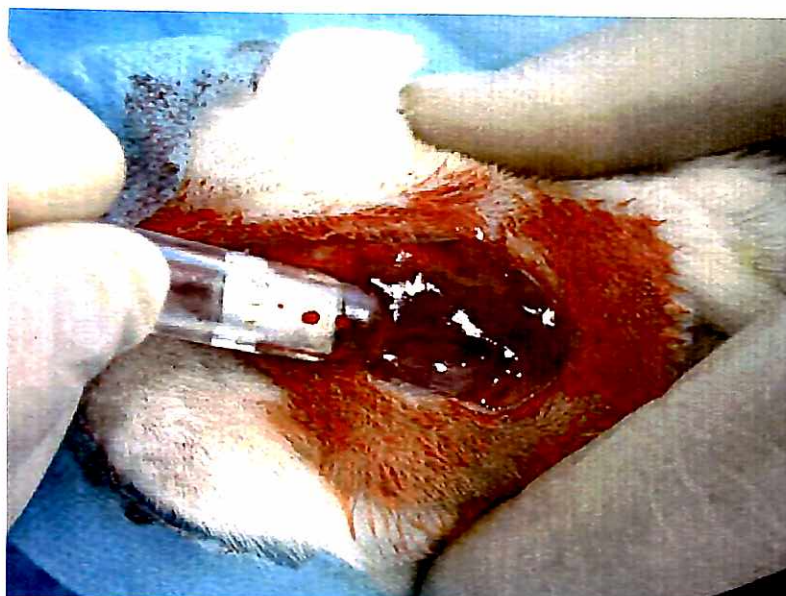


**Figura 2** - Descolamento do periósteo e exposição da calvária

Antes da instalação dos dispositivos, foi feita uma coleta de osso cortical na região sagital da calvária com o auxílio de um raspador ósseo “Autogenous”<sup>®18</sup> com movimentos póstero-anteriores com compressão da ponta do raspador, onde se localiza a lâmina, obtendo-se raspas de osso cortical extremamente delgadas, para posterior utilização no experimento.

---

<sup>18</sup> Autogenous, Sersosn Implantes, São Paulo Brasil



**Figura. 3** - Movimentos póstero-anteriores com leve compressão no raspador para obtenção de raspas de enxerto autógeno

O outro material analisado foi osso homogêneo fresco congelado particulado proveniente de banco de ossos (Uni-oss da Unimar). Tratava-se de tíbias e fêmures removidos em condições assépticas de coelhos que foram sacrificados 2 meses antes deste experimento. O material foi encaminhado ao Uni-oss da Universidade de Marília para processamento seguindo as normas do banco de tecidos músculo-esqueléticos da Universidade de Marília, que segue as normas da American Association of Tissue Banks (AATB). O material foi congelado a  $-86^{\circ}\text{C}$ , diminuindo o seu fator antigênico, porém mantendo os componentes da matriz óssea. Foi submetido também a uma imersão com o antibiótico vancomicina.



**Figura 4** - Fêmur de coelho (osso alógeno fresco congelado que foi processado previamente no Uni-oss da Universidade de Marília) após descongelamento em soro fisiológico



**Figura 5** - Mistura de osso autógeno e homogêneo na proporção de 1:1

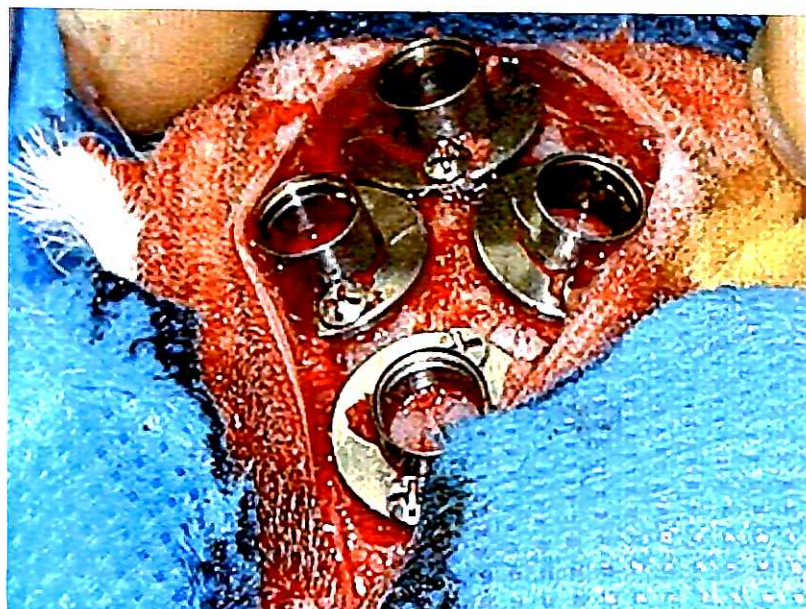
Realizamos então o fracionamento do fosfato de tetraciclina Tetrex®. Uma cápsula de 500mg foi aberta e o pó foi depositado sobre uma placa de vidro, sendo dividida em 5 partes iguais de 100mg e uma dessas partes foi novamente segmentada em 10 porções de 10mg, para que, logo em seguida fosse misturada aos enxertos particulados.



**Figura 6** - Fracionamento do fosfato de tetraciclina em porções de 10mg

Cada dispositivo fabricado apresentava duas perfurações com a finalidade de serem imobilizados com parafusos de 1,2mm de diâmetro. Foram posicionados um total de 4 dispositivos de forma a obter estabilidade pelo aplainamento feito com o raspador ósseo abrangendo toda a região da calota craniana exposta. Com uma broca de 1,1mm, em baixa rotação e irrigação abundante com soro fisiológico, o leito ósseo foi preparado para fixação dos parafusos. A irrigação com soro fisiológico tinha como objetivo refrigerar a broca, para impedir alterações teciduais decorrente de altas temperaturas durante a fresagem. Com todos os dispositivos presos e

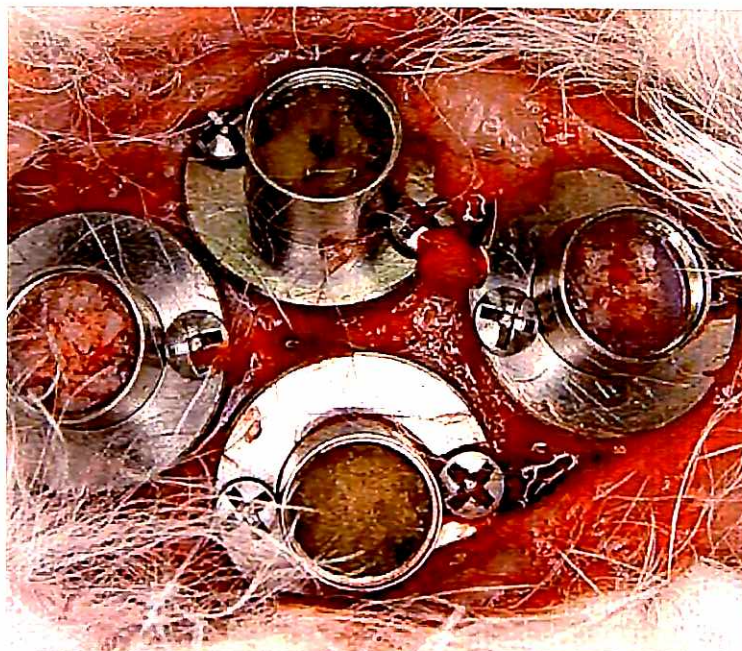
imóveis, procedeu-se as descorticalizações na porção óssea interna aos cilindros num total de 4 perfurações com a mesma broca utilizada para a fixação dos parafusos até que um sangramento fosse obtido, utilizando a capacidade regenerativa da díploe (HAMMERLE *et al*, 1995) e respeitando-se os princípios de RTG (BUSER *et al.*,1990).



**Figura 7** - Posicionamento e fixação dos cilindros de titânio na calota craniana do animal

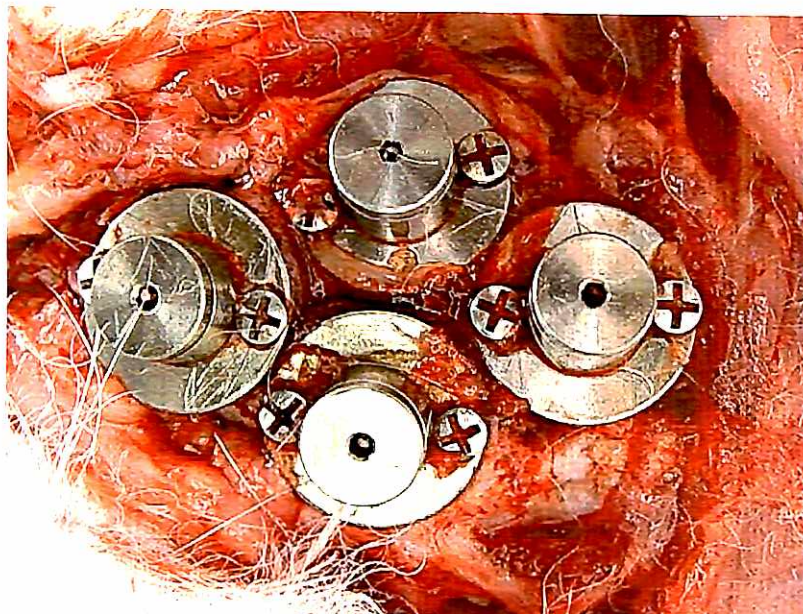
Realizamos então o preenchimento dos cilindros com os quatro materiais da pesquisa: enxerto autógeno particulado (raspas de osso) denominado grupo controle A, enxerto autógeno particulado associado à 10 mg de TTC visualizando-se uma proporção de 6:1 denominado grupo AT, enxerto homogêneo fresco congelado particulado de banco de ossos associado a enxerto autógeno particulado na proporção 1:1 denominado grupo AB, e enxerto homogêneo fresco congelado particulado de banco de ossos misturado com enxerto autógeno e associado à 10 mg de tetraciclina

visualizando-se a proporção de 3:3:1 respectivamente denominado grupo ABT. Os materiais pesquisados variavam de localização nos cilindros, sendo que, em cada coelho, realizava-se uma alteração de posicionamento em sentido horário (Tabela 1).



**Figura 8** - Preenchimento dos cilindros com os respectivos enxertos ósseos.

Os cilindros receberam em seu interior o material de enxertia compactado e foram fechados com uma tampa oclusiva rosqueada.



**Figura 9** - Fechamento dos cilindros com tampa parafusada.

Procedeu-se, então, o fechamento da ferida cirúrgica com sutura em dois planos, utilizando-se fios de sutura mononylon 4.0. Os animais foram monitorados até total recuperação dos efeitos anestésicos e conduzidos ao biotério.

#### 4.6 Períodos de avaliação

Os resultados obtidos foram avaliados após um período de 8 e 12 semanas, ou seja 2 grupos de 5 coelhos. Os coelhos foram identificados com números, com tatuagem na parte interna da orelha, sendo que a numeração 8, 11R, 13, 13A e 16 foram sacrificados após 8 semanas; e os identificados com 4, 6, 11, 12 e 15 após 12 semanas (Tabela 1).

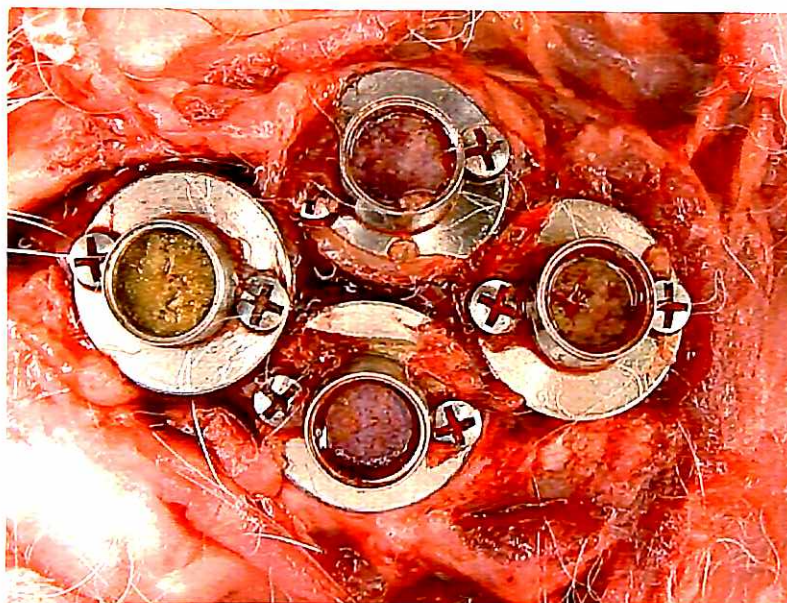
No. coelho	1	2	3	4	data do experimento	data do sacrificio	semanas
13	AT	AB	ABT	A	26/4/2006	21/6/2006	8
16	A	AT	AB	ABT	26/4/2006	21/6/2006	8
8	ABT	A	AT	AB	26/4/2006	21/6/2006	8
11R	A	AT	AB	ABT	3/5/2006	28/6/2006	8
13A	ABT	A	AT	AB	3/5/2006	28/6/2006	8
15	A	AT	AB	ABT	5/4/2006	28/6/2006	12
12	ABT	A	AT	AB	5/4/2006	28/6/2006	12
6	AB	ABT	A	AT	5/4/2006	28/6/2006	12
11	AB	ABT	A	AT	26/4/2006	19/7/2006	12
4	AT	AB	ABT	A	26/4/2006	19/7/2007	12

**Tabela 1** - Identificação dos coelhos, com a localização do material enxertado e o período de avaliação

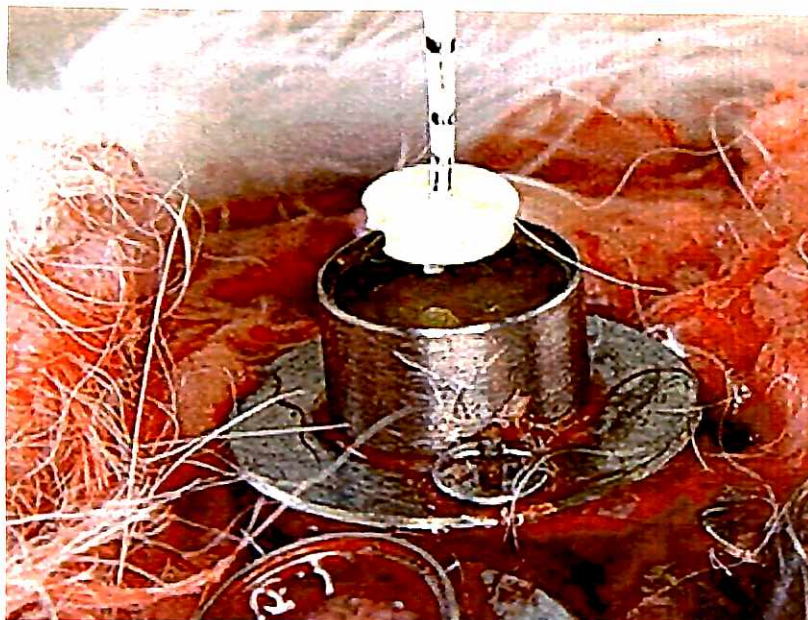
#### 4.7 Avaliação volumétrica e remoção das biópsias

A avaliação volumétrica foi realizada imediatamente após o sacrifício dos animais, nos períodos de 8 e 12 semanas respectivamente.

Foi efetuada a abertura incisando a calvária para acesso aos dispositivos. Todos os cilindros foram expostos e abertos, removendo-se as tampas oclusivas, e as mensurações foram aferidas com um paquímetro nas 4 localizações internas de cada cilindro; anterior(N), posterior (S), direita (L) e esquerda (O) para avaliação do volume macroscópico do osso neoformado. Considerando a altura do dispositivo, de 5 mm e o raio do dispositivo de 3 mm, foi possível calcular a altura do osso neoformado, subtraindo-se da altura do cilindro a média aritmética das 4 localizações internas, obtendo-se a altura do cilindro ósseo neoformado. Os volumes foram obtidos com a fórmula  $\pi.r^2.h$  com valores descritos em  $\text{mm}^3$  (**Tabela 2**).

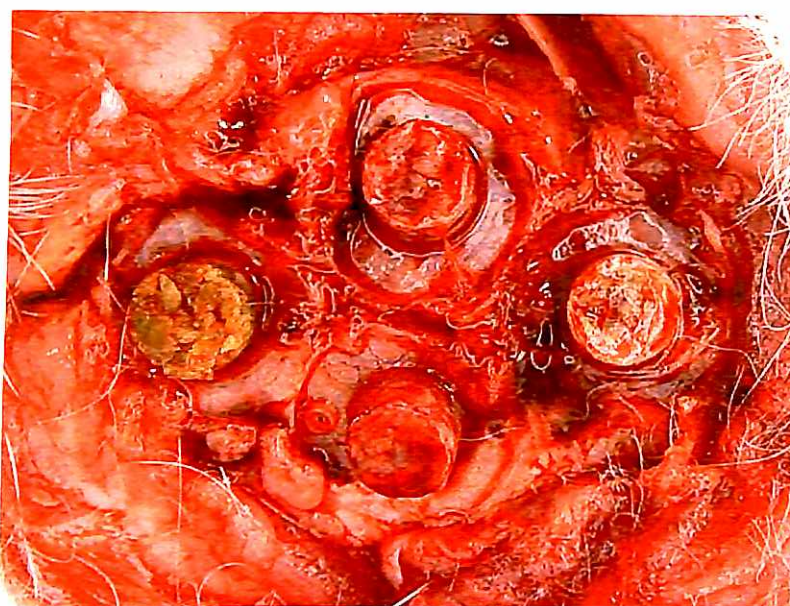


**Figura 10** - Abertura dos cilindros no período de 8 semanas de incorporação.



**Figura 11** - Mensuração da altura em quatro pontos do cilindro

Em seguida, removeu-se os dispositivos cilíndricos e biópsias do tecido ósseo foram realizadas com brocas trefinas, incluindo a tabua óssea externa da calota craniana. As peças foram imediatamente fixadas em solução de formol a 10 %, ph 7,0 e encaminhadas para a obtenção dos cortes histológicos.



**Figura 12** - Aspecto dos enxertos após remoção dos cilindros

<i>Coelho</i>	<i>Tempo</i>	<i>Local</i>	<i>Material</i>	<i>Média altura</i>	<i>Volume</i>
8	8	2	A	2,35	74,93
13	8	1	A	1,575	96,84
16	8	4	A	3,415	44,74
11R	8	2	A	2,65	66,34
13a	8	1	A	1,95	86,24
4	12	2	A	1,875	88,36
6	12	1	A	3,08	41
11	12	3	A	2	84,82
12	12	3	A	2,645	66,55
15	12	4	A	3,14	52,39
8	8	4	AB	1,8	90,48
13	8	2	AB	1,8	90,48
16	8	3	AB	1,8	90,48
11R	8	3	AB	1,575	96,84
13a	8	4	AB	1,95	86,24
4	12	2	AB	1,925	86,94
6	12	1	AB	1,975	85,53
11	12	1	AB	1,275	105,32
12	12	4	AB	1,45	100,37
15	12	3	AB	4,2	22,62
8	8	1	ABT	1,25	106,03
13	8	3	ABT	1,9	87,65
16	8	4	ABT	2,2	79,17
11R	8	4	ABT	2,125	81,29
13a	8	1	ABT	1,875	88,36
4	12	3	ABT	1,5	98,96
6	12	2	ABT	3,5	42,41
11	12	2	ABT	2,075	82,70
12	12	1	ABT	3,125	53,01
15	12	4	ABT	2,675	65,74
8	8	3	AT	1,725	92,60
13	8	1	AT	2,925	58,67
16	8	2	AT	3,5	42,41
11R	8	2	AT	2,125	81,29
13a	8	3	AT	2,2	79,17
4	12	1	AT	2,775	62,91
6	12	4	AT	2,2	79,17
11	12	4	AT	1,8	90,48
12	12	3	AT	2,95	57,96
15	12	2	AT	3,55	41,00

**Tabela 2** – Resultado da média das alturas (em mm) mensuradas para o cálculo do volume ( $\text{mm}^3$ ) do tecido ósseo neoformado.



**Figura 13** - Amostra de tecido ósseo, após biopsia.

#### 4.8 Preparo das lâminas histológicas

As amostras de enxerto ósseo para análise histológica foram encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Histológicas da UNISA. O material foi descalcificado em EDTA, incluído em parafina, seccionado por micrótomo com secções de 5 micrômetros e corado pelo método de Hematoxilina-Eosina (H.E). As lâminas foram submetidas à exame em microscópio de luz e submetidas a documentação fotográfica.

Procedeu-se, então, a análise histológica e histomorfométrica das amostras.

#### 4.9 Análise histológica e histomorfométrica

A documentação fotográfica, a análise histológica e análise histomorfométrica das lâminas histológicas foram realizadas no laboratório de Histomorfometria do Centro de Biociências Aplicadas a Pacientes com Necessidades Especiais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – CEBAPE/UNESP.

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. O método estereológico se baseia em princípios geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade de as imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidir com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal desse método está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem. Esse fato foi 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 (GOMES *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004).

Os fragmentos dos blocos ósseos trefinados foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados, sendo obtidas seis (6) lâminas histológicas/grupo/animal. Dentre essas lâminas, três (3) foram separadas aleatoriamente, sendo cinco campos histológicos, obtidos longitudinalmente na região do enxerto ósseo correspondente ao tecido ósseo mineralizado (Figura 14), avaliados pelo programa Axiovision 4.4<sup>o</sup>. Para o procedimento da

mensuração, foram utilizadas a objetiva 20x/0,25 Achroplan<sup>20</sup>, e ocular 10x W-PI<sup>21</sup> de um microscópio óptico Axioskop 40<sup>22</sup>. As imagens foram captadas por uma câmera digital AxioCam MRc5<sup>23</sup>, correspondendo a uma área de 0,58 mm<sup>2</sup>, onde se analisou a área das trabéculas ósseas neoformadas presentes na região do enxerto ósseo nos diversos grupos e períodos de observação experimentais.

---

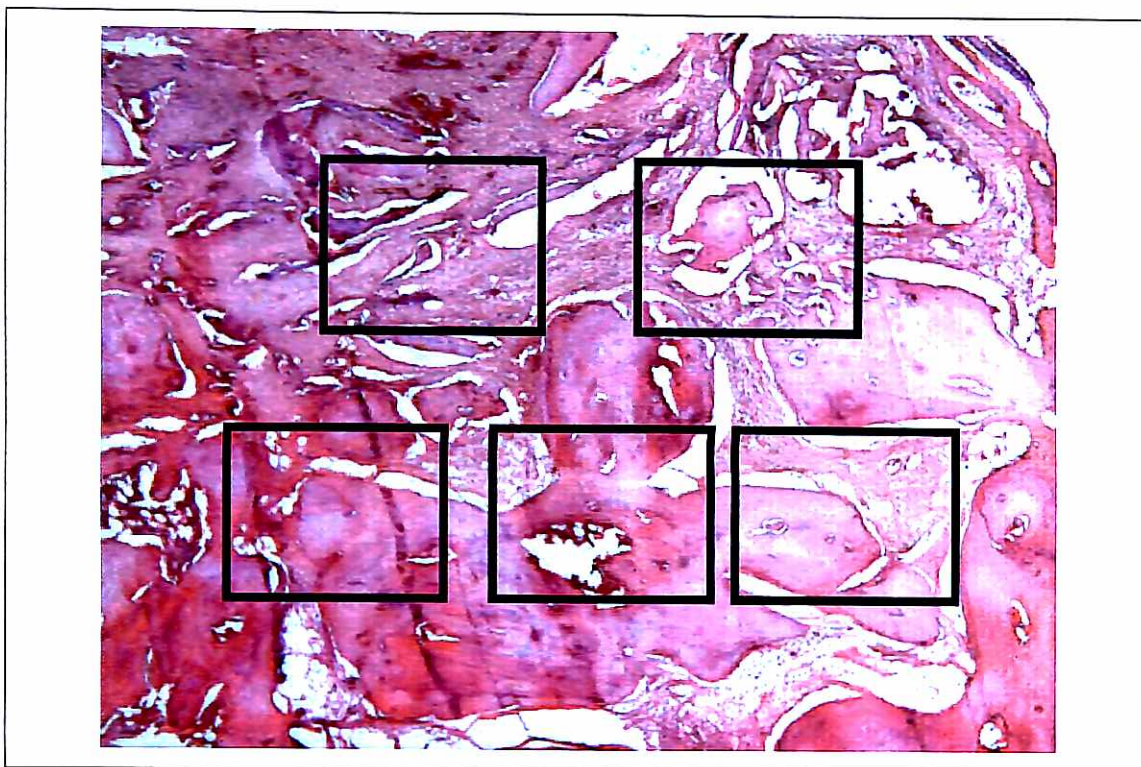
<sup>19</sup> Axiovision 4.4 , Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Göttingen- Alemanha

<sup>20</sup> Achroplan, Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Göttingen- Alemanha

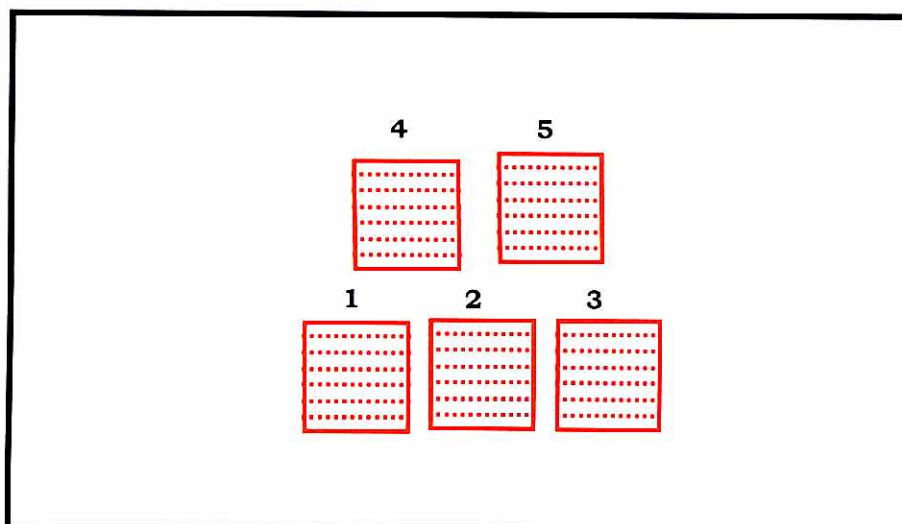
<sup>21</sup> W-PI, Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Göttingen- Alemanha

<sup>22</sup> Axioskop 40, Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Göttingen- Alemanha

<sup>23</sup> AxioCam MRc5, Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Göttingen- Alemanha



**Figura 14** - Representação esquemática da análise histomorfológica da região central da área enxertada, excluindo a região da cortical da calota craniana. (H.E; aumento original 25x).



**Figura 15** - Representação esquemática da análise histomorfológica sendo que em cada quadro foi realizada a mensuração da área com 100X de aumento.

#### 4. 10 Análise estatística

Os resultados da histomorfometria da densidade óssea foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey pelo software GraphPad Prism<sup>24</sup>. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

---

<sup>24</sup> GraphPad Prism version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise macroscópica

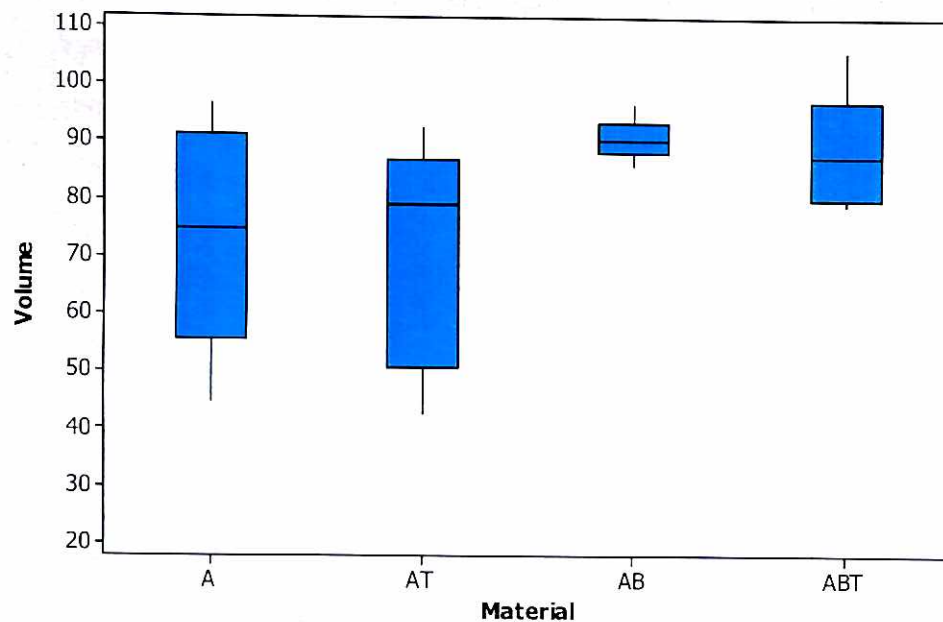
Esses resultados referem-se às amostras obtidas do preenchimento parcial dos cilindros com tecido ósseo, com variações de volume que foram comparados estatisticamente entre os 4 grupos de materiais utilizados.

Foi realizada análise histológica e histomorfométrica das amostras biopsiadas para verificar qualitativamente o comportamento do tecido ósseo neoformado com os materiais utilizados

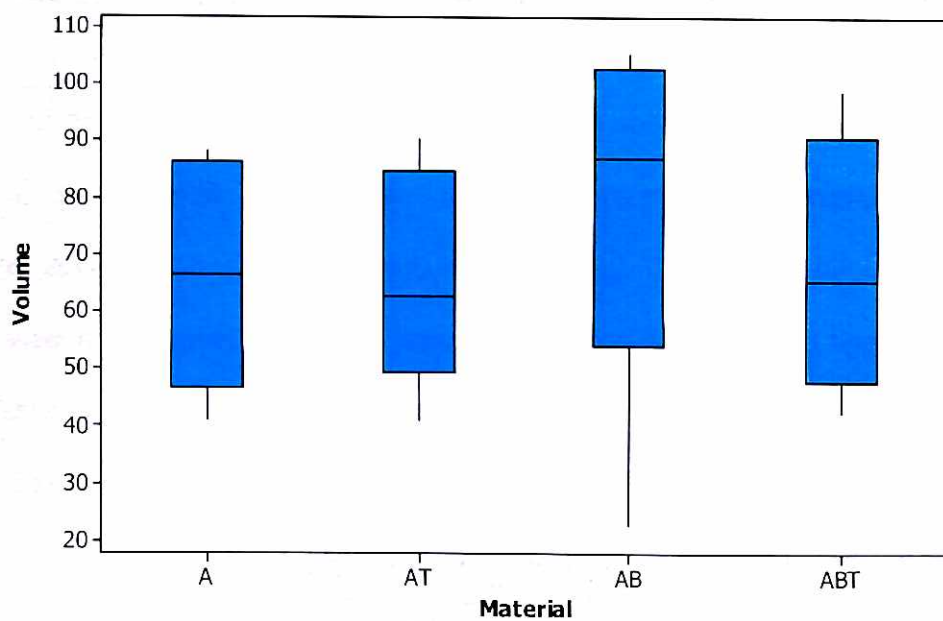
#### 5.1.1 Estatística da análise macroscópica

Osso	Tempo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
A	8	73,82	19,92	44,74	74,93	96,84
	12	66,62	20,39	41,00	66,55	88,35
AT	8	70,83	20,05	42,41	79,17	92,60
	12	66,30	19,18	41,00	62,91	90,48
AB	8	90,90	3,790	86,24	90,48	96,84
	12	80,20	33,30	22,60	86,9	105,30
ABT	8	88,50	10,57	79,17	87,65	106,03
	12	68,60	22,70	42,40	65,70	99,00

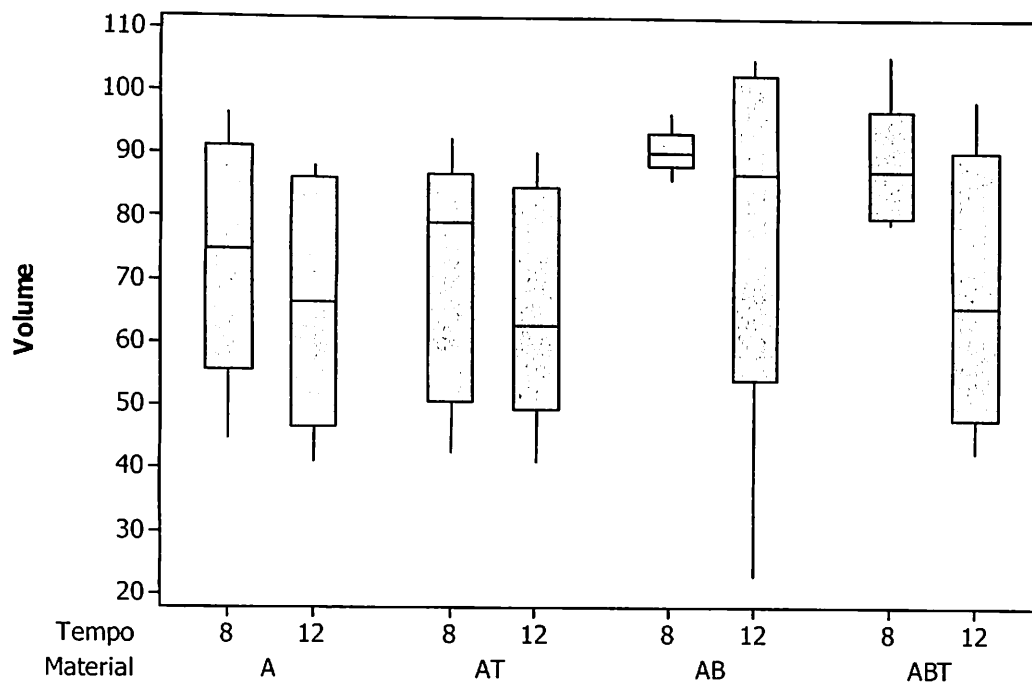
**Tabela 3** – Resultados da avaliação volumétrica (mm<sup>3</sup>) do tecido ósseo neoformado.



**Gráfico 1-** Mediana dos volumes dos enxertos em 8 semanas (em  $\text{mm}^3$ )



**Gráfico 2 –** Mediana dos volumes dos enxertos em 12 semanas ( $\text{mm}^3$ )



**Gráfico 3** – Comparação dos volumes dos enxertos nos 2 períodos (mm<sup>3</sup>).

O gráfico 3 mostra o comportamento do volume de osso ao longo do tempo, de acordo com cada tipo de enxerto. Observa-se que o comportamento do material A é o mais estável. O material AB, que em 8 semanas manteve-se bastante concentrado em torno de 90 mm<sup>3</sup>, em 12 semanas apresentou enorme variação. Algo semelhante, mas em menor intensidade, ocorre com o material ABT. Quanto ao material AT, em 8 semanas apresentava menor variação acima da mediana, o que se inverte em 12 semanas.

Na análise inferencial, considerando-se a variável Volume, será usado um modelo linear generalizado com análise de variância (ANOVA). Esse tipo de modelo permite determinar a significância de cada fator (tempo, material e local) sobre o crescimento ósseo, decompondo-o em fontes de variação. O primeiro fator excluído do modelo foi o local, com  $p=0,3884$ ,

seguido do tempo, com  $p = 0,5302$ . Sendo assim, pode-se dizer que existem evidências de que tanto o local quanto o tempo não influenciaram no volume final de osso.

O material foi o único fator que apresentou evidências de influência sobre o volume final de osso, com  $p = 0,0426$ .

Tendo em vista que o material utilizado influi sobre o volume ósseo final, podemos agora determinar entre quais tipos podem-se observar diferenças. Para tanto, empregamos a Análise de Tukey, que testa, dois a dois, os níveis de um determinado fator (material). O método calcula intervalos de confiança para a diferença do volume médio entre dois níveis do fator. Pode-se dizer que quando os intervalos cruzam o zero, não existe diferença entre os fatores (seria como dizer que os volumes médios em ambos os níveis são iguais).

Differences of Least Squares Means									
Effect	Material	Material	Estimate	Standard Error	DF	t Value	P >  t	Adjustment	Adj P
Material	A	AB	-25.5591	9.9665	28.2	-2.59	0.0072	Tukey-Kramer	0.0467
Material	A	ABT	-9.9275	9.3130	25.4	-1.19	0.2437	Tukey-Kramer	0.6394
Material	A	AT	-7.8797	9.0221	25.9	-0.87	0.3906	Tukey-Kramer	0.8155
Material	AB	ABT	16.0306	7.2773	9.13	2.20	0.0547	Tukey-Kramer	0.1645
Material	AB	AT	15.0794	7.2900	10.9	2.46	0.0308	Tukey-Kramer	0.1014
Material	ABT	AT	2.0495	7.5453	15.1	0.26	0.7975	Tukey-Kramer	0.9935

Differences of Least Squares Means							
Effect	Material	Material	Alpha	Lower	Upper	Adj Lower	Adj Upper
Material	A	AB	0.05	-44.3201	-7.5560	.	.
Material	A	ABT	0.05	-27.0452	7.1902	.	.
Material	A	AT	0.05	-26.4305	11.6734	.	.
Material	AB	ABT	0.05	-0.3965	22.4577	.	.
Material	AB	AT	0.05	2.0092	34.1435	.	.
Material	ABT	AT	0.05	-14.6655	15.7430	.	.

**Tabela 4** – Tabela da análise estatística de Tukey-Kramer

Observando os resultados, podemos dizer que, ao nível de 0,05, os tipos que apresentaram diferença significativa são A e AB (0,0467), sendo que o tipo AB apresentou maior volume ósseo final.

## 5.2 Análise Histológica

As partículas do enxerto autógeno do grupo A incorporaram entre si, exibindo, no conjunto, um tecido ósseo com inúmeros osteócitos em sua estrutura mineralizada. Observava-se também presença de células osteoprogenitoras e osteoblastos na periferia dessas partículas. Além disso, os sistemas haversianos com lamelas ósseas concêntricas foram visualizados no grupo de 12 semanas, caracterizando o fenômeno de remodelação óssea (turn-over) destas partículas (Figuras 16, 17, 24, 25).

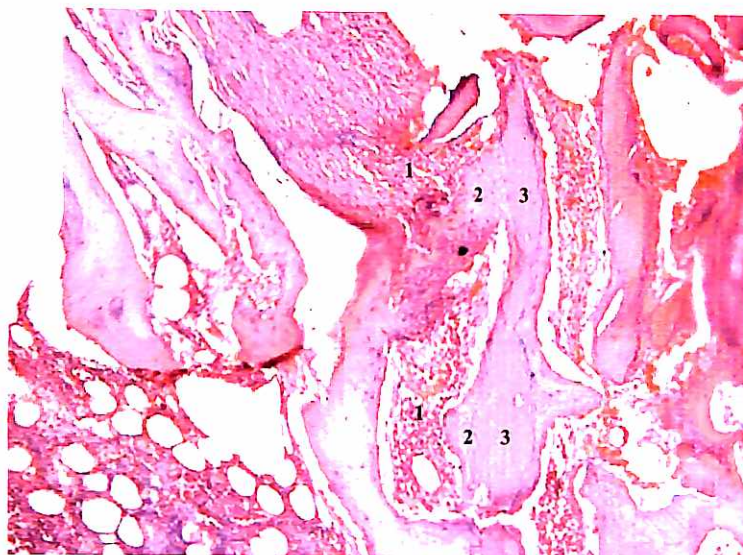
No grupo AT, observava-se maior quantidade de tecido conjuntivo osteogênico quando comparado com os todos os grupos de estudo. Esse tecido apresentava numerosas células osteoprogenitoras e osteoblásticas, bem como encontrava-se bem vascularizado. As partículas do enxerto ósseo, associado à tetraciclina (10mg/enxerto), não promoveram reação tecidual em todos os períodos de observação, uma vez que notava-se ausência de células inflamatórias, tanto mononucleares quanto polimorfonucleares. (Figura 18, 19, 26).

No grupo AB, verificava-se também a incorporação das partículas enxertadas tanto do tecido ósseo autógeno quanto homogêneo. Notava-se formação de tecido ósseo em camadas ao redor das partículas incorporadas no período de 8 semanas. Em 12 semanas, essas camadas eram mais

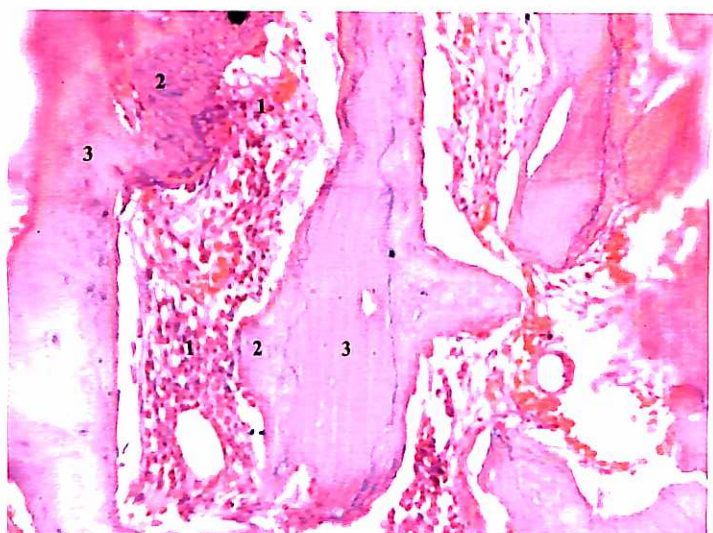
espessas, bem celularizadas, sugerindo apresentar propriedade osteoindutora em ambos os enxertos utilizados (Figura 20, 21, 27,28).

No grupo ABT, no período de 8 semanas, verificava-se a presença tanto de tecido ósseo neoformado quanto de tecido conjuntivo osteogênico, enquanto que, no períodos de 12 semanas, havia predomínio de tecido ósseo neoformado. Ausência de reação inflamatória, em todos os períodos de observação, foi ainda evidenciada, completando o quadro histológico (Figura 22, 23, 29, 30).

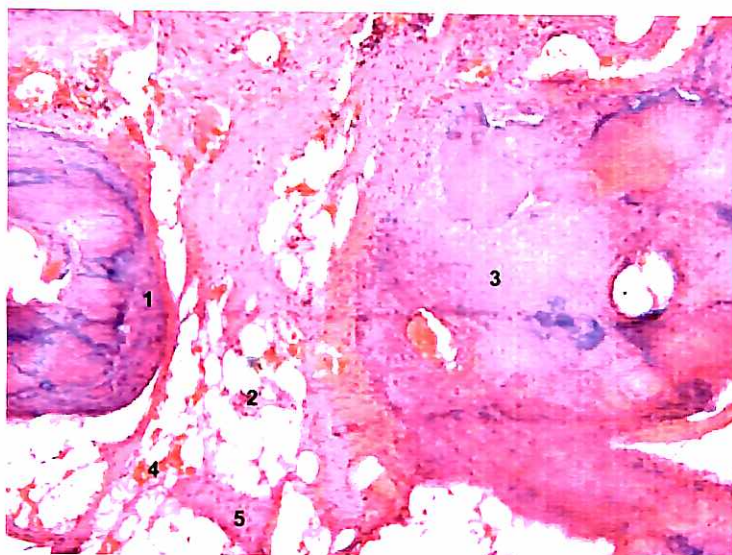
Analisando os grupos tratados com tetraciclina, notava-se que essa droga, na dose preconizada, não interferiu no processo de incorporação entre as partículas e na neoformação de tecido ósseo. Além disso, ausência de colônias bacterianas foi observada em todos os grupos de estudo em seus respectivos períodos de observação.



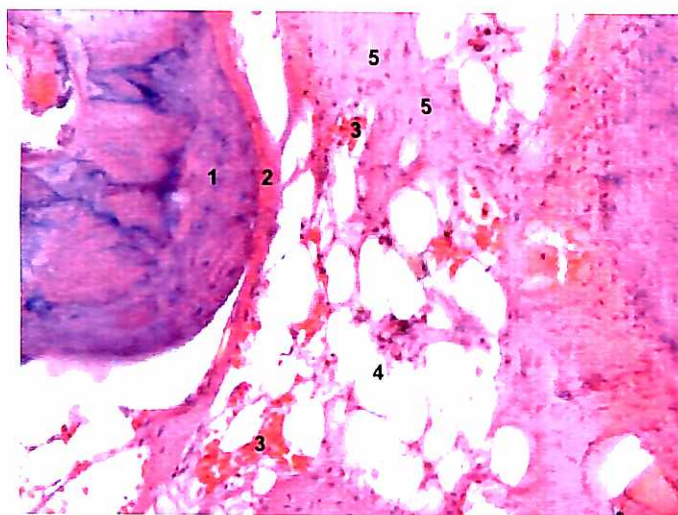
**Figura 16** - Enxerto ósseo autógeno particulado no período de 8 semanas de incorporação (H.E.aumento de 100X). Grande área de neoformação óssea caracterizada por (1) células conjuntivas (2) osteócitos aprisionados em nova matriz óssea e (3) partícula de enxerto ósseo.



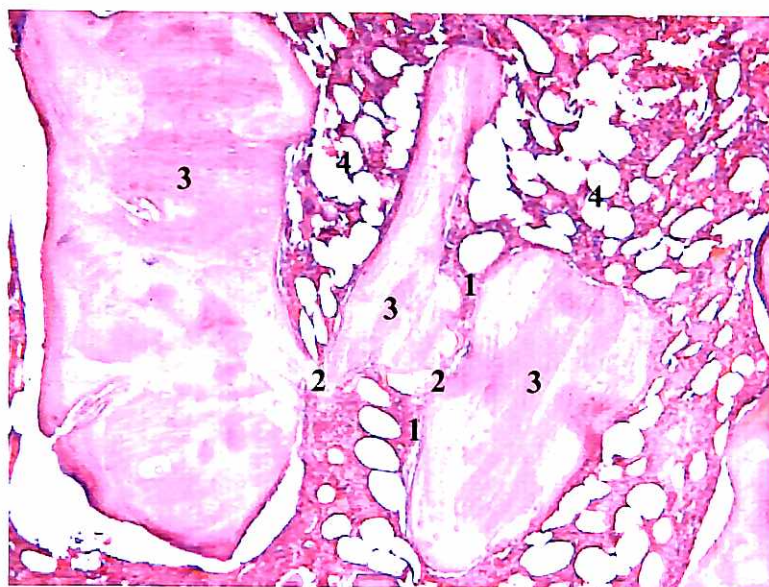
**Figura 17** – Partícula de enxerto incorporada dentro da matriz de células conjuntivas. (1) Células conjuntivas, (2) osteócitos aprisionados em nova matriz óssea e (3) partícula de enxerto ósseo. (H.E. aumento 200X fig. 16).



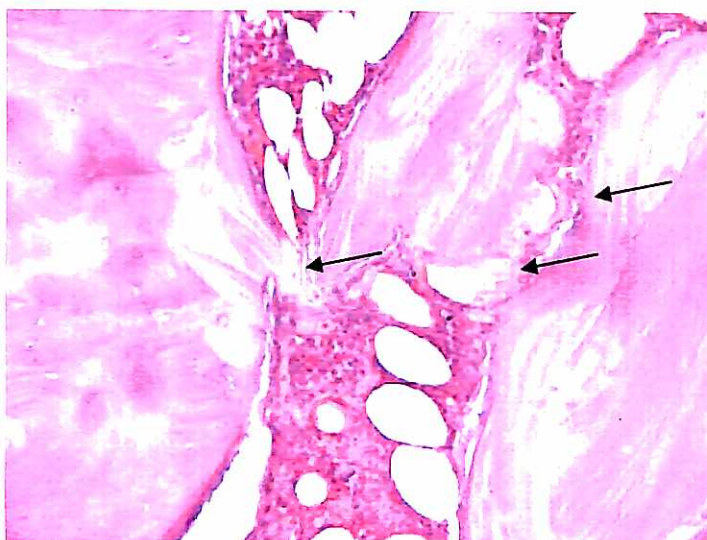
**Figura 18** – Enxerto ósseo autógeno particulado com tetraciclina no período de 8 semanas (H.E. aumento de 100X). (1) Novo tecido ósseo em torno de uma partícula de enxerto. (2) espaços medulares neoformados entre a partícula e a (3) cortical da calota craniana. (4) Vasos sanguíneos e (5) células de tecido conjuntivo.



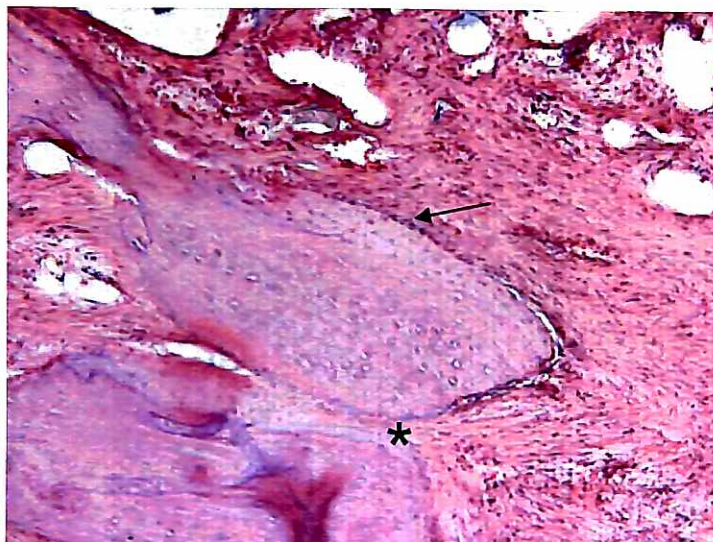
**Figura 19** – (1) Tecido ósseo neoformado, (2) osteoblastos na periferia da partícula óssea . Presença de (3) vasos sanguíneos, (4) espaços medulares e (5) tecido conjuntivo (H.E. aumento 200X fig. 18)



**Figura 20** – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogêneo fresco congelado particulado no período de 8 semanas (H.E.aumento de 100X) (1) Células conjuntivas, (2) osteócitos aprisionados em nova matriz óssea e (3) partículas de enxerto ósseo com arquitetura preservada. (4) grande quantidade de espaços medulares neoformados.



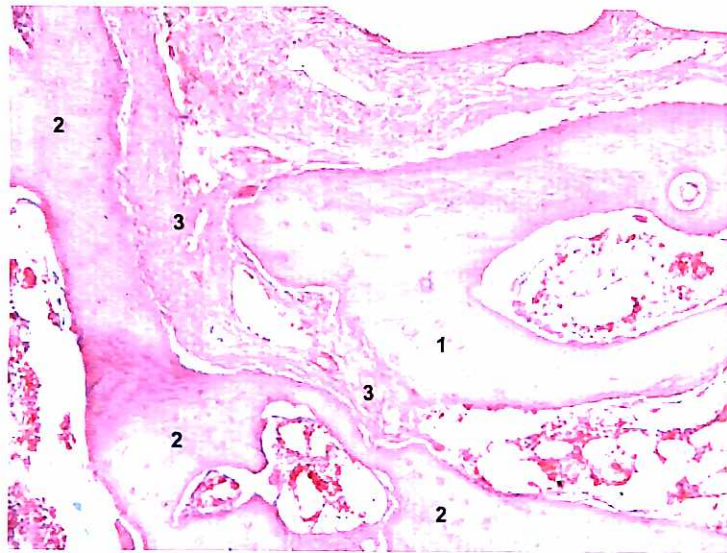
**Figura 21** – Detalhe da incorporação óssea entre as partículas de enxerto (setas). (H.E. aumento 200X fig. 20)



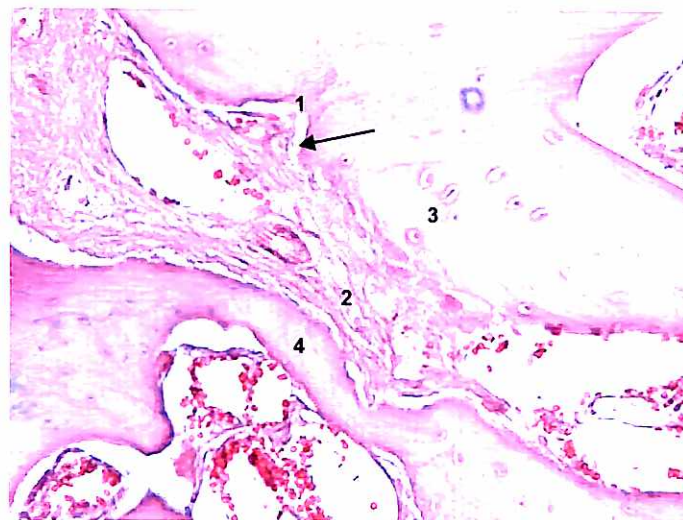
**Figura 22** – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogêneo fresco congelado particulado com adição de tetraciclina no período de 8 semanas (H.E. aumento de 100X). A deposição de matriz óssea (seta) comprova o processo aposicional e centrífugo na incorporação das partículas. Observa-se a união de 2 partículas de enxerto ósseo(\*).



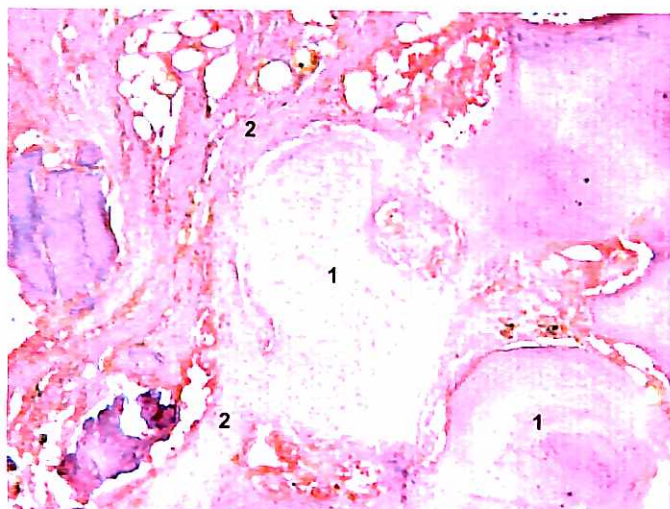
**Figura 23** – Observa-se 3 diferentes tipos de tecido: (1) tecido ósseo com osteócitos aprisionados na matriz, (2) camada de osteoblastos e (3) tecido conjuntivo. (H.E. aumento 200X fig. 22)



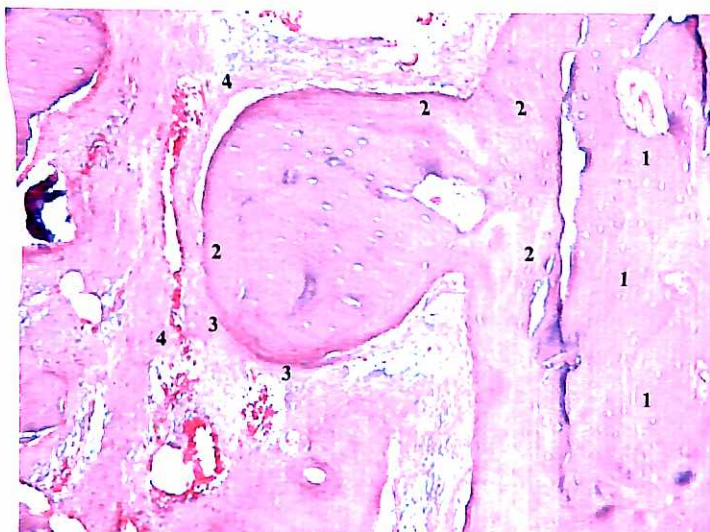
**Figura 24** – Enxerto ósseo autógeno particulado no período de 12 semanas de incorporação (H.E.aumento de 100X). Observa-se a (1) uma partícula em processo de incorporação óssea, se unindo a (2)cortical da calota craniana e (3)tecido conjuntivo.



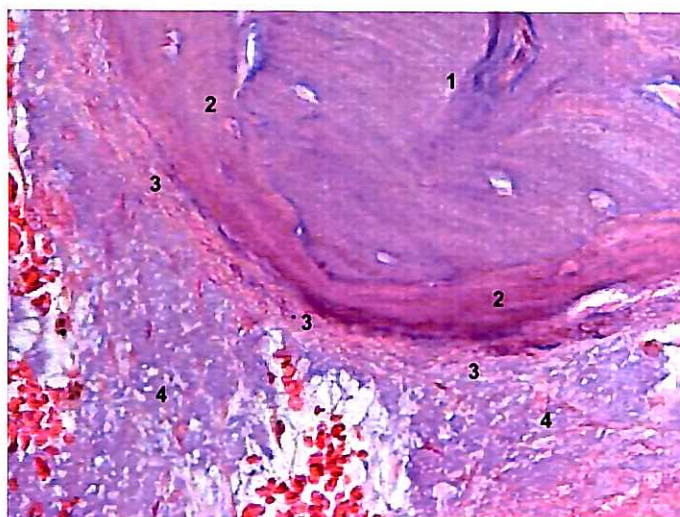
**Figura 25** – Um sinal de reabsorção de partícula óssea é visível em uma (1) lacuna de Howship com atividade de osteoclasto (seta). (2) Tecido conjuntivo com potencial osteogênico é observado entre as (3) partículas e a (4) cortical da calota craniana(H.E. aumento 200X fig. 24).



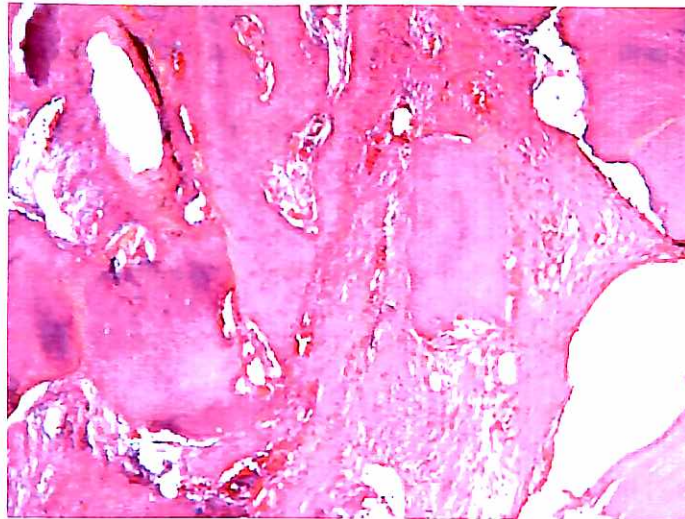
**Figura 26** – Enxerto ósseo autógeno particulado com tetraciclina após 12 semanas (H.E. aumento de 100X). Osteócitos são observados dentro da (1) partícula de enxerto circundada por (2) tecido conjuntivo. .



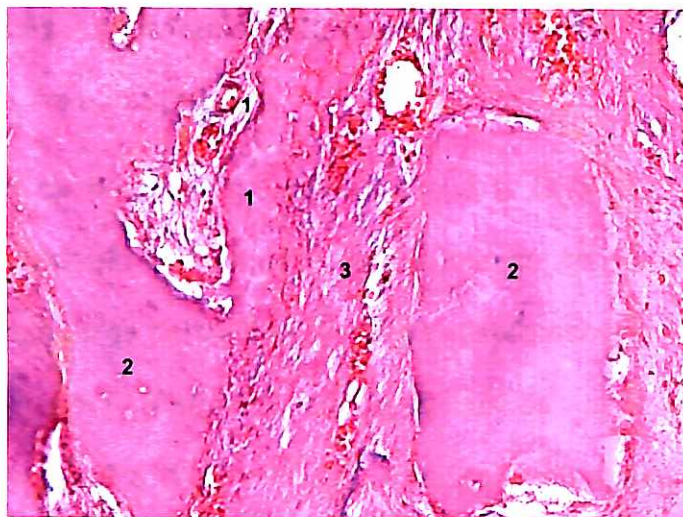
**Figura 27** – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado com enxerto homogêneo fresco congelado particulado no período de 12 semanas (H.E.aumento de 100X). Identifica-se (1) tábua externa da calota craniana, (2) grande quantidade de novo osso, (3) osteoblastos, e (4) tecido conjuntivo.



**Figura 28** – (1) Partícula óssea, com (2) neoformação óssea na periferia com (3) camada de osteoblastos e (4) tecido conjuntivo (H.E. aumento 200X fig. 27).



**Figura 29** – Enxerto ósseo autógeno particulado misturado a enxerto homogêneo fresco congelado particulado com tetraciclina no período de 12 semanas (H.E. aumento de 100X). Observa-se a incorporação entre diversas partículas de fragmentos ósseos.



**Figura 30** – Observa-se osteócitos aprisionados em matriz óssea neoformada (1) com os fragmentos de enxerto (2) e o tecido conjuntivo (3) (H.E. aumento 200X fig. 29).

### 5.3 Análise estatística da histomorfometria

São transcritos a seguir os resultados estatísticos da análise histomorfométrica da área de densidade óssea realizada na região do tecido ósseo mineralizado enxertado com osso autógeno particulado e osso autógeno particulado misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado associados ou não com tetraciclina nos diversos períodos experimentais. Esses resultados estão computados nas **TABELAS 5 e 6** e representados no **GRÁFICO 4, 5, 6 e 7**. Todos os valores estão expressos por Média e desvio padrão da média (SD) e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

Para facilitar a interpretação dos resultados, os grupos experimentais estão representados por letras (**A, AT, AB e ABT**) seguidas dos números **8 e 12** correspondentes aos períodos de observação (8 semanas e 12 semanas) após a cirurgia de enxerto ósseo.

Analisando os dados das **Tabelas 5 e 6** e **GRÁFICO 4** podemos observar que no intervalo de avaliação de 8 semanas, os coelhos do grupo **AT** apresentam valores de densidade óssea estatisticamente mais baixos em relação aos do grupo **A** ( $P < 0,001$ ), enquanto que os valores obtidos dos coelhos dos grupos **AB** e **ABT** mostram significativamente mais elevados ( $P < 0,001$ ). Quando comparamos os grupos **AT/AB** e **AT/ABT** entre si, verificamos que a área da densidade óssea é significativamente mais elevada nos grupo **AB** ( $P < 0,001$ ) e **ABT** ( $P < 0,001$ ). Podemos observamos ainda, diferenças estatísticas entre os valores detectados nos grupos **AB** e **ABT** traduzindo valores mais expressivos no tecido ósseo dos coelhos do grupo **ABT** ( $P < 0,01$ ).

Após 12 semanas das cirurgias de enxerto ósseo realizado na calota craniana dos coelhos, representado pelo **GRÁFICO 5**, verificamos uma variação entre os valores encontrados nos grupos **A/AT** e **AT/ABT**, mas não foi estatisticamente significante ( $P > 0,05$ ). Quando comparamos os grupos **A/AB** ( $P < 0,001$ ) e **AT/AB** ( $P < 0,01$ ), constatamos uma significativa diminuição da área óssea nos animais do grupo **AB**. Os grupos **AB** e **ABT** diferem entre si apresentando valores significativamente mais elevados nos coelhos do grupo **ABT** ( $P < 0,01$ ).

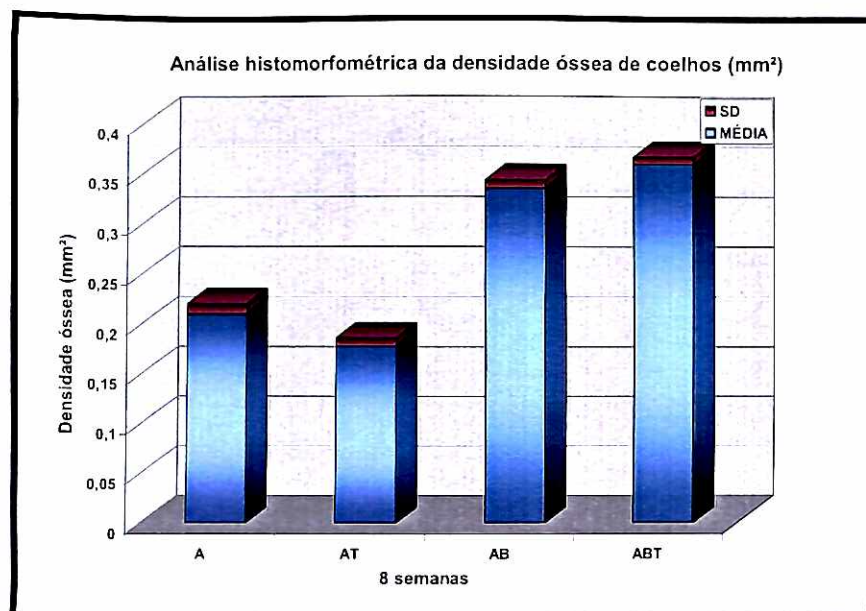
Os dados histomorfométricos representados nos **gráficos 6 e 7** demonstram, ainda, que os coelhos dos grupos **A12** e **AT12** apresentam área de tecido ósseo significativamente mais elevada do que aquelas dos grupos **A8** e **AT8** ( $P < 0,001$ ), contudo os animais dos grupos **AB12** e **ABT12** apresentam significativa diminuição de área óssea em relação aos animais dos grupos **AB8** e **ABT8** ( $P < 0,001$ ).

TEMPOS	GRUPOS	P
8 semanas (n=5)	<b>A8/ AT8</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>A8/ AB8</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>A8/ ABT8</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>AT8/ AB8</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>AT8/ ABT8</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>AB8/ABT8</b>	<b>P&lt;0,01<sup>**</sup></b>
12 semanas (n=5)	A12/ AT12	P>0,05 (n.s)
	<b>A12/ AB12</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>A12/ ABT12</b>	<b>P&lt;0,001<sup>***</sup></b>
	<b>AT12/ AB12</b>	<b>P&lt;0,01<sup>**</sup></b>
	AT12/ ABT12	P>0,05 (n.s)
	<b>AB12/ABT12</b>	<b>P&lt;0,05*</b>

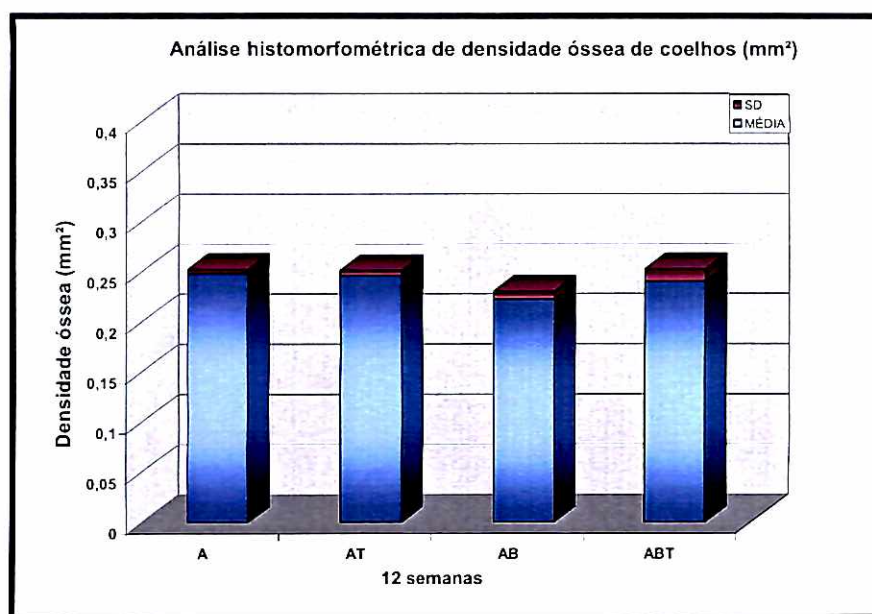
**Tabela 5** – Resultados da análise de variância (ANOVA) e Teste de Tuckey dos dados histomorfométricos dos grupos A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12), nos diferentes períodos de observação em 8 e 12 semanas.

GRUPOS	TEMPOS	
	8 semanas (n=5)	12 semanas (n=5)
A	0,210 ± 0,010	0,248 ± 0,004
AT	0,178 ± 0,008	0,246 ± 0,005
AB	0,336 ± 0,008	0,222 ± 0,008
ABT	0,360 ± 0,007	0,240 ± 0,012

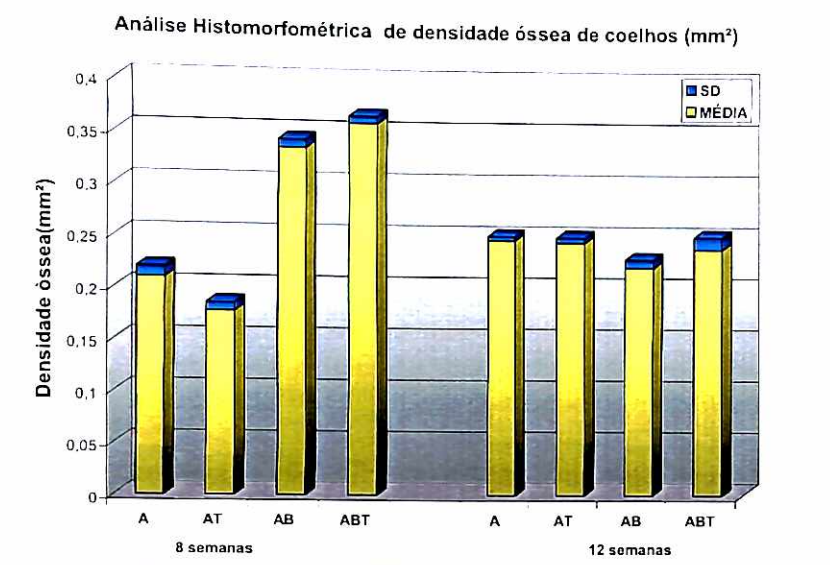
**Tabela 6** – Análise histomorfométrica da área de densidade óssea ( $\text{mm}^2$ ) dos tecidos mineralizados, obtido com enxertos de osso autógeno particulado e de osso autógeno particulado misturado com osso homogêneo fresco congelado particulado associados ou não com tetraciclina nos diversos grupos experimentais. **Valores expressos por Média  $\pm$  SD para cada grupo (n=5).**



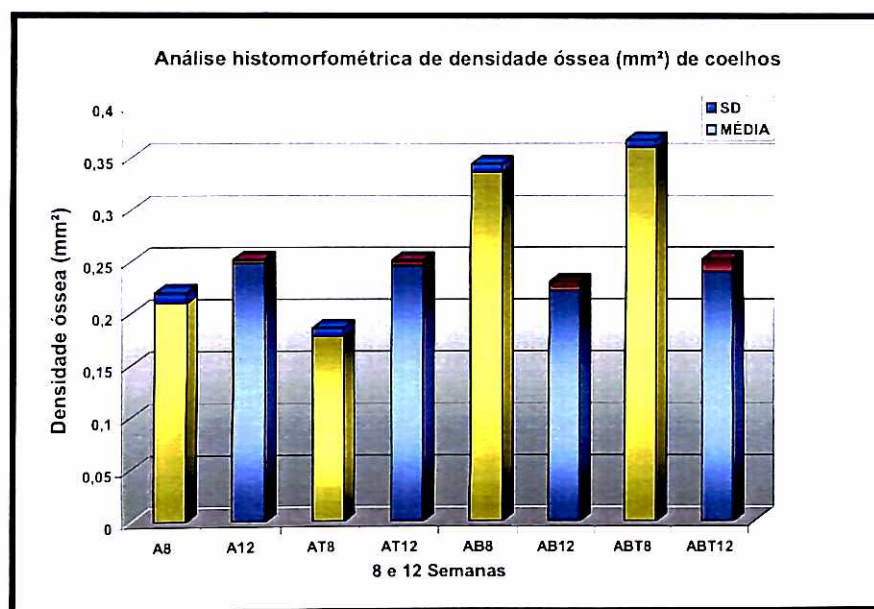
**Gráfico 4** - Valores médios da análise histomorfométrica da área de densidade óssea (mm<sup>2</sup>) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos A, AT, AB e ABT no período de 8 semanas.



**Gráfico 5** - Valores médios da análise histomorfométrica da área densidade óssea (mm<sup>2</sup>) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos A, AT, AB e ABT no período de 12 semanas.



**Gráfico 6** - Valores médios da análise histomorfométrica da área de densidade óssea (mm<sup>2</sup>) de tecido mineralizado nos enxertos nos coelhos dos grupos A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12), nos diferentes períodos.



**Gráfico 7** - Comparação dos valores médios da área de densidade óssea (mm<sup>2</sup>) de tecido mineralizado da calota craniana de coelhos dos grupos A (A8 e A12), AT (AT8 e AT12), AB (AB8 e AB12) e ABT (ABT8 e ABT12), entre os períodos de 8 e 12 semanas.

## 6 DISCUSSÃO

Foi observado que a adição de enxerto homogêneo fresco congelado a enxerto autólogo puro promove a formação de maior quantidade de tecido ósseo em volume, o que parece indicar que a partícula do osso homogêneo, por ter a sua reabsorção mais demorada, manteve o arcabouço para a proliferação de células osteoprogenitoras. Um dos fatores que possam ter interferido nos nossos resultados é o tamanho das partículas, uma vez que o osso autólogo foi obtido por raspagem e o osso homogêneo foi particulado por um triturador de compressão. Os resultados histológicos mostram diversas partículas ósseas com celularidade, internamente às partículas do novo osso formado, podendo ser interpretado que o osso foi revascularizado e incorporado, tendo auxílio da capacidade osteoindutora tanto do material autólogo quanto do homogêneo (PELEGRINE, 2006). Em um experimento, (ISAKSSON *et al.*, 1992) foi comprovado que partículas menores apresentavam melhor capacidade osteoindutora, sendo que o osso neoformado com maior rapidez e com maior vascularização era aquele obtido na forma de uma pasta óssea de raspas de fresagem, sendo a outra granulação empregada de 1000 $\mu$ m. Um outro trabalho estudando somente o tamanho das partículas ósseas autógenas demonstrou que partículas menores, em torno de 0,5 a 2mm<sup>3</sup> em volume, são reabsorvidas mais rapidamente em 4 semanas, indicando um maior nível de substituição óssea, se comparadas a de volumes de 10mm<sup>3</sup> (PALLESEN *et al.*, 2002). Nos trabalhos revistos, existiu uma diferença na granulação do material enxertado, sendo que, na maioria dos trabalhos as medidas das partículas eram

menores que 500 $\mu$ m de diâmetro, em torno de 100 a 300 $\mu$ m (SANDERS *et al.*, 1983), 250 a 420 $\mu$ m (HAMMERLE *et al.*, 1997) e 300 a 500 $\mu$ m (DRURY *et al.*, 2003), mas também houve relatos de pesquisas com partículas entre 250 a 1000 $\mu$ m (SLOTTE *et al.*, 2003).

Pelo estudo histomorfométrico, pudemos observar que a TTC tem efeito benéfico quando utilizada associada a enxerto misto (autógeno com homogêneo) se comparada ao enxerto autógeno, principalmente nas primeiras 8 semanas de reparação. Todavia, no grupo autógeno, quando associado a TTC, a histometria pareceu indicar que houve uma reabsorção mais rápida das raspas do grupo de 8 semanas, mas promovendo a mesma quantidade de novo osso no período de 12 semanas. O objetivo da associação de tetraciclina a enxertos ósseos autógenos puros ou mistos é a diminuição do risco da formação de abscessos e de secreções purulentas no pós-operatório em cirurgias de seio maxilar (SENDYK, 2005). Em nenhum dos grupos foi observado sinais de reações inflamatórias e/ou infecciosas.

A idéia de se associar a TTC na forma de pó, foi uma maneira de facilitar a sua mistura no enxerto misto. Diversos autores utilizaram TTC associada à outros biomateriais (SANDERS *et al.*, 1983; MABRY *et al.*, 1985; EVANS *et al.*, 1989; PHILIPPART *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004) para cirurgias de enxertos ósseos. Alguns autores utilizaram a TTC associada a outros enxertos sendo que a proporção enxerto/tetraciclina descrita foi de 4:1. A proporção era realizada na forma do pó de TTC adicionada ao biomaterial (MABRY *et al.*, 1985; EVANS *et al.*, 1989). Para evitar a superdosagem de TTC, e conseqüente reabsorção total dos materiais pesquisados, foi adotado no experimento a proporção de TTC com 10mg, não ultrapassando 1/6 do

volume total do material mineralizado que foi depositado nos dispositivos. Todavia, foi também empregado o uso da TTC em solução, com concentrações de 10mg/ml (DRURY *et al.*, 1991) e de 50mg/ml (MASTERS *et al.*, 1996) aplicada diretamente no enxerto. Porém os trabalhos com TTC se mostram conflitantes, questionando o real benefício da tetraciclina na reparação em alvéolos (THILANDER *et al.*, 1973), ao contrário de quando associados a enxertos demonstrando seus efeitos antimicrobianos, sua substantividade, seus efeitos anti-colagenolíticos e sua atividade de estimulação fibroblástica (KIM *et al.*, 2004). De acordo com os resultados desta pesquisa, a tetraciclina pareceu não exercer influência no ganho de tecidos duros, coerente com o trabalho de Masters *et al.* (1996).

Não existe uma correlação de metabolismo entre seres humanos e coelhos, porém o índice de atividade metabólica de coelhos é maior se comparado a seres humanos (ISAKSSON *et al.*, 1992). O tempo de sacrifício dos coelhos variaram entre 1 a 15 semanas baseando-se nos trabalhos de Isaksson *et al.*, 1992; Lundgren *et al.*, 1992; Hammerle *et al.*, 1995; Hammerle *et al.*, 1997; Pallesen, *et al.*, 2002.

O modelo de experimento animal de regeneração óssea em calvária de coelhos foi descrito na literatura por vários autores (ISAKSSON *et al.*, 1992; LUNDGREEN *et al.*, 1992; HAMMERLE *et al.*, 1995; HAMMERLE *et al.*, 1997; PALLESEN *et al.*, 2002; SHAND *et al.*, 2002; SLOTTE *et al.*, 2003). Entretanto, quando um modelo experimental era utilizando os procedimentos de RTG, diversos tipos de barreiras foram utilizadas, dentre elas, barreiras impermeáveis de PTFE (BUSER *et al.*, 1990; DONOS *et al.*, 2002; PALLESEN *et al.* 2002) que são descritos na literatura. Alguns trabalhos,

porém, foram com barreiras biodegradáveis (LUNDGREN *et al.*, 1992; HAMMERLE *et al.*, 1997). Contudo poucos trabalhos existem com o modelo experimental utilizando dispositivos cilíndricos metálicos (SLOTTE *et al.*, 2003) simulando uma situação de barreira impermeável. A vantagem de ser fixada com parafusos e por não sofrer colapso decorrente da sutura foi o motivo pela qual adotamos este modelo. O método com cilindros metálicos também foi descrito nos trabalhos de Manfro (2006) e Pelegrine (2006)

Um consenso entre todos os trabalhos em RTG é que o material de enxerto funciona como um arcabouço que vai propiciar a osteocondução, onde capilares neoformados vão revascularizar a região e servir de guia para deposição subsequente de osso neoformado (SANDERS *et al.*, 1983; HAMMERLE *et al.*, 1997).

## 7 CONCLUSÃO

A metodologia empregada e os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

1 - Não houve significância estatística entre as variações volumétricas do osso neoformado nos grupos tratados com tetraciclina (**AT** e **ABT**) nos dois períodos de observação.

2 - O **grupo AB** apresentou aumento significativo de volume em relação ao **grupo A** (controle) nos dois períodos de observação.

3 - A tetraciclina na dose utilizada (10mg/enxerto) apresentou significativa diminuição na área de densidade óssea no **grupo AT** em relação ao **grupo A** em 8 semanas, entretanto no período de observação de 12 semanas não houve diferença significativa entre os dois grupos.

4 - O **grupo ABT** apresentou um aumento significativo de área de densidade óssea quando comparado com o **grupo AB** nos dois períodos de observação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSER, D. U.; BRAGGER et al. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. **Clin Oral Implants Res** v. 1, n. 1, p. 22-32, 1990.

CARVALHO, V.A.P. ; TOSELLO, D. O. et al. Histomorphometric analysis of homogeneous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in mandibular of rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.19 ,n. 5, p. 679-686, 2004.

DEIJKERS, R. L.; BLOEM, R. M. et al. Contamination of bone allografts: analysis of incidence and predisposing factors. **J Bone Joint Surg Br** v. 79, n. 1, p. 161-166, 1997.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L. et al. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. **Clin Oral Implants Res** v. 13, n. 2, p. 185-191, 2002.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L. et al. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat. **Clin Oral Implants Res** v. 13, n. 2, p. 203-213, 2002.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L. et al. Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration. **Clin Oral Implants Res** v. 13, n. 2, p. 192-202, 2002.

DRURY, G. I.; YUKNA, R. A. Histologic evaluation of combining tetracycline and allogeneic freeze-dried bone on bone regeneration in experimental defects in baboons. **J Periodontol** v. 62, n. 11, p. 652-68, 1991.

EVANS, G. H.; YUKNA, R. A. et al. Effect of various graft materials with tetracycline in localized juvenile periodontitis. **J Periodontol** v. 60, n. 9, p. 491-497, 1989.

GOLLUB, L. M. et al. Tetracycline inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. **J Perio Res** v. 19, n. 6, p. 651-655, 1984

GOMES, M.F.; ANJOS, M.J.S. et al. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: Radiographic and histomorphometric studies. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.17 ,n. 4, p. 488-497, 2002.

GOODSON, J. M. HAFFAJEE et al. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J Clin Perio** v. 6, n.2, p.82-92, 1979

HAMMERLE, C. H.; OLAH, A. J. et al. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. **Clin Oral Implants Res** v. 8, n. 3, p. 198-207, 1997.

HAMMERLE, C. H.; SCHMID, J. et al. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. **J Oral Maxillofac Surg** v. 53, n. 2, p.167-174, 1995.

ISAKSSON, S.; ALBERIUS, P. et al. Contribution of autogeneic membranous bone chips and bone paste to healing of rabbit skull defects. **Scand J Dent Res** v. 100, n. 5, p. 274-278, 1992.

KIM, S. G.; CHUNG, T. Y. et al. The effect of high local concentrations of antibiotics on demineralized bone induction in rats. **J Oral Maxillofac Surg** v. 62, n. 6, p. 708-713, 2004.

LINDHE, J. et al. Local tetracycline delivery using hollow fibers devices in periodontal therapy. **J Clin Perio** v. 6, n. 3, p. 141-149, 1979

LUNDGREN, D.; NYMAN, S. et al. Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. **J Craniomaxillofac Surg** v. 20, n. 6, p. 257-260, 1992.

MABRY, T. W.; YUKNA, R. A. et al. Freeze-dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis. **J Periodontol** v. 56, n. 2. p. 74-81, 1985.

MANFRO, R. **Avaliação dos substitutos ósseos xenógenos inorgânicos bovinos Bio-Oss, Bone-Fill e Genox: análise histológica comparativa em coelhos.** 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2005.

MASTERS, L. B.; MELLONIG, J. T. et al. A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. **J Periodontol** v. 67, n. 8, p. 770-781, 1996.

PALLESEN, L.; SCHOU, S. et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. **Int J Oral Maxillofac Implants** v. 17, n. 4. p. 498-506, 2002.

PELEGRINE, A. **Análise comparativa entre enxerto ósseo autógeno fresco e homogêneo fresco congelado associados ou não à medula óssea autóloga: estudo clínico e histomorfométrico em coelhos.** 2006. 117 p. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2006.

PHILIPPART, P.; BRASSEUR, M. et al. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft: a 5-year survey. **Int J Oral Maxillofac Implants** v. 18, n. 3. p. 411-416, 2003.

SANDERS, J. J.; SEPE, W. W. et al. Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. Part III. Composite freeze-dried bone allografts with and without autogenous bone grafts. **J Periodontol** v. 54, n. 1. p. 1-8, 1983.

SENDYK, W. R. **A influência da adição de tetraciclina em enxertos ósseos utilizados nas cirurgias de levantamento de seio maxilar** 2005. 97 p. Dissertação (Livre Docência em Periodontia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005

SHAND, J. M.; HEGGIE, A. A. et al. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. **Int J Oral Maxillofac Surg** 31, n. 55. p. 25-31, 2002

SLOTTE, C.; LUNDGREN, D. et al. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. **Int J Oral Maxillofac Implants** v. 18, n. 6. p. 795-806, 2003.

THILANDER, H.; ASTRAND, P. The effect of tetracyclines on socket healing. **Acta Odontol Scand** v. 31, n. 2 13. p. 1-9, 1973.

**ANEXOS**

**TABELAS DAS MENSURAÇÕES DAS ALTURAS DOS CILINDROS  
PREENCHIDOS COM OSSO (mm)**

No. coelho	Local	Material	N	S	L	O
8 <sub>(8 semanas)</sub>	1	ABT	1,3	1	1	1,7
8 <sub>(8 semanas)</sub>	2	A	1,6	1,5	1,6	1,6
8 <sub>(8 semanas)</sub>	3	AT	1,8	1,7	1,7	1,7
8 <sub>(8 semanas)</sub>	4	AB	1,8	1,8	1,8	1,8
16 <sub>(8 semanas)</sub>	1	A	4	4,1	4,4	4
16 <sub>(8 semanas)</sub>	2	AT	3	3	5	3
16 <sub>(8 semanas)</sub>	3	AB	2,1	1,7	1,7	1,7
16 <sub>(8 semanas)</sub>	4	ABT	2,2	2,2	2,2	2,2
13 <sub>(8 semanas)</sub>	1	AT	2,5	3,4	2,9	2,9
13 <sub>(8 semanas)</sub>	2	AB	1,8	1,8	1,8	1,8
13 <sub>(8 semanas)</sub>	3	ABT	1,9	1,9	1,9	1,9
13 <sub>(8 semanas)</sub>	4	A	2	2,1	1,9	3,2
13a <sub>(8 semanas)</sub>	1	ABT	2,1	1,8	1,8	1,8
13a <sub>(8 semanas)</sub>	2	A	1,2	2,3	3	1,3
13a <sub>(8 semanas)</sub>	3	AT	2	1,6	2,8	2,4
13a <sub>(8 semanas)</sub>	4	AB	2,3	1,9	2	1,6
11R <sub>(8 semanas)</sub>	1	A	1,7	2,2	3,5	2
11R <sub>(8 semanas)</sub>	2	AT	2	2,5	2,3	1,7
11R <sub>(8 semanas)</sub>	3	AB	1,9	1,5	1,4	1,5
11R <sub>(8 semanas)</sub>	4	ABT	1,5	1,6	2,9	2,5

No. coelho	Local	Material	N	S	L	O
12 <sub>(12 semanas)</sub>	1	ABT	2,7	3	4,4	2,4
12 <sub>(12 semanas)</sub>	2	A	1,8	1,3	1,3	3,1
12 <sub>(12 semanas)</sub>	3	AT	2,2	2,8	4,2	2,6
12 <sub>(12 semanas)</sub>	4	AB	1,7	1,7	1,2	1,2
15 <sub>(12 semanas)</sub>	1	A	3,3	3,2	4	3,7
15 <sub>(12 semanas)</sub>	2	AT	2,3	4	4	3,9
15 <sub>(12 semanas)</sub>	3	AB	3,7	3,1	5	5
15 <sub>(12 semanas)</sub>	4	ABT	3,7	2,9	1,9	2,2
6 <sub>(12 semanas)</sub>	1	AB	2,2	2,2	1,8	1,7
6 <sub>(12 semanas)</sub>	2	ABT	3,4	4,1	2,6	3,9
6 <sub>(12 semanas)</sub>	3	A	2,3	1,6	2,7	1,4
6 <sub>(12 semanas)</sub>	4	AT	2	2,3	2	2,5
11 <sub>(12 semanas)</sub>	1	AB	1,2	1,3	1,3	1,3
11 <sub>(12 semanas)</sub>	2	ABT	1,6	2,1	2,2	2,4
11 <sub>(12 semanas)</sub>	3	A	2,9	1,6	1,7	1,7
11 <sub>(12 semanas)</sub>	4	AT	2,2	1,5	1,7	1,8
4 <sub>(12 semanas)</sub>	1	AT	3	1,9	3,7	2,5
4 <sub>(12 semanas)</sub>	2	AB	1,7	2,4	1,9	1,7
4 <sub>(12 semanas)</sub>	3	ABT	1,2	1,4	1,8	1,6
4 <sub>(12 semanas)</sub>	4	A	1,5	1,4	1,5	1,7

**TABELAS DAS MEDIDAS DAS ÁREAS PARA  
ANÁLISES HISTOMÉTRICAS**

Grupo A – 8 semanas

Campos	Coelho 8		Coelho 11R		Coelho 13		Coelho 13A		Coelho 16					
1	0,11	0,24	0,21	0,20	0,23	0,25	0,21	0,22	0,18	0,17	0,25	0,16	0,25	
2	0,18	0,21	0,21	0,24	0,23	0,17	0,17	0,22	0,17	0,20	0,17	0,22	0,20	0,14
3	0,16	0,19	0,19	0,24	0,23	0,20	0,25	0,18	0,16	0,29	0,22	0,14	0,32	0,21
4	0,14	0,19	0,21	0,22	0,21	0,20	0,23	0,19	0,14	0,26	0,19	0,24	0,25	0,27
5	0,24	0,16	0,37	0,25	0,25	0,24	0,19	0,21	0,23	0,25	0,19	0,23	0,20	0,26
Média	0,166	0,198	0,232	0,214	0,23	0,212	0,21	0,204	0,176	0,236	0,188	0,216	0,226	0,226
Média/coelho	0,20		0,22		0,21		0,21		0,20		0,22		0,22	
Média do grupo:	0,21													

Grupo AT – 8 semanas

Campos	Coelho 8		Coelho 11R		Coelho 13		Coelho 13A		Coelho 16					
1	0,19	0,14	0,17	0,14	0,17	0,12	0,23	0,23	0,13	0,23	0,18	0,21	0,19	0,13
2	0,18	0,13	0,14	0,23	0,22	0,09	0,23	0,16	0,14	0,18	0,18	0,22	0,19	0,13
3	0,18	0,18	0,15	0,18	0,11	0,28	0,12	0,24	0,15	0,16	0,19	0,19	0,19	0,20
4	0,13	0,18	0,25	0,15	0,30	0,11	0,26	0,14	0,22	0,20	0,17	0,20	0,20	0,26
5	0,10	0,17	0,27	0,11	0,13	0,10	0,26	0,14	0,16	0,17	0,20	0,19	0,17	0,22
Média	0,156	0,16	0,196	0,166	0,186	0,14	0,22	0,182	0,16	0,188	0,18	0,202	0,188	0,188
Média/coelho	0,17		0,17		0,18		0,18		0,18		0,18		0,19	
Média do Grupo:	0,178													

Grupo AB – 8 semanas

Campos	Coelho 8		Coelho 11R		Coelho 13		Coelho 13A		Coelho 16						
1	0,38	0,31	0,45	0,40	0,31	0,35	0,28	0,40	0,43	0,48	0,29	0,38	0,29	0,38	
2	0,26	0,38	0,30	0,39	0,38	0,28	0,24	0,31	0,30	0,33	0,38	0,38	0,38	0,32	0,29
3	0,33	0,37	0,40	0,29	0,35	0,37	0,32	0,34	0,38	0,27	0,42	0,33	0,31	0,33	0,33
4	0,16	0,47	0,39	0,35	0,30	0,30	0,31	0,31	0,25	0,44	0,43	0,32	0,35	0,35	0,35
5	0,45	0,29	0,26	0,28	0,32	0,29	0,38	0,33	0,37	0,33	0,25	0,30	0,32	0,29	0,29
Média	0,32	0,36	0,36	0,34	0,33	0,32	0,31	0,34	0,35	0,37	0,35	0,34	0,32	0,33	0,33
Média/coelho	0,35		0,33		0,33		0,34		0,34		0,34		0,33		0,33
Media grupo	0,34														

Grupo ABT – 8 semanas

Campos	Coelho 8		Coelho 11R		Coelho 13		Coelho 13A		Coelho 16						
1	0,37	0,32	0,38	0,40	0,33	0,36	0,30	0,34	0,38	0,45	0,41	0,38	0,35	0,32	
2	0,40	0,42	0,43	0,41	0,42	0,42	0,38	0,30	0,34	0,42	0,43	0,37	0,38	0,36	
3	0,35	0,47	0,37	0,38	0,29	0,34	0,30	0,35	0,37	0,39	0,24	0,39	0,36	0,37	
4	0,28	0,35	0,35	0,44	0,20	0,22	0,41	0,35	0,36	0,39	0,38	0,39	0,33	0,38	
5	0,30	0,33	0,32	0,28	0,39	0,34	0,38	0,40	0,39	0,31	0,27	0,3	0,36	0,34	
Média	0,34	0,38	0,37	0,38	0,33	0,34	0,35	0,35	0,37	0,41	0,35	0,366	0,356	0,354	
Média/coelho	0,36		0,35		0,36		0,37		0,37		0,37		0,36		
Media grupo	0,36														

Grupo A – 12 semanas

Campos	Coelho 4		Coelho 6		Coelho 11		Coelho 12		Coelho 15			
1	0,29	0,22	0,24	0,29	0,3	0,2	0,28	0,35	0,22	0,23	0,29	0,18
2	0,26	0,37	0,23	0,2	0,21	0,22	0,19	0,27	0,28	0,27	0,21	0,24
3	0,16	0,27	0,27	0,24	0,25	0,23	0,26	0,18	0,21	0,29	0,3	0,2
4	0,25	0,31	0,24	0,23	0,23	0,25	0,3	0,21	0,28	0,28	0,28	0,17
5	0,2	0,21	0,25	0,28	0,22	0,3	0,33	0,28	0,21	0,29	0,24	0,27
Média	0,232	0,276	0,246	0,248	0,242	0,24	0,256	0,258	0,24	0,262	0,274	0,212
Média/coelho	0,25		0,24		0,25		0,25		0,25		0,25	
Media do grupo	0,25											

Grupo AT – 12 semanas

Campos	Coelho 4		Coelho 6		Coelho 11		Coelho 12		Coelho 15			
1	0,23	0,2	0,22	0,22	0,27	0,18	0,26	0,27	0,25	0,2	0,23	0,22
2	0,25	0,23	0,29	0,27	0,28	0,29	0,1	0,25	0,24	0,28	0,19	0,3
3	0,25	0,24	0,29	0,27	0,2	0,25	0,28	0,34	0,24	0,14	0,29	0,25
4	0,28	0,21	0,19	0,27	0,3	0,21	0,21	0,27	0,29	0,23	0,17	0,17
5	0,33	0,25	0,22	0,2	0,25	0,21	0,25	0,27	0,2	0,39	0,19	0,33
Média	0,268	0,226	0,242	0,246	0,26	0,228	0,22	0,28	0,244	0,268	0,208	0,254
Média/coelho	0,25		0,24		0,25		0,25		0,25		0,24	
Media do Grupo	0,25											

Grupo AB – 12 semanas

Campos	Coelho 4		Coelho 6		Coelho 11		Coelho 12		Coelho 15				
1	0,27	0,29	0,18	0,19	0,17	0,18	0,17	0,24	0,18	0,23	0,2	0,25	0,21
2	0,18	0,29	0,13	0,32	0,33	0,27	0,24	0,14	0,19	0,26	0,16	0,23	0,19
3	0,25	0,26	0,17	0,18	0,13	0,17	0,24	0,14	0,19	0,26	0,26	0,23	0,29
4	0,31	0,25	0,18	0,3	0,17	0,19	0,19	0,29	0,27	0,18	0,29	0,26	0,29
5	0,25	0,21	0,21	0,29	0,27	0,21	0,18	0,19	0,2	0,16	0,18	0,19	0,18
Média	0,252	0,26	0,174	0,256	0,214	0,204	0,19	0,238	0,228	0,218	0,218	0,232	0,232
Média/coelho	0,23		0,22		0,22		0,22		0,21		0,23		0,23
Media grupo	0,22												

Grupo ABT – 12 semanas

Campos	Coelho 4		Coelho 6		Coelho 11		Coelho 12		Coelho 15				
1	0,25	0,25	0,24	0,26	0,23	0,12	0,27	0,28	0,23	0,23	0,23	0,2	0,19
2	0,27	0,26	0,29	0,25	0,28	0,22	0,23	0,11	0,31	0,27	0,24	0,35	0,16
3	0,19	0,2	0,23	0,241	0,26	0,29	0,23	0,3	0,26	0,25	0,32	0,25	0,33
4	0,2	0,19	0,22	0,19	0,22	0,26	0,33	0,23	0,32	0,33	0,23	0,29	0,25
5	0,25	0,25	0,18	0,31	0,23	0,19	0,1	0,25	0,25	0,19	0,14	0,15	0,23
Média	0,232	0,23	0,232	0,25	0,244	0,216	0,222	0,236	0,229	0,238	0,232	0,272	0,186
Média/coelho	0,23		0,24		0,24		0,24		0,26		0,23		0,23
Media do grupo	0,24												

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UNISA**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
Comitê de Ética em Pesquisas  
Registro CONEP n.º 306  
Aprovado em 16/05/2000

**PARECER N.º 064/2006**

**REGISTRO CEP UNISA N.º 134/06**

**Projeto de Pesquisa:** " Avaliação de enxerto ósseo autogéno misturado com enxerto homogéno de banco de ossos associados ou não à tetraciclina em calvária de coelhos: estudo histológico e histomorfométrico

**Pesquisadores Responsáveis:** Orientador: Prof.Dr. Alfredo Gromatzky  
Pós-Graduando: Renato Limberte

**Área Temática Especial:** Faculdade de Odontologia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de " Avaliação de enxerto ósseo autogéno misturado com enxerto homogéno de banco de ossos associados ou não à tetraciclina em calvária de coelhos: estudo histológico e histomorfométrico"

São Paulo, 29 de novembro de 2006

**PROF. DR. G.C.GENOFRE NETTO**  
Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro

## Parecer Consubstanciado de Projeto

**Título do Projeto: " Avaliação de enxerto ósseo autógeno misturado com enxerto homogêneo de banco de ossos associados ou não à tetraciclina em calvária de coelhos: estudo histológico e histomorfométrico"**

**Pesquisador Responsável : Pós- Graduando: Renato Limberte**

**Orientador: Prof. Dr. Alfredo Gromatzky**

**Data da Versão**

**Cadastro 087**

**Data do Parecer 29/11/2006**

**Grupo e Área Temática I.5 Novos procedimentos**

### Objetivos do Projeto

**Avaliar a viabilidade de utilização de enxertos ósseos misturados com tetraciclina**

### Sumário do Projeto

**Avaliar quatro tipos de enxertos ósseos em calvaria de coelhos**

<i>Aspectos relevantes para avaliação</i>	<i>Situação</i>
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Sim
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Animais
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Na Instituição sim
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção eqüitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/08/2006
Data de término prevista	01/02/2007
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

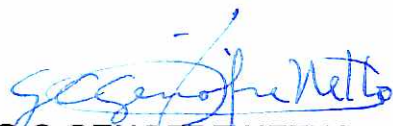
Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto tem importância na área odontológica por estudar os efeitos da adição de antibiótico a enxertos e cirurgias de reconstrução ósseo alveolar.

São Paulo, 29 de NOVEMBRO de 2006.



**PROF. DR. G.C.GENOFRE NETTO**  
Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro