

HENRIQUE DUQUE DE MIRANDA CHAVES NETTO

Cirurgião-Dentista

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS
PARTICULADO E EM BLOCO. ESTUDOS EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de Doutor
em Clínica Odontológica, área de concentração
em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Orientador: Prof. Dr. Renato Mazzonetto

Piracicaba - SP

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C398a	Chaves Netto, Henrique Duque de Miranda. Avaliação do processo de incorporação dos enxertos ósseos particulado e em bloco. Estudos em modelo animal. / Henrique Duque de Miranda Chaves Netto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Renato Mazzonetto. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Ossos - Enxerto. I. Mazzonetto, Renato. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em Inglês: Evaluation of the incorporation process of particulate and block bone grafts. Studies in animal model

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Bone grafts

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Renato Mazzonetto, José Ricardo de Albergaria Barbosa, Leandro Eduardo Klüppel, Marco Antônio Zanini, Luiz Antônio Lima Resende

Data da Defesa: 26-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2010, considerou o candidato HENRIQUE DUQUE DE MIRANDA CHAVES NETTO aprovado.

Prof. Dr. RENATO MAZZONETTO

Prof. Dr. LUIZ ANTONIO LIMA RESENDE

Prof. Dr. LEANDRO EDUARDO KLÜPPEL

Prof. Dr. JOSE RICARDO DE ALBERGARIA BARBOSA

Prof. Dr. MARCO ANTONIO ZANINI

DEDICATÓRIA

“Com muito amor, admiração, sinceridade e gratidão eterna, dedico esta etapa tão sonhada da minha vida à minha família, exemplo de união, amor, dedicação e, acima de tudo, apoio incondicional a todas minhas escolhas e vontades. Sem vocês minha vida seria absolutamente insignificante. Retorno, finalmente, ao convívio diário com vocês”

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por possibilitar a realização deste curso de Pós-Graduação.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida no decorrer do programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Renato Mazzonetto pela amizade, apoio incondicional, orientação e contribuição não somente na execução desta tese, mas em minha formação de cirurgião e docente. Tenha certeza que levarei para o resto de minha vida os conhecimentos transmitidos, assim como a forma desprendida e simples que você trata todos seus alunos. O seu desprendimento, compreensão e forma transparente como sempre me tratou nunca serão esquecidos. Serei eternamente grato pela oportunidade de realizar este sonho!

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Albergaria Barbosa, pessoa simples e serena, pela amizade conquistada ao longo destes cinco anos, assim como disposição incondicional em me ensinar a ler as lâminas histológicas. Você é um exemplo de serenidade a ser seguido. Saiba que tem um amigo em Juiz de Fora.

Ao Professor Dr. Márcio de Moraes, pessoa dedicada em manter este programa de Pós-Graduação e transmitir seus conhecimentos. Agradeço a forma que fui recebido aqui nesta casa. Seu zelo pelo programa servem de exemplo a todos.

Ao Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira, pelo seu prazer em nos ensinar. Muito obrigado pela valiosa ajuda na formação acadêmica e cirúrgica, assim como pelos conselhos sinceros e objetivos. Minha sincera gratidão e respeito.

À Professora Renata pela forma solícita e carinhosa que sempre atendeu minhas dúvidas, me incentivando a conquistar meus ideais.

Aos Professores Luciana Asprino, João Sarmento e Renato Sawazaki pela forma como aceitaram meu convite para participarem da minha qualificação. Seus nomes

foram propostos pela maneira educada e elegante que vocês sempre me mostraram onde poderia melhorar.

Aos Professores Luiz Antonio Lima Resende e Marco Antônio Zanini pela forma solícita e certa como aceitaram participar de minha defesa de Tese. Meus sinceros agradecimentos e respeito.

Ao Professor Leandro Eduardo Klüppel, amigo verdadeiro e companheiro de pós graduação durante meu mestrado, pela dedicação total que sempre teve a mim e todos meus colegas de pós graduação, nos ajudando a ser tornar cirurgiões, transmitindo todo seu conhecimento técnico adquirido, assim como tranquilidade nos momentos mais difíceis. Saiba que serei sempre grato a tudo que você sempre fez por mim e meus colegas de curso. Você, mesmo ainda aluno, foi um excelente Professor!! Conte sempre comigo pro que der e vier sempre!!!

Ao Professor da Faculdade de Economia da Universidade Federal de Juiz de Fora e amigo Alexandre Zanini pela ajuda e forma solícita em me ajudar na parte estatística de minha tese, assim como por me esclarecer os fundamentos estatísticos, até então não compreensíveis.

A todos Professores, alunos e funcionários que passaram por esta escola, ajudando-a a se desenvolver e estar neste lugar de destaque. Meu eterno respeito e admiração.

A todos funcionários, professores e alunos da Universidade Federal de Juiz de Fora, especialmente à Faculdade de Odontologia, por estarem sempre trabalhando em prol da formação de seus alunos, servindo-me como exemplo de como conviver bem e harmoniosamente em um meio universitário. Agradeço a forma como fui recebido por todos vocês, sempre estimulando a conquistar meu futuro profissional. Muito obrigado! Serei eternamente grato!!

Aos meus irmãos Alexandre e Leonardo, melhores amigos e confidentes, que sempre me estimulam, apóiam de maneira incondicional, estando sempre dispostos a me ajudarem de qualquer forma. Vocês são um exemplo de vida!! Me espelho em

vocês!!!! Obrigado por compreenderem minha ausência em momentos importantes de suas vidas. Agora, finalmente, retorno ao convívio diário com vocês. Obrigado pela força! Essa conquista é devido a existência de vocês!!

Aos meus Pais, Henrique e Graça, que, além de serem o norte da minha jornada, vivem cada segundo das suas vidas por mim e meus irmãos!!!! Tenho imenso orgulho de ser filhos de vocês. Nunca terei como agradecer este apoio que vocês sempre deram a mim e aos meus irmãos. Vocês são exemplos de pessoas e pais ideais!! Amo vocês mais que tudo nesta vida!!!! Agora posso realizar meu sonho de trabalhar junto com vocês.

À Maria da Consolação Rocha (Bia), pela dedicação total sempre a mim e a todos lá em casa. Você é minha mãe preta. Te amo!!!!

A Carolzinha, companheira e testemunha de minha dedicação. Seu carinho, amor, e alegria irradiante me ensinaram a olhar o mundo de uma maneira mais ingênua, fundamental para se viver de forma mais feliz e saudável. Amo muito você minha Tita!!

Aos amigos que fiz por todos lugares que andei. Sem sua amizade, atenção e estímulo, minha vida seria muito mais difícil. Serei sempre grato a forma como vocês permitiram que participasse de suas vidas, mesmo estando distante.

Aos meus amigos e colegas do curso de Pós-Graduação desde meu estágio aqui: Anibal, Bernardo, Fabrício, Alex, Cecília, Glaykon, Greison, Bento, Eduardo, Renato, Leandro, Fábio, Jaime, Miguel, Rafael, Adriano, Felipe, Heric, Érica, José, Sérgio Monteiro, Saulo, Paulo Hemerson, Simeu, Gabriela, Lucas Martins, Lucas Cavallieri, Rafael Ortega e Claudio Noia pela amizade, convívio, troca de conhecimentos e, o mais importante, por aceitarem e compreenderem meu modo de ser. Sem vocês, não estaria terminando esta jornada! Obrigado por existirem!

Aos meus amigos Frederico Felipe, Rafael Ortega e Claudio Noia por me compreenderem, respeitando meus momentos ausentes de forma desprendida, cobrindo

minhas falhas, sem nunca exigir nada em troca. Tenha certeza que, sem vocês, esta conquista seria muito mais difícil, se não impossível. Foi uma honra o convívio com vocês! Serei eternamente grato!!

Aos meus colegas de turma, Mariana e Sergio Olate, pela ajuda imprescindível, força e apoio para que eu chegasse até aqui. Vocês são meus pilares aqui em Piracicaba. Obrigado por todos segundos que vocês dispuseram para me ajudar, assim como pela honra de ser da mesma turma. Vocês sempre serão fundamentais na minha vida. Conte sempre comigo onde quer que estejam!!

Aos funcionários da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP - UNICAMP, Didi, Sueli, Daiana, Angélica, Fernanda, Mariana, Débora, Ricardo e Keila por tornarem viável o funcionamento do Centro Cirúrgico, assim como pela amizade e confiança conquistada durante estes anos. Sem vocês nada disso existiria!! Agradeço o carinho e preocupação que vocês sempre tiveram por mim.

A todos estagiários que passaram pela área de cirurgia, pela ajuda importante, assim como pela forma que se portaram durante todo o período do estágio. Toda conquista é valorizada quando se trabalha duro. Meu respeito e admiração pela força de vontade.

A todas pessoas que passaram pela minha vida, me estimulando, incentivando, ajudando a crescer e me desenvolver. Levarei todas coisas boas vividas com vocês para sempre.

Qualquer conquista, por menor que seja, é fruto da união de várias pessoas. É impossível conquistar algo por si só. Levo isso firme em minha mente. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa de minha vida. Minha sincera gratidão e respeito.

"Infelizmente chegaria mesmo um dia em que seria preciso acabar. Fica a saudade dos bons tempos que lembrarei com alegria, mesmo que um vazio lá dentro queira me convencer que podia mais.... Agora posso fechar os olhos e ver o quanto se passou, o que parecia inatingível é hoje orgulho, o sonho se realizou. Sentirei saudades! E ter saudade é mais que apenas lembrar. Ter saudade é não ter medo de olhar para trás, é ter coragem de aprender com tudo que se viveu, e continuar Afinal, a vida continua, minha história está apenas começando."

(autor desconhecido)

RESUMO

Desde o desenvolvimento da implantodontia, associou-se estética à função nas reabilitações, aumentando a necessidade de enxertos ósseos visando a instalação adequada destes implantes. O processo de incorporação dos enxertos geralmente é acompanhado através de análise clínica e exames de imagem. Deste modo, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos. O presente trabalho apresenta 3 pesquisas em modelo animal, descritas nos Capítulos a seguir.

CAPITULO I: Comparação histológica das diferenças existentes no processo de reparo ósseo em defeitos criados em calotas cranianas de cães, preenchidos com coágulo e enxerto ósseo autógeno particulado, a fim de se estabelecer uma classificação, defeito crítico ou não crítico, dos defeitos de 8mm de diâmetro. Observou-se, em dois períodos de sacrifício, correspondentes as fases inicial e tardia do processo de reparo ósseo, que os defeitos preenchidos com coágulo sangüíneo apresentaram um processo de reparo inferior ao grupo preenchido por enxerto ósseo autógeno, sendo este o único que apresentou aposição de tecido ósseo nos dois períodos. Deste modo, pode ser concluído que os métodos que auxiliam no processo de reparo ósseo estão indicados em casos de defeitos iguais ou maiores que 8mm, sendo este classificado como crítico.

CAPITULO II: O propósito deste capítulo foi estabelecer uma relação entre os exames radiográficos e o processo de incorporação de enxertos ósseos de origem autógena, heterógena (matriz óssea bovina anorgânica) e coágulo sangüíneo, em defeitos criados em calotas cranianas de cães. Observou-se nos periodos correspondentes às fases inicial e final do processo de reparo ósseo os exames de imagem. Apesar de apresentarem-se divergentes na preservação do processo de incorporação destes enxertos, obtiveram resultados semelhantes as análises histológicas somente nos grupos de coágulo sangüíneo e enxerto ósseo de origem autógena. Deste modo, os exames radiográficos servem como parâmetro na preservação de procedimentos de reconstrução somente quando são utilizados enxertos ósseos de origem autógena, assim como casos de reparação

espontânea através do coágulo sangüíneo. CAPITULO III: O objetivo deste estudo foi avaliar histológica e histométricamente a interface enxerto ósseo versus leito receptor em cães. Para tanto foram obtidos dois blocos de enxerto ósseo córtico-medular de cada cão, sendo que um destes foi fixado com a interface cortical voltada para o leito receptor, enquanto o outro foi fixado com a face medular voltada ao leito receptor. Os 6 cães foram divididos em dois períodos de sacrifício. Pode-se observar presença de tecido conjuntivo, vasos sangüíneos, tecido ósseo neoformado em ambos grupos nos dois períodos de sacrifício. A análise histométrica evidenciou que a formação de tecido ósseo neoformado foi estatisticamente semelhante em ambos grupos. Deste modo, pode-se concluir que a estrutura cortical ou medular não interferiu na formação de tecido ósseo na região de interface entre enxerto e leito receptor.

Palavras-chaves: Enxerto ósseo, modelo animal, incorporação

ABSTRACT

Since the implantodontology was developed, aesthetics was associated to function, increasing the requirement of bone grafting meaning the correct installation of them. The bone grafting integration process generally are accompanied thru out clinical and images exams. Thus, several studies are being developed. The present work performed 3 researches using animal model, divided in Chapters. CHAPTER I: Had the meaning to compare, thru out descriptive histological analysis, the differences that exists on bone healing in defects created in dogs calvarium, fulfilling with clot and particulate autogenous bone graft , meaning the establish a classification, such as critic or non-critic, of the 8mm diameter defects created on dogs calvarium. It was observed, on both sacrifice periods, similar to earlier and late phases of the bone healing repair, that the defects fulfilled with blood clot presented an inferior healing process when compared with the autogenous bone graft group, being this the unique that showed apposition of mineralized tissue on both periods. Thus, bone defects over 8mm can be considered critical, being necessary some method to help tissue repair, as well as, autogenous bone grafts works well when helping this regeneration process, being indicated to assist bone repair like this performed on this study. CHAPTER II: The aim of this research was to establish a relation between radiographic exams and bone grafting integration of autogenous bone graft and heterogenous bone graft (anorganic bovine bone matrix) and blood clot in defects performed on dogs calvarium. It was observed that on the correspondent periods of initial and delay phases of bone healing repair the radiographic exams. Besides presented divergent on the accompaniment of heterogenous bone graft, they obtained similar results from histological analysis on blood clot and autogenous graft groups. As concluded, radiographic tests can de used as a parameter for reconstruction proservation only when autogenous bone grafts are used, as well as in cases of spontaneous repair through blood clot. CHAPTER III: The proposal of these chapter was value, thru out histological descriptive and histometric

analysis, the interface between bone graft and receipt area in dogs. To perform that, it was obtained 2 cortical-medullar bone blocks from each dog, being one fixed with the cortical face in contact to the receipt area and another fixed with the medullar face in contact to the receipt area. It was observed the presence of connective tissue, blood vessel, and mineralized tissue formation on both sacrifice periods. The histometric analyze showed that the bone tissue formation in this region was found to be statistically similar and did not influence the autogenous bone graft incorporation process.

Key-words: Bone grafting, animal model, integration

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPITULO 1 - Análisis Histológico del Proceso de Reparación en Defectos Óseos. Reconocimiento de Defectos Críticos	5
CAPITULO 2 - Diagnostic Predictability of radiographic exam in bone grafting healing period: Histological vs Radiological analyzes	17
CAPITULO 3 - Histological evaluation of Cancellous and Cortical interface when bone grafting: Histometric analyzes	28
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO	43

INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento da implantodontia, principalmente após estudo realizado por Branemark *et al.*, em 1969, associou-se o fator estética à função durante as reabilitações, aumentando a necessidade de enxertos ósseos visando a instalação tridimensional adequada dos implantes, seja nas deformidades congênitas ou adquiridas, assim como para correções esqueléticas com finalidade estética (Buser *et al.*, 1996).

Os procedimentos cirúrgicos de reconstrução dos rebordos alveolares tornaram-se particularmente comuns a partir da década de 90, pois, devido a facilidade de acesso aos implantes dentários osseointegráveis, muitos pacientes que não podiam receber este tratamento por apresentarem pouca quantidade óssea passaram a ser indicados para cirurgia de reconstrução dos rebordos alveolares atróficos (Jensen *et al.*, 2006).

A perda de tecido ósseo nos maxilares encontra-se associada a manutenção ou não dos dentes. Fatores como traumatismo, doença periodontal e patologias interferem diretamente na reabsorção do osso alveolar necessitando, em alguns casos, de técnicas para reconstrução destas áreas durante a reabilitação (Calan *et al.*, 1993).

Ao contrário da maioria dos tecidos, o osso apresenta um potencial de reparar-se sem presença de cicatriz, isto é, restabelecendo ao final do processo de reparo um tecido igual ao existente anteriormente na região (Nunamaker, 1998). Isto ocorre através de um processo dinâmico de remodelação, envolvendo a neoformação e reabsorção (Nunamaker, 1998). Este processo geralmente é acompanhado através de análise clínica e exames de imagem, principalmente radiográficos (Ferrús-Torres *et al.*, 2009). Apesar disto, poucos estudos fazem relação entre os exames de imagem e a análise histológica (Pallesen *et al.*, 2002).

A utilização de enxertos ósseos foi primeiramente descrita por meio de um enxerto heterógeno em calota, apresentando resultados satisfatórios (Lynch *et al.*, 1999). Com o desenvolvimento das técnicas de antisepsia, assim como desenvolvimento de novos materiais, os enxertos ósseos se tornaram procedimentos comuns e seguros (Lynch *et al.*, 1999).

Os enxertos podem ser utilizados através de duas formas básicas: particulado ou bloco. O tipo do defeito ósseo é que irá determinar a forma de enxerto utilizada, visando assim, um posicionamento adequado do mesmo e conseqüentemente reduzindo possíveis espaços entre o enxerto e o leito receptor (Klüppel, 2007). Em casos de defeitos de 3 paredes, como rebordos com deficiência em espessura, os enxertos em bloco seriam a opção de escolha visto que este tem sua estabilização facilitada através de parafusos, apesar destes apresentarem um potencial de reparo mais lento quando comparados à forma particulada, visto que esta possui uma maior angiogenese na fase inicial, devido a um maior espaço entre as partículas do enxerto (Klüppel, 2008).

A forma de apresentação do material interfere de forma significativa neste processo de neoformação. Enxertos particulados apresentam uma penetração de células e vasos sangüíneos facilitada, tornando o processo acelerado quando comparado com enxertos em bloco, devido à sua estrutura densa e cortical que promove uma barreira física para a angiogênese (Moioli *et al.*, 2007). De forma geral, o percurso da neoformação dos vasos sangüíneos ocorre de forma centrípeta, ou seja, indo da periferia em direção ao centro do defeito. Desta forma, enxertos em bloco apresentam uma angiogênese no interior do defeito menor que os enxertos particulados (Nishimura *et al.*, 2004).

Estudos desenvolvidos por Schwarz *et al.* (2008), avaliando histoquimicamente processos reconstrutivos utilizando enxertos em bloco e particulados em cães, relataram que a forma particulada apresentou neoformação óssea significativamente superior quando comparado com a forma em bloco, sendo que fatores como as proteínas ósseas morfogenéticas influenciam positivamente este processo.

Durante a fase de remodelação do enxerto ósseo, as características mecânicas do leito receptor exercem uma influência significativa, principalmente quando forças excessivas atuam sobre o material enxertado, sendo este um dos problemas mais comuns nas reconstruções do tecido ósseo (Tong *et al.*, 2000).

Dentre os fatores que interferem de forma significativa no processo de regeneração do tecido ósseo, pode-se citar: posição inlay ou onlay, origem embriológica, forças atuantes sobre o enxerto, forma de fixação, existência ou não de periósteo e revascularização (Linka *et al.*, 2008)

Dentre os tipos de enxertos ósseos pode-se destacar os de origem autógena, visto que este é o melhor material a ser utilizado como enxerto, principalmente em casos de pouca espessura óssea. Isto se deve ao fato de possuir as propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, além de serem seguros em relação à transmissão de doenças ou geração de respostas imunológicas exacerbadas (Seibert, 1983; Mazzone *et al.*, 2009). Contudo, a abordagem de um segundo sítio cirúrgico apresenta desvantagens como volume limitado, maior morbidade transoperatória, maior tempo cirúrgico, tornando a técnica mais difícil e, em alguns casos, imprevisível. Por este motivo, estudos envolvendo substitutos ósseos vêm sendo realizados (Vance *et al.*; 2004), principalmente em animais (Asprino, 2003; Stabile, 2007; Klüppel, 2007; Klüppel, 2008; Olate, 2009; Chaves Netto, 2009). Apesar disto, a metodologia empregada nestes estudos ainda é controversa, principalmente na classificação dos defeitos ósseos em Críticos ou Não-críticos (Chaves Netto, 2009).

Dentre os substitutos ósseos, a matriz óssea bovina anorgânica é amplamente utilizada e aceita na literatura. Na área odontológica, este substituto ósseo pode ser utilizado em casos de regeneração de defeitos periodontais, recobrimento das fenestrações em implantodontia, como material osteocondutor após remoção de lesões císticas, durante elevação do assoalho do seio maxilar e em associação ao osso autógeno (Pallesen *et al.*, 2002; Gomes, 2002). Esta grande utilização pelos cirurgiões-dentistas se deve pela facilidade de acesso, comprovação científica do seu emprego e, principalmente, devido ao seu custo (Chaves Netto, 2009).

Turner (2001), comparou uma série de modelos animais com o *Homo sapiens*. O autor observou que, apesar de difícil manuseio e alto custo, os macacos *Rhesus* foram os mais semelhantes aos seres humanos, seguidos pelos cães, sendo estes animais de fácil manuseio e baixo custo. O autor observou que a relação no processo de reparação óssea entre cães e seres humanos é de 1:3. Deste modo, de acordo com os estudos de Prein (1998), os períodos de sacrifícios de 3 e 6 semanas em cães, corresponderiam às fases de reparação óssea entre os períodos de 1 e 2 meses, ou seja, àqueles estágios de reparação óssea primária e secundária.

Portanto, estudos visando melhorar a compreensão do processo de incorporação do enxerto e relação clínica durante a fase de preservação, assim como pesquisas em

modelos animais visando uma padronização dos mesmos são fundamentais para otimizar os procedimentos cirúrgicos de reconstrução dos maxilares.

Deste modo, o presente trabalho apresenta 3 pesquisas utilizando cães como modelo animal, subdivididas em capítulos, objetivando estabelecer uma classificação dos defeitos ósseos a serem realizados para posteriormente estabelecer uma relação clínica entre os exames radiográficos e as características estruturais do enxerto com o processo de reparo ósseo.

CAPITULO 1

Análisis Histológico del Proceso de Reparación en Defectos Óseos. Reconocimiento de Defectos Críticos en Canes.

RESUMEN

Los procedimientos quirúrgicos que envuelven la rehabilitación de la región maxilofacial requieren frecuentemente el uso de injertos para la reconstrucción de deformidades congénitas o adquiridas. De esta forma, defectos óseos pueden clasificarse como críticos o no críticos. En esta investigación fueron utilizados 6 canes machos realizando 2 defectos bicorticales de 8mm de diámetro en la calota craneal de cada animal; el relleno de las cavidades se realizó como grupo 1 con coágulo sanguíneo y grupo 2 con hueso autógeno en partículas. A través de un análisis histológico descriptivo se observó en el periodo de tres semanas de sacrificio que el grupo 2 fue el único en presentar regiones de aposición de nuevo tejido óseo. En el periodo de 6 semanas el grupo 2 presentó partículas de hueso autógeno utilizadas para el relleno en estado de reabsorción avanzada en ausencia de los bordes nítidos entre el defecto y el hueso preexistente. De este modo se concluye que el método que auxilia en el proceso de reparación tisidual como los injertos óseos autógenos, están indicados en la recuperación de defectos críticos, iguales o mayores que 8mm.

Palabras clave: Injerto óseo, defectos críticos, reparación ósea

SUMMARY

Surgical procedures involving maxillofacial region frequently require bone grafting to reconstruct the congenital or acquired defects, as well to aesthetic. The bone defect can be critical or non-critical. To perform the present study were used 8 dogs, males. It was performed 2 bicortical defects having 8 mm of diameter on the calvarium of each animal. The cavities were filled up through the following way: group 1 – blood clot, group 2 – particulate autogenous bone graft. Through the descriptive radiologic and histological analysis, it was observed on 3 weeks period that The group 2 was the only one that presented new bone

apposition. On the 6 weeks sacrifice period. The group 2 was the only one that showed advanced resorption stage of the bone grafts particles used for fulfillment being, also the only one that showed periphery of the defects without limit. On this way, it may be conclude that bone defects over 8mm can be considered Critical, being necessary some method to help tissue repair, as well as, autogenous bone grafts works well when helping this regeneration process, being indicated to assist bone repair like this performed on this study.

Key words: bone grafts; critical defect, osseous repair

INTRODUCCIÓN

El hueso presenta un potencial de reparación muy elevado con un proceso dinámico de remodelación que envuelve la neoformación y la reabsorción ósea caracterizada por la casi total ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontanea, necesitando factores que estimulen la reparación (Jensen *et al.*, 2006). La velocidad de reparación del hueso es inferior a la de otros tejidos, motivo por el cual también en algunos casos es necesario la utilización de materiales de reconstrucción ósea que actúen como injertos y auxilien el proceso de reparación ósea (Hing *et al.*, 2007).

Algunos requisitos para el adecuado desarrollo de la reparación ósea incluyen el cierre primario del tejido blando (sutura), presencia de angiogénesis que permita la irrigación sanguínea de los tejidos, presencia de células mesenquimales no diferenciadas, mantención adecuada del lecho quirúrgico y estabilidad de la región en reparación junto al material instalado si fuesen utilizados injertos (Wang & Boyapati, 2006).

La forma física del material injertado influye de forma significativa en el proceso de neoformación ósea. Injertos en partículas presentan una penetración facilitada entre células y vasos sanguíneos, transformándose en un proceso de reparación más rápida que en las formas de bloque; la propia estructura cortical de este ultimo presenta una barrera física para la penetración de células (Moioli *et al.*, 2007). Debido a que la formación de vasos sanguíneos ocurre de forma centrípeta, es decir, desde la periferia hacia el centro del defecto, los injertos en bloque también presentan menos estructura vascular en su región central al ser comparados con los injertos en partículas (Nishimura *et al.*, 2004). El tipo de defecto óseo define en gran parte la forma física del injerto a ser utilizado, intentando un

posicionamiento adecuado junto a la disminución de espacios entre el injerto y el lecho receptor (Nishimura *et al.*, 2004).

El injerto autógeno (hueso obtenido del propio receptor) es considerado el patrón oro en las reconstrucciones óseas, puesto que presenta las propiedades de osteoinducción, osteogénesis y osteoconducción, siendo su principal desventaja el hecho de presentar un sitio donante, aumentando la morbilidad del procedimiento (Kübler *et al.*, 2004).

Otra arista del asunto está en el hecho de que el sitio receptor debe ser preparado para recibir el injerto óseo ya que una parte importante de las células osteoprogenitoras vienen de esta región; además, buena parte de los osteocitos son inviables después de poco tiempo de realizado el injerto (De Boever *et al.*, 2005). Durante la fase de remodelado del injerto óseo, las características mecánicas del sitio receptor ejercen una influencia importante, principalmente cuando las fuerzas excesivas actúan sobre el material injertado, siendo un problema relevante y común en las reconstrucciones óseas (Tong *et al.*, 2000).

De esta forma, factores asociados al proceso de reparación ósea incluyen el tipo de defecto óseo (*inlay* o de cavidad y *onlay* o de sobreposición), existencia de fuerzas externas, estabilidad del injerto, existencia de periostio y revascularización de la región (Linka *et al.*, 2008). Cuando el defecto es *inlay*, la dimensión del defecto óseo presenta influencia significativa en la reparación del mismo. Son denominados defectos críticos a aquellos defectos donde el organismo no consigue promover el reparo tecidual de tejido óseo formándose, básicamente, un tejido cicatricial y son llamados defectos no críticos a los que el organismo es capaz de promover la reparación ósea integral sin métodos de auxilio para la reparación (Serra e Silva *et al.*, 2006).

El objetivo de esta investigación es comparar a través del análisis histológico descriptivo, las diferencias existentes en el proceso de reparación ósea de defectos confeccionados en calotas craneanas de canes, utilizando el coagulo y el injerto autógeno en forma de partículas para identificar el grado de reparación entre estos dos métodos terapéuticos a fin de establecer una clasificación en críticos e non-críticos, e también se el injerto óseo autógeno auxilia en el proceso del reparo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio experimental descriptivo en una muestra de 6 canes machos adultos de 15 kg aproximadamente. Este trabajo fue aprobado por la Comisión de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Estadual de Campinas (CEEa)-IB-UNICAMP con el protocolo numero 1343-1.

Procedimientos quirúrgicos

Treinta minutos antes del procedimiento, los animales recibieron profilaxis antibiótica con benzilpenicilina benzática (0,1 ml/kg) y la aplicación del corticoide dexametasona (0,5 mg/kg), ambos por vía intramuscular. La sedación de los animales fue con el inductor anestésico cloridrato de ketamina (0,15ml/kg), por vía intramuscular, para finalmente ser sometidos a anestesia general con inyección endovenosa de pentobarbital sódico 3% (30mg/kg).

Después de realizar la antisepsia de rutina, fue ejecutada una incisión lineal hasta periostio para exponer la calota craneana de los animales. En ellas fueron creados dos defectos óseos con trefina de 8 mm de diámetro, montada en motor de baja velocidad a 1000 rpm; posteriormente fue realizado el clivaje de los fragmentos óseos hasta presentar exposición de dura madre (Figura 1). Los fragmentos óseos removidos fueron triturados en una maquina particuladora de hueso obteniendo partículas de entre 0,5 y 2 mm en su dimensión mayor, presentando mayoritariamente partículas de tamaño menor. Después de su hidratación con suero fisiológico al 0,9%, las partículas óseas fueron utilizadas para completar uno de los dos defectos, cubriéndolo completamente y compactándolo con instrumentos quirúrgicos y gasa seca; este defecto fue denominado grupo 1; el segundo defecto fue mantenido solo con el coagulo sanguíneo producido durante la intervención quirúrgica; este grupo se denominó como grupo 2.

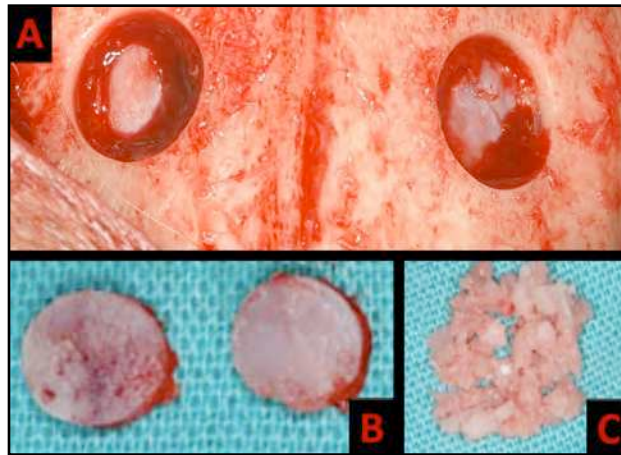


Figura 1: A. Cavidades (defectos) confeccionadas en las regiones parietales derecha e izquierda, manteniendo la integridad de la duramadre. B. Fragmentos óseos removidos del defecto. C. Partículas óseas después de la trituración de ambos bloques.

Finalmente, el sitio quirúrgico fue cerrado con suturas simples en tres planos utilizando suturas absorbibles y no absorbibles (vicryl 4-0, poliglactina 910).

Sacrificio de los Animales

Los animales fueron aleatoriamente divididos en dos grupos correspondiendo los dos periodos de sacrificio del estudio; el primer grupo fue sacrificado a las 3 semanas de la intervención quirúrgica y el segundo grupo a las 6 semanas post-quirúrgicas. Para este procedimiento fue realizada la sobredosis de cloro de potasio (19,1%) por vía endovenosa; posteriormente se realizaron las osteotomías para la remoción de la calota craneana con fresas 702 en pieza de alta rotación (400.000 rpm) e irrigación con suero fisiológico al 0,9% con un margen de seguridad de 5 mm desde la periferia del defecto óseo.

Análisis Histológico

La mantención de la pieza y confección de laminas histológicas se desarrollo mediante técnicas histológicas de rutina utilizando la tinción de hematoxilina-eosina (HE). El análisis descriptivo estudió los patrones de regeneración ósea, como presencia de reacción inflamatoria y presencia de tejido conectivo, intentando establecer una secuencia de eventos de la reparación ósea. De esta forma, los fenómenos de necrosis, hemorragia, actividad osteoclástica y osteoblástica y presencia del material injertado fueron estudiados tanto en la periferia del defecto como en el centro del mismo, empleando microscopia de luz en aumentos de 50X y 100X.

RESULTADOS

Sacrificio a las 3 semanas

En el grupo 1, que corresponde a los defectos con coágulo, se observó tejido conectivo en casi la totalidad del defecto creado, la periferia estaba bien delimitada caracterizando al hueso preexistente la presencia de dos corticales nítidas. La región de la periferia (Figura 2A) también mostraba áreas de remodelación con reabsorción y aposición ósea. Entre el tejido conectivo neoformado fue posible identificar la presencia de un discreto proceso inflamatorio y algunos vasos sanguíneos (Figura 2B). No se observó tejido óseo neoformado (Figura 2).

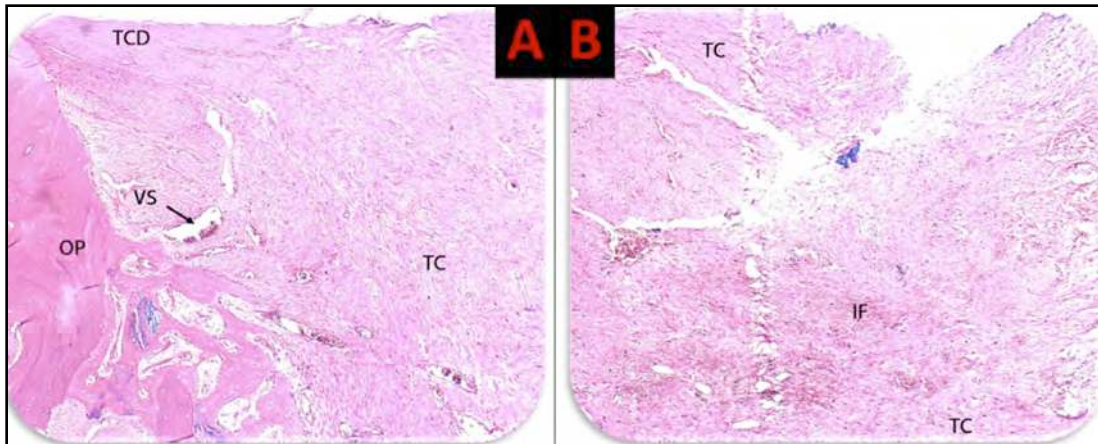


Figura 2: Fotomicroscopia del grupo 1 después de 3 semanas de realizados los procedimientos en la calota craneana (HE; 10x). OP- hueso preexistente, VS- vaso sanguíneo, TC- tejido conectivo, TCD- tejido conectivo denso, IF- infiltrado inflamatorio.

El grupo 2, de defectos rellenos con hueso autógeno en partículas presentó un límite definido entre hueso preexistente y el defecto óseo. Los márgenes presentaron áreas de remodelación y neoformación ósea en dirección al centro del defecto, caracterizando un proceso de formación ósea centrípeta (Figura 3A). Se observó también la interposición de tejido conectivo entre las trabéculas óseas neoformadas junto a áreas de angiogénesis. Se identificó un estado más avanzado de reparación ósea al ser comparado con el defecto sin injerto, estableciéndose un proceso de cicatrización por sustitución de tejidos (Figura 3B). Hubo una tendencia a la formación ósea en dirección centrípeta con la presencia de fragmentos de hueso necrótico remanente (Figura 4), en algunas áreas hubo menos reacción inflamatoria al ser comparado con el defecto sin injerto (Tabla 1).

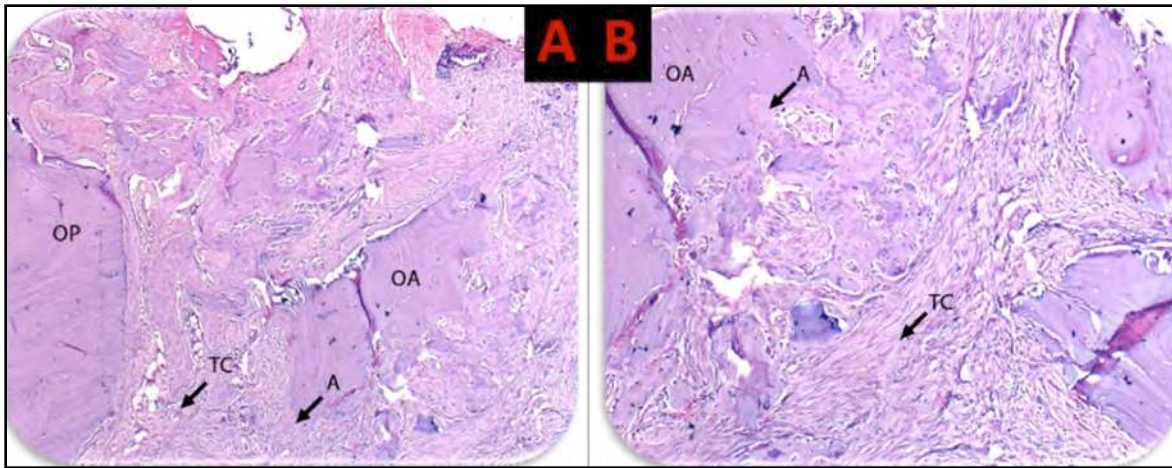


Figura 3: Fotomicroscopia del grupo 2 en el primer sacrificio de 3 semanas (HE; A.10x, B.20x). A- aposición de nuevo hueso, OA- injerto de hueso autógeno, TC- tejido conectivo.

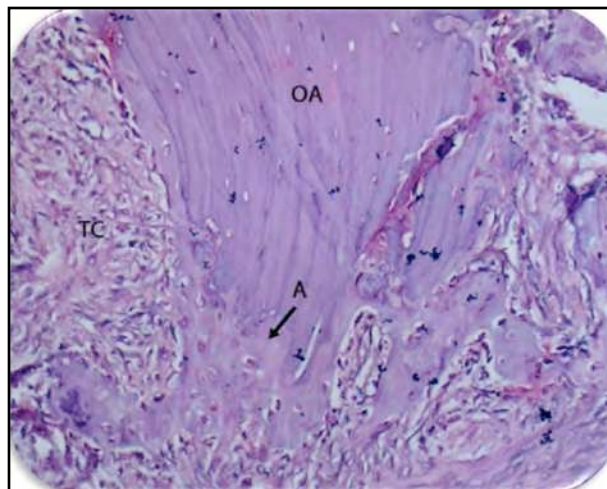


Figura 4: Fotomicroscopia del grupo 2 despues de 3 semanas del sacrificio (HE; 40x). A-aposición de nuevo hueso, OA- injerto de hueso autógeno, TC- tejido conectivo.

Sacrificio a las 6 semanas

En el grupo 1 (coagulo) la región límite entre el hueso preexistente y el hueso neoformado se identifico nuevamente. El hueso preexistente presento nuevamente las dos corticales definidas y el hueso esponjoso formado por tejido conectivo de buena celularidad y vascularización. Junto a los márgenes de la cavidad formada se observo remodelación del hueso preexistente y hueso neoformado en dirección centrípeta (Figura 5A). En la porción central se observo tejido conectivo fibroso entre algunas trabéculas óseas neoformadas (Figura 5B).

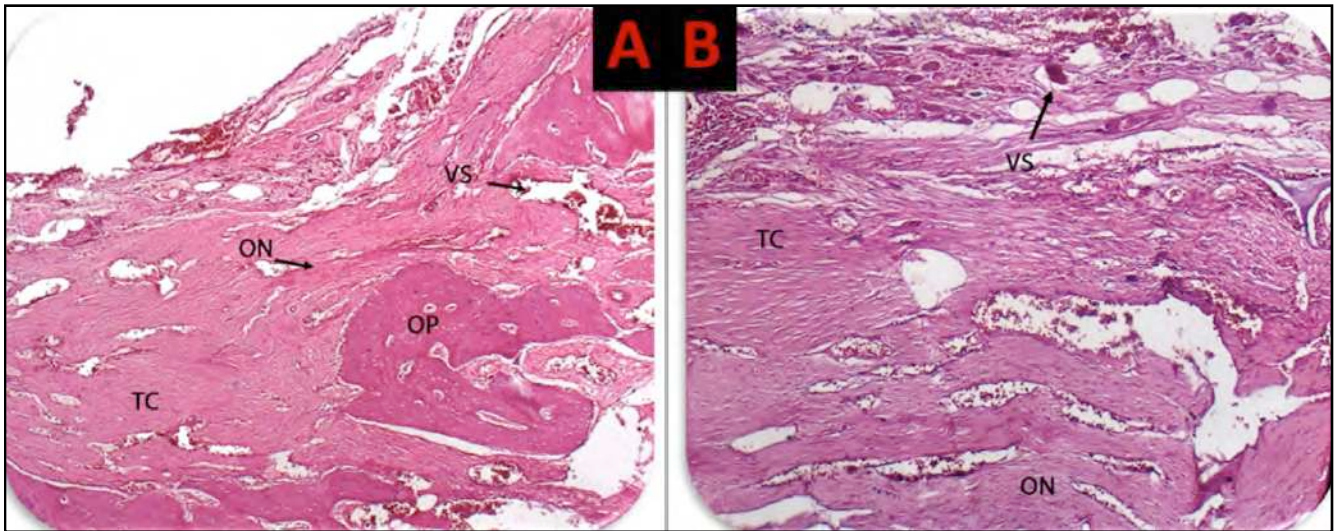


Figura 5: Fotomicroscopia del grupo 1 el segundo periodo de sacrificio de 6 semanas (HE;10x). OP- tejido óseo preexistente, ON- tejido óseo neoformado, TC- tejido conectivo, VS- vaso sanguíneo.

En el grupo 2 (injerto de hueso autógeno), se observó un relleno casi integral de la cavidad quirúrgica, con presencia de algunas áreas de tejido conectivo fibroso y tejido óseo esponjoso. Los bordes del defecto se presentaron limitadas; en el interior del tejido óseo neoformado se visualizó algunas partículas del injerto junto a nuevos vasos sanguíneos (Figura 6A). Se verificó claramente un estado más avanzado de reparación ósea con un crecimiento centrípeto (Figura 6B).

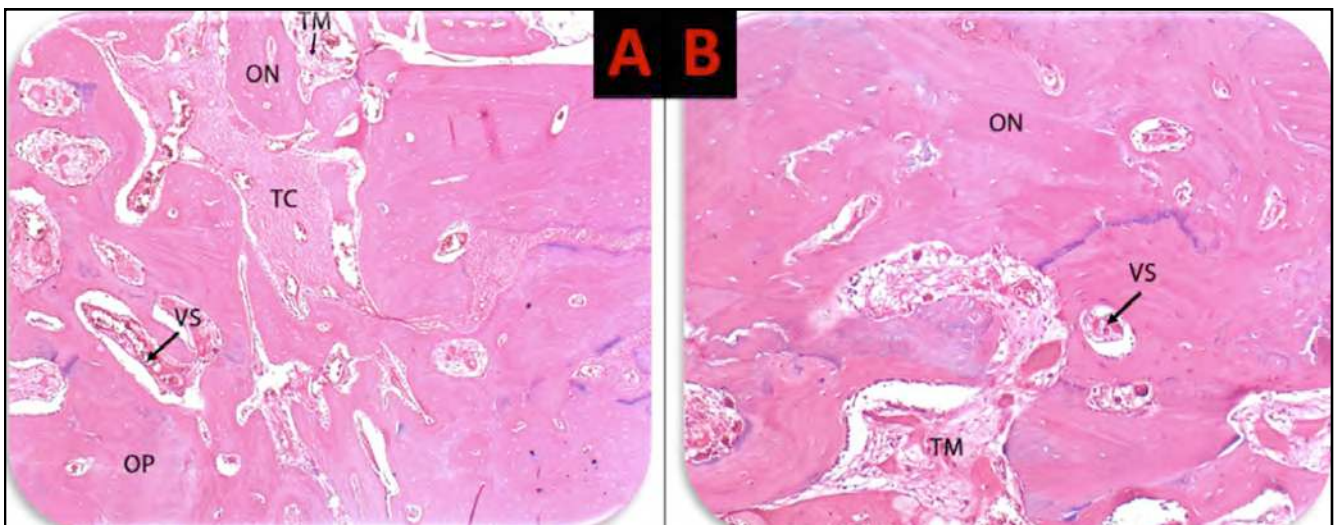


Figura 6: Fotomicroscopia del grupo 2 a las 6 semanas del sacrificio de los animales (HE; 10x). ON- tejido óseo neoformado, TC- tejido conectivo, VS- vaso sanguíneo, TM: tejido óseo esponjoso.

Tabla 1: Resumen del análisis histológico descriptivo en defectos óseos de 6 animales estudiados en dos periodos de sacrificios (3S- sacrificio de 3 semanas; 6S- sacrificio de 6 semanas)

	Tejido conectivo	Infiltrado inflamatorio	Aposición ósea	Tejido óseo neoformado	Material injertado	Vaso sanguíneo	Periferia defecto
Defecto con Coagulo (3S)	Presente	Discreto	Ausente	Ausente	Inexistente	Presente	Presente
Defecto con Injerto (3S)	Presente	Discreto	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Defecto con Coagulo (6S)	Presente	Discreto	Ausente	Presente	Inexistente	Presente	Presente
Defecto con Injerto (6S)	Presente	Discreto	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente

DISCUSION

El presente estudio es capaz de reportar un proceso de reparación ósea más rápida en defectos rellenados con hueso en partículas al ser comparados con los rellenos con coagulo, lo que está de acuerdo con otros resultados encontrados en la literatura internacional (Haas *et al.*, 2002; Laureano Filho *et al.*, 2007).

Turner (2001) estudió el proceso de reparación ósea en diferentes modelos animales (primates, canes, gatos, ratones, conejos y minicerdos), observando que la velocidad de la reparación ósea en el humano era más próxima al de los perros con una relación de 3:4 (hombre: can). De esta forma, los periodos de sacrificio de 3 a 6 semanas corresponderían a fases de reparación ósea de 1 y 2 mes en el humano.

Una de las indicaciones para el uso de injertos óseos está representado por la presencia de defectos críticos, puesto que estos no consiguen una reparación completamente autónoma o sin ayuda de técnicas reconstructivas (Callan & Rohner, 1993). Estudios anteriores señalaron que defectos de 8mm se presentaban como defectos no críticos (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Klüppel LE, 2007). A pesar de ello, en este estudio fue posible observar que los defectos confeccionados en las calotas craneanas no presentaron reparación ósea espontanea después de 6 semanas de análisis, presentando una elevada cantidad de tejido conectivo en la región central del defecto. De esta forma, defectos iguales o superiores a 8mm de diámetro deberían ser considerados como defectos

críticos, necesitando técnicas reconstructivas como la instalación de injertos para obtener la reparación integral del sitio óseo defectuoso.

El hueso autógeno es considerado el patrón de oro en las técnicas reconstructivas. Diferentes estudios ratifican la capacidad de estimular positivamente el proceso de reparación, permitiendo la aceleración de la secuencia biológica y optimas cualidades tisulares al final del proceso (Tong *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006; Hing *et al.*; 2007). Durante el estudio histológico se observó que las cavidades con injerto óseo presentaron un proceso de reparación más avanzado, observándose regiones de aposición ósea en la periferia de los defectos a las 3 semanas; a las 6 semanas fue menos visible la diferencia en el margen del defecto, prueba de la existencia de reparación ósea avanzada en esta región.

CONCLUSIÓN

Defectos iguales o superiores a 8mm de diámetro mayor deben ser considerados como de tipo crítico. Los injertos de partículas de hueso autógeno son auxiliares del proceso de reparación ósea, siendo indicados para la reparación de defectos con tres o mas paredes.

REFERÊNCIAS

- Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *J. Periodontol.* 1993; 64: 575-82.
- De Boever AL, De Boever JA. Guided bone regeneration around non-submerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2005; 16: 549-56.
- Haas R, Haidvogel D, Donath K, Watzek G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep: Part I – Histological findings. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13: 396-404.
- Hing KA, Wilson L, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J.* 2007; 7(4): 457-90.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J. Craniofac. Surg.* 1990; 1(1): 60-8.
- Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. *Clin. Oral Impl. Res.* 2006; 17: 237-43.
- Klüppel, LE. Influência dos diferentes tamanhos de partículas da matriz óssea bovina anorgânica no processo de reparo ósseo. Análise histológica e radiográfica de defeitos criados cirurgicamente em calvária de coelhos. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.
- Kübler A, Neugebauer J, Oh J, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts in different bone graft substitutes. An in vitro study. *Implant Dent.* 2004; 13: 171-9.
- Laureano-Filho JRC, Branco BL, Andrade ESS, Albergaria-Barbosa JR. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2007; 73(2): 123-45.

- Link D, Van den Dolder J, van den Beucken J, Wolke J, Mikos A, Jansen J. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF-b1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials*. 2008; 29: 675–82.
- Moioli E, Clark P, Summer C, Mao J. Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis. *Bone* 2008; 42: 332-40.
- Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clin. Oral Impl. Res.* 2004; 15: 293-300.
- Serra e Silva F, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2006; 64: 931-5.
- Ton L., Buchman SR. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *J. Craniomaxillofac. Trauma*. 2000; 6: 31-41.
- Turner AS. Animal models of osteoporosis – Necessity and limitations. *Eur. Cells Mat.* 2001; 1: 66-81.
- Wang HL, Boyapati L. “PASS” Principles for Predictable Bone Regeneration. *Implant Dent.* 2006; 15 (1):1-17.

CAPITULO 2

Diagnostic Predictability of radiographic exam in the bone graft healing period: Histological vs Radiographical analyses

ABSTRACT

Surgical procedures involving the rehabilitation of the maxillofacial region frequently require use of bone grafts. Bone graft proservation is generally done through clinical analysis and especially through image tests, although few studies specifically correlate both. The object of this work is to establish a clinical relation between radiographic exams and the bone repair process stage by comparing these to histological tests in cases of autogenous and heterogenous graft proservation. Three defects were performed in the skull cap of 6 male adult dogs by using two sacrifice periods. As concluded, radiographic tests can be used as a parameter for reconstruction proservation only when autogenous bone grafts are used, as well as in cases of spontaneous repair through blood clot.

Key words: radiograph exam, predictability, bone graft

INTRODUCTION

Surgical procedures involving the rehabilitation of the maxillofacial region frequently require using bone grafts for reconstructing congenital or acquired deformities, as well as for skeletal corrections for aesthetic purposes (Jensen & Sindet-Pedersen,1991). Thus, after reconstructive procedures take place grafts go through a number of events culminating in their incorporation by the recipient bed. This graft incorporation process happens dynamically through reabsorption and apposition of the new bone tissue (Nunamaker,1998).

Graft proservation is generally done through clinical analysis and especially through image tests such as radiography and tomography (Serra e Silva *et al.*, 2006), even though these are not reliable as to the quality of the graft that is being assessed. The histological test is the gold standard to assess bone tissue quality that forms in the grafted area (Pallesen *et al.*, 2002).

Amongst the material used in bone grafting, autogenous graft is now considered the gold standard for reconstructions because it has properties such as osteoinduction, osteoconduction and osteogenesis. Despite that, a donor site is necessary what promotes increased surgical morbidity as well as limited bone volume (Kübler *et al.*, 2004). For that reason, bone replacements are being developed and researched. Among these, anorganic bovine bone matrix is the most widely used both for its many years of research and its known osteoconductive potential (Callan & Rohrer, 1993; Haas *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2006).

Thus, the object of this work is to establish a clinical relation between radiographic and histological tests in cases of autogenous and heterogenous graft proservation (anorganic bovine bone matrix).

METHODOLOGY

Once approved by the Ethic Commission for Animal Experimentation of Campinas State University under protocol number 1343-1, the methodology was chosen consisting of 3 defects performed in the parietal bones of 6 male adult dogs weighting 15kg as described below:

Preoperative

Thirty minutes before the procedure the animals received intramuscular injection with dexamethasone (0.5 mg/kg) and 0.1 mL/kg weight of benzathine benzylpenicillin as an antibiotic prophylaxis. Before the surgical procedures, the animals were intramuscularly sedated with the anesthetic inductor ketamine chlorohydrate (0.15 mL/kg) and underwent general anesthesia receiving a 3% pentobarbital sodium (30 mg/kg) intravenous injection.

Surgical procedure and evaluated material

For this study, 3 cavities were created in parietal regions and the dura mater integrity was preserved with a 8-mm wide trephine bur.

Bone fragments that were removed were ground in the bone grinder and kept hydrated in a 0.9% physiological saline solution before its use.

Cavity area were almost around 5mm of height and 8 mm wide. Filling was randomly done. One was filled with blood clot (Group I), another with 750 a 1000µm ground

autogenous bone (Group II), and yet another with 450 a 749 μm anorganic bovine bone matrix (Group III).

After cavity filling, periosteum and temporal muscles were approximated with sutures by using absorbable stitch (polyglactin 910). Superficial planes were sutured with 4-0 monofilament nylon stitch.

Sacrificing and sampling

Animals were randomly divided into two groups corresponding to the two sacrifice periods: the first group consisted of 3 animals which were sacrificed three weeks after surgical procedure; the second group consisted of 3 animals which were sacrificed six weeks after surgical procedure, which corresponds to 1 and 2 months in humans, i.e., primary and secondary repair according to Turner *et al.* 2001. Sacrificing took place with a 19.1% *potassium chloride* intravenous overdose until cardiorespiratory arrest. Following this stage, access to the animal's skull was created and the grafted region exposed.

Bone blocks were obtained by cross and coronal sectioning of the bone with a 702 tapered drill in high-speed turbine under constant saline solution irrigation with a 5-mm safety margin for the previously operated areas. After that, a single periapical film F sensibility were used to take the radiographies as described below and the material was sent for lamina preparation using hematoxylin-eusin technique. The blocks were sagittally cut on two identical parts, obtaining 5 serial laminas with 6 μm of espessure from each.

Radiographs were taken on a perpendicularly position 10 centimeters far from the blocks. The technique was performed using a same radiographic machine with the regulation of 60KV e 10mA and 0,25 seconds of exposure time . All films were reveled on a automatic process revelation machine using the T-mat type chemical solutions. The total revelation period were 7 minutes for each radiographic film.

Radiologic Analysis

Radiographic images were comparatively analyzed between the prepared bone-defect region and the intact bone area around the defects (control area) by correlating radiographic density in the central and peripheral regions.

Histological Analysis

The descriptive method was used for histological analysis and bone regeneration patterns were assessed such as: presence of inflammatory reaction and sequence of events involving bone repair of circular defects. Events and tissue characteristics in the bone repair process were described as necrosis, hemorrhage, osteoclast and osteoblast activities, presence of connective tissue and maturation degree, presence of grafted material remnants, as well as new bone tissue formation.

RESULTS

3 WEEKS

GROUP I - Clot

Radiological assessment suggests a well demarcated cavity with a considerably smaller radio-opacity in the central (CA) and peripheral (PA) regions when compared to pre-existing (PB) bone tissue, as shown in Figure 1A. Through the histological analysis, connective tissue (CT) was observed to fill the surgical cavity almost completely, and the surrounding region (PB) was well demarcated. The region in the defect borders shows remodeling areas with a bone reabsorption and apposition, as well as dense connective tissue (DCT). Amidst the newly formed conjunctive tissue there is a discreet inflammatory process (IP) and some blood vessels (BV). Newly formed bone tissue was not observed (Figure 1B).

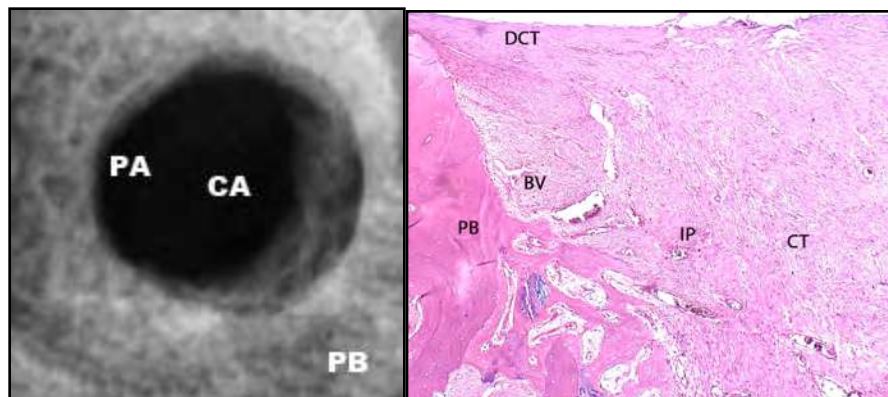


Figure 1-A-B: Periapical radiography and histological analysis (10x) for Group I within a 3-week period. Note that both indicate a repair process still with no newly formed bone tissue.

GROUP II - Autogenous Bone Graft

Radiological assessment showed a well demarcated and totally filled cavity with radio-opaque areas inside (CA), a finding that is compatible with the graft compaction in the trans-operative. Although these grafts showed some less demarcated regions, autogenous bone particles are evident as well as the defect surrounding area (PA), as shown in Figure 2A. In the histological analysis we could identify the limiting regions between pre-existing bone and graft (PB). Defect margins showed remodeling areas and new centripetal bone formation (Figure 2B). Also observed was the fibrous connective tissue (CT) interspersed with newly formed bone trabeculae (A), as well as revascularization areas and some remnants of grafted bone tissue (BG).

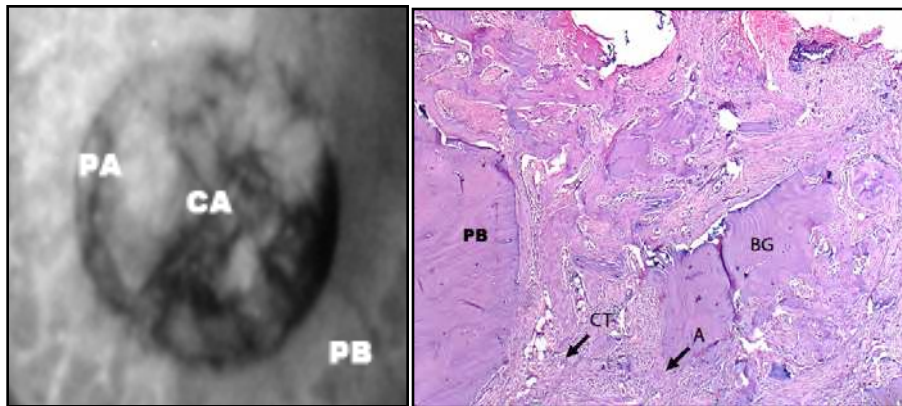


Figure 2 A-B: Periapical type radiography and histological analysis (10x) for Group II within a 3-week period. Note that both indicate a more advanced repair process than Group I, which suggests regions of newly formed bone tissue in both analyses (A).

GROUP III – Fine-grained anorganic bovine bone matrix

Radiological assessment showed a clear contour in the bone defect (CA), which is visibly more radiolucent than the adjacent bone tissue (PB) although it shows radiopaque points inside (CA), as shown in Figure 3A. In histological sections there is fibrous connective tissue (CT) almost entirely filling the surgical cavity. Few newly formed and still immature bone trabeculae were found interspersed by the fibrous conjunctive tissue and blood vessels (BV). Defect border was clear (PB) and showed remodeling areas in the defect margins. Some remaining particles were found from the material used for cavity filling (BG). The group also showed a discreet inflammatory process (Figure 3B).

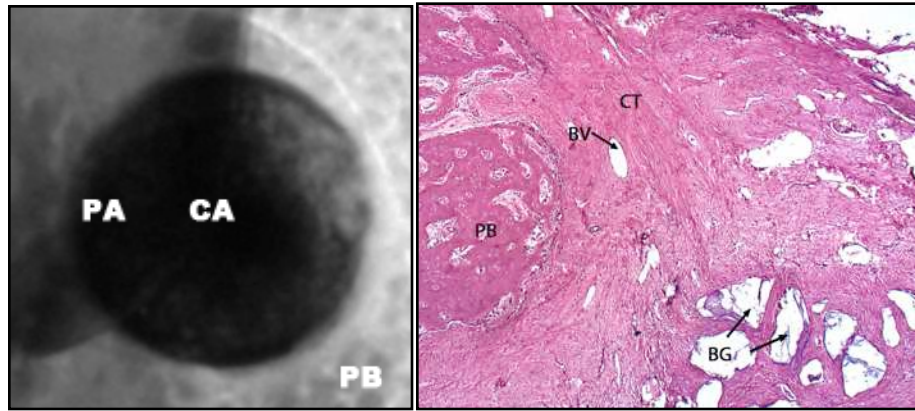


Figure 3 A-B: Periapical type radiography and histological analysis (10x) for Group III within a 3-week period. Note that the histological analysis shows calcified material inside. This does not represent a newly formed bone tissue but particles from the grafted material.

6 WEEKS

GROUP I - Clot

Radiological analysis showed a decreased limit demarcation between defect (PA) and pre-existing bone (PB) when compared to the 3-week period, as well as a decreased radiolucency relating to the clot region (CA) especially in the regions surrounding the defect (Figure 4A). Histologically, the pre-existing bone (PB) was still clear and the central region showed good cellularity and vascularization (BV). In the surgical bone cavity margins, remodeling areas were observed in the pre-existing bone and the newly formed bone (NB) in a centripetal direction. In the central portion, there was fibrous connective tissue (CT) interspersed with some newly formed bone trabeculae (Figure 4B).

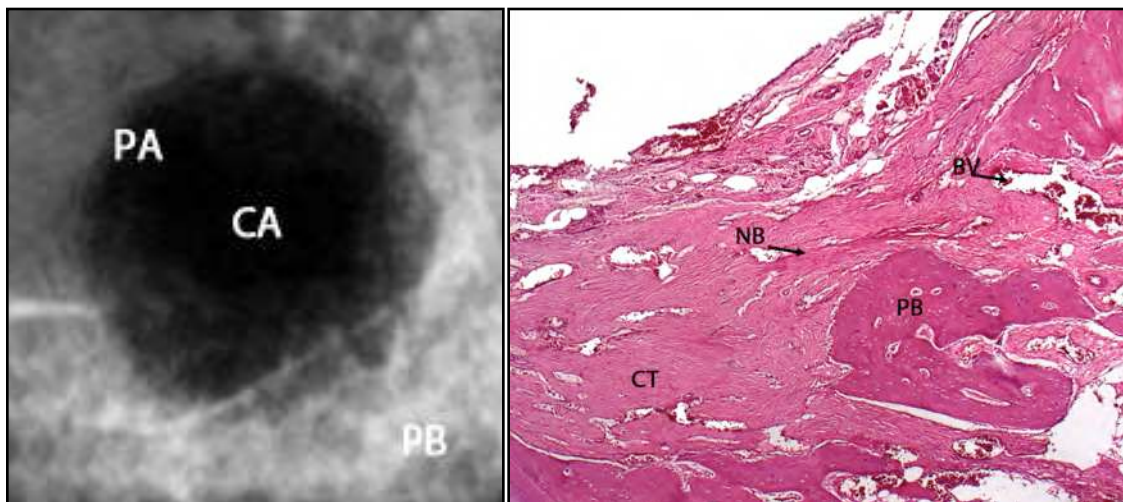


Figure 4 A-B: Periapical type radiography and histological analysis (10x) for Group I within a 6-week period. The histological analysis showed some remodeling in the peripheral region and the presence of newly formed bone tissue, just as suggested by the radiological analysis.

GROUP II – Autogenous bone graft

The radiological analysis shows that the osteotomy is virtually unnoticed and its filling shows radio-opacity similar to the adjacent bone (PB), yet still scattered and with an undefined and amorphous trabeculate with points of mineralization in the central (CA) and peripheral (PA) regions, as shown in Figure 5A. The histological analysis showed that the surgical cavity was almost entirely filled with newly formed bone trabeculae (NB) interspersed by some areas of fibrous connective tissue (CT) and medullary bone tissue (MBT). Defect borders were not well demarcated (PB). The inside of the newly formed bone tissue showed some particles from the graft that was used to fill the surgical cavity and also some blood vessels (BV). The margins of this pre-existing bone tissue showed remodeling and new bone formation areas, and its growth was considered centripetal. Analyzing the graft shows a more advanced state of bone regeneration because this was the basis for the development of the replacement-regeneration process (Figure 5B).

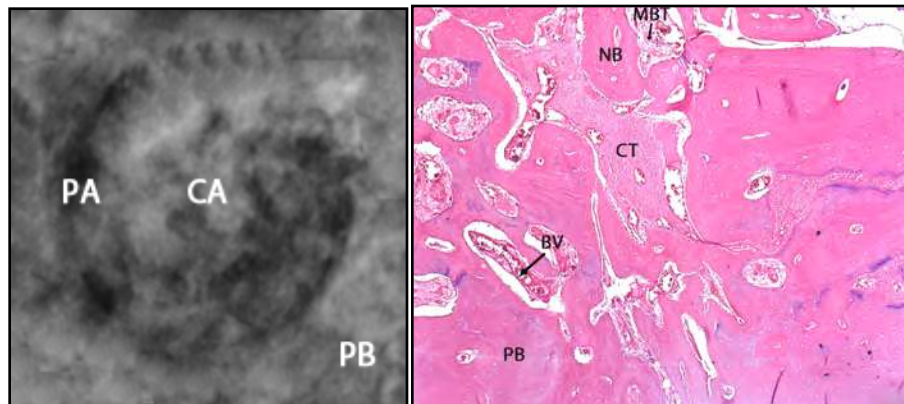


Figure 5 A-B: Periapical type radiography and histological analysis (10x) for Group II within a 6-week period. Note that both analyses converge towards the presence of mature bone tissue with no clinical difference between the pre-existing region and the newly formed bone tissue.

GROUP III – Fine-grained anorganic bovine bone matrix

The radiographic test showed clear contours in bone defect (PA). The defect showed a visibly more radiopaque image, especially in the central region (CA), which suggests the onset of a centrifugal bone repair process (figure 6A). The histological analysis showed advanced vascularization (BV) in the filling site and the start of bone tissue formation (NB). The process was in a more advanced new bone formation stage but some grafted

material (BG) fragments are still found. However, these fragments show clear signs of an intense and varied reabsorption process with some particles almost entirely reabsorbed while others only partially. These particles are surrounded by connective tissue (CT) interspersed by newly formed bone tissue. The limit between the surgical bone cavity and the pre-existing bone (PB) was easily identified. In its periphery, the pre-existing bone tissue showed remodeling and new centripetal bone formation areas. Also, a discreet inflammatory process was found, especially around these particles for the bone substitute that was used (Figure 6B).

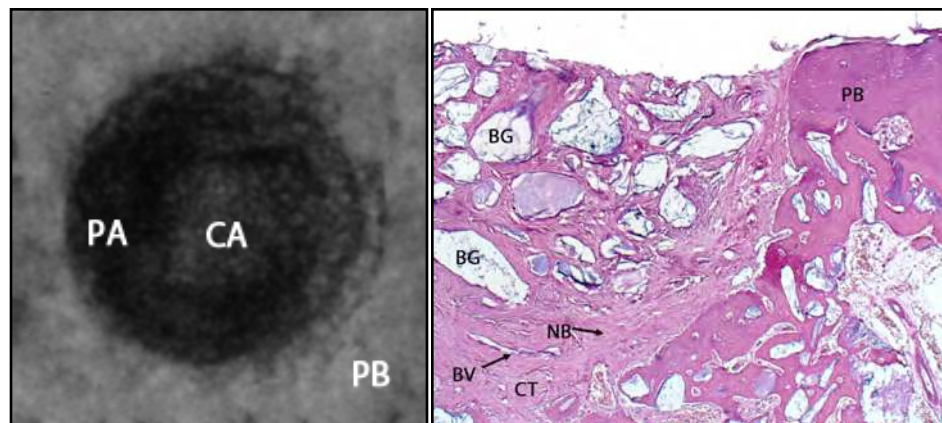


Figure 6 A-B: Periapical type radiography and histological analysis (10x) for Group III within a 6-week period. Note that although the radiological image suggests new bone formation in the defect area, there is still little newly formed bone tissue as per the histological analysis.

DISCUSSION

Using imaging tests such as radiographies and tomographies for post-operative follow-up in surgical procedures is customary. Although tomographic tests have a greater resolution, radiographic tests generally have a similar efficacy for clinical preservation (Whaites, 1996; Ferrús-Torres *et al.*, 2009). Thus, this work used periapical radiographies because they have a better distortion when compared to other radiographic tests (Dudic *et al.*, 2001) besides providing diagnostic efficacy.

Radiographies serve as parameters to quantitatively assess bone gain in post-operative periods, and helps the preservation of cases (Rosenwasser *et al.*, 1994). This work showed similar results when assessing autogenous bone or blood clot grafted areas. In spite of that, the radiographic analysis of heterogenous grafts was different from the histological analysis for both sacrifice periods.

Several studies have used radiographic tests during the preservation phase of bone reconstruction and have showed satisfactory results (Callan *et al.*, 1993; De Boever, 2005). This study detected that in cases of autogenous graft reconstruction the image tests were shown to be efficient because the results for radiographic and histological tests were similar in both sacrifice periods. For the 3-week period, internal radiopaque areas can be seen in the radiographic analysis, suggesting grafted material and newly formed bone tissue, as well as radio-opacity similar to the adjacent bone for the 6-week period. These findings are confirmed through histological analysis. On the other hand, results from this study also highlight the how likely it is that radiographic tests, which are a highly valued parameter in reconstructive surgery follow-up (Ferrús-Torres *et al.*, 2009; Bell *et al.*, 2003), are insufficient to determine the quality of the newly formed bone tissue when an anorganic bovine bone matrix is used as osteoconductor. An example of this is the fact that defects treated with fine-grained bovine bone matrix have a radiolucent aspect at the end of the experimental periods, which could suggest little new bone formation. In fact, what happens is that the cavity is filled with immature bone tissue and highly reabsorbed grafted particles.

Thus, the present work suggest that although radiographic tests are inefficient for assessing tissue repair process when using heterogenous material they serve as a parameter in the preservation of reconstructions when using autogenous bone grafts, as well as in cases of spontaneous repair through blood clot.

REFERENCES

- Jensen J, Sindet-Pedersen S. Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(12):1277-87.
- Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S56-65.
- Serra e Silva F, Albergaria-Barbosa JR, Mazzone R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64: 931-5.
- Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. 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.* 2002;17(4):498-506.
- Kübler A, Neugebauer J, Oh J, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts in different bone graft substitutes. An in vitro study. *Implant Dentistry* 2004; 13(2): 171-179.
- Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *J Periodontol.* 1993; 64: 575-82.
- Haas R, Haidvogel, Donath K, Watzek G. Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep: Part I – Histological findings. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002;13: 396-404.
- Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. *Clin Oral Impl Res.* 2006; 17: 237-43.
- Whaites E. Bitewing radiography. In: Whaites E. *Essentials of dental radiography and radiology.* 2nd ed, p 91-8. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996.
- Ferrús-Torres et al. Diagnostic predictability of digital and conventional panoramic radiographs. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; 38: 1184-7.

Dudic A, Giannopoulou C, Martinez M, Montet X, Kiliaridis S. Diagnostic accuracy of digitized periapical radiographs validated against micro-computed tomography scanning in evaluating orthodontically induced apical root resorption. *Eur J Oral Sci.* 2008;116(5):467-72.

Rushton VE, Horner K, Worthington HV. Screening panoramic radiology of adults in general dental practice: radiological findings. *Br Dent J.* 2001;190(9):495-501.

Rosenwasser MP, Garino JP, Kiernan HA, Michelsen CB. Long term followup of thorough debridement and cancellous bone grafting of the femoral head for avascular necrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1994; 306: 17-27.

De Boever AL, De Boever JA. Guided bone regeneration around non-submerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. *Clin Oral Impl Res.* 2005; 16: 549.

Bell GW, Rodgers JM, Grime RJ, Edwards KL, Hahn MR, Dorman ML, Keen WD, Stewart DJ, Hampton N. The accuracy of dental panoramic tomographs in determining the root morphology of mandibular third molar teeth before surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(1):119-25.

CAPITULO 3

Histological evaluation Cancellous and Cortical interface when bone grafting. Histometric analyzes

ABSTRACT

Surgical procedures involving the rehabilitation of the maxillofacial region frequently require using bone grafts, the autogenous bone being the gold standard since it holds the properties of osteoconduction, osteoinduction, and osteogenesis. This graft incorporation process happens dynamically, and some factors may interfere with the incorporation process such as the graft's structural characteristic. In this study, through a descriptive and histometric histological analysis of the mineralized bone tissue formation in the graft-receiving bed interface in cases of medullary or cortical interface at two sacrifice periods, the bone tissue formation in this region was found to be statistically similar and did not influence the autogenous bone graft incorporation process.

Key words: medullar bone, cortical bone, bone graft

INTRODUCTION

Surgical procedures involving the rehabilitation of the maxillofacial region frequently require using bone grafts (Calan *et al.*, 1993). This graft incorporation process happens dynamically through reabsorption and apposition of the new bone tissue (Schliephake, 2002), and it can be influenced by factors that are inherent to the patient or external factors (Issa *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Within the factors that interfere with the incorporation process is the graft's structural characteristic (Tong *et al.*, 2000). Generally, this can be medullary or cortical (Nunamaker, 1998). Medullary grafts are typically revascularized faster involving all the region, whereas cortical grafts are slower and incomplete (Nunamaker, 1998) because it has smaller spaces between grafts, which can make it harder for the angiogenesis in the region (Nunamaker, 1998).

Thus, the bone incorporation process is made harder because of the fewer blood vessels in the graft region. This reduces the number of precursor osteoblast cells (Bhatt *et al.*, 2007). As a result, the cortical graft incorporation process is slower than the medullary one, and at the end of the process there are still regions that did not undergo any bone tissue formation and they show remaining islands of grafted material (Kübler *et al.*, 2004). Despite that, several studies show the efficacy for both grafts in alveolar border restoration before implant insertion (Serra e Silva *et al.*, 2006; Silva, 2006; Sverzut, 2008).

Thus, the object of this study is to assess graft block incorporation through a histometric analysis when grafts are of the cortical-medullary or cortical type.

METHODOLOGY

Once approved by the Ethic Commission for Animal Experimentation of Campinas State University under protocol number 1343-1, the methodology was chosen consisting of 3 defects performed in the parietal bones of 6 15-kg male adult dogs as described below:

Preoperative

Thirty minutes before the procedure the animals received intramuscular injection with 0.1 mL/kg weight of benzathine benzylpenicillin and dexamethasone (0.5 mg/kg) as an antibiotic prophylaxis. Before the surgical procedures, the animals were intramuscularly sedated with the anesthetic inductor ketamine chlorohydrate (0.15 mL/kg) and underwent general anesthesia receiving a 3% pentobarbital sodium (30 mg/kg) intravenous injection.

Surgical procedure and evaluated material

For this study, 2 cortical-cancellous grafts measuring 5 millimeters (2 mm of cortical and 3 mm of cancellous bone) of high and 8 millimeters of diameter were removed from parietal regions in 6 male adult dogs weighing 15 kg on average. The dura mater integrity was preserved.

Bone fragments that were removed were fixed on the frontal bone region without gap between the graft and recipient area, using 1.5mm metallic screws using Lag Screw technique. Recipient site was not decorticalized.

Blocks fixtures was randomly performed. One was fixed with the cortical region of the graft in contact to recipient area (Group I), another with the cancellous region of the graft in contact to recipient area (Group II).

After bone graft's stabilization and fixation, periosteum and temporal muscles were approximated with sutures by using absorbable stitch (polyglactin 910). Superficial planes were sutured with monofilament 4-0 nylon stitch.

Sacrificing and sampling

Animals were randomly divided into two groups corresponding to the two sacrifice periods: the first group consisted of 3 animals which were sacrificed three weeks after surgical procedure; the second group consisted of 3 animals which were sacrificed six weeks after surgical procedure, which corresponds to 1 and 2 months in humans, i.e., primary and secondary repair according to Turner *et al.* (2001). Sacrificing took place with a 19.1% *potassium chloride* intravenous overdose until cardiorespiratory arrest. Following this stage, access to the animal's skull was created and the grafted region exposed.

Bone blocks were obtained by cross and coronal sectioning of the bone with a 702 tapered drill in high-speed turbine under constant saline solution irrigation with a 5-mm safety margin for the previously operated areas. After that, the material was sent for lamina preparation using hematoxylin-eosin technique. The blocks were sagittally cut on two identical parts, obtaining 5 serial laminas with 6µm of espessure from each.

Histomorphometric Analysis

Specimen were immersed in 4% formalin and embedded in resin in according with routine histological technique. There were cut longitudinally to bone grafts and, finally, stained with hematoxylin-eosinophile solutions for light microscopy analysis. Histomorphometric analyses were reported as numbers obtained to point lineal analysis. It was measurement the mineralized tissue formation on the interface between the graft and receipt area, using 10x and 50x magnification .

Statistical Analysis

Initially, descriptive statistics were used for histological analysis referring the presence or not of blood vessel, connective tissue and mineralized tissue formation. For the 48 examined slices with histomorphometric analysis, Independent Sample t test for paired analysis was used (Biostat 5.0 software) with a 5% significance level.

RESULTS

3 WEEKS

Histological descriptive Analysis

Descriptive analyses noted on the interface in both groups the presence of connective tissue fulfilling the interface between the graft and recipient area, as well as the mineralized tissue formation and blood vessels. The recipient area and graft were well delimited as shows figure 1. Table 1 resume the 3 weeks period histological descriptive analyses.

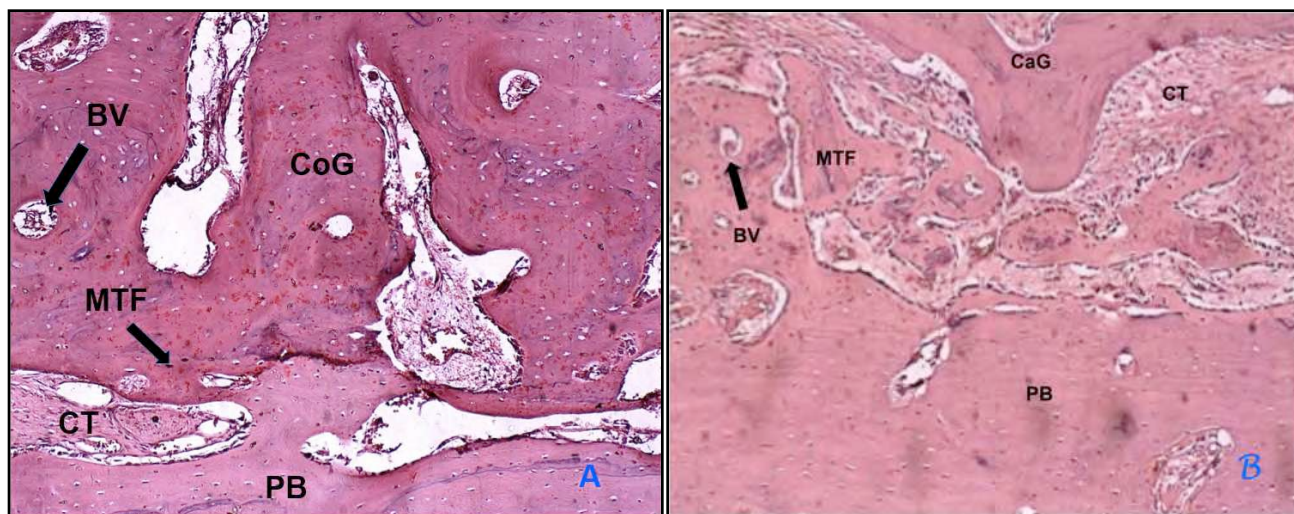


Figure 1 A-B: Histological analysis (10X) for Group I - Cortical interface (CoG) - (A) and Group II - Cancellous interface (CaG) - (B) within a 3-week period. Note that the histological analysis shows calcified material inside (MT), blood vessel (BV) and connective tissue (CT).

Table 1: Resume of descriptive histological analyses on 3 weeks period.

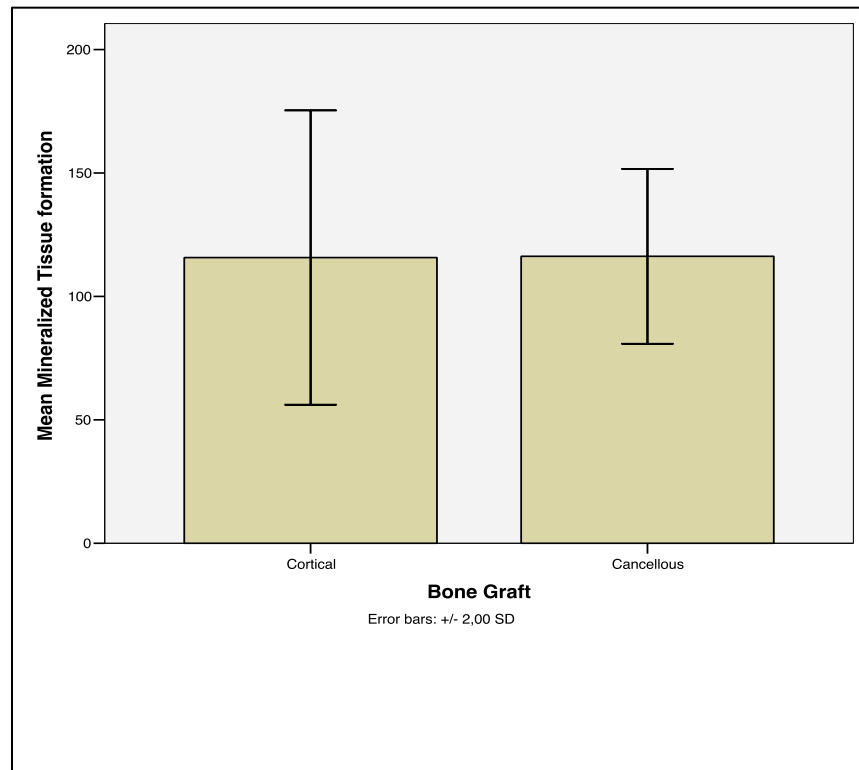
GROUP	Connective tissue	Inflammatory process	Mineralized Tissue formation	Blood vessels	Recipient area
I	Present	Absent	Present	Present	well delimited
II	Present	Absent	Present	Present	well delimited

Histomorphometric Analysis

The mean values for mineralized tissue formation on the interface graft and recipient area (MTF) for the group I, Cortical interface, was 115.75 points (± 8.603 points of standart error mean) and for the group II, Cancellous interface, was 116.25 points (± 5.113 points of standart error mean) as shows table 2. It was not observed statistically significant difference ($p= 0.961$). Mineralized tissue formation showed statistically the same results in each group. The standart deviation values for each group on 3 weeks period are presented on graphic 1.

Table 2: Cortical vs Cancellous bone interface on 3 weeks period. Note that both presented statistically the same mean mineralized tissue formation

Type of interface	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p value
Cortical	12	11.575	29.803	8.603	0. 961
Cancellous	12	11.625	17.710	5.113	



Graphic 1: Cortical and Cancellous interface standart deviation values on 3 weeks period.

6 WEEKS

Histological descriptive Analysis

Descriptive analyses noted on the interface in both groups the presence of blood vessels and less connective tissue fulfilling the interface between the graft and recipient area, being this region almost fulfilled by mineralized tissue formation. The recipient area and graft were not evidenced as shows figure 2. Table 2 resume the 6 weeks period histological descriptive analyses.

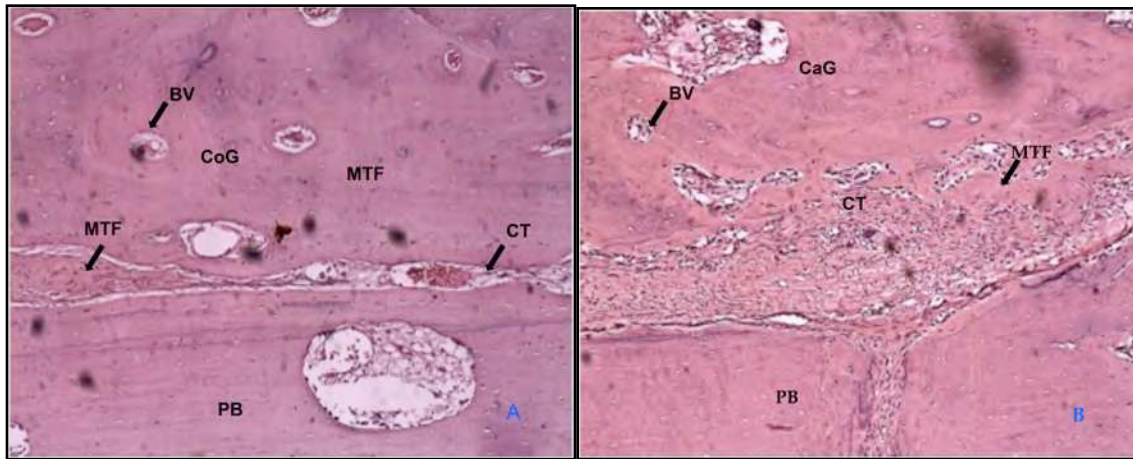


Figure 2 A-B: Histological analysis (10x) for Group I - Cortical interface (CoG) - (A) and Group II - Cancellous interface (CaG) - (B) within a 6-week period. Note that the histological analysis shows more calcified material inside (MT) than 3 weeks period, blood vessel (BV) and connective tissue (CT).

Table 3: Resume of descriptive histological analyses on 6 weeks period.

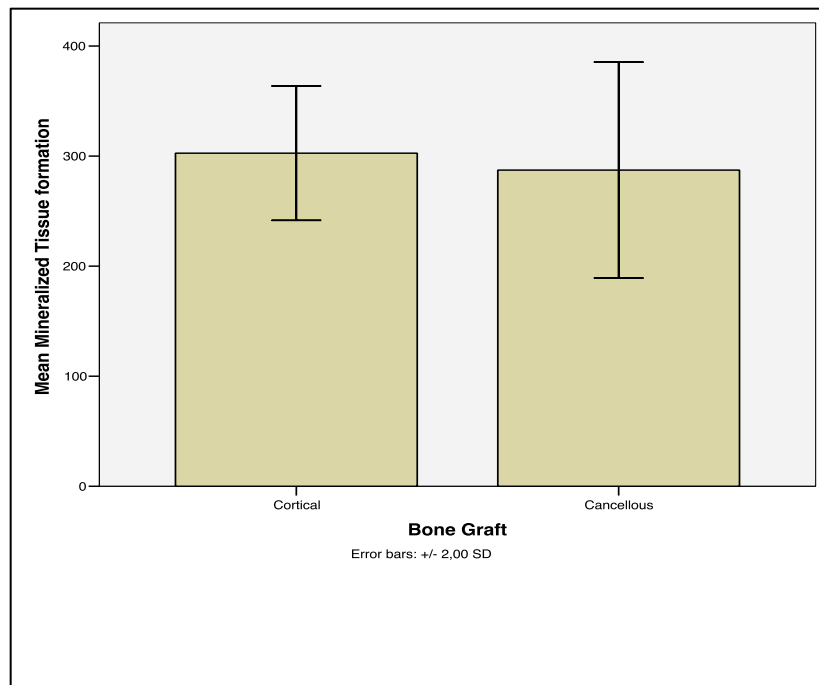
GROUP	Connective tissue	Inflammatory process	Mineralized Tissue formation	Blood vessels	Recipient area
I	Present	Absent	Present	Present	not delimited
II	Present	Absent	Present	Present	not delimited

Histomorphometric Analysis

The mean values for mineralized tissue formation on the interface graft and recipient area (MTF) for the group I, Cortical interface, was 302.67 points (± 8.808 points of standart error mean) and for the group II, Cancellous interface, was 287.25 points (± 14.158 points of standart error mean) as shows table 2. It was not observed statistically significant difference ($p= 0.365$). Mineralized tissue formation showed statistically the same results in each group. The standart deviation values for each group on 6 weeks period are presented on graphic 2.

Table 4: Cortical vs Cancellous bone interface on 6 weeks period. Note that both presented statistically the same mean mineralized tissue formation

Type of interface	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p value
Cortical	12	30.267	30.512	8.808	0.365
Cancellous	12	28.725	49.044	14.158	



Graphic 2: Cortical and Cancellous interface standart deviation values on 6 weeks period.

When analyzed the comparison between the 6 weeks and 3 weeks periods, both groups, Cortical and Cancellous interface, presented statistically significant difference ($p=0.000$) for Mineralized tissue formation as shows Table 5 and 6.

Table 5: Comparison between 3 and 6 weeks periods of group I. Note that mineralized tissue formation were statistically difference.

Cortical interface	Weeks	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p value
	3	12	11.575	29.803	8.603	0.000
	6	12	30.267	30.512	8.808	

Table 6: Comparison between 3 and 6 weeks periods of group II. Note that mineralized tissue formation were statistically difference.

	Weeks	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	p value
Cancellous interface	3	12	116.25	17.710	5.113	0.000
	6	12	287.25	49.044	14.158	

DISCUSSION

Bone graft indication for treatment of congenital or acquired deformities has increased in line with dental implant therapy (Calan *et al.*, 1993; Pallesen *et al.*, 2002). This study used autogenous bone, since this is the gold standard because of its properties of osteoconduction, osteoinduction, and osteogenesis. Also, this is the type of graft most commonly used to treat these kinds of defects (Serra e Silva *et al.*, 2006; Silva, 2006; Sverzut, 2008).

The Lag Screw technique reduces the space between the graft and recipient area (Serra e Silva *et al.*, 2006). This technique, used on the present work, reduced the gap on the interface graft-recipient area, improving the incorporation of the graft probably because it promotes a primary reparation.

Amongst the parameters for assessing graft incorporation is the presence of conjunctive tissue, blood vessels, and newly formed mineralized tissue (Franceschi *et al.*, 2005). This study observed that in the descriptive histological analysis both groups showed the same types of cells in both sacrifice periods. In both cases there was graft incorporation at the 6-week assessment, which corresponds to 2 months in human beings as described by Turner *et al.* (2001), being statistically similar.

Besides some authors noted that decorticalization of receipt area have influence on bone graft healing, improving their integration (Nunamaker, 1998 ;Issa *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008;), the present work observed that both types of interface were integrated besides any preparation of recipient area, suggesting that it does not influence on bone graft integration.

Patient-inherent factors, such as external characteristics, can influence the graft incorporation process (Issa *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). External

factors include the graft's structural characteristics (Tong *et al.*, 2000), the medullary-type showing a better repair process when compared to cortical grafts because of a greater angiogenesis. This supposedly facilitates osteoblast precursor cell migration to the graft region, thus speeding up the incorporation due to greater absorption and new mineralized connective tissue formation (Nunamaker, 1998). Despite that, this study could not observe any statistic difference between the two groups in mineralized tissue formation for both sacrifice periods. When assessing the difference between these two periods, the newly formed mineralized tissue formation was found to be statistically significant, which indicates graft incorporation in both groups. This way, it may be suggest that, when analyze the probability to relapse, both type of grafts are similar, despite some authors suggests (Nunamaker, 1998 ; Tong *et al.*, 2000).

Thus, it may be concluded that both the medullary and cortical graft morphology does not influence in bone graft incorporation on the graft-receiving area interface region when using autogenous bone grafts.

REFERENCES

Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. J Periodontol. 1993; 64: 575-82.

Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2002; 31: 469–84.

Issa MJP, Tiossi R, Pitol DL & Mello SAS. TGF- β and new bone formation. Int.J.Morphol. 2006; 24(3):399-405.

Jensen SS, Broggini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. Clin Oral Impl Res. 2006; 17: 237-43.

Wang YN, Feng CC, Liu JL, Li F, Fu L, Wang Z. [Transforming Growth Factor beta Alleviates Acute Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Murine Model.] Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2008;16(5):1135-9.

Tong L, Buchman SR. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *The Journal of Craniomaxillofacial Trauma* 2000; 6(1): 31-41.

Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S56-65.

Bhatt KA, Chang EI, Waren SM, Lin SE, Bastidas N, Ghali S *et al.*. Uniaxial Mechanical Strain: An In Vitro Correlate to Distraction Osteogenesis. *J Surg Res*. 2007; 143: 329 –36.

Kübler A, Neugebauer J, Oh J, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts in different bone graft substitutes. An in vitro study. *Implant Dentistry* 2004; 13(2): 171-9.

Serra e Silva F, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64: 931-5.

Silva FM, Cortez AL, Moreira RW, Mazzonetto R. Complications of intraoral donor site for bone grafting prior to implant placement. *Implant Dent*. 2006;15(4):420-6.

Sverzut AT, Stabile GA, de Moraes M, Mazzonetto R, Moreira RW. The influence of tobacco on early dental implant failure. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(5):1004-9.

Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. 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*. 2002;17(4):498-506.

Franceschi C. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126 (2): 351-61.

Turner AS. Animal models of osteoporosis – Necessity and limitations. *European Cells and Materials* 2001;1: 66-81.

CONCLUSÃO

No presente estudo, pode-se concluir que:

1 - Os defeitos iguais ou superiores a 8mm de diâmetro realizados em calota craniana de cães devem ser considerados como defeitos do tipo crítico;

2 - Os enxertos de partículas de osso autógeno auxiliam no processo de reparação óssea nestes defeitos;

3 - O exame radiográfico, apesar de eficaz em caso de enxertos autógenos e reparação espontânea através de coágulo sangüíneo, não serve para avaliar reparo tecidual quando se utiliza a matriz óssea bovina anorgânica como substituto ósseo.

4 - A morfologia do enxerto, medular ou cortical, não influencia no processo de incorporação na região de interface enxerto-área receptora dos enxertos ósseos de origem autógena.

REFERÊNCIAS

- Asprino L. Comparação entre substitutos ósseos de origem bovina sobre o processo de regeneração óssea guiada em defeitos perim- plantares. Análise histológica e histométrica em tíbia de cães. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2003.
- Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg 1969; 3(2): 81-100.
- Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editores. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Santos; 1996. p.31-48.
- Callan DP, Rohrer MD. Use of bovine derived hydroxiapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. J Periodontol. 1993; 64: 575-82.
- Chaves Netto HDM. Avaliação do carreador Carboxi-metil-celulose associado à matriz óssea bovina anorgânica em defeitos na calota de cães. Analise Histológica e radiológica. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2009.
- Ferrús-Torres E, Gargallo-Albiol J, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Diagnostic predictability of digital and conventional panoramic radiographs. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009; 38, 1184-7.
- Gomes LA. Implantes osseointegrados: técnica e arte. São Paulo: Santos; 2002. 278p.
- Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. Clin Oral Impl Res. 2006; 17: 237-43.
- KlÜppel LE. Influência dos diferentes tamanhos de partículas da matriz óssea bovina anorgânica no processo de reparo ósseo. Análise histológica e radiográfica de defeitos criados cirurgicamente em calvária de coelhos. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.

- Klüppel LE. Utilização de parafusos absorvíveis para fixação de enxertos ósseos autógenos. Estudo histológico em coelhos. [Tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2008.
- Link DP, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Wolke JG, Mikos AG, Jansen JA. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF-b1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials* 2008; 29: 675–82.
- Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Carol Stream: Quintessence Books; 1999. 325p.
- Mazzonetto R, Chaves Netto HDM, Nascimento FFAO, Rodrigues-Chessa JJ, Klüppel LE. Reconstruções ósseas em implantodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade. Napoleão; 2009. 368p.
- Moioli EK, Clark PA, Sumner DR, Mao JJ . Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis. *Bone* 2007;10: 1016.
- Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clin Oral Impl Res.* 2004; 15: 293–300.
- Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S56-65.
- Olate S. Análise histológica e histomorfométrica do reparo ósseo perimplantar em cães submetidos a instalação de implantes endosseos com um modelo de carga precoce em dois diferentes desenhos de implantes.[Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2009.
- Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. 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* 2002; 17(4):498-506.
- Prein. Manual of the internal fixation in Cranio-facial Eskeleton. Hardcover Springer; 1995, 750 p.
- Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Ferrari D, Sager M, Becker J. Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes biocoated with rhGDF-5 and rhBMP-2: an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19(5): 679-86.

Seibert JS. Reconstruction of deformed, partially edentulous ridges, using full thickness onlay grafts. Technique and wound healing. Compend Contin Educ Dent. 1983 4: 437-53.

Stabile GAV. Avaliação histológica da biocompatibilidade de um sistema para fixação interna baseado em polímero absorvível.[Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2007.

Tong L, Buchman SR. Facial bone grafts: contemporary science and thought. The Journal of Craniomaxillofacial Trauma 2000; 6(1): 31-41.

Turner AS. Animal models of osteoporosis – Necessity and limitations. European Cells and Materials 2001;1: 66-81.

Vance GS, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Johnston H, Scheetz JP. Comparison of an allograft in an experimental putty carrier and a bovine-derived xenograft used in ridge preservation: a clinical and histologic study in humans. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19(4): 491-7.

ANEXO

Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal

	
UNICAMP	CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

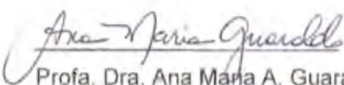
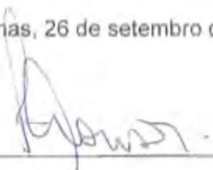
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1343-1, sobre "Estudo comparativo da influência da consistência da matriz óssea bovina em defeitos na calota de cães. Avaliação histológica e radiológica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Renato Mazzonetto / Henrique Duque de Miranda Chaves Netto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1343-1, entitled "Comparative study of the consistence of bovine bone matrix influence in defects on dog's calvarium. Histological and radiologic analyses", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.

 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
--	---

CEEA/IB – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 Telefax: (19) 3521-6356 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm
---	--