

RESUMO

BURY L. A. L. Avaliação histomorfométrica do reparo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico, preenchidos com osso bovino. Faculdade de Odontologia de Barretos. UNIFEB. 2012.

O propósito do presente estudo foi avaliar do ponto de vista histométrico o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico (DTC) criados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico e preenchidos ou não com osso bovino inorgânico. Defeitos ósseos de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro foram criados na calota craniana de 40 ratos sendo que em 20 destes os defeitos foram realizados com broca trefina (**Grupo Tr**) e nos demais, com instrumento piezoelétrico (**Grupo Pi**). Os animais de ambos os grupos foram divididos em subgrupos de 10 animais cada um que receberam os seguintes tratamentos: **Tr** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os defeitos; **Tr + Bf** – os defeitos foram preenchidos com osso bovino inorgânico e a seguir, uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os defeitos; **Pi** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os defeitos; **Pi + Bf**–

os defeitos foram preenchidos com osso bovino e uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os defeitos. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados nos períodos de 30 e 45 dias de pós-operatório. Após captura das imagens, um software de análise de imagem foi utilizado para a análise histométrica. Foi calculado a porcentagem de osso neoformado em relação a área total do defeito criado e os dados obtidos foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Aos 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa na formação de tecido ósseo, entre os grupos. O grupo **Tr** no período de 45 dias evidenciou maior formação de tecido ósseo ($37,73 \pm 15,21$) quando comparado com o grupo **Pi** ($19,87 \pm 6,47$) e **Tr + Bf** ($13,68 \pm 3,30$) aos 30 dias. Diante dos resultados concluiu-se que o defeito ósseo criado com broca trefina, preenchidos com coágulo e protegido com membrana reabsorvível foi o tratamento mais satisfatório no preenchimento ósseo entre os grupos tratados. Nenhum defeito ósseo provocado em calvária de ratos com 5 mm de diâmetro apresentou completa regeneração óssea espontânea no período final de avaliação de 45 dias.

Unitermos – Biomateriais, Piezocirurgia, Reparação de feridas, regeneração óssea, Enxerto ósseo.

ABSTRACT

BURY L. A. L. Histomorphometric evaluation of the repair in critical-size defects created in rat calvaria, performed with a burr or trephine instrument piezoelectric, filled with bovine bone. Barretos Dental School. UNIFEB. 2012.

The purpose of this study was to evaluate the point of view histometric bone repair in critical-size defects (DTC) created with a burr or trephine instrument and piezoelectric or not filled with inorganic bovine bone. Critical-size bone defects 5 mm in diameter were created in the skull 40 rats and in 20 of these defects were made with a burr trephine (Tr group) and the other, with piezoelectric instrument (PI group). The animals of both groups were divided into subgroups of 10 animals each who received the following treatments: **Tr** - the defects were filled with blood clot and a resorbable membrane was placed on defects; **Tr + Bf** - the defects were filled with inorganic bovine bone and then, a resorbable membrane was placed over on defects; **Pi** - the defects were filled with blood clot and a resorbable membrane was placed on defects; **Pi + Bf** defects were filled with bovine bone and a resorbable membrane was placed on defects. Five animals from each group

were euthanized during the periods of 30 and 45 days postoperatively. After capturing images of an image analysis software was used for histometric analysis. We calculated the percentage of new bone over the total area of the defect created and the data were analyzed statistically (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). At 30 days there was no statistically significant difference in bone tissue formation between the groups. Tr group in 45-day period showed increased formation of bone tissue (37.73 ± 15.21) compared to Pi (19.87 ± 6.47) and Tr + Bf (13.68 ± 3.30) groups to 30 days. From the results it was concluded that the bone defect created with drill trephine, filled with clot and secured with absorbable membrane was the most satisfactory bone in growth between the treated groups. No bone defect induced in rat calvaria with 5 mm in diameter showed complete spontaneous bone regeneration during the end assessment 45 days.

Key words - Biomaterials, Piezosurgery, wound repair, bone regeneration, bone graft.

1 – INTRODUÇÃO

Diferentes condições clínicas como defeitos ósseos periodontais, espessura óssea reduzida pós-exodontia, altura e espessura óssea inadequada para a instalação de implantes e cavidades ósseas resultantes de procedimentos cirúrgicos requerem o uso de procedimentos para restabelecer a arquitetura e o volume ósseo. Diferentes técnicas são apresentadas na literatura para o restabelecimento da altura e largura óssea, como uso de enxertos ósseos, uso de membranas (regeneração tecidual guiada) como ou sem o emprego de substituto ósseo, além de fatores de crescimento (Potijanyakul et al., 2010). É notório na literatura que o osso autógeno é o *“padrão ouro”* constituindo-se no material de primeira escolha. Este procedimento possui algumas limitações como a quantidade de osso obtida, a necessidade de uma segunda área cirúrgica (área doadora) e principalmente a morbidade da área doadora (Calixto et al., 2008; Potijanyakul et al., 2010) o que estimulou os profissionais a procurarem outros substitutos.

Como opção surgiu o uso de tecido ósseo obtido de indivíduos da mesma espécie. São os conhecidos enxertos homogêneos ou aloenxertos que face a diferença do perfil genético entre o doador e o receptor e o risco de transmissão de doenças

tem o seu uso ainda questionado e por estas razões é limitado rotineiramente o seu uso (Aichelmann-Reydi et al., 1998; Calixto et al. 2008). Surgiram também outras opções como o uso de tecido osso de outras espécies. Denominados de enxertos xenógenos, tem no osso bovino o seu principal representante. Além destes tem crescido nos últimos anos o interesse dos clínicos e pesquisadores pelos materiais naturais ou sintéticos, também denominados de "aloplásticos" os quais, derivados de fosfato de cálcio, tem na hidroxiapatita e fosfato tricálcio seus representantes mais utilizados

Por outro lado procedimentos cirúrgicos que requerem o corte do tecido ósseo (osteotomia / osteoplastia) são realizados em sua maioria, com instrumentos rotatórios (brocas), mecânicos (serras) e, mais recentemente foi apresentado o sistema que utiliza a piezoeletrecidade. A piezoeletrecidade foi descoberta por Pierre Currie em 1881 (Kfourri et al., 2009) e constitui-se em um fenômeno físico, específico de certos cristais, como o quartzo, que são capazes de gerar micro movimentos que levam a formação de cavitações quando aplicados sob pressão em uma superfície (Leclercq et al. 2008; Kfourri et al., 2009). Estes micro movimentos atingem a frequência de 25 a 29 kHz com uma amplitude de 60 a 210 μm possibilitando o corte seletivo do tecido mineralizado, sem danificar o tecido mole (Vercellotti et al., 2001). Embora vários

estudos clínicos comprovaram a efetividades desta técnica (Vercelotti, et al., 2001; Vercelotti et al., 2004, Robiony et al., 2004, Eggers et al., 2004, Kramer et al., 2006, Katrikova et al., 2006; Gleisal et al., 2007, Heiland et al., 2007; Labanca et al., 2008, Leclerq et al., 2008, Barone et al., 2008; Kfourri et al., 2009, Camargo-Filho, 2010, Sammartino et al., 2011, Baldir et al., 2011) inclusive na área médica (Hoigne et al., 2006) ainda são escassos e recentes os estudos que avaliaram histomorfometricamente a efetividade deste procedimento (Berengo et al., 2006, Bacci et al., 2010, Pavliková et al., 2011), o que requer a necessidade de mais estudos que avaliem comparativamente defeitos criados por brocas e com sistema piezoelétrico, principalmente quando estes estiverem preenchidos ou não com substitutos ósseos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - SUBSTITUTOS ÓSSEOS

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado especializado, dinâmico, bem vascularizado, que possui funções fisiológicas e homeostáticas (Davies, 2003). Diferentes funções são atribuídas ao tecido ósseo. Dentre estas destacam-se as funções de suporte, proteção e locomoção sendo estas influenciadas por fatores locais e sistêmicos (Katchburian & Arana, 2004).

Nos últimos anos o restabelecimento morfofuncional dos defeitos ósseos têm se constituído um dos maiores desafios não só da área periodontal como também da cirurgia maxilofacial e da implantodontia. Diferentes substitutos estão disponíveis na prática clínica e cabe ao profissional reconhecer o mais indicado. Preferencialmente, devem possuir capacidade de estimular a regeneração óssea e combinar propriedades osteogênica, osteoindutora e ou osteocondutora (Tamimi et al., 2006).

O osso autógeno constitui o material de escolha porém as limitações da sua disponibilidade na cavidade bucal tem motivado os pesquisadores a utilizarem outros substitutos ósseos (Block & Kent, 1997). Uma grande variedade de materiais homogêneos, xenógenos, sintéticos ou aloplásticos tem sido largamente

utilizados. Isto se deve à fácil obtenção e em quantidades significativas, além de não haver a necessidade de realização de uma outra área cirúrgica (Topazian et al., 1971). Dentre os diferentes biomateriais apresentados na literatura destaca-se o uso de vidro bioativo (Furlaneto et al., 2007), sulfato de cálcio (Furlaneto et al., 2007) osso seco congelado desmineralizado (DFDB) (Lim et al., 2000; Turonis et al., 2006; Kalish et al., 2008), plasma rico em plaquetas (Messora et al., 2008a, 2008b; Nagata et al., 2009); proteína morfogenética óssea recombinante humana (Pang et al., 2004); materiais cerâmicos como o fosfato de cálcio bifásico (Park et al., 2010), fosfato beta-tricálcio (Yun et al., 2010); matriz derivada de esmalte (Potijanyakul et al., 2010); hormônio da paratireóide (Yun et al., 2010); hidroxiapatita (Park et al., 2009); associação de componentes orgânicos e osso mineral bovino – PepGen P15 (Artzi et al., 2008) e o osso bovino (Matzenbacher et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Ramírez-Fernandez et al., 2011)

Dado sua importância, o osso bovino tem sido o de primeira escolha, nos últimos anos, para cirurgia maxilofacial (Ramírez-Fernandes et al., 2011). Dentre as relevâncias do uso deste biomaterial pode ser destacado a exclusão da morbidade na área doadora (autógeno), sem necessidade de segunda área cirúrgica (autógeno), a redução da antigenicidade dos aloenxertos e menor

risco de transmissão de doenças (Zasacki, 1991, Felinto, 2010) além da sua maior disponibilidade, menor custo, praticidade do armazenamento e fácil manuseio transoperatório do biomaterial (Mellonig et al., 1992; Conrad et al., 1993), apesar de necessitar de maior tempo para a regeneração óssea (Felinto, 2010).

Embora diferentes tipos de osso xenógeno tem se apresentado (bovinos e suínos), o bovino é o mais estudado, porém há ainda, a necessidade de pesquisas para oferecer maior sustentação do seu uso clínico, principalmente pesquisas que avaliem o uso do osso bovino associado com outras técnicas, como o sistema piezoelétrico.

2.2 - MODELO EXPERIMENTAL EM CALVÁRIA

Diferentes modelos experimentais tem sido apresentados na literatura para avaliar a reparação óssea de diferentes defeitos ósseos frente a diferentes biomateriais. Dentre estes modelos destaca-se o modelo de defeito ósseo criado em tíbia (Melo et al., 2005; Mendes et al., 2006; Ramírez-Fernandez et al., 2011) e alvéolo dental (Guglielmotti & Cabrini, 1985, Santos Jr & Melhado, 1990, Camargo et al., 2000, Calixto et al., 2008). Este, por ser um modelo no qual os materiais implantados interferem no reparo alveolar, tem sido pouco utilizado nos últimos anos. Mais

recentemente o modelo de defeitos ósseos criados em calvárias voltou a despertar o interesse dos pesquisadores o que pode ser avaliado pelo elevado número de pesquisas que utilizaram esta metodologia (Furlaneto et al., 2007; Messoria et al., 2008a, 2008b; Oliveira et al., 2008; Artzi et al., 2008; Kalish et al., 2008; Honma et al., 2008; Nagata et al., 2009; Park et al., 2009; Potijanyakul et al., 2010; Yun et al., 2010; Santinoni, 2012). Este modelo experimental tem se constituído um modelo adequado para avaliar técnicas de regeneração óssea na região maxilofacial (Lim et al., 2000) porém tais defeitos devem ser realizados com uma dimensão que não ocorra a regeneração óssea natural, os chamados defeitos ósseos de tamanho crítico. Por definição defeito de tamanho crítico (DTC) é um defeito que não apresenta a regeneração óssea de forma natural e espontânea; a regeneração óssea não é obtida durante o período de reparo (Schmitz & Hollinger, 1986).

O defeito de tamanho crítico criado em ratos na região crânio-mandibulo-facial permite uma avaliação *in vivo* da caracterização da resposta celular, biodegradação e biocompatibilidade de materiais de enxertos ósseos antes de serem testados em espécies diferenciadas na escala filogenética (Hollinger & Kleinschmidt, 1990) e tem se constituído em modelo atrativo para estudar o reparo ósseo.

Relatos encontrados na literatura atestam que o primeiro estudo que avaliou o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico foi descritos por Freeman Turnbull et al. (1973). Os autores realizaram defeitos ósseos em calotas craniana de ratos utilizando fresa com 2 mm de diâmetro. A partir daí houve um elevado número de pesquisas que estudaram o reparo de defeitos ósseos criados, em sua maioria, com brocas, diamantadas ou trefinas, com diferentes diâmetros como de 2 mm (Saueressing, 2005), 3,8 mm (Honma et al., 2008), 5 mm (Turonis et al. 2006; Furlaneto et al., 2007; Artzi et al., 2008; Nagata et al., 2009), 8 mm (Lim et al., 2000; Matzenbacher et al., 2003; Pang et al., 2004; Messoria et al., 2008a; Park et al., 2009; Almeida et al., 2010), 8,8 mm (Honma et al., 2008), 12 mm (Herculiani et al., 2000) e 15 mm (Nagata et al., 2009). Os resultados destes estudos comprovaram a efetividade deste modelo experimental para avaliar o reparo ósseo e a biocompatibilidade de diferentes materiais, além do que trata-se de um procedimento cirúrgico de fácil execução.

2.3 - PIEZOCIRURGIA

Procedimentos cirúrgicos que envolvem o corte do tecido ósseo tem sido realizado com diferentes instrumentos. Instrumentos como serras e brocas, podem induzir calor na área

tratada o que requer o uso associado de intensa irrigação para minimizar o aquecimento da área cirúrgica e conseqüentemente promover adequado reparo ósseo. No entanto estes instrumentos requer também do cirurgião, além de amplo conhecimento da anatomia da área cirúrgica, grande destreza e habilidade uma vez que podem provocar danos em tecidos nobres como nervos e vasos de diferente calibres.

Recentemente surgiu um novo instrumento capaz de promover o corte de tecido ósseo utilizando-se o chamado "Efeito – Piezo". Físicos franceses Jean e Marie Curie mencionaram pela primeira vez o efeito-piezo em 1880 e demonstraram que certos cristais produzem corrente elétrica sob pressão mecânica (Hoigne et al., 2006). Os cristais ao serem submetidos à pressão sofrem oscilações mecânicas com frequência capaz de promover a cavitação do tecido em decorrência da ruptura da coesão molecular de líquidos frente às ondas ultrassônicas (Leclercq et al., 2008). Ainda segundo estes autores sua indicação na prática clínica limita-se a algumas intervenções como: remoção de implantes osseointegrados, remoção de osso do sínfise mentoniana e área retromolar e lateralização do nervo alveolar inferior. Dentre as desvantagens desta metodologia destaca-se sua ineficiência e

fragilidade para cortes em tecido ósseo muito denso (Vercellotti, 2004).

Embora ainda pouco estudo, o uso do sistema piezoelétrico na prática clínica pode ser avaliado pelos vários trabalhos que atestaram a efetividade deste sistema em diferentes tipos de cirurgia (Vercellotti, 2004; Robiony et al., 2004; Gruber et al., 2005; Kramer et al., 2006; Metzger et al., 2006; Hoigne et al., 2006; Gleizal et al., 2007; Leclercq et al., 2008; Labanca et al., 2008) o que torna-o um procedimento técnico-cirúrgico confiável.

3 – PROPOSIÇÃO

Constitui propósito do presente estudo avaliar histometricamente a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvária de ratos, com broca trefina ou com instrumento piezoelétrico e preenchidos ou não com osso bovino inorgânico.

4 - MATERIAL E MÉTODO

Animais

No presente estudo foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) com peso aproximado entre 300 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Todos animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura entre 22 - 24°C e com ciclo de 12 horas de luz dia. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada uma, separados de acordo com o grupo experimental e alimentados com ração adequada e água *ad libitum*. O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Campus de Araçatuba – UNESP **(Processo 1200/2011) (Anexo 1)**

Procedimentos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com 20 animais cada um: **grupo Tr** - os animais foram submetidos à criação de defeitos de tamanho crítico na calvária com broca trefina com 5 mm de diâmetro e **grupo Pi** no qual os animais foram

submetidos à criação dos defeitos de tamanho crítico na calvária com instrumento piezoelétrico.

Criação do defeito em calvária com broca trefina - Tr

Os animais dos grupos **Tr** foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (0,7 mg/kg) associado a xylazina (0,6 mg/kg). Nos animais do grupo **Tr** após tricotomia e antissepsia da região da calota craniana dos animais, foi realizado o procedimento de criação do defeito de tamanho crítico (DTC) que seguiu o descrito por Furlaneto (2007) e Messora et al. (2008a, 2008b). Resumidamente o procedimento constou de uma incisão em formato de "U", com sua base voltada para a região anterior da calvária seguido do levantamento de um retalho de espessura total. A seguir, um defeito de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro foi criado nos ossos parietais, envolvendo a sutura sagital. O defeito foi realizado utilizando uma broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (Dentoflex Sistemas de Implante, São Paulo, SP, Brasil) acoplada a uma peça de mão em motor em baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. A seguir, foram criadas duas marcações em formato de "L" que foram preenchidas com amálgama, uma na porção posterior do defeito e outra na porção

anterior. Estas marcações, realizadas distando 2 mm da margem do defeito, serviram para localizar o centro do defeito durante o processamento laboratorial e, também, como referência para determinar a margem óssea original do defeito durante a análise histométrica (Furlaneto et al., 2007; Messori et al., 2008a, 2008b, Santinoni, 2012) (Figura 1).

Criação do defeito em calvária com instrumento Piezoelétrico - Pi

Os animais do grupo **Pi** foram anestesiados nas mesmas condições utilizadas nos animais do grupo **Tr**. Após tricotomia e anti-sepsia da região da calota craniana dos animais, foi justaposto ao tecido ósseo da calota craniana um guia cirúrgico (Fig. 2 b), fixado por intermédio de um parafuso, criado especialmente para esta finalidade o qual apresentava diâmetro interno de 5 mm criando um defeito de tamanho crítico de 5 mm de diâmetro envolvendo os ossos parietais, sutura sagital e em condições semelhantes para todos os animais. Para a osteotomia com sistema piezoelétrico foi utilizado a ponta ES009 acoplada a peça de mão do equipamento piezoelétrico (Piezosonic Esacrom, VK Driller, São Paulo, Brasil) sob irrigação abundante com solução salina estéril. A

seguir, foram criadas duas marcações em formato de “L” que foram preenchidas com amálgama, uma na porção posterior do defeito e outra na porção anterior. Estas marcações, realizadas distando 2 mm da margem do defeito, serviram para localizar o centro do defeito durante o processamento laboratorial e, também, como referência para determinar a margem óssea original do defeito durante a análise histométrica (Furlaneto et al., 2007; Messoria et al., 2008a, 2008b) (Figura 2).

Grupos e tratamentos

Os animais dos grupos **Tr** e **Pi** foram aleatoriamente divididos em dois subgrupos de 10 animais cada um, cujos defeitos criados na calvária receberam os seguintes tratamentos : **Tr** – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo e, a seguir, uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os mesmos; **Tr + Bf** – os defeitos foram preenchidos com osso bovino (Bonefill®, Bionnovation, São Paulo, Brasil) (Figura 3 e 5) e, a seguir, uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os defeitos **Pi** – os defeitos foram preenchidos somente coágulo sanguíneo e, a seguir, uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os mesmos; ; **Pi + Bf**– os defeitos foram preenchidos com osso bovino (Bonefill®,

Bionnovation, São Paulo, Brasil) e, a seguir, uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os mesmos.

O volume do biomaterial foi padronizado para todos os defeitos criados experimentalmente nos espécimes do grupo Tr + Bf e Pi + Bf de tal forma que os defeitos foram completamente preenchidos.

Em todos os espécimes foi utilizada uma membrana reabsorvível de cortical de osso bovino liofilizada (GenDerm®, Baumer, Divisão de Biomateriais, São Paulo, Brasil) (Figura 4); recortada com diâmetro superior à do defeito ósseo provocados na calvária, mantida em posição por intermédio de suturas realizadas a partir dos tecidos moles marginais.(Figura 5)

Períodos experimentais

Após os períodos de 30 e 45 dias de pós-operatórios, 5 animais de cada subgrupo experimental foram sacrificados. A eutanásia foi realizada através de dose excessiva de anestésico (Thiopental, 150 mg/kg peso corporal).

Processamento laboratorial

Após a eutanásia a área do defeito cirúrgico realizado e os tecidos moles da calota craniana de cada animal foram removidos

em um só bloco. As peças obtidas foram fixadas em formoldeído a 4% por um período mínimo de 48 horas. Após este período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 16%. Após descalcificação inicial, cada peça foi cortada no sentido longitudinal, seguindo o eixo maior da marcação de amálgama em "L" obtendo-se assim duas hemicalotas, proporcionado a obtenção de cortes histológicos no centro do defeito. Cortes transversais distantes 2 mm da margem do defeito foram realizados seguindo a marcação do eixo menor do "L. Com a realização dos cortes transversais, os espécimes tiveram uma extensão longitudinal padronizada de 9 mm correspondente a 5 mm do defeito ósseo criado e acrescido de 2 mm em cada uma das margens do defeito (Figura 6).

Concluído a descalcificação as peças foram submetidas ao trâmite laboratorial de rotina (lavadas, desidratadas, diafanizadas) e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados, com 6 μ m de espessura, os quais foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) para análise histomorfométrica.

Análise histométrica

Os cortes histológicos de cada espécime correspondentes à região central do defeito criado cirurgicamente foram analisados por um mesmo examinador cego ao experimento e calibrado anteriormente. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de câmera digital acoplada a microscópio de luz, com aumento original de 5X e transferidas para um computador. As imagens digitalizadas foram analisadas por um software (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging BmbH, 07740 Jena Germany) que permitiu a análise histométrica de todos os espécimes.

O seguinte critério foi utilizado para a análise histométrica da imagem digitalizada de acordo com Messoria et al. (2008a,2008b):

1. Delineamento da Área Total (AT) a ser analisada, correspondente à área do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada da seguinte forma: a espessura do osso original da calota foi medida à direita e à esquerda do defeito cirúrgico (2 mm de extensão em cada extremidade); essas duas extremidades de osso original da calota foram então unidas com duas linhas, uma traçada seguindo a superfície interna da calota e outra seguindo a superfície externa da mesma, reproduzindo a ligeira curvatura dessa estrutura anatômica. A Área Total (AT) foi

medida em mm² e foi considerada 100%.

2. Dentro da AT, foi delimitada a Área de Osso Neoformado (AON) nos grupos. A porcentagem de osso neoformado (AON) foi determinada empregando a fórmula:

$$\text{AON (\%)} = \text{AON} \times 100 \text{ dividido pela AT}$$

Os dados histométricos obtidos foram analisados pelo programa computacional BioEstat.

Análise estatística

O valor atribuído a AON de cada animal foi representado pela porcentagem medida obtida dos cortes histológicos examinados. Foi realizado o teste ANOVA para avaliar a significância das diferenças entre os grupos em relação à AON além do teste de Tukey, havendo diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

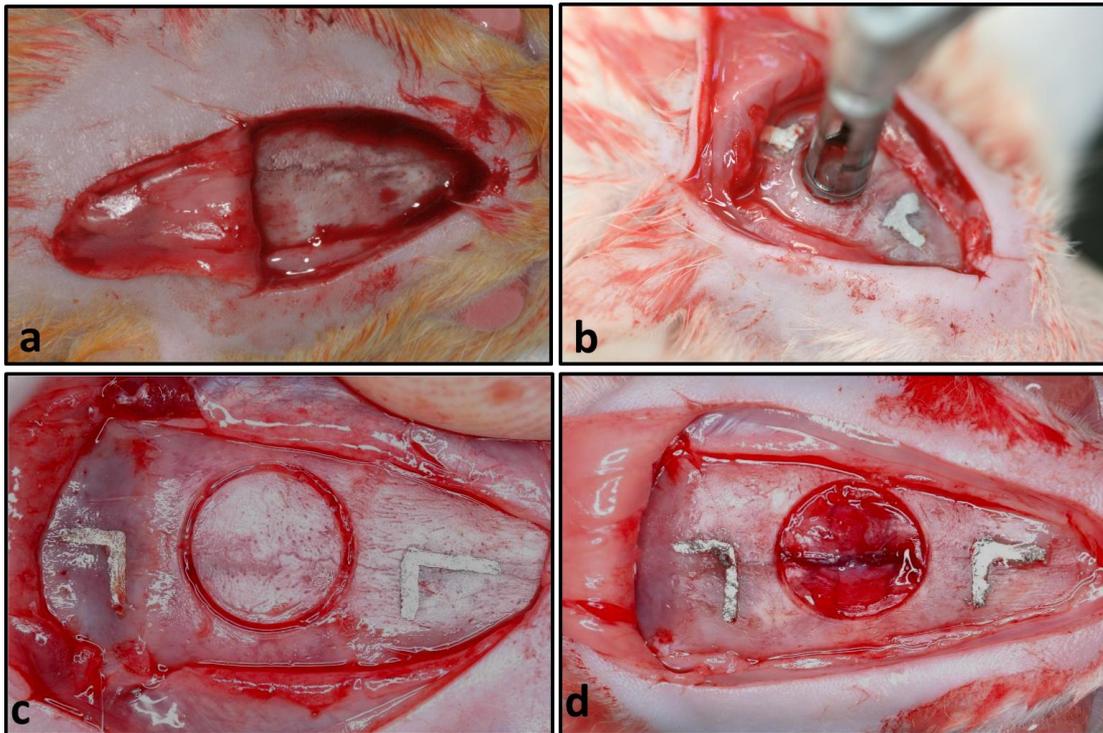


Figura 1. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico realizado com broca trefina. a) calota craniana exposta; b) broca trefina em posição; c) osteotomia realizada ; d) defeito ósseo criado.

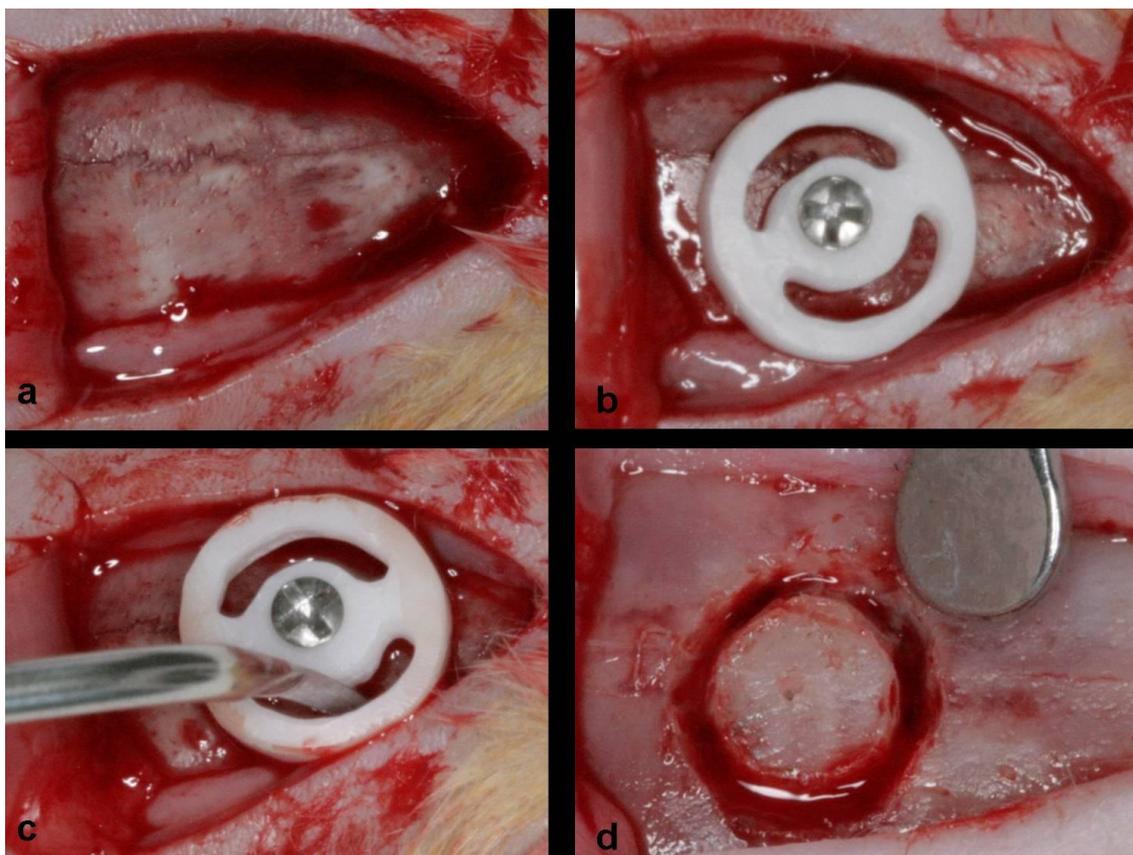


Figura 2. Procedimento cirúrgico para criação de defeito de tamanho crítico com instrumento piezoelétrico. a) calota craniana exposta; b) padrão cirúrgico fixado na calota craniana; c) ponta do instrumento piezoelétrico em posição para corte; d) osteotomia realizado.



Figura 3. Osso bovino inorgânico granulado (Bonefill®)

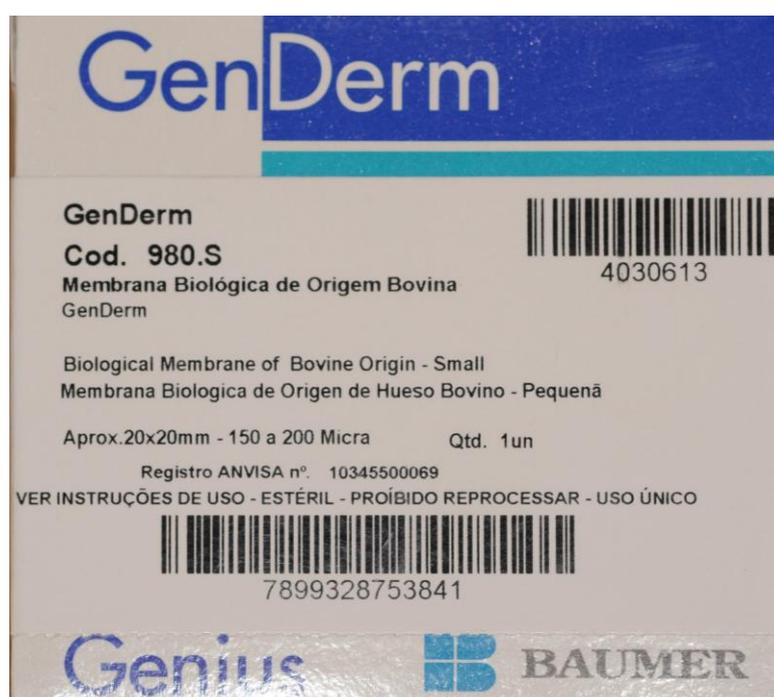


Figura 4. Membrana de cortical de osso bovino

utilizada (GenDerm®)

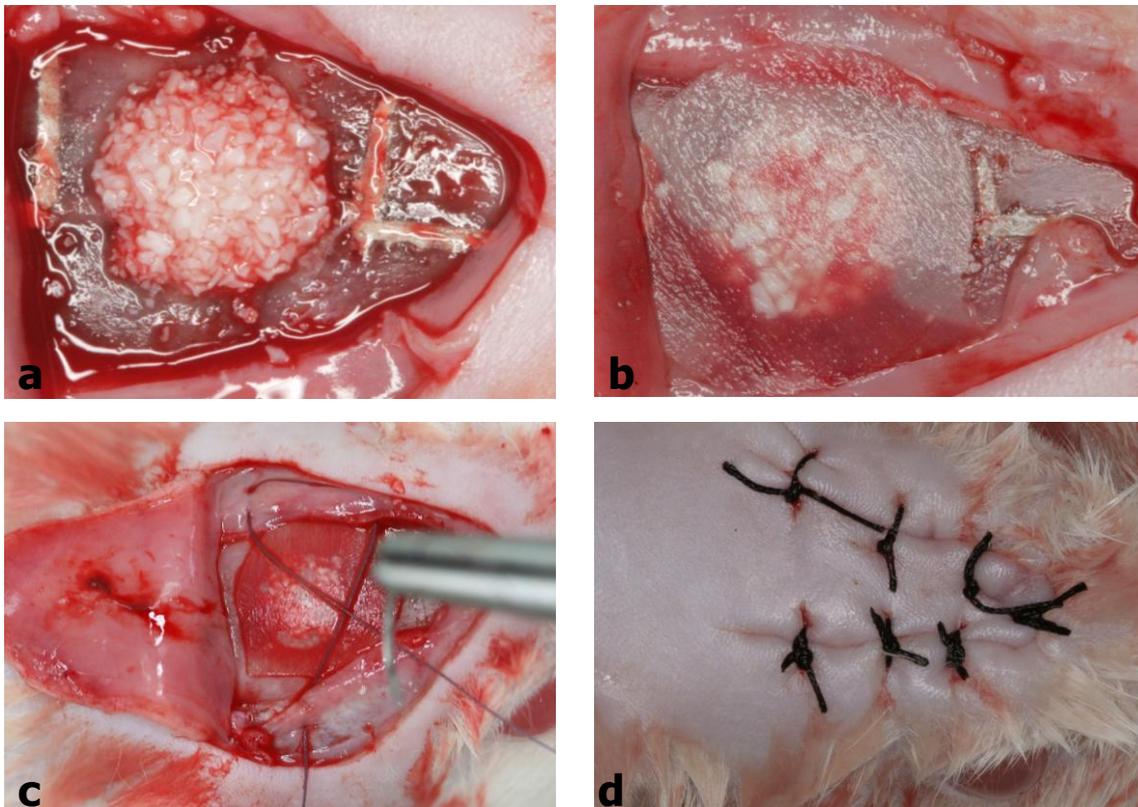
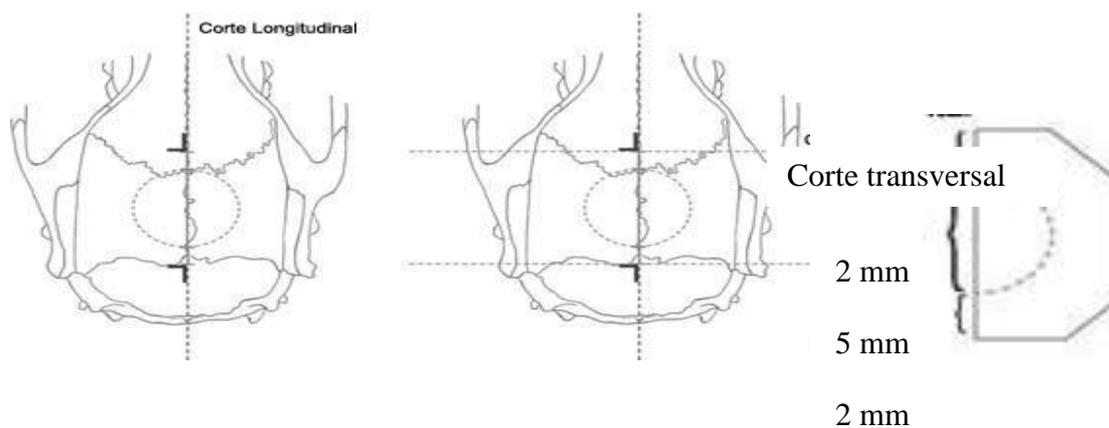


Figura 5. Preenchimento do defeito ósseo de tamanho crítico com osso bovino. a) defeito ósseo preenchido com o biomaterial; b) Membrana de cortical de osso bovino em posição; c) sutura compressiva a partir das bordas do tecido mole; d) retalho posicionado mantido com suturas.



Modificado de Furlaneto et al., (2007); Messora et al., (2008a,2008b)

Figura 6. Recorte da peça anatômica. Corte longitudinal e transversal realizados nas peças da calota craniana dos animais após descalcificação inicial.

5 – RESULTADO

Análise histométrica

As lâminas obtidas foram avaliadas para serem selecionadas para a análise histométrica. Algumas destas estavam insatisfatórias para a análise e foram descartadas o que reduziu para quatro o número de amostras de animais por grupo/período. A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Boiostat Windows 1995 Sonopress. Industria Brasileira, Manaus, AM, Brasil).

Os dados foram avaliados quanto a normalidade e a homogeneidade das variâncias. As médias e desvios padrão da quantidade de novo osso formado foram descritos em porcentagem de área de osso neoformado (% AON) para cada grupo em cada período, bem como a análise comparativa entre os grupos nos períodos de 30 e 45 dias de pós-operatório foram realizadas e estão representados na Tabela 1.

Os dados obtidos evidenciaram que houve maior formação de osso nos espécimes dos grupos **Tr** aos 45 de pós-operatório ($37,73 \pm 15,21$). Neste grupo os defeitos foram criados com broca

trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo e cobertos por membrana reabsorvível.

Na análise inter-grupos foi observado que houve diferença estatisticamente significativa entre os espécimes do grupo **Tr** ($37,73 \pm 15,21$) no período de 45 dias quando comparado com os do grupo **Pi** ($14,26 \pm 3,88$) e os do grupo **Tr + Bf** ($13,68 \pm 3,30$) nos períodos de 30 dias. Estes achados demonstraram que os defeitos criados com trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo e cobertos com membrana, ou com sistema piezoelétrico, preenchidos com biomaterial (Bonafill®) e membrana, induziram menor formação óssea aos 30 dias que os espécimes cujos defeitos foram criados com broca trefina, preenchidos com coágulo e coberto com membrana no período de 45 dias. No final do experimento nenhum DTC evidenciou completa formação de tecido ósseo (Figura 7).

Tabela 1 - Média e Desvio padrão (M±DP) dos dados histométricos descritos em porcentagem de área de osso neoformado (% AON) nas calotas cranianas de ratos, de acordo com cada grupo (Tr, Pi, Tr + Bf, Pi + Bf) nos períodos de 30 e 45 dias.

Grupos		
Períodos/Dias	30 DIAS	45 DIAS
Tratamentos		
Tr	19,87±6,47	37,73±15,21
Pi	14,26±3,88 ⁺	23,60±14,45
Tr + Bf	13,68±3,30 ⁺	18,46±2,28
Pi + Bf	19,03±4,62	23,69±15,59
N	16	16

⁺ Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com o Grupo Tr aos 45 dias – Análise de Variância a dois critérios - ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey.

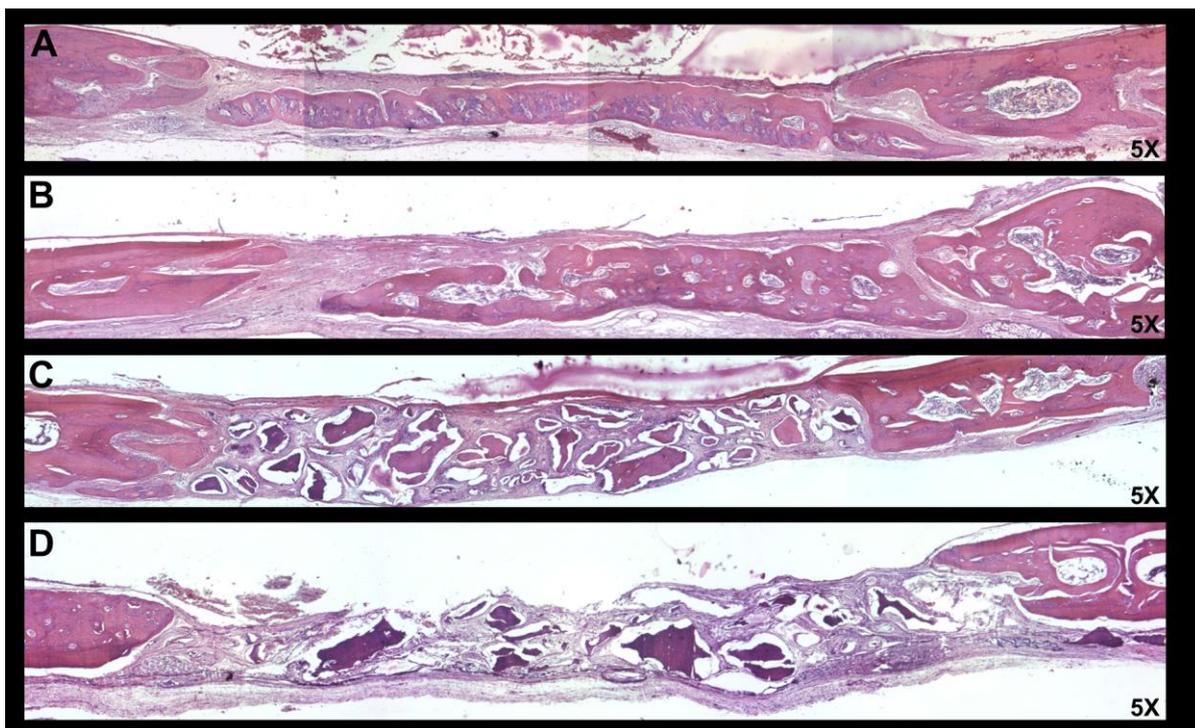


Figura 7. Vista panorâmica dos defeitos em calvária de ratos. 45 dias.

A – Grupo trefina (Tr); **B** – Grupo Piezoelectrico (Pi); **C** – Grupo Trefina e biomaterial (Tr + Bf); **D** – Grupo Piezoelectrico mais biomaterial (Pi + Bf).

Aumento original 5 X.

6 – DISCUSSÃO

O uso de animais em pesquisas experimentais contribuiu significativamente para o desenvolvimento de pesquisas em condições próximas às encontradas em humanos. Por ser de fácil obtenção e em larga escala o rato tem sido o animal mais utilizado. Defeitos de tamanho crítico (DTC) podem ser definidos como aqueles que não ocorre a regeneração completa, espontaneamente e segundo Melcer (1969) defeitos provocados no osso parietal de ratos não reparam com tecido ósseo em condições normais. Há evidências na literatura que este tipo de defeito ósseo pode ser reparado quando o substituto ósseo utilizado for o adequado (Santinoni, 2012). Proposto inicialmente por Frieman & Turnbull (1973) o modelo em calvária de ratos tem sido muito utilizada por ser realizado em uma área anatômica de reduzido stress mecânico com estabilidade das estruturas vizinhas, que permite avaliar a interação do novo osso formado com o osso original (Mankani et al., 2006).

No presente estudo os defeitos – DTC foram criados cirurgicamente de duas diferentes formas: broca trefina e instrumento piezoelétrico, todos com 5 mm de diâmetro e os

defeitos cirúrgicos criados receberam preenchimento ou não com osso bovino inorgânico granulado.

Na análise dos resultados obtidos observa-se histometricamente que nenhum dos defeitos ósseos provocados em calvária de ratos de todos os grupos (Tr, Pi, Tr + Bf e Pi + Bf) e em ambos períodos analisados (30 e 45 dias) apresentaram completa formação óssea (Tabela 1, Figura 7). Pode ser observado que houve formação óssea significativa nos espécimes do grupo **Tr** no período de 45 dias. Estes fatos provavelmente possa estar associados a diferentes condições como : tamanho do defeito, reduzido suprimento sanguíneo e elementos celulares da área, o período de avaliação e até mesmo o uso da membrana.

Estudos demonstraram que a reparação de defeitos ósseos depende do seu tamanho. Honna et al., (2007) avaliaram regeneração óssea em defeitos ósseos de 3.8 mm e 8.8 mm, em períodos que variaram de 1 a 36 semanas. Observaram que os defeitos menores demonstraram completa formação óssea e que os defeitos maiores não havia a reparação óssea completa, evidenciando a presença de tecido conjuntivo fibroso nas áreas não reparadas. Acrescentaram ainda que a formação do tecido ósseo cessa após 24 semanas independente do tamanho do defeito.

Acreditamos ainda que o período de avaliação de 30 dias constitui um período precoce para este tipo de avaliação biológica, principalmente quando biomateriais de enxertia são empregados em defeitos de tamanho crítico. Na literatura observa-se diferentes períodos de avaliação deste tipo de defeito, sendo encontrado avaliação a partir de 1, 2, 3, 4, 8 e 12 semanas (Freeman & Turnbull, 1973), 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24 e 36 semanas (Honma et al., 2008), 4 e 12 semanas (Furlaneto et al., 2007; Messoria et al., 2008a), 6 e 12 semanas (Park et al., 2009), 6, 13, 26 e 52 semanas (Schliephake et al., 2004), 8 e 16 semanas (Costa et al., 2010), 8 semanas (Matzenbacher et al., 2003), 12 semanas (Artzi et al., 2008), 30 dias (Nagata et al., 2009), 7, 14, 21, 30 e 90 dias (Oliveira et al., 2008), 10, 20 e 30 dias (Mendes et al., 2006), 180 dias (Almeida et al., 2010) o que evidencia a ausência de uma padronização quanto ao período ideal para a avaliação.

Considerando que os resultados obtidos nos períodos de 30 e 45 dias nos espécimes dos grupos Tr + Bf ($13,68 \pm 3,30$), ($18,46 \pm 2,28$) e grupo Pi + Bf ($19,03 \pm 4,62$), ($23,69 \pm 15,59$) respectivamente, observa-se que provavelmente, o biomaterial não foi completamente reabsorvido e conseqüentemente não foi capaz de induzir significativa formação de novo osso. No entanto os dados

conferem evidências de formação óssea mais diferenciada no período maior de avaliação (45 dias) entre os espécimes do grupo Tr + Bf ($18,46 \pm 2,28$) e o grupo Pi + Bf ($23,69 \pm 15,59$).

Os resultados obtidos nos espécimes dos grupos **Tr** aos 45 dias ($37,73 \pm 15,21$) fortalecem ainda mais o papel importante que o coágulo sanguíneo desempenha no processo de regeneração óssea, principalmente quando protegido de infecção e de infiltração de tecidos no interior da cavidade cirúrgica pelo uso de barreira biológica, conforme foi proposto por Dahlin et al., (1988) e Nyman et al., (1993) com o objetivo de impedir a infiltração de tecido conjuntivo ou epitélio na área do defeito promovendo, conseqüentemente, condições favoráveis para uma boa regeneração óssea (Lim et al. 2000), embora há de ser considerado também, o importante papel do perióstio na regeneração óssea (Cunha et al., 2007). No presente estudo foi utilizado esta membrana baseado nos estudos de Herculiani et al. (2000) que avaliaram o reparo ósseo de DTC de 12 mm de diâmetro provocados em calvária de cobaias cujos defeitos em um dos grupos, foram protegidos com membrana de cortical de osso bovino (Gen-derm). Os autores observaram que o grupo recoberto somente com a membrana apresentou crescimento ósseo

significativo nas bordas do defeito, atingindo após 6 meses, 52% da área da lesão ocupada por tecido ósseo. Demonstraram ainda que o uso de membrana associado ao enxerto ósseo bovino mostrou, segundo os autores, ser uma alternativa viável no tratamento de defeitos ósseos perenes de menores dimensões.

Outro fato que merece a atenção é que os defeitos de tamanho crítico encontrados nas diferentes pesquisas da literatura foram criados, em sua maioria, com brocas com diâmetro variável a partir de 2 mm (Saueressing, 2005), 3,8 mm (Honma et al., 2008), 5 mm (Turonis et al. 2006; Furlaneto et al., 2007; Artzi et al., 2008; Nagata et al., 2009), 8 mm (Lim et al., 2000; Matzenbacher et al., 2003; Pang et al., 2004; Messoria et al., 2008; Park et al., 2009; Almeida et al., 2010), 8,8 mm (Honma et al., 2008) e até de 15 mm (Nagata et al., 2009). Não há um consenso no tamanho ideal do defeito crítico. Utilizamos no presente estudo DTC com 5 mm de diâmetro por este ser considerado de tamanho crítico por vários autores (Artzi et al., 2008, Aalami et al., 2004) e por ter sido utilizado por vários pesquisadores para avaliar diferentes biomateriais (Schmitz & Holinger, 1986, Hollinger & Kleinschmidt, 1990, Turonis et al. 2006; Furlaneto et al., 2007; Nagata et al., 2009).

Por outro lado não é comum na literatura pesquisas que avaliaram a resposta óssea frente a defeitos criados com instrumento piezoelétrico em DTC preenchidos ou não com substitutos ósseos. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tamanho do defeito utilizado no presente estudo, de 5 mm de diâmetro, foi um defeito que não demonstrou regeneração espontânea e que sua criação quer com o uso de broca trefina ou com instrumento piezoelétrico não comprometeram os eventos biológicos da regeneração óssea.

7 – CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, com a metodologia utilizada no presente estudo, pode ser concluído que:

- 1) Nenhum defeito ósseo (DTC) provocado em calvária de ratos com 5 mm de diâmetro apresentou completa regeneração óssea espontânea;
- 2) Os defeitos ósseos criados com broca trefina, preenchidos com coágulo sanguíneo e membrana de cortical de osso bovino, demonstraram maior formação óssea que os demais grupos, no período de 45 dias.
- 3) Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de novo osso formado nos defeitos criados com broca trefina ou com sistema piezoelétrico, entre os grupos no período de 30 dias.

8 - REFERÊNCIAS*

1. AALAMI OO, NACAMULI RP, LENTON KA, COWAN CM, FANG TD, FOND KD, SHI YY, SONG HM, SAHAR DE, LONGAHER MT. Application of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg* 2004;**114**:713-720.
2. AICHELMANN-REIDY ME, YUKNA RA. Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dent Clin North Am* 1998;**42**:491-503.
3. ALMEIDA JM, SANTOS MR, FERNANDES, L.A., THEODORO, L.H., GARCIA, V.G. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímero de mamona. *Rev Odont Araçatuba* 2010;**31**:22-27.
4. ARTZI Z, KOOZLOVSKY A, NEMCOVSKY CE, MOSES O, TAL H, ROHRER MD, PRASAD HS, WEINREB M. Histomorphometric evaluation of natural mineral combined with synthetic cell-binding peptide (P-15) in critical-size defects in the rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implant* 2008;**23**:1063–1070.
5. BACCI C, LUCCHIARI N, VALENTE M, BARBERA MD, FRIGO AC, BERENGO M. Intra-oral bone harvesting : two methods compared using histological and histomorphometric assessments. *Clin Oral Impl Res* 2011;**22**:600-605.
6. BALD D, MENINI M, PERA F, RAVERA G, PERA P. Sinus floor elevation using osteotomes or piezoelectric surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;**40**:497-503.
7. BARONE A, SANTINI S, MARCONCINI S, GIACOMELLE L. Osteotomy and membrane elevation during the maxillary sinus augmentation procedure. A comparative study: piezoelectric device vs. conventional rotative instruments. *Clin Oral Implants Res* 2008;**19**:511-515.

* Elaborada segundo Norma Vancouver

8. BERENGO M, BACCI C, SARTORI M, PERINI A, BARBERA MD, VALENTE M. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol* 2006;**55**:189-198.
9. BLOCK MS, KENT JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of augmentation bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;**55**:1281-1286.
10. CALIXTO RFE, TEÓFILO JM, BRENTGANI LG, LAMANO T. Comparison of rat bone healing following intra-alveolar grafting with organic or inorganic bovine bone particles. *Braz J Oral Sci* 2008;**7**:1512-1519.
11. CAMARGO PM, LEKOVIC V, WEINLAENDER M, KLOKKEVOLD PR, KENNEY EB, DIMITRIJEVIC B. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontias. *Oral Sur oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;**90**:581-586.
12. CAMARGO FILHO GP. Estudo comparativo de duas técnicas de enxerto autógeno utilizando piezocirurgia para levantamento de seio maxilar. 2010. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de São Paulo. USP. 61p.
13. CONRAD EU, ERICKSEN DP, TENCER AF, STRONG DM, MACKENZIE AP. The effects of freeze- drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop* 1993;**290**:279-284.
14. COSTA AM, KOBAYASHI GS, BUENO DF, MARTINS MT, FERREIRA M, PASSOS-BUENO MR, ALONSO N. An experimental model for the study of craniofacial deformities. *Acta Cir Bras* (Serial on the Internet) 2010;**25**.
15. DAHLIN C, LINDE A, GOTTLAW J. Healing of bone defect by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;**81**:672-676.
16. DAVIES JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;**67**:932-949.
17. EGGERS G, KLEIN J, BLANK J. Piezosurgery: An ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004;**42**:451-456

18. FELINTO KCA. Uso de enxerto ósseo bovino liofilizado na regeneração óssea Guiada (ROG). Revisão da literatura e relato de caso. 2010. Monografia (Graduação) – UFPB/CCS. 60p.
19. FOWLER EB, CUENIN MF, HOKETT SD. Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials : study in rat calvaria defects. *J Periodotol* 2002;**73**:191-197.
20. FRAME, J.W. Animal research: the experimental model. *Brit J Oral Maxillofac Surg* 1984;**22**:341-348.
21. FREEMAN E, TURNBULL RS. The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont Res* 1973;**8**:229-236.
22. FURLANETO FAC, NAGATA MJH, FUCINI SE, DELIBERADOR TM, OKAMOTO T, MESSORA MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulphate: a histologic and histometric study in rat calvária. *Clin Oral Impl Res* 2007;**18**:311-318.
23. GLEISAL A, BE, BERA JC, LAVANDIER B, BEZIAT JL. Piezoelectric osteotomy: a new technique for bone surgery - advantages in craniofacial surgery. *Child Nerv Syst* 2007;**23**:509-513.
24. GRUBER, R.M., KRAMER, F.J., MERTEN, H.A, SCHLIEPHAKE, H. Ultrasonic surgery: an lternative way in orthognatic surgery of the mandibule. A pilot study. *Int j Oral maxillofac Surg* 2005;**34**:590-593.
25. GUGLIELMOTTI, M.B., CABRINI, R.L. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985;**43**:359-364.
26. HEILAND, M., BLESSMAN, M., POHLENZ, P., LI, L., SCHMELZLE, R., BLAKE, F. Intraoral ostotomies using piezosurgery for distraction in an infant with Pierre-Robin sequence. *Clin Oral Investig* 2007;**11**:303-306.
27. HERCULIANI PP, CESTARI TM, TAGA EM, TAGA, R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. *Rev Bras Implant* 2000;**4-6**:7-14.

28. HOIGNE DJ, STUBINGER S, KAENEL OV, SHAMDASAN S., HASENBOEHLER P. Piezoelectric osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique. *BMC Musc Dis* 2006;**7**:1-4.
29. HOLLINGER JO, KLEINSCHMIDT JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;**1**:60-68.
30. HONMA T, ITAGAKI T, NAKAMURA M, KAMAKURA S, TAKAHASHI I, ECHIGO S, SASANO Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis* 2008;**14**:457-464.
31. KALISH BP, SCHUSTER GS, PEACOCK ME, CUENIN MF, SWIEC GD, POTTER BJ, BUXTON TB, McPHERSON III JC. Influence of matrix-suspended demineralized bone on osseous repair using a critical-sized defect in the rat (*Rattus norvegicus*) calvarium. *J Oral Impl* 2008;**34**:83-89
32. KATCHBURIAN E, ARANA V. Histologia e embriologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2004.
33. KATRIKOWA B, WIRTZ R, KREMPIEN R, BLANK J, EGGERS G. Piezosurgery: a new safe technique in cranial osteoplasty? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;**35**:461-465.
34. KFOURI FA, DUALIBI MT, BRETOS JLG, FERREIRA LM, DUALIBI SE. Cirurgia piezoelétrica em implantodontia: aplicações clínicas. *RGO* 2009;**57**:121-126.
35. KRAMER FJ, LUDWING HC, MATERNA T, GRUBER R, MERTEN HA, SCHILIEPHAKE H. Piezoelectric osteotomies in craniofacial procedures: a series of 15 pediatric patients. *J Neurosurg* 2006;**104**(suppl):68-71.
36. LABANCA M, AZZOLA F, VINCI R, RODELLA LF. Piezoelectric surgery: twenty years of use. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;**46**:265-269
37. LECLERCQ P, ZENATI C, DOBAN DM. Ultrasonic bone cut. Part 2: State-of-art specific clinical applications. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;**66**:183-188.

38. LIM SC, LEE MJ, YEO HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Path Intern* 2000;**50**:594-602.
39. MANKANI MH, KUZNETSOV SA, WOLFE RM, MARSHALL GW, ROBEY PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells* 2006;**24**:2140-2149.
40. MATZENBACHER SA, MAILHOT JM, McPHERSON JC, CUENIN MF, HOKETT SD, SHARAWY M, PEACOCK ME. In vivo effectiveness of a glycerol-compounded demineralized freeze-dried bone xenograft in the rat calvarium. *J Periodontol* 2003;**74**:1641-1646.
41. MELCER AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch oral Biol* 1969;**14**:1101-1109.
42. MELLO LG, NAGATA MJH, BOSCO AF, RIBEIRO LL, LEITE, CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin oral Implants Res* 2005;**16**:683-691.
43. MELLONIG JT, PREWETT AB, MOYER MP. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 1992;**63**:979-983.
44. MENDES SM, FONSECA CE, BASSI APF, PONZONI D, CARVALHO PSP. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso desmineralizado ou por osso composto com ou sem proteína morfogenética do osso (BMP). *Rev Odont Araçatuba* 2006;**27**:34-40.
45. MESSORA MR, NAGATA MJH, DORNELLES RCM, BONFIM SRM, FURLANETO FAC, de MELO, LGN, DELIBERADOR TM, BOSCO AF, GARCIA VG, FUCINI SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008a;**43**:723-729.
46. MESSORA MR, NAGATA MJH, MARIANO RC, DORNELLES RCM, BONFIM SRM, FUCINI SE, GARCIA VG, BOSCO AF. Bone healing

- in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008;**43**:217-223.
47. METZGER MC, BORMANN KH, SCHOEN R, GELLRICH NC. Inferior alveolar nerve transposition. An in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. *J Oral Implantol* 2006;**32**:19-25.
 48. NAGATA MJH, MELO LGN, MESSORA MR, BONFIM SRM, FUCINI SE, GARCIA VG, BOSCO AF, OKAMOTO T. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009a;**36**:775-783.
 49. NAGATA MJH, MESSORA MR, POLA N, CAMPOS N, VIERIA R, ESPER LA, SBRANA M, FUCINI SE, GARCIA VG, BOSCO AF. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res* 2009b;**9**:1-6.
 50. NYMAN S, KARRING T, GOTTLOW J, LAURELL L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontology 2000* 1993;**1**:26-35.
 51. OLIVEIRA RC, OLIVEIRA FHG, CESTARI TM, TAGA R, GRANJEIRO JM. Morphometric evaluation of repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Impl Res* 2008;**19**:749-754.
 52. PANG EK, IM SU, KIM CS, CHOI SH, CHAI JK, KIM CK, HAN SB, CHO KS. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2004;**75**:1364-1370.
 53. PARK JW, KIM ES, JANG JH, SUH JY, PARK KB, HANAWA T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Impl Res* 2010;**21**:268-276.
 54. PARK JW, JANG JH, BAE SR, AN CH, SUH JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Impl Res* 2009;**20**:372-378.

55. PAVLIKOVÁ G, FOLTÁN R, BURIAN M, HORKÁ E, ADÁMEK S, HEJCL A, HANZELKA T, SEDÝ J. Piezosurgery prevents brain tissue damage: an experimental study on a new rat model. *Int J Maxillofac Surg* 2011;**40**:840-844.
56. POTIJANIAKUL P, SATTAYASANSAKUL W, PONGPANICH S, LEEPONG N, KINTARAK S. Effects of enamel matrix derivate on bioactive glass in rat calvarium defects. *J Oral Impl* 2010;**36**:195-204.
57. RAMÍREZ-FERNÁNDEZ MP, CALVO-GUIRADO JL, DELGADO-RUIZ RA, del VAL JEMS, GÓMEZ-MORENO G, GUARDIA J. Experimental modelo of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon®): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Impl Res* 2011;**22**:727-734.
58. ROBIONY M, POLINI F, COSTA F, VERCELOTTI T, POLITI M. Piezoeletric bone cutting in multipiece maxillary osteotomies. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;**62**:759-761.
59. SAMMARTINO G, TROSINO O, DILAURO AE, AMATO M, CIOFFI A. Use of piezosurgery device in manegement of surgical dental implant complication: a case report. *Impl Dent* 2011;**20**: DOI: 10.197/ID.0b013e31820fb2da
60. SANTINONI CS. Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia. Araçatuba. 2012.
61. SANTOS Jr, P.V., MELHADO, R.M. Efeito da estimulação ultra-sônica sobre o processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odont UNESP* 1990;**19**:291-299.
62. SCHLIEPHAKE H, TAVASSOL F, GELINSKY M, DARD M, SEWING A, POMPE W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Impl Res* 2004;**15**:112-118.

63. SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthopedics Related Res* 1986;**205**:299-308.
64. SAUERESSIG F. Avaliação microscopia do processo de reparo ósseo na presença de enxerto ósseo humano liofilizado mineralizado e desmineralizado e membrana de cortical bovina em calota craniana de ratos. Dissertação (Mestrado) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005. 122p.
65. TAMIMI FN, TORRES J, CLEMENTE C, LÓPES-CABARCOS E, BLANCO LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio_Oss and B-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;**33**:922-928.
66. TOPAZIAN RG, HAMMER WB, BOUCHER LJ, HULBERT SF. Use of alloplastic for ridge augmentation. *J Oral Surg* 1971;**29**:792-798.
67. TURONIS JW, McPHERSON JC, CUENIN MF, HOKETT SD, PEACOCK ME, SHARAWY M. The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical- sized defect in the rattus norvegicus calvarium. *J Oral Implant* 2006;**3**:55-62.
68. VERCELLOTTI T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol* 2004;**53**:207-214.
69. VERCELLOTTI T, CROVACE A, PALERMO A. The piezoelectric osteotomy in orthopedics: clinical and histological evaluations (pilot study in animals) *Med J Surg Med* 2001;**9**:89
70. YUN JI, WIKESJO UME, BORKE JL, BISCH FC, LEWIS JE, HEROLD RW, SWIEC GD, WOOD JC, McPHERSON III JC. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a B-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvária defect model. *J Clin Periodontol* 2010;**37**:419-426.
71. ZASACKI W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopaedic surgery. *Clin Orthop Relat Res* 1991;**272**:82-87.

9 – ANEXOS

9.1. COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO EM DEFEITOS DO TAMANHO CRÍTICO CRIADOS EM CALVÁRIA DE RATOS, REALIZADOS COM BROCA TREFINA OU INSTRUMENTO PIEZOELÉTRICO, PREENCHIDOS COM OSSO BOVINO"* sob responsabilidade do(a) *Pesquisador(a) Valdir Gouveia Garcia* e o colaborador **Luis Augusto Lordêlo Bury** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela CEUA em 01/07/2011 de acordo com o Processo 1200/2011.

Araçatuba, 04 de Julho de 2011


João Eduardo Gomes Filho
Presidente da CEUA

FAC/wbm.

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

9.2 – AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DESTE TRABALHO

AUTORIZO a reprodução total ou parcial deste trabalho,
desde que seja citada a fonte.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Barretos abril de 2012.

Luis Augusto Lordêlo Bury

Períodos de avaliação de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.