



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Daniel Deluiz Martins

**Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução
alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise
tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e
remodelação**

Rio de Janeiro

2016

Daniel Deluiz Martins

Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e remodelação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco
Prof. Dr. Paul Christian Schiller

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

M386 Martins, Daniel Deluiz.
Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e remodelação / Daniel Deluiz Martins. - 2016.
54 f.

Orientadores: Eduardo Muniz Barretto Tinoco.
Paul Christian Schiller.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Transplante ósseo. 2. Transplante homólogo. 3. Aumento do rebordo alveolar. I. Tinoco, Eduardo Muniz Barreto. II. Schiller, Paul Christian. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Enfermagem. IV. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniel Deluiz Martins

Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e remodelação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em 04 de fevereiro de 2016.

Orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Paul Christian Schiller
University of Miami

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Danilo Passeado Branco Ribeiro
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Fabio Ramoa Pires
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Luciano Santos Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ingo Riederer
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

À minha mulher, Isabel, meu grande amor e minha incondicional companheira, pela compreensão, dedicação e por sempre me apoiar e me acompanhar nessa difícil jornada.

Às minhas filhas, Helena e Antônia, por me darem a felicidade apaixonante de ser pai.

À minha mãe, Lucia, pelo amor, pela dedicação de uma vida inteira e por ser o meu exemplo a seguir na profissão e na vida.

AGRADECIMENTOS

A Eduardo Muniz Barretto Tinoco – meu orientador, pelos ensinamentos, pelas oportunidades oferecidas, intensa dedicação e grande amizade durante estes anos de trabalho juntos.

A Paul Christian Schiller – meu orientador externo, pela amizade, por ter me recebido e acolhido em seu laboratório, e pela confiança para desenvolver este projeto em colaboração.

A Gianluca D'Ippolito e Gaëtan Delcroix – colaboradores, por fazerem a estada em um laboratório de biologia molecular no exterior uma experiência única, produtiva e prazerosa.

A Luciano Santos Oliveira – colaborador, pela dedicação, amizade e contribuição neste difícil trabalho de pesquisa.

A Fábio Ramoa Pires – colaborador, pela imprescindível participação, disponibilidade e empenho neste trabalho.

A equipe de professores e alunos do Instituto de Odontologia PUC-Rio – pelo apoio e colaboração neste projeto.

A Neise Deluiz – minha tia, segunda mãe e grande incentivadora, por ter sempre me guiado no caminho da pesquisa e da ciência, pela dedicação, e pelos incontáveis conselhos.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

MARTINS, Daniel Deluiz. *Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e remodelação*. 2016. 54 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

Rebordos alveolares extensamente reabsorvidos podem levar a um volume ósseo insuficiente para a instalação de implantes osseointegrados, assim como comprometer as restaurações definitivas no ponto de vista estético e funcional. Na última década, diversos estudos têm demonstrado a aplicação de enxertos alógenos como substitutos ósseos na reconstrução alveolar. Apesar de bem documentado em relatos e séries de casos, o uso do tecido alógeno ainda requer estudos mais bem desenhados para a orientação da prática clínica e das condutas na sua utilização. O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento clínico dos aloenxertos ósseos em bloco antes e após a instalação dos implantes, além de investigar sua incorporação e remodelação. Em um período de 53 meses, pacientes que tivessem indicação para reconstrução maxilar óssea em bloco foram consecutivamente incluídos no estudo. O trabalho foi dividido em 4 estudos para a investigação dos parâmetros separadamente: a incorporação e remodelação; a prevalência de complicações e taxa de sobrevivência dos implantes; dados histológicos e tomográficos de longo prazo; além de um ensaio piloto. Os enxertos apresentaram taxas de reabsorção entre 13,98% (4 meses) e 31,52% (6 meses); neoformação óssea entre 20,79% (4 meses) e 27,2% (6 meses); presença de células ósseas e ausência de infiltrado inflamatório histologicamente; intensa positividade para um marcador de atividade óssea fisiológica; prevalência de complicações de 22,14%; além demonstrar uma taxa de sobrevivência dos implantes instalados de 94,03%. Após 4 anos de acompanhamento com implantes em carga, demonstram uma reabsorção entre 2,1 a 7,7%. Histologicamente, foram encontrados remanescentes do tecido alógeno juntamente com um número abundante de osteócitos, osteoblastos e vasos. Os parâmetros avaliados apresentam-se similares aos de outras modalidades reconstrutivas, demonstrando a viabilidade dos enxertos em bloco alógenos como uma opção para o aumento ósseo maxilar com fins de instalação de implantes dentais.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Osso homólogo ultracongelado. Transplante homólogo. Transplante alogênico. Aumento do rebordo alveolar.

ABSTRACT

MARTINS, Daniel Deluiz. *Behavior of bone block allografts in the maxillary alveolar reconstruction before and after implants placement: tomographic, histological and immunohistochemical analysis of the incorporation and remodeling*. 2016. 54 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

Extremely resorbed alveolar ridges may lead to insufficient bone volume for dental implants placement, as well as jeopardize the final prosthesis in the aesthetic and functional standpoints. In the last decade, several studies have demonstrated the application of allogeneic grafts as bone substitutes in the alveolar reconstruction. Although case reports and case series are well documented in the literature, the use of the allograft bone requires more well-designed studies to guide the clinical practice. The aim of this study was to evaluate the clinical behavior of bone allograft blocks before and after implant placement and to investigate its incorporation and remodeling. In a 53-months period, patients who had indication for maxillary bone block reconstruction were consecutively included in the study. The trial was divided into four studies to investigate the following parameters separately: the incorporation and remodeling; the prevalence of complications and the survival rate of the implants; histological and tomographic long-term data; and a pilot study. The grafts showed resorption rates from 13.98% (4 months) to 31.52% (6 months); new bone formation from 20.79% (4 months) to 27.2% (6 months); presence of bone cells and absence of inflammatory infiltrate histologically; intense positivity for a physiological bone activity marker; 22.14% prevalence of complications; and a implants survival rate of 94.03%. After a 4 years follow-up with loaded implants, the grafts demonstrated a reabsorption rate from 2.1 to 7.7%. Histologically, remnants of allograft tissue were found along with an abundant number of osteocytes, osteoblasts and vessels. The evaluated parameters showed to be similar to other reconstructive procedures, demonstrating the viability of allogeneic bone block grafts as an option to augment the alveolar ridge for dental implants placement.

Keywords: Bone graft. Fresh-frozen bone. Homologous transplantation. Allogeneic transplantation. Alveolar ridge augmentation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| AATB | American Association of Tissue Banks |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| CBCT | Cone-Beam Computed Tomography |
| CGSNT/MS | Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes do Ministério da Saúde |
| DFDBA | Demineralized Freeze Dried Bone Allograft |
| EAMST | European Association of MusculoSkeletal Transplantation |
| FDDBA | Freeze Dried Bone Allograft |
| FFB | Fresh-frozen Bone |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| HUPE | Hospital Universitário Pedro Ernesto |
| INTO | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia |
| IOPUC | Instituto de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica |
| SNT | Sistema Nacional de Transplantes |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1 | O ENXERTO ALÓGENO NA ODONTOLOGIA | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | Seleção dos pacientes e protocolo clínico | 24 |
| 3.2 | Análise tomográfica | 26 |
| 3.3 | Análise histológica | 26 |
| 3.4 | Análise histomorfométrica | 27 |
| 3.5 | Análise Imunohistoquímica | 27 |
| 3.6 | Avaliação de longo prazo | 28 |
| 4 | RESULTADOS | 29 |
| 4.1 | Estudo 1 | 29 |
| 4.1.1 | <u>Observações clínicas</u> | 29 |
| 4.1.2 | <u>Avaliação tomográfica</u> | 30 |
| 4.1.3 | <u>Avaliação histológica</u> | 30 |
| 4.1.4 | <u>Avaliação histomorfométrica</u> | 30 |
| 4.2 | Estudo 2 | 31 |
| 4.2.1 | <u>Observações clínicas</u> | 31 |
| 4.2.2 | <u>Avaliação tomográfica</u> | 32 |
| 4.2.3 | <u>Avaliação histológica</u> | 32 |
| 4.2.4 | <u>Avaliação histomorfométrica</u> | 32 |
| 4.2.5 | <u>Avaliação imunohistoquímica</u> | 33 |
| 4.2.6 | <u>Sobrevivência de implantes</u> | 33 |
| 4.3 | Estudo 3 | 33 |
| 4.4 | Estudo 4 | 34 |
| 5 | DISCUSSÃO | 36 |
| 6 | CONCLUSÃO | 40 |
| | REFERÊNCIAS | 42 |
| | ANEXO A – Estudo 1 | 51 |

| | |
|----------------------------------|----|
| ANEXO B – Estudio 2 | 52 |
| ANEXO C – Estudio 3 | 53 |
| ANEXO D – Estudio 4 | 54 |

INTRODUÇÃO

Atualmente, a reabilitação de pacientes totalmente ou parcialmente edentados com o uso de implantes orais e próteses implanto-suportadas é uma rotina e uma modalidade de tratamento bem documentada na literatura.¹ Altas taxas de sucesso alcançadas com técnicas atuais permitem que planejamentos cada vez mais complexos sejam possíveis estendendo as indicações destes dispositivos na clínica odontológica. Avanços recentes na fabricação, tratamento de superfície e desenho das conexões protéticas permitem que muitos casos complexos possam ser solucionados de forma relativamente pouco invasiva.^{2,3}

Dentre os fatores mais importantes para o sucesso alcançado nos planejamentos com implantes orais está a presença de volume e qualidade ósseos adequados.⁴⁻⁶ Estes requisitos mostram-se cada vez mais necessários uma vez que conceitos atuais de reabilitação sobre implantes preconizam o posicionamento cirúrgico das fixações de acordo com o desenho ideal das próteses, ao contrário de ditar-se apenas pelo quantidade óssea disponível.⁷⁻⁹

Atrofias alveolaresseveras frequentemente apresentam um desafio nas reabilitações orais totais ou parciais. Rebordos extensamente reabsorvidos podem levar não só a um volume ósseo insuficiente para a instalação de implantes osseointegrados, assim como relações protéticas maxilo-mandibulares desfavoráveis nos sentidos vertical, antero-posterior ou transversal. Isto se deve por conta da direção centrípeta da reabsorção das tábuas ósseas, o que pode comprometer as restaurações definitivas no ponto de vista estético e funcional.^{7,9}

Na maioria das vezes, a depleção do volume de tecido ósseo nos maxilares é uma consequência da atrofia fisiológica após a perda dentária, de trauma local, de periodontite ou de patologias odontogênicas.^{6,10} Por essa razão, nos casos onde existe a necessidade de aumento ósseo, diferentes materiais de enxerto estão disponíveis para serem empregados na reconstrução alveolar previamente à instalação dos implantes.^{11,12}

O tecido ósseo, apesar de sua natureza mineral, consiste de um órgão complexo, vital e dinâmico.¹³ Em sua composição apresenta uma densa camada cortical externa e uma camada interior medular. Esta estrutura tridimensional compreende um intrincado sistema de trabéculas que age como um reservatório

para um metabolismo ósseo intensamente ativo. Esta arquitetura permanece em um contínuo *turn-over* capaz de reparar e modelar tanto sua forma, quanto sua função. Para tal, o osso conta com um denso sistema de canais de nutrição, um estoque de cálcio e fosfato, células altamente especializadas, além de fontes de células multipotentes no perióstio e na periferia de pequenos vasos.^{13,14} O restabelecimento do rebordo adequado para receber implantes dentais deve prover estrutura suficiente para fixação mecânica dos parafusos em uma posição favorável tridimensionalmente, bem como um ambiente saudável e fisiologicamente propício à osseointegração. Desta forma, é necessário que o material de enxertia utilizado para as reconstruções seja, além de biocompatível, também capaz de regenerar o tecido perdido com uma estrutura que contenha um arcabouço calcificado, vascularizado e compreendendo células ósseas que permitam a cicatrização no entorno dos implantes de forma similar ao osso nativo.^{6,9}

Diversas técnicas de aumento ósseo e diferentes materiais têm sido empregadas na reconstrução de rebordos alveolares deficientes. Dentre elas, a regeneração óssea guiada; a distração osteogênica; os enxertos em bloco; a divisão de crista alveolar; os enxertos livres vascularizados e a osteoindução com fatores de crescimento utilizando proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).^{6,9,10,15-17} Apesar da grande variedade, a sobrevivência a longo prazo dos implantes apresenta-se semelhante na utilização de quaisquer uma destas técnicas.^{6,10} Para estas aplicações, estão disponíveis diferentes biomateriais, tais como: enxertos de origem animal (xenógenos), materiais sintéticos (aloplásticos), tecido ósseo captado do próprio paciente (autógeno) e enxertos humanos de banco de tecidos (homólogos ou alógenos).

A escolha da modalidade de tratamento para abordar os aumentos do rebordo alveolar deve estar relacionada ao tipo e extensão da atrofia. A predictabilidade destes procedimentos é fortemente influenciada pelo tamanho da região a ser enxertada, da complexidade do defeito e da presença e quantidade de inserção em dentes adjacentes.^{8,9}

Rebordos extensamente reabsorvidos, na maioria das vezes, recebem a indicação para a reconstrução com enxertos em bloco.⁸ Nesta técnica, blocos de enxerto ósseo provenientes de diferentes fontes são precisamente adaptados ao leito receptor onde planeja-se o aumento alveolar e são firmemente fixados ao mesmo. De forma geral, a enxertia é feita previamente à instalação dos implantes e

a completa cicatrização da área e incorporação do enxerto é aguardada. A incorporação do material enxertado ao novo sítio é dada através de uma ossificação intramembranosa pela migração e crescimento de vasos para interior do bloco com uma subsequente lenta substituição e remodelação do enxerto.^{18,19} Durante este processo, ao mesmo tempo em que o enxerto sofre incorporação, este também é submetido a uma diminuição de volume resultante da atividade de remodelação. Sabe-se hoje que diferentes materiais apresentam comportamentos distintos e diferentes períodos de espera antes da instalação dos implantes resultam em graus de incorporação e reabsorção variados.⁷

O material para enxertia óssea considerado como o padrão ouro na literatura atual é o osso autógeno.²⁰⁻²³ A utilização deste material nas reconstruções alveolares com altas taxas de sucesso e boa previsibilidade é extensamente relatado nas publicações científicas. O osso coletado do próprio paciente apresenta propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras dadas pelas células viáveis, proteínas morfogenéticas e por seu arcabouço, respectivamente.²⁰ Mais além, não há qualquer restrição quanto à compatibilidade ou transmissão de doenças. No entanto, o uso do osso autógeno implica, invariavelmente, em uma maior morbidade inerente ao procedimento de remoção do material doador.^{21,24-26} Da mesma forma, a disponibilidade limitada, a possibilidade de lesões em estruturas nobres, edema excessivo, perda de sangue, o aumento da morbidade e complicações associadas com um segundo acesso cirúrgico, estimulam a procura por outros substitutos ósseos.^{22,27}

Na última década, diversos estudos têm demonstrado a aplicação de enxertos ósseos alógenos como uma opção viável para a substituição tecido autógeno.²⁸⁻³¹ O uso de aloenxertos ósseos têm sido descrito extensivamente em procedimentos ortopédicos e, hoje, pode ser considerado como um material seguro nos pontos de vista imunológico e virológico.³² Enxertos alógenos proporcionam uma estrutura que suporta a regeneração do osso hospedeiro que irá eventualmente substituir o enxerto por osseocondução. No entanto, aloenxertos exibem uma capacidade osteoindutora reduzida e uma capacidade limitada para incorporar-se ao osso receptor.³³⁻³⁵ Comparados aos enxertos autógenos, o osso alógeno promove uma incorporação mais lenta e uma maior reabsorção volumétrica. Apesar de não termos estudos extensos disponíveis, menores taxas de sobrevivência de implantes orais instalados em sítios reconstruídos com aloenxertos têm sido relatadas.^{36,37}

Apesar de bem documentado em relatos e séries de casos, o uso do tecido alógeno ainda requer estudos mais bem desenhados para a orientação da prática clínica e das condutas na sua utilização.²⁷ As técnicas cirúrgicas descritas nas publicações em muito se assemelham às utilizadas com enxertos autógenos, entretanto análises com relação às complicações, sobrevivência dos implantes e taxas de sucesso, estão restritas a um número de indivíduos pequeno em cada estudo, falta de padronização dos procedimentos e a um curto período de acompanhamento.

Com relação ao aspecto histológico, não há um consenso na análise dos resultados dos aloenxertos ósseos. Embora vários estudos tenham demonstrado tecido vital e osso recém-formado incorporado nas áreas enxertadas, autores reportam uma revascularização inadequada, pobre crescimento ósseo, e um número pequeno de células presentes durante o processo de remodelação encontrado nas biópsias.^{22,38-40} Avaliações em ensaios de imunohistoquímica também evidenciam um aumento da atividade de reabsorção durante o período de cicatrização em aloenxertos em comparação com autoenxertos.³⁸ Estes resultados são de extrema importância, uma vez que os sítios enxertados devem apresentar volume ósseo suficiente e também serem fisiologicamente ativos para serem capazes de receber e osseointegrar os implantes orais. Os dados reportados de histologia se resumem à análise dos enxertos antes da instalação dos implantes. Não há a necessidade de reentrada cirúrgica em sítios enxertados após a osseointegração dos mesmos. No que diz respeito à ortopedia, onde existe um número maior de estudos publicados, cirurgias de revisão de quadril com enxertos alógenos após 5 anos em função demonstraram resultados satisfatórios nas biópsias.⁴¹⁻⁴⁴ Nenhum relato histológico do comportamento a longo prazo deste material na odontologia está disponível até o presente momento.

O tempo de espera para o segundo estágio cirúrgico (instalação dos implantes) não é consenso na literatura.^{31,40,45-50} Supõe-se que quanto maior o tempo, maior o grau de incorporação dos enxertos - o que seria benéfico para a instalação dos implantes. Porém, a extensão do período de espera para o segundo estágio cirúrgico, também parece implicar em uma maior reabsorção/remodelação do osso enxertado.⁵¹ Os tempos de incorporação e taxas de remodelação dos enxertos homólogos ainda não estão bem definidos e muitos estudos utilizam-se de dados provenientes do uso de outros biomateriais.^{8,32,49,51}

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento clínico dos enxertos ósseos alógenos em bloco antes e após a instalação dos implantes, além de investigar sua incorporação e remodelação através de técnicas de tomografia computadorizada, histologia, histomorfometria e imunohistoquímica.

1 O ENXERTO ALÓGENO NA ODONTOLOGIA

Enxertos ósseos alógenos vêm sendo utilizados na odontologia por pelo menos quatro décadas. Nos últimos 20 anos, houve um crescimento significativo mundialmente na aplicação deste material dado pelo estabelecimento de diretrizes severas para a seleção dos doadores, para a captação, processamento e distribuição.^{22,52,53}

Este material é captado de doadores cadáveres ou vivos e eliminam a necessidade de remoção de tecido ósseo do próprio paciente. O osso é tipicamente tratado por congelamento, liofilização, irradiação e outras manipulações que conferem ao material um menor risco de contaminação.²⁰ Diferentes formas de processamento atribuem variadas propriedades e, conseqüentemente, indicações clínicas distintas⁵⁴. O osso homólogo está comumente disponível nas formas de enxerto mineralizado liofilizado (FDBA – *freeze dried bone allograft*), liofilizado desmineralizado (DFDBA – *demineralized freeze dried bone allograft*) e fresco ultracongelado (FFB – *fresh frozen bone*).

Idealmente, enxertos ósseos utilizados nas reconstruções alveolares para futura reabilitação com implantes osseointegráveis devem apresentar integridade estrutural suficiente para manter espaço durante o crescimento, consolidação e maturação óssea. Além disso, devem ser capazes de promover a migração de células no sítio receptor com o potencial de formar tecido ósseo no interior do enxerto. Apesar de controversa, outra característica comumente citada na literatura como preferível nos materiais ósseos enxertados, é que os mesmos devem ser totalmente reabsorvidos, remodelados e substituídos por osso nativo viável. Como com qualquer técnica ou material desejável, os enxertos devem apresentar resultados previsíveis e reproduzíveis.^{21,55}

De acordo com as propriedades das quais enxertos ósseos podem apresentar, podemos classificá-los em três grupos relacionados ao estímulo para a formação óssea: osteocondutores, osteoindutores e osteogênicos. Osteocondução refere-se ao crescimento passivo de tecido mesenquimal e vascular dentro de uma estrutura de arcabouço proporcionada pelo material do enxerto. Osteoindução, por sua vez, inclui o recrutamento de células progenitoras proporcionado pelo material de enxerto com estímulo para diferenciação em células ósseas. Há inicialmente uma migração

de células indiferenciadas para o interior do enxerto e, em sequência, um estímulo para a diferenciação das mesmas em osteoblastos pela indução mediada por proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Na osteogênese, existe a transferência de células osteoprogenitoras viáveis no interior enxerto para sítio receptor. No conceito de propriedade osteogênica do enxerto, as células do tecido doador devem sobreviver ao transplante e proliferar-se no sítio receptor, diferenciando-se em osteoblastos.^{21,55}

O aloenxerto, quando liofilizado, provém um arcabouço favorável à condução óssea, porém é reabsorvido quando implantado em sítios ectópicos⁵⁶. Por sua vez, o enxerto ósseo desmineralizado apresenta características osteoindutivas em sua superfície. Esta propriedade é demonstrada pela capacidade de induzir a formação óssea endocondral quando transplantado em tecidos que não são favoráveis à ossificação⁵⁷. O processo de liofilização do tecido ósseo permite uma maior expressão de proteínas morfogenéticas (BMPs), o que confere um maior potencial de osteoindução em relação ao enxerto fresco ultracongelado^{20,33,34}. Contudo, ainda assim, os enxertos FFB apresentam propriedades osseoindutoras por conterem proteínas morfogenéticas no interior de sua matriz orgânica⁵⁸⁻⁶¹. Embora estas propriedades tenham sido descritas na literatura, uma vasta inconsistência em sua descrição e em seus resultados é encontrada. Isso se deve provavelmente às diferenças no processamento ou ainda na variabilidade entre os doadores humanos.⁵⁴

No Brasil, a utilização de qualquer tecido humano é regulada pela Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes do Ministério da Saúde (CGSNT/MS) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diretrizes rígidas não permitem a comercialização de nenhum derivado humano, mesmo que para fins terapêuticos. Por este motivo, não há exploração comercial pela indústria dos enxertos alógenos em nosso país, diferentemente de países como os Estados Unidos e países na Europa.⁶²

A disponibilização de tecidos músculo-esqueléticos no Brasil é feita por bancos de tecidos que possuam licença sanitária e estejam autorizados pela CGSNT exclusivamente para a utilização por médicos ou cirurgiões-dentistas credenciados no Sistema Nacional de Transplantes (SNT). O banco de tecidos músculo-esqueléticos é o estabelecimento que, com recursos humanos e instalações físicas adequadas, realiza triagem clínica e laboratorial dos doadores, captação,

identificação, transporte, processamento, armazenamento, e disponibilização dos tecidos. A captação do tecido ósseo é feita majoritariamente de doações realizadas pelas famílias de pessoas falecidas ou de pacientes que se submeteram à cirurgia ortopédica de quadril com remoção de osso sadio para substituição por prótese. Os tecidos são submetidos à triagem obrigatória, clínica e sorológica, quarentena, processamento e armazenamento adequados. São realizados exames sorológicos, um questionário epidemiológico e verificação de prontuário para minimizar a possível transmissão de doenças infecto-contagiosas transmitidas pelo sangue, como hepatites B e C, HIV, toxoplasmose, citomegalovírus, malária e outras. Outros fatores tais como câncer, osteoporose, doenças infecciosas ou uso de corticóides recentemente e por tempo prolongado também contra-indicam a doação.⁶² Os padrões técnicos de processamento e utilização nos demais países que utilizam enxertos ósseos alógenos seguem diretrizes similares reguladas conforme a Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB – *American Association of Tissue Banks*) e a Associação Européia de Transplantes Músculo-Esqueléticos (EAMST – *European Association of Músculo Skeletal Transplantation*).⁶³ A segurança no uso deste material vem aumentando nos últimos anos e a ausência de relatos de contaminação cruzada de doenças como o HIV e a hepatite tornam o uso deste material mais comum como uma alternativa viável para enxertia óssea maxilar.

Grande parte dos estudos que documentam a utilização de blocos ósseos alógenos na odontologia são compostos de relatos e séries de casos.^{29–31,35,47,48,50,53,64–68} Uma revisão sistemática publicada em 2008²⁷, examinou a efetividade e predictabilidade do uso de enxertos alógenos em bloco com intuito de corrigir deformidades alveolares para posterior instalação de implantes dentais. Com base na busca feita pelos autores, os trabalhos avaliados que cumpriram os requisitos de inclusão, foram: 2 relatos de caso, 6 séries de casos, e uma série de casos prospectiva e multicêntrica. Apesar dos bons resultados de incorporação relatadas nos estudos e nos altos índices de sucesso dos implantes, os autores reportam que as evidências clínicas resumem-se a trabalhos limitados, não padronizados com relação ao método de tratamento e seleção dos defeitos a serem tratados, além de proverem um curto tempo de acompanhamento. Em conclusão, esta revisão sistemática sugere que a evidência para a utilização deste material permanece insuficiente para estabelecer a eficácia do tratamento relativa à incorporação dos enxertos, à quantidade de aumento do rebordo alveolar, e à

sobrevivência a longo prazo dos implantes. Mais importante, dos 35 artigos selecionados inicialmente pelos autores, apenas 3 referiam-se ao uso de enxertos frescos-congelados, o que sugere que este material oferecia ainda menos dados confiáveis publicados na literatura até então. Entre 2008 e 2015, séries de casos prospectivos foram publicados com maior frequência avaliando as reconstruções maxilares com o uso de blocos alógenos frescos-congelados^{31,39,40,50,63,66,68-76}. Estes trabalhos, apesar de não serem padronizados e utilizarem técnicas, tempos de espera antes da instalação dos implantes, e materiais adjuntos diferentes (como membranas para o recobrimento dos enxertos ou material particulado para o preenchimento de *gaps*), apresentaram bons resultados clínicos de maneira geral. Os estudos incluíram de 11 a 101 pacientes, com variações na metodologia aplicada para a avaliação dos resultados. O mais comumente relatado foi a análise da resposta clínica^{31,39,40,50,63,66,68-71,76}, seguido do sucesso cumulativo dos implantes^{31,39,63,72-75,77}, da análise histológica^{31,39,40,70,71,76} e, por fim, da taxa de reabsorção durante a incorporação.^{39,71,72,76}

Clinicamente, os enxertos alógenos apresentam taxas de sucesso compatíveis com outras técnicas regenerativas.^{53,68,78,79} Taxas de falhas dos blocos variam entre 0^{39,40,68,71,73,80} e 11,76%.⁷⁰ As complicações relacionadas às falhas mais comuns apontadas nos estudos são: perdas parciais ou totais dos blocos, problemas ocorridos nos tecidos moles (deiscência e perfuração tardia da mucosa) e infecção. Entretanto, mesmo quando complicações são notadas a tempo e são corretamente abordadas, não necessariamente resultam em perda total dos procedimentos de enxertia.⁶⁹

O sucesso cumulativo dos implantes instalados em sítios reconstruídos com blocos ósseos alógenos é alto e, da mesma forma, comparável a outras modalidades de reconstruções ósseas. As taxas variam entre 94,7%⁶⁶ e 100%.^{31,72,75} Com uma média ponderada entre os estudos de 96,9% (95% IC: 92,8-98,7%), levando-se em consideração uma soma de todos os estudos com a avaliação de 228 implantes em um período médio de acompanhamento de 23,9 meses.⁷⁸

Na avaliação histológica e histomorfométrica, apesar das diferenças no tempo de coleta e avaliação das biópsias após a cirurgia de enxertia, os estudos relatam a ausência ou discreto infiltrado inflamatório presente no tecido enxertado.^{31,39,40,70,71,76} A presença de osteócitos, neoformação óssea e vascularização no interior do aloenxerto também é uma característica comumente relatada. Os remanescentes do

enxerto que ainda não foram remodelados apresentam-se histologicamente como tecido calcificado com lacunas vazias no lugar de núcleos de osteócitos. Isto se deve ao processamento do tecido que remove o conteúdo celular presente no enxerto. Com relação a estes remanescentes do enxerto ainda presentes após a incorporação inicial, os achados são semelhantes, porém as análises são divergentes. Alguns autores sugerem que esta característica se deve ao lento processo de remodelação sofrido por estes enxertos,^{31,39,40,76} enquanto demais grupos interpretam este achado como sendo osso necrótico.^{22,68,70,71,81} Em relação ao osso autógeno, a quantidade de partículas remanescentes do enxerto na região após um curto período de tempo é maior nos enxertos alógeno, entretanto, em intervalos maiores, ambos apresentam características histológicas semelhantes, o que sugere uma diferença na velocidade de remodelação tanto em ensaios em humanos quanto em animais.^{35,82} Em coelhos, a quantidade de osso neoformado com a utilização de enxertos alógenos demonstrou-se ser estatisticamente igual à quantidade obtida com enxertos autógenos.⁸²

A incorporação dos enxertos ósseos implica invariavelmente em reabsorção parcial de volume do tecido enxertado⁸³. A utilização de enxertos frescos congelados no reparo de fraturas e defeitos ósseos foi observada em modelos animais em ratos e coelhos, demonstrando não somente a incorporação dos enxertos, como também neovascularização e regeneração da medula óssea nas regiões enxertadas.^{59,84} In vitro, parece existir um potencial significativo para o crescimento celular nos ossos alógenos frescos congelados, assim como um potencial osseointegrador demonstrado com altas taxas de proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina descritos em alguns estudos.^{34,85,86} Relatos de taxas de reabsorção em enxertos alógenos em bloco *onlay* variam entre 10%⁷² a 52%⁷¹ dependendo do tempo esperado e do tipo de enxerto utilizado. Diferenças na origem embrionária da região doadora (formação endocondral ou intramembranosa) têm sido sugeridas como preditor da quantidade de reabsorção dos enxertos. Entretanto, demais estudos enfatizam maior importância na microarquitetura do osso a ser enxertado.⁸⁷⁻⁹⁰ Aparentemente, enxertos com maior conteúdo cortical reabsorvem em menor escala.⁹⁰

Sugere-se que o processamento, forma de utilização e características do tecido ósseo influenciam no comportamento do enxerto. Longos períodos de congelamento, não remoção das camadas superficiais do bloco antes da fixação, e a idade do doador são responsáveis por diferenças na resposta do crescimento celular

no tecido ósseo in vitro.^{91,92} Da mesma forma, ensaios mecânicos demonstram que diferentes formas de lavagem e esterilização parecem tornar os blocos mais susceptíveis a fraturas.^{93,94} Em animais, a técnica cirúrgica utilizada para a instalação do osso alógeno também demonstrou ser um fator significativo no que diz respeito à reabsorção do bloco enxertado.¹⁹

É comum na literatura a comparação entre os enxertos de osso alógeno e autógeno. Apesar de exercerem a mesma função nas reconstruções dos rebordos alveolares para a futura instalação de implantes dentais, os dois materiais apresentam resultados distintos e, possivelmente, indicações clínicas distintas. A diminuição do trauma cirúrgico, disponibilidade virtualmente ilimitada de material reconstrutivo, ausência de dor e desconforto em um segundo sítio doador, além da diminuição da chance de lesão de estruturas nobres e menor tempo de cirurgia, têm levado os profissionais da odontologia a indicar cada vez com mais frequência substitutos ósseos no lugar do atual “padrão ouro” - o osso autógeno.^{7,9,87} Ainda assim, estudos comparativos apresentam uma perda de volume maior nos enxertos alógenos quando no momento da instalação dos implantes, uma taxa de remodelação mais lenta e resultados clínicos considerados piores.^{22,71}

Ao contrário de outros órgãos e tecidos utilizados em cirurgias de transplante, não existe a necessidade de utilizar haplotipos HLA compatíveis no osso alógeno.⁹³ Com o processamento e o congelamento a -80°C , há o rompimento das membranas de células eucariotas e procariotas como resultado da formação de cristais de gelo, o que diminui a imunogenicidade e o risco de contaminação.^{93,95} Em modelo animal, enxertos osteocondrais DLA (*dog leukocyte antigen* - análogo ao HLA humano) incompatíveis ultracongelados demonstraram vascularização maior em relação aos frescos incompatíveis.⁹⁵ Da mesma forma, elevados níveis de anticorpos anti-DLA foram encontrados no líquido sinovial de cães transplantados com enxertos osteoarticulares frescos em relação aos ultracongelados.⁹⁶ Linfócitos T reativos a células HLA incompatíveis foram encontrados em humanos após o transplante de tecido ósseo ultracongelado para reconstruções de defeitos pós remoção de tumores.⁹⁷ Esta resposta reativa ao homoenxerto é sugerida como um fator de atraso na incorporação de enxertos homólogos, apesar de serem escassos os trabalhos avaliando estas reações em humanos.⁹³ Com relação ao impacto imunológico da enxertia alógena em comparação com o enxerto autógeno, Spin-Neto e colaboradores³⁷ não conseguiram encontrar diferenças nos aumentos de

TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-1 β no sangue periférico de pacientes enxertados com ambos os materiais.

Achados histológicos em biópsias de reentradas de cirurgias ortopédicas e autópsias em quadril e joelho revelam remanescentes dos enxertos frescos congelados mesmo após longos períodos de tempo (48 meses).⁴³ Relatos semelhantes foram descritos em reentradas de transplantes ósseos em fêmures.⁹⁸ Cirurgias de revisão de quadril de 2 a 27 meses pós-enxertia com tecido ósseo alógeno também apresentaram achados histológicos com remanescentes do enxerto em processo de reabsorção, descritos como “osso não-viável”.⁴¹ Até o presente momento, não há relatos de achados histológicos em longo prazo de enxertos alógenos utilizados na odontologia.

O período necessário para a incorporação do osso homólogo não está claro nas publicações e muitos estudos parecem se utilizar dos dados provenientes do uso de outros biomateriais.⁹⁹ Trabalhos que utilizam tempos de espera maiores supõem que quanto maior o tempo, maior o grau de incorporação dos enxertos. Porém, a extensão do período de espera para o segundo estágio cirúrgico também parece implicar em uma maior reabsorção do osso enxertado, o que em casos extremos pode resultar em quantidade óssea insuficiente para instalação dos implantes.⁵¹

2 OBJETIVOS

São objetivos do presente trabalho:

- a) comparar o grau de incorporação e remodelação de enxertos alógenos frescos-congelados em bloco no aumento ósseo maxilar em períodos diferentes de tempo antes da instalação dos implantes dentais;
- b) analisar a prevalência de complicações e taxa de sobrevivência dos implantes em maxilas enxertadas com blocos ósseos alógenos frescos-congelados;
- c) analisar dados de longo prazo de histologia e tomografia computadorizada de enxertos ósseos alógenos frescos-congelados em bloco maxilares após a instalação dos implantes;
- d) verificar a viabilidade dos enxertos ósseos alógenos frescos-congelados em bloco no aumento ósseo maxilar para fins de instalação de implantes dentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em 4 estudos que encontram-se nos Anexos A, B, C e D. Os materiais e métodos utilizados em cada estudo estão detalhados nos manuscritos correspondentes. O protocolo comum a todos está descrito nesta seção.

A divisão dos estudos foi feita conforme o seguinte:

- a) Estudo 1³⁹: (estudo piloto): Alterações tempo-dependentes nos enxertos ósseos alógenos em bloco: achados tomográficos, histológicos e histomorfométricos.
- b) Estudo 2¹⁰⁰: Incorporação e remodelação dos enxertos ósseos alógenos na reconstrução maxilar: uma análise tomográfica, histomorfométrica e imunohistoquímica.
- c) Estudo 3¹⁰¹: Resultados adversos de enxertos ósseos alógenos no aumento alveolar: análise das complicações e sobrevivência dos implantes.
- d) Estudo 4¹⁰²: Análise histológica e tomográfica de enxertos ósseos alógenos com implantes em carga em um acompanhamento de 4 anos.

3.1 Seleção dos pacientes e protocolo clínico

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) sob o registro nº 2762/2010. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento esclarecido para participar do estudo.

De julho de 2010 a dezembro de 2014, pacientes do curso de implantodontia do Instituto de Odontologia da PUC-Rio (IOPUC) que tivessem indicação para reconstrução óssea em bloco prévia à instalação de implantes foram consecutivamente incluídos no estudo. Os critérios de exclusão foram: pacientes fumantes; pacientes apresentando doenças sistêmicas; pacientes em terapia prévia

ou atual com bifosfonatos oral ou endovenoso e pacientes irradiados nos últimos 5 anos.

Uma anamnese completa e exame físico foram feitos para cada paciente para a determinação de alguma eventual contra-indicação ao procedimento. Todos os pacientes foram submetidos a um exame de tomografia computadorizada cone-beam (CBCT) prévia da região para a confirmação da indicação e planejamento do procedimento. O número e tamanho dos blocos ósseos foram determinados a partir de medidas lineares nas tomografias.

Os tecidos ósseos homólogos ultra-congelados foram adquiridos para cada paciente de acordo com as normas do Sistema Nacional de Transplantes (SNT) no Banco de Tecidos Músculo-Esqueléticos do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO). Os tecidos foram fornecidos conforme a disponibilidade do banco de tecidos em tamanho e quantidade necessários a cada cirurgia. Os enxertos utilizados foram fragmentos córtico-esponjosos de tíbia proximal, crista ilíaca e fêmur.

Para o Estudo 2, pacientes que obtiveram a liberação de enxerto pelo banco de tecidos que não fosse originário de tíbia foram excluídos. Esta exclusão foi feita de forma a homogeneizar a amostra a ser avaliada com enxertos de mesma origem e foi sugerida durante o desenvolvimento e submissão do Estudo 1 como piloto.

As cirurgias foram executadas por operadores comprovadamente treinados no Curso de Especialização em Implantodontia do IOPUC. Os detalhes dos procedimentos cirúrgicos estão descritos nos Estudos 1 e 2.

Após a cirurgia de enxertia óssea, os pacientes foram solicitados a fazer um exame de tomografia computadorizada no intervalo máximo de 7 dias a partir do procedimento. Este exame foi considerado como a TC₀.

Para o Estudo 1, os pacientes foram randomicamente alocados em 3 diferentes grupos de acordo com o tempo de espera entre a cirurgia de enxertia óssea e a instalação de implantes. Os grupos respeitaram os seguintes intervalos: grupo 1 - 4 meses; grupo 2 – 6 meses ;e grupo 3 – 8 meses.

A partir dos resultados obtidos no estudo piloto (Estudo 1), no desenho do Estudo 2, o terceiro grupo (8 meses de intervalo) foi extinto. Os pacientes seguintes passaram a ser consecutivamente alocados de forma randomizada em 2 grupos referentes aos intervalos seguintes: grupo 1 – 4 meses; e grupo 2 – 6 meses.

Dado o período de espera, todos os pacientes foram submetidos a um novo exame de CBCT com um intervalo máximo de 7 dias antes do dia planejado para a instalação dos implantes. Este exame foi considerado como a TC_{Final}.

No intervalo determinado, os pacientes foram submetidos à instalação dos implantes. Todas as cirurgias seguiram a mesma rotina descrita nos estudos 1 e 2. As amostras dos enxertos coletadas foram enviadas ao Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UERJ para serem processadas e utilizadas nas análises histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica.

Para o Estudo 3, durante todo o período do atendimento aos pacientes submetidos às cirurgias reconstrutivas, dados relacionados a possíveis resultados adversos foram coletados nas consultas de acompanhamento. Foram feitas consultas nos intervalos de 7, 14, 30, 60, 90 e 120 dias e as seguintes complicações foram registradas: deiscência de sutura; infecção; exposição do enxerto por perfuração da mucosa; perda parcial do enxerto; e perda total do enxerto. Em um acompanhamento total de 12 meses, a perda de implantes instalados nas regiões reconstruídas também foi incluído como uma das complicações avaliadas.

3.2 Análise tomográfica

Os exames de tomografia TC₀ e TC_{Final} foram mensurados digitalmente com o auxílio de softwares de computador e comparados entre si a fim de verificar a diferença de volume sofrida pelos enxertos em bloco durante o período de incorporação determinado nos estudos 1 e 2. As metodologias utilizadas em cada estudo foram diferentes e estão descritas em detalhes nos anexos.

3.3 Análise histológica

As análises histológicas feitas nos 4 estudos foram descritivas a fim de identificar parâmetros microscópicos importantes nos processos de incorporação, complicações e acompanhamento de longo prazo. As características estudadas

foram: aspecto geral das biópsias; presença de células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos); neoformação óssea; vascularização; permanência de remanescentes não incorporados do aloenxerto; e presença de infiltrado inflamatório.

As lâminas foram avaliadas por microscopia ótica (Nikon Eclipse 50i, Tóquio, Japão), em aumentos de 100x, 200x e 400x.

3.4 Análise histomorfométrica

Foram feitas análises histomorfométricas nos estudos 1 e 2. No estudo 1, a análise foi feita por contagem de células, vasos, e *scores* visuais para a quantificação de remanescentes do aloenxerto e da proporção tecido não-calcificado/tecido ósseo.

No estudo 2, a análise morfométrica foi feita com auxílio do software de computador ImageJ (NIH) e os parâmetros avaliados foram: percentual de tecido calcificado, percentual de tecido ósseo neoformado, e percentual de remanescente de aloenxerto. A descrição detalhada da metodologia utilizada nas análises está presente nos estudos 1 e 2.

3.5 Análise Imunohistoquímica

As amostras descalcificadas e incluídas em parafina foram submetidas à análise imunohistoquímica no Estudo 2 através do método de detecção por imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo primário para a marcação da proteína podoplanina (clone D2-40) nas biópsias. As lâminas foram coradas com hematoxilina após a sequência da reação com os anticorpos e revelação. As lâminas foram avaliadas por microscopia ótica (Leica DM500, Wetzlar, Alemanha), em aumentos de 100x, 200x e 400x. A descrição detalhada da metodologia utilizada está presente no Estudo 2.

3.6 Avaliação de longo prazo

Durante o período do Estudo 4 pacientes participantes necessitaram de intervenções adicionais nas regiões reconstruídas com os enxertos alógenos após o término do tratamento planejado. Estes indivíduos requeriram cirurgia mucogengival reparadora ou a instalação adicional de implantes em sítios que estavam restaurados com a prótese final após um período médio de $48,25 \pm 3,5$ meses. Os pacientes foram solicitados a fazer um exame de tomografia computadorizada a fim de avaliar a região a ser operada. Este exame foi utilizado para fins de comparação volumétrica com o exame obtido anteriormente (exame TC_{Final}).

Durante a cirurgia adicional, o acesso ganho à região previamente enxertada foi utilizado para a coleta de uma nova biópsia do aloenxerto. A biópsia foi enviada ao Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UERJ para ser processada e analisada histologicamente.

Os detalhes da metodologia utilizada estão descritos no Estudo 4.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos para cada estudo estão descritos separadamente:

4.1 Estudo 1

4.1.1 Observações clínicas

Dos 24 indivíduos inicialmente incluídos no estudo, um paciente desenvolveu infecção no local da cirurgia, o que exigiu a remoção do enxerto. Outro paciente não cumpriu o intervalo correto para tomografias. Ambos pacientes foram excluídos do estudo.

Durante a reabertura, todos os blocos mostraram-se mecanicamente estáveis e clinicamente bem incorporados no leito receptor. Não houve deslocamento do enxerto durante a perfuração e instalação dos implantes. Todos os enxertos mostraram evidência de vascularização clinicamente, evidenciado pelo sangramento intra-ósseo.

Um total de 75 implantes foram instalados nas regiões enxertadas em 22 pacientes no estudo. Em todos os casos, os implantes conseguiram uma estabilidade primária adequada com torques de inserção satisfatórios.

Dos implantes colocados, 5 (6,66%) foram perdidos precocemente, embora não houvesse envolvimento clinicamente aparente dos enxertos. 4 (5,33%) dos 5 implantes foram perdidos no mesmo paciente.

O padrão de reabsorção dos enxertos apresentou-se claramente uniforme. As áreas dos enxertos que foram mais ou menos reabsorvidos variaram para cada paciente e para cada bloco individualmente. Aparentemente, as regiões ósseas esponjosas apresentaram maior reabsorção que as porções corticais, embora este tenha sido um achado clínico e não tenha sido avaliado no estudo.

4.1.2 Avaliação tomográfica

Na avaliação da reabsorção dos enxertos em diferentes intervalos de tempo entre os grupos, houve uma clara diferença indicando que os intervalos mais curtos resultaram em uma redução significativamente menor no tamanho.

Comparando-se os grupos de teste por one way-ANOVA, a diferença foi demonstrada estatisticamente significativa em relação à redução de volume dos enxertos para os 3 grupos.

Não houve discrepância entre grupos quanto à taxa de reabsorção como confirmado pelo teste de Friedman. Assim, a homogeneidade dentro de cada grupo foi observada.

4.1.3 Avaliação histológica

A análise histológica evidenciou a presença de osteoblastos nas margens das regiões calcificadas. As regiões superficiais das biópsias, equivalentes à porção cortical do enxerto, apresentaram vários espaços de osteócitos sem conteúdo celular - característica dos remanescentes do enxerto não incorporado. Osso neoformado preenchido por osteócitos perto regiões de ossos enxertados também foram comumente vistos. Vasos foram encontrados abundantemente nas biópsias.

4.1.4 Avaliação histomorfométrica

Comparando a análise histomorfométrica, também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

O número de osteócitos foi significativamente menor no grupo 3 em comparação com os grupos 1 e 2 como evidenciado pelo Kruskal-Wallis H. Similarmente, o número de vasos também mostrou diferenças significativas entre os grupos. No entanto, na avaliação dos vasos, o grupo 2 mostrou ser diferente dos

grupos 1 e 3 também evidenciados pelo Kruskal-Wallis H. Grupos 1 e 3 não mostraram diferenças estatísticas entre eles.

Na avaliação do enxerto remanescente nas biópsias, foram encontradas diferenças significativas entre o grupo 3 e os demais grupos utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os grupos 1 e 2 não mostraram diferenças estatisticamente. Dentro de cada grupo não houve discrepâncias, como confirmado pelo teste de Friedman.

Em relação às proporções de tecido calcificado / tecido não calcificado, não houve diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Como em avaliações anteriores, os grupos foram homogêneos como confirmado pelo teste de Friedman.

4.2 Estudo 2

4.2.1 Observações clínicas

Dos 66 pacientes incluídos no estudo, 3 desenvolveram complicações que levaram à perda total de enxerto e foram excluídas do estudo. Treze indivíduos apresentaram infecção, deiscência de sutura e/ou perfuração mucosa. Os casos de infecção e deiscência foram prontamente tratados com desbridamento, antibioticoterapia e instrução de higiene. Perfurações mucosas expondo a área enxertada após a cicatrização inicial foram acompanhadas com cuidado para evitar a infecção secundária do local cirúrgico. As exposições foram limpas por um profissional e os pacientes foram instruídos a aplicar um gel de clorexidina a 0,2% duas vezes por dia durante o período de cicatrização ou até o fechamento da perfuração.

Durante a reentrada dos enxertos, todos os blocos mostraram boa estabilidade mecânica após a remoção dos parafusos de fixação. Um total de 305 implantes foram colocados nos locais reconstruídos. Os enxertos permitiram um posicionamento satisfatório dos implantes de acordo com o planejamento protético. Todos os implantes foram colocados com o torque de inserção de 20Ncm a 45Ncm, demonstrando boa estabilidade primária.

4.2.2 Análise tomográfica

A taxa de reabsorção média no Grupo 1 ($13,98\% \pm 5,59$) foi estatisticamente significativa abaixo do Grupo 2 ($31,52\% \pm 6,31$). O padrão e direção das alterações sofridas pelos blocos de enxerto não foi uniforme e parecia ser mais evidente na porção esponjosa e das bordas para o centro. Embora o grupo de 6 meses tenha mostrado maior perda volumétrica, a reabsorção não comprometeu a colocação dos implantes conforme planejado.

4.2.3 Avaliação histológica

À microscopia de luz, as amostras apresentaram diferentes graus de incorporação e maturação óssea. Foi possível observar que a face cortical apresentou menor atividade celular em relação à área esponjosa. Os restos do aloenxerto não-remodelados estavam presentes em todas as biópsias evidenciadas pelas lacunas vazias dos osteócitos. Em ambos os grupos, as amostras mostraram áreas de nova formação óssea com quantidades distintas de tecido calcificado imaturo, osteoblastos e osteócitos. Vasos sanguíneos também foram encontrados abundantemente entre os espaços de enxerto. Em geral, as amostras apresentaram conteúdo ósseo saudável com discreto ou nenhum infiltrado inflamatório.

4.2.4 Avaliação histomorfométrica

Diferenças na quantidade de tecido calcificado encontrado nas amostras não foram observadas entre os grupos. A percentagem de osso recém-formado também não demonstrou diferença quando comparada com as amostras do Grupo 2. Remanescentes do tecido enxertado foram encontrados em ambos os grupos, sem significância estatística entre eles.

4.2.5 Avaliação imunohistoquímica

As amostras mostraram marcação evidente para a proteína podoplanina em ambos os grupos. A expressão da proteína revelou uma longa formação de dendritos osteócitos dentro da área enxertada, o que é impossível identificar com a coloração histológica usual. A atividade da podoplanina foi detectada em áreas de formação óssea nova, osso imaturo e também em áreas ósseas lamelares. Como esperado, as partículas de restante do aloenxerto foram negativas para a imunocoloração.

4.2.6 Sobrevivência de implantes

Dos 305 implantes colocados nas áreas reconstruídas, 16 implantes (5,24%) foram perdidos no período avaliado no estudo, mostrando uma taxa de sobrevivência cumulativa de 94,76%. Ao utilizar o paciente como unidade, 79% dos indivíduos apresentaram falhas de implante. Não houve correlação entre o número de implantes perdidos e os grupos [$p=0,673$] e também não houve correlação estatisticamente significativa com os sítios enxertados [$p=0,252$].

4.3 **Estudo 3**

Um total de 58 pacientes com 92 rebordos alveolares atróficos foram enxertados durante o período do estudo. A distribuição das complicações foi analisada utilizando o indivíduo como uma unidade. Os eventos adversos iniciais registrados foram: infecção em 6 (10,3%) casos e deiscência em 5 (8,62%) dos indivíduos. Ambas as situações foram tratadas com desbridamento, antibioticoterapia e instrução de higiene e foram cuidadosamente monitoradas para preservar os enxertos. A exposição tardia dos enxertos ocorreu em 7 (12,07%) dos casos. A perda parcial e total do enxerto esteve sempre presente com outras

complicações e ocorreu em 4 (6,90%) e 3 (5,17%) pacientes respectivamente. A taxa de falha do implante foi de 16 (5,97%) dos 268 aparelhos colocados em 12 (20,6%) dos 58 pacientes.

A infecção mostrou ter uma relação significativa com a perda parcial e total do enxerto quando comparada a sítios sem infecção (2 de 52 [$p = 0,049$], 0 de 52 [$p < 0,001$], respectivamente). A ocorrência de deiscência de sutura também apresentou correlação estatisticamente significativa com perda parcial e total de enxerto (2 de 53 [$p = 0,033$]; 1 de 53 [$p = 0,017$], respectivamente). Apenas uma perda parcial do enxerto e uma perda total do enxerto foram registradas em locais de exposição tardia. Isto não foi estatisticamente significativo quando comparado com locais sem exposição tardia (3 de 51 [$p = 0,411$], 2 de 51 [$p = 0,325$]).

As comparações entre desfecho inadvertido e falha do implante não mostraram qualquer significância estatística. Isto significa que não há associação entre infecção e falha do implante, deiscência e falha do implante, ou exposição tardia e falha do implante.

Apenas uma das relações analisadas demonstrou-se estatisticamente significativa. Assim, a maioria dos casos não mostra associação entre a prevalência de complicações e os sítios de enxerto. Isto também significa que não há relação entre a localização do enxerto e o tipo de complicação. Contudo, os pacientes com enxerto total do arco demonstraram significativamente mais falhas de implante.

Histologicamente, as amostras dos fragmentos removidos na perda parcial e total do enxerto apresentaram infiltrado inflamatório intenso. Nas amostras onde a perda ocorreu após a incorporação inicial do enxerto, é possível ver as células inflamatórias agudas perto do osso recém-formado.

4.4 Estudo 4

Os enxertos ósseos apresentaram-se clinicamente favoráveis e demonstraram uma forte união ao local receptor no momento da sua exposição. Quando penetrados com a broca de trefina, todos os 4 enxertos exibiram sangramento intra-ósseo como seria de esperar do tecido nativo, demonstrando assim evidência clínica de vascularização. Todos os implantes próximos aos locais

trefinados apresentaram sinais de tecido ósseo e mucoso saudáveis e estavam firmemente osseointegrados.

A reabsorção do aloenxerto após a instalação dos implantes foi evidenciada pela comparação das imagens tomográficas. As alterações volumétricas variaram de 2,1 a 7,7% nos 4 casos. Embora os enxertos apresentassem diferentes graus de redução de volume, nenhum dos implantes foi exposto ou apresentou fenestração óssea.

A avaliação histológica das amostras demonstrou enxertos bem incorporados com diferentes graus de remodelação. As biópsias mostraram um número abundante de osteócitos dentro das secções bem como osteoblastos no entornodas bordas de estruturas calcificadas. A infiltração de células inflamatórias variou de nenhuma a discreta e houve sinais de vascularização em todas as biópsias avaliadas.

Lacunas vazias de osteócitos foram evidentes no paciente número 2 onde foi utilizado enxerto de tibia córtico-esponjoso. Esta característica foi claramente identificada nas camadas superficiais do enxerto, ao nível da face cortical. Nas secções mais profundas e nas outras 3 amostras de pacientes foram encontrados poucos remanescentes dos enxertos originais.

5 DISCUSSÃO

Estudos avaliando a utilização dos enxertos ósseos alógenos frescos congelados na odontologia têm crescido consideravelmente nos últimos anos. O interesse da comunidade científica neste material reflete a necessidade dos profissionais em alcançar resultados satisfatórios em extensas reconstruções maxilares buscando segurança e minimização da morbidade trazidos pelo osso autógeno.

O presente trabalho incluiu pacientes com deficiências ósseas maxilares severas que, para serem reabilitados com implantes dentais, necessitavam de cirurgias reconstrutivas a fim de devolver um contorno ósseo do rebordo alveolar favorável para um tratamento previsível, estético, funcional e eficaz a longo prazo.

A literatura acerca do comportamento dos aloenxertos em bloco para o ganho ósseo maxilar ainda necessita de maiores investigações e a determinação de fatores importantes tais quais os parâmetros e intervalos de incorporação, assim como taxas de sucesso e prevalência de complicações não estão suficientemente definidos^{27,78}.

Um estudo piloto foi desenhado como forma de investigar o período ideal para instalação de implantes após a cirurgia de enxertia óssea e avaliar a incorporação destes aloenxertos.³⁹ Inicialmente, foi feita a determinação de 3 períodos distintos de intervalo antes da cirurgia de implante baseados nos relatos publicados pelos demais trabalhos. A seleção de 22 pacientes consecutivos com a avaliação das modificações volumétricas e o grau de incorporação dos enxertos foi executada através de um acompanhamento tomográfico e de uma análise histomorfométrica.

Os resultados deste primeiro estudo apresentaram-se bastante favoráveis com relação à viabilidade da utilização dos aloenxertos em bloco demonstrados pelo alto índice de sucesso nas cirurgias reconstrutivas e na sobrevivência dos implantes. Entretanto, tanto as impressões clínicas, como os dados provenientes da análise tomográfica foram importantes para a modificação do estudo subsequente com relação aos intervalos de espera. O período de 8 meses após a enxertia apresentou-se com uma característica de remodelação desfavorável clinicamente no momento da instalação dos implantes. Além disso, os dados da comparação volumétrica demonstraram uma diminuição total do volume dos enxertos significativamente maior do que os demais grupos, podendo chegar a 70% de perda de suas dimensões.

Ainda avaliando este mesmo grupo, os demais parâmetros estudados não apresentaram um desempenho significativamente superior que justificasse a manutenção deste intervalo de espera nos experimentos subsequentes. Com base nestes resultados, o segundo estudo, mais abrangente, foi desenhado com apenas grupos de 4 e 6 meses.

As análises por mensuração linear e de volume utilizando-se a tomografia computadorizada *cone-beam* têm aprimorado-se consideravelmente nos últimos anos. A disponibilidade de *softwares* com diferentes recursos torna as avaliações tanto para o uso clínico, quanto para a utilização em pesquisa, cada vez mais elaboradas. No estudo piloto, as mensurações volumétricas nas imagens de CBCT foram feitas utilizando-se um *software* de computador que foi previamente validado para sua utilização nesta avaliação. O *software* mostrou-se preciso e de fácil utilização para a geração de dados confiáveis na análise das alterações volumétricas. Contudo, conforme o desenvolvimento estudo, novas ferramentas estiveram disponíveis apresentando maior agilidade nas mensurações, além da geração de imagens mais elaboradas e ilustrativas. A escolha pela alteração do programano segundo estudo deu-se, então, por tais motivos e não propriamente pelo melhoramento na acurácia das análises.

Com fins de comparação histomorfométrica, no estudo piloto foram utilizados métodos de contagem e quantificação visual dos parâmetros avaliados. A determinação de *scores* para a comparação foi validada através de testes intra-examinador apresentando um índice Kappa de 0,80 - o que pode ser considerado como uma taxa de concordância extremamente fiel¹⁰³. Todavia, a utilização de somente 3 *scores* para a avaliação de um processo complexo como a incorporação dos tecidos enxertados em uma amostra significativamente maior que a inicial, poderia apresentar-se como uma limitação em uma análise mais precisa. Por outro lado, o aumento do número de *scores* visuais diminui a capacidade de concordância do operador. Por esta razão, no segundo estudo, as lâminas das biópsias foram fotografadas e um *software* de análise de imagens digitais (ImageJ) foi utilizado para gerar mensurações em percentual do campo ocupado. Desta forma, a quantificação dos parâmetros estudados pôde ser mais precisamente avaliada no estudo subsequente. Ainda na comparação histomorfométrica, os parâmetros iniciais de contagem de osteócitos e vasos foram excluídos do segundo estudo, uma vez que a quantificação de tecido ósseo neoformado foi utilizado e, acompanhando a literatura

atual,⁸¹ parece ser suficiente para a observação da atividade de incorporação dos enxertos.

No Brasil, a disponibilização dos tecidos alógenos aos profissionais cirurgiões tanto na odontologia quanto na ortopedia é feita através do Sistema Nacional de Transplantes. Esta regulação confere grande segurança e controle na utilização de materiais de origem humana, porém também influencia diretamente o processo de liberação e obtenção dos enxertos. Em outras palavras, isso significa que, por serem disponibilizados especificamente para cada caso e paciente, o oferecimento dos enxertos está sujeito ao estoque do Banco de Tecidos. Assim sendo, em algumas ocasiões do estudo piloto, os tecidos disponibilizados foram de origens variadas como de tíbia, íliaco ou fêmur dos doadores. Esta variação foi considerada no desenho do segundo estudo, uma vez que diferenças nas características da incorporação de enxertos de origens diferentes já foram descritas na literatura na utilização do osso autógeno.⁹⁰ Com isso, a disponibilização pelo Banco de Tecidos de enxertos de origem diferente de tíbia do doador, foi considerado como critério de exclusão para o estudo subsequente. Da mesma forma, a diferença na distribuição entre o conteúdo cortical e medular do enxerto parece ter influência nas características da incorporação no leito receptor.^{87,90} Apesar deste último ser um controle extremamente difícil de ser feito no ponto de vista clínico e apresentar-se como uma limitação de nosso estudo, a utilização de tecidos provenientes somente de tíbia buscou manter os enxertos o mais homogêneos possível.

Dentro dos demais fatores determinantes para a definição da previsibilidade de uma modalidade de tratamento está a avaliação da prevalência de resultados adversos. Embora pareça que muitas das complicações em curto prazo associadas à cirurgia de enxertia em bloco maxilar estejam mais relacionadas à técnica do que propriamente ao material utilizado, não existem dados disponíveis até então para tal comparação. As complicações observadas no decorrer do presente trabalho em muito se assemelham às descritas para outras modalidades de enxerto em bloco e, por esta razão, os mesmos parâmetros de avaliação foram utilizados.^{69,83} Desta forma, foi possível realizar uma análise das complicações e de taxas de sucesso que pudesse ser comparada tanto com modalidades de blocos ósseos autógenos como deblocos alógenos liofilizados.

A avaliação do sucesso e do comportamento de enxertos ósseos a longo prazo está disponível apenas em análises clínicas. Após a instalação dos implantes

nos enxertos incorporados, não há a necessidade de um novo acesso cirúrgico na região, tornando a biópsia destes sítios um procedimento inconveniente e desnecessário. Na ortopedia, cirurgias de revisão são indicadas e, apesar de raras, há relatos de análises histológicas de enxertos alógenos em cirurgias de quadril e joelho após períodos de até 27 meses.^{41,104} No presente trabalho, 4 biópsias puderam ser coletadas em pacientes que tinham recebido próteses sobre implantes instalados em enxertos depois de um período médio de 48.25 ± 3.5 meses. Estes indivíduos necessitaram de cirurgias complementares nas áreas enxertadas previamente incluídas nos primeiros estudos. Desta forma, foi possível o relato de dados clínicos, tomográficos e histológicos em um acompanhamento de longo prazo destes enxertos pela primeira vez na literatura.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente trabalho podemos concluir que:

- a) os enxertos ósseos alógenos frescos-congelados em bloco para aumento ósseo maxilar sofrem uma reabsorção volumétrica significativamente maior no intervalo de 6 meses (31,52%) comparado com o intervalo de 4 meses (13,98%). Dentro dos intervalos estudados, não foram encontradas diferenças nos parâmetros de incorporação dos enxertos. Levando-se em conta todos os achados do presente estudo, ambos os intervalos, 4 e 6 meses, são favoráveis para a instalação de implantes dentais;
- b) a prevalência de complicações com a utilização de enxertos ósseos alógenos frescos-congelados em bloco no presente estudo foi de 22,14%. Dentro das complicações avaliadas, a distribuição apresentou-se como: 10,3% de infecções; 8,62% de deiscência de sutura; 12,07% de exposição tardia do enxerto; 6,9% de perda parcial e 5,17% de perda total dos enxertos. A taxa de sobrevivência dos implantes instalados nas áreas enxertadas foi de 94,03%;
- c) Os enxertos ósseos alógenos frescos-congelados em bloco demonstram uma reabsorção volumétrica entre 2,1 a 7,7% após um período de acompanhamento de 4 anos com implantes em carga. Histologicamente, remanescentes do tecido alógeno foram encontrados juntamente com um número abundante de osteócitos, osteoblastos e vasos nas regiões enxertadas. Não foram identificados sinais infiltrado inflamatórias biópsias, corroborando com um quadro clínico de sucesso a longo prazo;
- d) os enxertos alógenos frescos-congelados em bloco apresentaram taxas de reabsorção volumétrica entre 13,98% (4 meses) e 31,52% (6 meses); neoformação óssea entre 20,79% (4 meses) e 27,2% (6 meses) histomorfometricamente; presença de células ósseas e ausência de infiltrado inflamatório histologicamente; intensa positividade para um marcador de atividade óssea fisiológica imunohistoquimicamente; prevalência de complicações de 22,14%;

além demonstrar uma taxa de sobrevivência dos implantes instalados de 94,03%. Os parâmetros avaliados apresentam-se similares aos de outras modalidades reconstitutivas, demonstrando a viabilidade dos enxertos em bloco alógenos como uma opção para o aumento ósseo maxilar com fins de instalação de implantes dentais.

REFERÊNCIAS

1. Esposito M, Ardebili Y, Worthington H V: Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. Cochrane database Syst Rev 7: CD003815, 2014.
2. Lambert FE, Weber H-P, Susarla SM, Belser UC, Gallucci GO: Descriptive analysis of implant and prosthodontic survival rates with fixed implant-supported rehabilitations in the edentulous maxilla. J Periodontol 80: 1220, 2009.
3. Becker W, Goldstein M, Becker BE, Sennerby L: Minimally invasive flapless implant surgery: a prospective multicenter study., 2005.
4. Steenberghe D Van, Quirynen M, Svensson B, Brånemark PI: Clinical examples of what can be achieved with osseointegration in anatomically severely compromised patients. Periodontol 2000 33: 90, 2003.
5. Milinkovic I, Cordaro L: Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 43: 606, 2014.
6. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington H V: The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. Int J Oral Maxillofac Implants 21: 696, 2006.
7. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M: Bone augmentation procedures in implant dentistry. Int J Oral Maxillofac Implants 24 Suppl: 237, 2009.
8. McAllister BS, Haghghat K: Bone augmentation techniques. J Periodontol 78: 377, 2007.
9. Misch CM: Maxillary autogenous bone grafting. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 23: 229, 2011.
10. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington H V, Coulthard P: The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol 2: 167, 2009.
11. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF: Bone graft substitutes. Expert Rev Med Devices 3: 49, 2006.
12. Klinge B, Flemmig TF: Tissue augmentation and esthetics (Working Group 3). Clin Oral Implants Res 20 Suppl 4: 166, 2009.
13. Sodek J, McKee MD: Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontol 2000 24: 99, 2000.

14. Javed A, Chen H, Ghorri FY: Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22: 283, 2010.
15. Hämmerle CHF, Jung RE: Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000 33: 36, 2003.
16. Schliephake H, Weich H a., Dullin C, Gruber R, Frahse S: Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid-An experimental study in rats. *Biomaterials* 29: 103, 2008.
17. Misch CM: Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12: 767, 1997.
18. Andrade MGS, Moreira DC, Dantas DB, Sá CN, Bittencourt TCB, DSC de, Sadigursky M: Pattern of osteogenesis during onlay bone graft healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110: 713, 2010.
19. Oh K-C, Cha J-K, Kim C-S, Choi S-H, Chai J-K, Jung U-W: The influence of perforating the autogenous block bone and the recipient bed in dogs. Part I: a radiographic analysis. *Clin Oral Implants Res* 22: 1298, 2011.
20. Deatherage J: Bone materials available for alveolar grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22: 347, 2010.
21. Zouhary KJ: Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22: 301, 2010.
22. Spin-Neto R, Landazuri Del Barrio RA, Pereira LAVD, Marcantonio RAC, Marcantonio E, Marcantonio E: Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res* 15: 490, 2013.
23. Springer ING, Terheyden H, Geiß S, Härle F, Hedderich J, Açil Y: Particulated bone grafts - Effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 15: 205, 2004.
24. Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW: Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 13: 514, 2002.
25. Sittitavornwong S, Gutta R: Bone graft harvesting from regional sites. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 22: 317, 2010.
26. Arx T von, Häfliger J, Chappuis V: Neurosensory disturbances following bone harvesting in the symphysis: a prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* 16: 432, 2005.
27. Waasdorp J, Reynolds DMDMA, Reynolds M a: Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25: 525, 2008.

28. Lupovici J: Revisiting the hopeless ridge: part I--challenging the gold standard. *Compend Contin Educ Dent* 30: 130, 2009.
29. Leonetti J a., Koup R: Localized Maxillary Ridge Augmentation With a Block Allograft for Dental Implant Placement: Case Reports. *Implant Dent* 12: 217, 2003.
30. Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, Scheyer ET, Mellonig JT: Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23: 417, 2003.
31. Contar CMM, Sarot JR, Bordini J, Galvão GH, Nicolau GV, Machado MAN: Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *J oral Maxillofac Surg* 67: 1280, 2009.
32. Macedo LGS, Mazzucchelli-Cosmo LA, MacEdo NL, Monteiro ASF, Sendyk WR: Fresh-frozen human bone allograft in vertical ridge augmentation: Clinical and tomographic evaluation of bone formation and resorption. *Cell Tissue Bank* 13: 577, 2012.
33. Wildemann B, Kadow-Romacker a, Pruss a, Haas NP, Schmidmaier G: Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank* 8: 107, 2007.
34. Bormann N, Pruss A, Schmidmaier G, Wildemann B: In vitro testing of the osteoinductive potential of different bony allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 130: 143, 2010.
35. Gomes KU, Carlini JL, Biron C, Rapoport A, Dedivitis R a: Use of allogeneic bone graft in maxillary reconstruction for installation of dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 2335, 2008.
36. Carinci F, Brunelli G, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmer L: A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clin Implant Dent Relat Res* 12: 91, 2010.
37. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Freitas RM De, Pereira LAVD, Carlos IZ, Marcantonio E: Immunological aspects of fresh-frozen allogeneic bone grafting for lateral ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 24: 963, 2013.
38. Hawthorne AC, Xavier SP, Okamoto R, Salvador SL, Antunes AA, Salata LA: Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling: Part III: Allografts. *Clin Oral Implants Res* 24: 1164, 2013.
39. Deluiz D, Oliveira LS, Pires FR, Tinoco EMB: Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: tomographic, histologic, and histomorphometric findings. *Clin Implant Dent Relat Res* 17: 296, 2015.

40. Contar CMM, Sarot JR, Costa MB da, Bordini J, Lima AAS de, Alanis LRA, Trevilatto PC, Machado MÂN: Fresh-frozen bone allografts in maxillary ridge augmentation: histologic analysis. *J Oral Implantol* 37: 223, 2011.
41. Hamer a. J, Suvarna SK, Stockley I: Histologic evidence of cortical allograft bone incorporation in revision hip surgery. *J Arthroplasty* 12: 785, 1997.
42. Heekin RD, Engh CA, Vinh T: Morselized allograft in acetabular reconstruction. A postmortem retrieval analysis. *Clin Orthop Relat Res*: 184, 1995.
43. Ullmark G, Obrant KJ: Histology of impacted bone-graft incorporation. *J Arthroplasty* 17: 150, 2002.
44. Donk S van der, Buma P, Slooff TJJH, Gardeniers JWM, Schreurs BW: Incorporation of morselized bone grafts: a study of 24 acetabular biopsy specimens. *Clin Orthop Relat Res*: 131, 2002.
45. Petrunaro PS, Amar S: Localized Ridge Augmentation with Allogenic Block Grafts Prior to Implant Placement: Case Reports and Histologic Evaluations. *Implant Dent* 14: 139, 2005.
46. Keith JD, Petrunaro P, Leonetti J a, Elwell CW, Zeren KJ, Caputo C, Nikitakis NG, Schöpf C, Warner MM: Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). *Int J Periodontics Restorative Dent* 26: 321, 2006.
47. Pendarvis WT, Sandifer JB: Localized ridge augmentation using a block allograft with subsequent implant placement: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 28: 509, 2008.
48. Morelli T, Neiva R, Wang H-L: Human histology of allogeneic block grafts for alveolar ridge augmentation: case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 29: 649, 2009.
49. Viscioni A, Franco M, Rigo L, Guidi R, Brunelli G, Carinci F: Implants inserted into homografts bearing fixed restorations. *Int J Prosthodont* 22: 148, 2008.
50. Peleg M, Sawatari Y, Marx RN, Santoro J, Cohen J, Bejarano P, Malinin T: Use of corticocancellous allogeneic bone blocks for augmentation of alveolar bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25: 153, 2010.
51. Smolka W, Eggensperger N, Carollo V, Ozdoba C, Iizuka T: Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 17: 149, 2006.
52. Franco M, Viscione A, Rigo L, Guidi R, Brunelli G, Avantaggiato A, Carinci F: Osseotite implants inserted into fresh frozen bone grafts. *J Maxillofac Oral Surg* 8: 201, 2009.

53. D'Aloja C, D'Aloja E, Santi E, Franchini M: The use of fresh-frozen bone in oral surgery: a clinical study of 14 consecutive cases. *Blood Transfus* 9: 41, 2011.
54. Committee on Research the American Academy of Periodontology S and T: Position Paper; Tissue Banking of Bone Allografts Used in Periodontal Regeneration. *J Periodontol* 72: 834, 2001.
55. Pape HC, Evans A, Kobbe P: Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma* 24 Suppl 1: S36, 2010.
56. Goldring SR, Roelke M, Glowacki J: Multinucleated cells elicited in response to implants of devitalized bone particles possess receptors for calcitonin. *J Bone Miner Res* 3: 117, 1988.
57. Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893, 1965.
58. Xavier SP, Dias RR, Sehn FP, Kahn A, Chaushu L, Chaushu G: Maxillary sinus grafting with autograft vs. fresh frozen allograft: a split-mouth histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res*: 1, 2014.
59. Shand JM, Heggie a a C, Holmes a D, Holmes W: Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31: 525, 2002.
60. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Borgonovo A, Rezzani R, Santoro F: TGF-beta1 and VEGF after fresh frozen bone allograft insertion in oral-maxillo-facial surgery. *Histol Histopathol* 25: 463, 2010.
61. Marx RE, Carlson ER: Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 1372, 1993.
62. ANVISA: Legislação em Vigilância Sanitária. Resolução da Dir Colegiada RDC No 220 27 dezembro, 2006.
63. Acocella A, Bertolai R, Nissan J, Sacco R: Clinical, histological and histomorphometrical study of maxillary sinus augmentation using cortico-cancellous fresh frozen bone chips. *J Craniomaxillofac Surg* 39: 192, 2011.
64. Keith JD: Localized ridge augmentation with a block allograft followed by secondary implant placement: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 24: 11, 2004.
65. Carinci F, Brunelli G, Zollino I, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Guidi R, Strohmenger L: Mandibles grafted with fresh-frozen bone: an evaluation of implant outcome. *Implant Dent* 18: 86, 2009.
66. Barone A, Varanini P, Orlando B, Tonelli P, Covani U: Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 1300, 2009.

67. Bianchini MA, Buttendorf AR, Benfatti C a M, Bez LV, Ferreira CF, Andrade RF de: The use of freeze-dried bone allograft as an alternative to autogenous bone graft in the atrophic maxilla: a 3-year clinical follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 29: 643, 2009.
68. Wallace S, Gellin R: Clinical evaluation of freeze-dried cancellous block allografts for ridge augmentation and implant placement in the maxilla. *Implant Dent* 19: 272, 2010.
69. Chaushu G, Mardinger O, Peleg M, Ghelfan O, Nissan J, Allografts B: Analysis of complications following augmentation with cancellous block allografts. *J Periodontol* 81: 1759, 2010.
70. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Pereira LAVD, Marcantonio E, Wenzel A: Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res* 24: 167, 2013.
71. Lumetti S, Consolo U, Galli C, Multinu A, Piersanti L, Bellini P, Manfredi E, Corinaldesi G, Zaffe D, Macaluso GM, Marchetti C: Fresh-frozen bone blocks for horizontal ridge augmentation in the upper maxilla: 6-month outcomes of a randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 16: 116, 2014.
72. Nissan J, Mardinger O, Calderon S, Romanos GE, Chaushu G: Cancellous bone block allografts for the augmentation of the anterior atrophic maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res* 13: 104, 2011.
73. Nissan J, Marilena V, Gross O, Mardinger O, Chaushu G: Histomorphometric analysis following augmentation of the anterior atrophic maxilla with cancellous bone block allograft. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27: 84.
74. Nissan J, Gross O, Mardinger O, Ghelfan O, Sacco R, Chaushu G: Post-traumatic implant-supported restoration of the anterior maxillary teeth using cancellous bone block allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 69: e513, 2011.
75. Novell J, Novell-Costa F, Ivorra C, Fariñas O, Munilla A, Martinez C: Five-year results of implants inserted into freeze-dried block allografts. *Implant Dent* 21: 129, 2012.
76. Acocella A, Bertolai R, Ellis E, Nissan J, Sacco R: Maxillary alveolar ridge reconstruction with monocortical fresh-frozen bone blocks: a clinical, histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg* 40: 525, 2012.
77. Barone A, Varanini P, Orlando B, Tonelli P, Covani U: Deep-Frozen Allogeneic Onlay Bone Grafts for Reconstruction of Atrophic Maxillary Alveolar Ridges: A Preliminary Study. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 1300, 2009.
78. Monje A, Picos MA, Chan H, Suarez F, Gargallo-Albiol J, Hernández-Alfaro F, Galindo-Moreno P, Wang H: On the feasibility of utilizing allogeneic bone blocks for atrophic maxillary augmentation. *Biomed Res Int* 2014: 1, 2014.

79. Kim S-G, Park J-S, Lim S-C: Placement of implant after bone graft using J block allograft. *Implant Dent* 19: 21, 2010.
80. Contar CMM, Sarot JR, Bordini J, Galvão GH, Nicolau GV, Machado MAN: Maxillary Ridge Augmentation With Fresh-Frozen Bone Allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 1280, 2009.
81. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Coletti FL, Pereira L a. VD, Marcantonio E, Wenzel A: Remodeling of cortical and corticocancellous fresh-frozen allogeneic block bone grafts - a radiographic and histomorphometric comparison to autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res* 26: 747, 2015.
82. Pelegrine AA, Sorgi da Costa CE, Sendyk WR, Gromatzky A: The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank* 12: 171, 2011.
83. Chiapasco M, Zaniboni M: Failures in jaw reconstructive surgery with autogenous onlay bone grafts for pre-implant purposes: incidence, prevention and management of complications. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 23: 1, 2011.
84. Lee FY, Hazan EJ, Gebhardt MC, Mankin HJ: Experimental model for allograft incorporation and allograft fracture repair. *J Orthop Res* 18: 303, 2000.
85. Hofmann a, Konrad L, Hessmann MH, Küchle R, Korner J, Rompe JD, Rommens PM: The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. *J Orthop Res* 23: 846, 2005.
86. Pappalardo S, Mastrangelo F, Reale Marroccia D, Cappello V, Ciampoli C, Carlino V, Tanteri L, Costanzo M, Sinatra F, Tetè S: Bone regeneration: in vitro evaluation of the behaviour of osteoblast-like MG63 cells placed in contact with polylactic-co-glycolic acid, deproteinized bovine bone and demineralized freeze-dried bone allograft. *J Biol Regul Homeost Agents* 22: 175.
87. Manson PN: Facial bone healing and bone grafts. A review of clinical physiology. *Clin Plast Surg* 21: 331, 1994.
88. Smith JD, Abramson M: Membranous vs endochondrial bone autografts. *Arch Otolaryngol* 99: 203, 1974.
89. Zins JE, Whitaker LA: Membranous vs endochondral bone autografts: implications for craniofacial reconstruction. *Surg Forum* 30: 521, 1979.
90. Ozaki W, Buchman SR: Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg* 102: 291, 1998.

91. Kluger R, Bouhon W, Freudenberger H, Kröner A, Engel A, Hoffmann O: Removal of the surface layers of human cortical bone allografts restores in vitro osteoclast function reduced by processing and frozen storage. *Bone* 32: 291, 2003.
92. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD: Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol* 69: 470, 1998.
93. Costain DJ, Crawford RW: Fresh-frozen vs. irradiated allograft bone in orthopaedic reconstructive surgery. *Injury* 40: 1260, 2009.
94. Boyce T, Edwards J, Scarborough N: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 30: 571, 1999.
95. Stevenson S, Li XQ, Martin B: The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 73: 1143, 1991.
96. Stevenson S: The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 69: 573, 1987.
97. Deijkers RL, Bouma GJ, Meer-Prins EM van der, Huysmans PE, Taminiau AH, Claas FH: Human bone allografts can induce T cells with high affinity for donor antigens. *J Bone Joint Surg Br* 81: 538, 1999.
98. Nelissen RG, Bauer TW, Weidenhielm LR, LeGolvan DP, Mikhail WE: Revision hip arthroplasty with the use of cement and impaction grafting. Histological analysis of four cases. *J Bone Joint Surg Am* 77: 412, 1995.
99. Carinci F, Guidi R, Franco M, Viscioni A, Rigo L, Santis B De, Tropina E: Implants inserted in fresh-frozen bone: a retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence Int (Berl)* 40: 413, 2009.
100. Deluiz D, Santos Oliveira L, Ramôa Pires F, Reiner T, Armada L, Nunes MA, Muniz Barretto Tinoco E: Incorporation and Remodeling of Bone Block Allografts in the Maxillary Reconstruction: A Randomized Clinical Trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 19: 180, 2017.
101. Deluiz D, Oliveira L, Fletcher P, Pires FR, Nunes MA, Tinoco EMB: Fresh-Frozen Bone Allografts in Maxillary Alveolar Augmentation: Analysis of Complications, Adverse Outcomes, and Implant Survival. *J Periodontol* 87: 1261, 2016.
102. Deluiz D, Oliveira LS, Fletcher P, Pires FR, Tinoco JM, Tinoco EMB: Histologic and Tomographic Findings of Bone Block Allografts in a 4 Years Follow-up: A Case Series. *Braz Dent J* 27: 775, 2016.

- 103.Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159, 1977.
- 104.Gouin F, Passuti N, Verrielle V, Delecrin J, Bainvel J V: Histological features of large bone allografts. *J Bone Joint Surg Br* 78: 38, 1996.

ANEXO A – Estudo 1

Deluiz, D., Oliveira, L.S., Pires, F.R., Tinoco, E.M.B. Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: tomographic, histologic, and histomorphometric findings. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2015: 17, 296–306.

ABSTRACT

Background: Bone allografts have shown satisfactory clinical results in alveolar ridge reconstructions. However, the process of incorporation and the resorption rates of these grafts are not yet fully understood.

Purpose: The aim of this study was to use computed tomography (CT), histology, and histomorphometry to assess the time-dependent rates of resorption and incorporation of fresh-frozen bone allografts.

Materials and Methods: Twenty-four patients underwent alveolar ridge reconstruction with bone block allografts and were randomly allocated to three groups with different graft healing periods (4, 6, or 8 months) before implant placement. To assess the resorption rates, CT scans were acquired within 7 days after bone graft surgery and at the end of the period. Graft samples were collected and sent for histological and histomorphometric analyses.

Results: The graft resorption mean rates were $13.02\% \pm 3.86$, $32.77\% \pm 7.84$, and $50.78\% \pm 10.43$ for the 4-, 6-, and 8-month groups, respectively, and were significantly different among the three groups. Newly formed bone with osteocytes near the grafted bone was observed in all three groups. The number of osteocytes was significantly lower at 4 months. Grafted bone remains were significantly higher in the shortest period of time. All of the grafts showed large amounts of calcified tissue.

Conclusions: All three groups showed new bone formation and different bone resorption rates. Graft healing periods of 4 months showed less graft resorption and seemed to be the most favorable for implant placement. Healing periods of 8 months showed the largest rate of graft resorption, which could render the grafts unfavorable for implant placement.

KEY WORDS: allograft, alveolar ridge reconstruction, atrophic maxilla, bone grafting

ANEXO B – Estudo 2

Deluiz, D., Santos Oliveira, L., Ramôa Pires, F., Reiner, T., Armada, L., Nunes, M.A., Muniz Barretto Tinoco, E. Incorporation and Remodeling of Bone Block Allografts in the Maxillary Reconstruction: A Randomized Clinical Trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2017: 19, 180–194.

ABSTRACT

Background: Severe alveolar atrophy often presents a challenge for the implant surgery. The significant lack of bone in the alveolar ridges may compromise the final restorations both from the aesthetic and functional standpoints.

Objectives: To evaluate the behavior of bone block allografts for the maxillary augmentation and to investigate its incorporation, remodeling, and implant survival rates in two different healing time points.

Material and Methods: Sixty-six consecutive patients (52 female/14 male, mean age: 57.9569.06 years old), presenting 113 atrophic alveolar ridges underwent maxillary augmentation with fresh-frozen allogeneic bone blocks from tibia. Patients were randomly assigned in two groups: Group 1—patients who would wait 4 months for implant placement after grafting, and Group 2—patients who would wait 6 months. Events of infection, suture dehiscence or mucosal perforation were recorded. Cone-beam computed tomography scans were compared volumetrically between the time of the grafting surgery and reentry procedure after incorporation. Biopsies were collected and subjected to histological, histomorphometric and immunohistochemical analysis.

Results: A total of 305 implants were placed in the reconstructed sites. The mean resorption rate in Group 1 (13.98%65.59) was significantly lower than Group 2 (31.52%66.31). The amount of calcified tissue, newly formed bone and remaining graft particles demonstrated no difference between groups. The samples showed evident immunolabeling for the podoplanin protein in both groups. The implants cumulative survival rate was 94.76%.

Conclusions: The findings of the present study indicate that there is a significant difference regarding the resorption of the grafts when waiting 4 or 6 months before placing the implants, even though no difference was found in the histological, histomorphometric, and immunohistochemical features. Both 4-month and 6-months healing times are suitable for the implant placement.

KEY WORDS: alveolar ridge reconstruction, bone allograft, bone augmentation, bone grafting, edentulous atrophic maxilla, implant survival, randomized controlled trial, histological analysis

ANEXO C – Estudo 3

Deluiz, D., Oliveira, L., Fletcher, P., Pires, F.R., Nunes, M.A., Tinoco, E.M.B. Fresh-Frozen Bone Allografts in Maxillary Alveolar Augmentation: Analysis of Complications, Adverse Outcomes, and Implant Survival. *Journal of periodontology*. 2016; 87, 1261–1267.

ABSTRACT

Background: Success of any bone augmentation procedure is dependent on several factors. Because complications occur in some cases, the aims of this study are to analyze adverse events associated with placement of fresh-frozen bone allografts (FFBAs) during alveolar ridge augmentation and to assess 1-year survival of dental implants placed in reconstructed sites.

Methods: Fifty-eight consecutive patients (15 males and 43 females, aged 38 to 76 years; mean age: 58 ± 9.2 years) requiring maxillary bone reconstruction prior to implant placement were enrolled in this study. A total of 268 implants was subsequently placed in sites reconstructed with FFBAs. There were 22 posterior grafted sites, 19 anterior, and 17 full-arch sites. After a 4- to 6-month integration period, all patients received an implant-supported fixed prostheses. Complications occurring during treatment and the 12-month follow-up period were recorded and evaluated.

Results: Thirteen of 58 (22.41%) patients experienced some kind of complication in the receptor site. Infection occurred in six (10.34%) individuals, dehiscence in five (8.62%), and mucosal perforation in seven (12.07%). Adverse outcomes categorized as partial and total graft loss occurred in four (6.90%) and three (5.17%) patients, respectively. Implant failure rate was 16 (5.97%) of the 268 fixtures placed in 12 (20.70%) of 58 patients.

Conclusions: Infection and suture dehiscence are significantly correlated with graft loss in a maxillary FFBA augmentation. Patients with full-arch grafting reconstructions lost significantly more implants. Early diagnosis and prompt management of adverse events seem to be of great importance in prevention of total graft loss.

KEY WORDS: Allografts; alveolar ridge augmentation; bone transplantation; graft survival; postoperative complications; wound healing.

ANEXO D – Estudo 4

Deluiz, D., Oliveira, L.S., Fletcher, P., Pires, F.R., Tinoco, J.M., Tinoco, E.M.B. Histologic and Tomographic Findings of Bone Block Allografts in a 4 Years Follow-up: A Case Series. *Brazilian Dental Journal*. 2016: 27, 775–780.

ABSTRACT

The aim of this paper is to report histologic and tomographic findings of fresh frozen bone block allografts bearing dental implants in functional occlusion in a long-term follow-up. Four patients with implants functionally loaded for 4 years on augmented ridges requiring additional mucogingival surgery or implant placement were included in this case series. Cone-beam tomography scans were compared volumetrically between the baseline (first implant placement) and current images. Biopsies of the grafts were retrieved and sent to histological analysis. Volumetric reduction of the grafts varied from 2.1 to 7.7%. Histological evaluation demonstrated well-incorporated grafts with different degrees of remodeling. While data presented in this report are from a small sample size and do not allow definitive conclusions, the biopsies of the grafted sites were very similar to the host's native bone. Remodeling of the cortical portion of the allografts seems to take longer than the cancellous portion. The presence of unincorporated graft remains did not impair the implant success or the health of the surrounding tissues. This is the first time histologic and tomographic long term data of bone allograft have been made available in dentistry.