

Fábio Yoshio Tanaka

ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR
COMPARANDO OS MEIOS DE CONSERVAÇÃO
PARA ENXERTO ÓSSEO DE CALOTA CRANIANA.
ANÁLISE MICROSCÓPICA E IMUNOISTOQUÍMICA
EM RATOS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
“Campus de Araçatuba – UNESP”, para obtenção do
grau de Doutor em Odontologia - Área de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Tetuo Okamoto
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA

2005

Dados Curriculares

Fábio Yoshio Tanaka

Nascimento : 23/02/1972 – BAURU/SP

Filiação : Jorge Heiji Tanaka

Alice Yoshiko Tanaka

1991-1994..... : Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

1996-1999..... : Prof. Assistente da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Universidade de Marília- UNIMAR-SP.

1997-1999..... : Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

1999..... : Prof. Adjunto da Disciplina de Anestesiologia e Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Universidade Paranaense UNIPAR- Campus Cascavel- PR.

2003-
2005.....: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Doutorado, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.



Dedicatória

A Deus,

Pelo seu infinito amor,

Pela razão e motivo da nossa existência,

Pela Sua Proteção,

Pela Sua Sabedoria.

Venho, neste momento, agradecê-lo pela oportunidade recebida de cursar, aprimorar, aprender a aprender e concluir mais uma fase da minha vida, pois foi Ele quem sempre me guio e iluminou meus passos para esta vitória.

Muito Obrigado!

À minha esposa Rosana Aramaki Tanaka,

pelo incentivo constante, companheirismo e espírito de resignação pelo qual você soube: compreender-me, ajudar-me nas fases mais árduas da conquista deste ideal e também pelas horas de convívio e afeto, que a elaboração deste trabalho lhes roubou. Te amo!
Meu sincero muito obrigado!

Á minha filha Larissa Aramaki Tanaka,

Por ser parte integrante neste contexto e desta etapa da minha vida, pois neste período de pós-graduação que participou da minha alegria desde o momento em que fui aprovado, mesmo que na vida intra-uterina. Participou na luta e concretização deste ideal logo que você arriscou seus primeiros passos. Alegrou minha vida com seu sorriso, carinho e suas primeiras palavras, deixando sempre a certeza que nunca estive e nem estarei só.

Aos meus pais Jorge e Alice, por ter me ensinado os princípios de educação, amor ao próximo, espírito de luta, sinceridade e honestidade.

Aos meus Irmãos Maurício e Érika pelo amor fraterno e participação das minhas conquistas.

Aos meus sogro e sogra Girou Aramaki e Tezerinha, pelo sentimento que demonstraram, pelo estímulo e aquele mais sincero e verdadeiro carinho que só se reserva a um filho.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto, pelo seu exemplo a ser seguido como pessoa, professor e orientador. Considero-o como meu pai em minha formação, pois o senhor me ensinou a pesquisar, ensinou-me com sua amizade sincera, confiança e humildade que a pesquisa se faz por meio de muita dedicação e amor.

Prof. Tetuo, muito obrigado pela oportunidade oferecida, pela orientação segura e confiança depositada em mim, durante, no transcorrer do curso e no desenvolver desta pesquisa.

A Prof^a.Dra. Roberta Okamoto, pelo exemplo de pessoa e características incomensuráveis como seu pai. Pela orientação segura, dedicação e tempo despendido na execução e ensinamentos no campo da imunistoquímica os quais sem eles a execução deste trabalho não seria possível.



Agradecimentos

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP-Araçatuba, Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, meu eterno agradecimento por conceder essa oportunidade de realizar o Curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos e amizade;

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação e da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pelo conhecimento, amizade e ensinamentos transmitidos;

À Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba- UNESP” – em nome do seu Diretor o Professor Doutor Paulo Botacin, por conceder recursos e abrir as portas desta maravilhosa Universidade para a realização irrestrita de pesquisa;

Ao CNPq (processo no- 140904/2003-4), pela concessão da bolsa de estudo, possibilitando assim a realização deste;

Ao amigo e Professor Dr. Américo de Oliveira e Prof. Dr. Michel Saad Neto, pela oportunidade de convivência e aprendizado;

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia e Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, pela acolhida, amizade, convivência gratificante e ensinamentos valiosos para minha formação;

A Marina, Adélia e Valéria do setor de Pós-Graduação pela receptividade calorosa, amizade, dedicação e ajuda irrestrita no setor de suas atividades;

Aos Amigos André Dotto Sottovia, Thais Manfrin, Marcelo Kaiatt, Cristiano, Eduardo, José Luiz Leles, Vínicius Canavarros Palma, Jordan, Fernando Kaiatt e Natasha pela convivência e amizade sincera que já deixam saudades.

Aos Amigos e Companheiros na execução da pesquisa, Carolina Chiantelli Cláudio, Thaís da Silveira Rodrigues, Paulo de Almeida Júnior, Leandro de Carvalho Cardoso, pela amizade, convívio, companheirismo, solidariedade sempre demonstrados e pelo apoio e estímulo jamais negados.

Aos Amigos da Universidade Paranaense UNIPAR, Professores da Disciplina de Dentística, Ortodontia, Prótese, Periodontia, Preventiva, Endodontia, Radiologia, Estomatologia, Fisiologia, Anatomia, Histologia e em especial ao Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm, Prof. Dr. Márcio Gramma Hoepfner, Prof. Luís César Lopes, Prof. Emerson Chaves Furlaneto pelo incentivo, apoio e compreensão os quais foram imprescindíveis para a realização desta Pós-Graduação;

Agradecimentos

Ao Departamento de Histologia e Embriologia Humana da Faculdade de Odontologia da Araçatuba-UNESP por permitir e dar suporte a realização da parte Laboratorial e Experimental deste Trabalho;

Aos funcionários e amigos, Cleide, Gilmar, Dirce, Bernadete, Valdir e Glauco, pela acolhida, pelo convívio e apoio jamais negados;

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção carinhosa, eficiência e exemplo de amor ao trabalho;

Este trabalho e a realização deste Curso de Pós Graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial foi possível graças à colaboração e ajuda de várias pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho. A todos o meu Muito Obrigado!!!!



Epígrafe

A inteligência sem amor, te faz perverso.

A justiça sem amor, te faz implacável.

A diplomacia sem amor, te faz hipócrita.

O êxito sem amor, te faz arrogante.

A riqueza sem amor, te faz avaro.

A docilidade sem amor, te faz servil.

A pobreza sem amor, te faz orgulhoso.

A beleza sem amor, te faz ridículo.

A autoridade sem amor, te faz tirano.

O trabalho sem amor, te faz escravo.

A simplicidade sem amor, te deprecia.

A oração sem amor, te faz introvertido.

A lei sem amor, te escraviza.

A política sem amor, te deixa fanático.

A cruz sem amor se converte em tortura.

A vida sem amor...não tem sentido.

(Autor desconhecido)



Resumo

Tanaka FY. Estudo da viabilidade celular comparando os meios de conservação para enxerto ósseo de calota craniana. Análise microscópica e imunoistoquímica em ratos [Tese]. Araçatuba: UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2005.

O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade celular comparando os meios de conservação para enxerto ósseo. A preservação de células viáveis em procedimentos de enxerto ósseo é de fundamental importância para que se tenha a osteogênese. Foram utilizados 43 ratos machos. Após a antisepsia do campo operatório foi realizada incisão linear na região mediana da calota craniana para obtenção do enxerto da região parietal direita e esquerda as quais foram removidas com auxílio de trefina de 5mm de diâmetro acoplada em micro-motor de baixa rotação, sob constante irrigação com solução de soro fisiológico 0,9% estéril. As peças do enxerto foram acondicionadas em tubos de ensaio estéreis os quais foram devidamente identificadas de acordo com o grupo e mantidas dentro deste tubo conforme cada condição do grupo. Como meio de conservação da viabilidade celular do enxerto foi utilizado o soro fisiológico a 0,9% (Grupo I) e a solução de Euro Collins[®] (Grupo II) e ainda para verificar se a temperatura tem influência direta na manutenção da viabilidade celular foi analisado o enxerto ósseo conservado em temperatura ambiente (Grupo III) e o enxerto ósseo sem nenhuma solução, porém mantido em gelo (GrupoIV). Para avaliar a viabilidade celular foi utilizada análise histológica e imunoistoquímica imediata e ainda em cada grupo analisou-se a viabilidade celular no período de 6 horas, 12 horas, 24 horas e 30 horas. Como resultado observou-se que a solução de Euro Collins[®] apresentou-se superior ao soro fisiológico no que se diz respeito à manutenção da viabilidade celular do enxerto ósseo onde se pode notar viabilidade celular até o período de 30 horas.

Palavras- chave: Osso e Ossos. Transplante ósseo. Sobrevivência celular.
Sobrevivência do enxerto.



Abstract

Tanaka FY. Study of cellular viability comparing storage media for skull vault bone graft. A microscopic and immunohistochemical analysis in rats. [Tese]. Araçatuba: UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2005.

The aim of this study was to analyze cellular viability comparing storage media for skull vault bone graft. Preservation of viable cells in bone graft procedures is of paramount importance to obtain osteogenesis. Forty-three male used in this study. After antisepsis of the operative field, a linear incision was made on the middle region of the skull vault to obtain a bone graft from the right and left parietal areas. The grafts were removed with a 5-mm diameter trephine bur coupled to low-speed handpiece under continuous irrigation with sterile 0.9% saline. The graft pieces were placed in sterile 5-mL test tubes with caps, and were properly identified according to the group and maintained inside the test tubes as per each group conditions. The storage media evaluated for preservation of graft cellular viability were 0.9% saline (Group I) and Euro Collins[®] solution (Group II). In order to assess whether the temperature has a direct influence on the maintenance of cellular viability, the analysis was extended to bone grafts stored at room temperature (Group III) and bone grafts with no solution, but maintained in ice (Group IV). Cellular viability was evaluated by immediate histological and immunohistochemical analyses. For each group, cellular viability was analyzed at 6, 12, 24 and 30 hours after procedure. The results of this study showed that Euro Collins[®] solution yielded better performance than 0.9% saline as regards the maintenance of bone graft cellular viability (up to 30 hours).

Key-words: Bone and bones. Bone transplantation. Cell survival. Graft survival.



Lista de Abreviaturas

PVPI.....: Polivinilpirrolidona iodada

PBS.....: Solução Tampão Fosfato

HE.....: Hematoxicilina e eosina

OPG.....: Osteoprotegerina (Rabbit anti-opg- Santa Cruz Biotechnology)

RANK.....: Rabbit anti-rank- Santa Cruz Biotechnology)

RANKL ...: Goat anti-rankl- Santa Cruz Biotechnology)

DAB.....: Diaminobenzidina



Lista de Figuras

FIGURA 1	Grupo Euro Collins 24 horas – OPG, borda da calota (original, 160x, Diaminobenzidina).	31
FIGURA 2	Grupo seco ambiente 30 horas (original, 160x, HE).	32
FIGURA 3	Grupo seco gelo 30 horas (original,) 160x, HE).	32
FIGURA 4	Grupo imediato – OPG (original, 169x, Diaminobenzidina).	33
FIGURA 5	Grupo seco gelo 6 horas – RANKL, periferia da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).	33
FIGURA 6	Grupo seco ambiente 6 horas – RANKL (original, 63x, Diaminobenzidina)	34
FIGURA 7	Grupo soro fisiológico 6 horas – RANK (original, 160x, Diaminobenzidina).	34
FIGURA 8	Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).	35
FIGURA 9	Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 160x, Diaminobenzidina).	35
FIGURA 10	Grupo controle da imunoistoquímica (original, 63x, Diaminobenzidina).	36
FIGURA 11	Ratos (<i>Rattus norvegicus albinus</i> .Wistar) acondicionados em gaiolas (Biotério e Centro Cirúrgico Experimental “Ilídio Teodoro”-UNESP.	66
FIGURA 12	Ratos machos com peso corporal variando entre 250 a 300 gramas.	66
FIGURA 13	Anestesia por via intramuscular.	66
FIGURA 14	Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina.	66
FIGURA 15	Tricotomia.	66
FIGURA 16	Antissepsia com PVPI.	66
FIGURA 17	Incisão com lâmina 15.	67
FIGURA 18	Descolamento do retalho mucoperiostal com descolador de Molt e Hollemback 3S.	67

Hollemback 3S.

FIGURA 19	Osteotomia com broca trefina e irrigação com foro fisiológico 0,9% .	67
FIGURA 20	Área osteotomizada.	67
FIGURA 21	Remoção do osso da calota com auxílio do Hollemback 3 S.	67
FIGURA 22	Peça removida. Preservação das meníngeas.	67
FIGURA 23	Acondicionamento em frascos identificados.	68
FIGURA 24	Acondicionamento em soro fisiológico 0,9%.	68
FIGURA 25	Solução de Euro Collins.	68
FIGURA 26	Ativador da Solução de Euro Collins.	68
FIGURA 27	Conservação em isopor com gelo.	68
FIGURA 28	Conservação em temperatura aproximada de 3 graus Centígrados.	68
FIGURA 29	Peças acondicionadas para tramitação laboratorial.	69
FIGURA 30	Peças lavadas em agitador orbitário.	69
FIGURA 31	Peças em EDTA com trocas semanais.	69
FIGURA 32	Peças conservadas em solução de sacarose.	69
FIGURA 33	Micrótomo de congelação.	69
FIGURA 34	Inclusão da peça em sacarose.	69
FIGURA 35	Corte com espessura de 16 micrometros.	70
FIGURA 36	Colocação dos cortes em lâminas gelatinizadas.	70
FIGURA 37	Lâminas gelatinizadas.	70
FIGURA 38	Secagem das lâminas.	70

FIGURA 39	Protocolo imunistoquímica.	70
FIGURA 40	Lavagem com PBS.	70
FIGURA 41	Inativação da peroxidase endógena.	71
FIGURA 42	Ciclos de lavagem.	71
FIGURA 43	Anticorpo primário.	71
FIGURA 44	Reação do anticorpo primário.	71
FIGURA 45	Anticorpo secundário.	71
FIGURA 46	Reação do anticorpo secundário.	71
FIGURA 47	Incubação do complexo ABC.	72
FIGURA 48	Revelação.	72
FIGURA 49	Histológico em HE.	72



Lista de Tabelas

TABELA 1 Grupos e Períodos Experimentais.

25



Sumário

1. Introdução	19
2. Material e Método	23
3. Resultados	28
4. Discussão	37
5. Conclusão	45
6. Referências	47
7. Anexos:	55
Anexo A – Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	54
Anexo B- Revisão da Literatura	56
Anexo C- Figuras referentes à metodologia científica e experimental	65
Anexo D- Fotos das Lâminas do Histológico e Imunoistoquímico	73
Anexo E- Normas da Journal of Applied Oral Science	83
Anexo F- Instruções de uso – Solução Euro Collins	86

Introdução

“O segredo de progredir é começar. O segredo de começar é dividir as tarefas árduas e complicadas em tarefas pequenas e fáceis de executar e depois começar pela primeira”.

(Mark Twain)



1) Introdução*

O tratamento de deformidades crânio-maxilo-faciais, como também de defeitos congênitos, nessa área, tem um longo histórico de experiência com vários tipos de biomateriais. Os grandes defeitos ósseos resultantes de trauma, neoplasias ou infecções que não cicatrizam espontaneamente e muitas vezes deixam seqüelas que comprometem a forma e função dos maxilares. Similarmente, lacunas provenientes de ostectomias no esqueleto facial também, requerem enxertos para estabilizar os segmentos ósseos e devolver o contorno natural da região. (Klinge et al.¹³, 1992).

Do ponto de vista da aceitação biológica, em função da superior compatibilidade tecidual, o melhor material de enxerto é o autógeno. No entanto quando é utilizado, existe a necessidade de ato cirúrgico adicional para remoção do material que freqüentemente cria ferida cirúrgica cujo pós-operatório é clinicamente mais desconfortável ao paciente do que a cirurgia para a correção da deformidade (Okamoto et al.¹⁷, 1991, Klinge et al.¹³, 1992). O sintoma pós-operatório mais freqüente nesse caso é a dor. Porém outras ocorrências podem surgir: pneumotórax, na remoção de costela (Hauser⁸, 1992); hematoma retroperitoneal (Ziccardi et al.²⁸, 1992), na remoção de íliaco; e perfuração da dura-máter, na remoção da calota craniana (Jackson et al.⁹, 1987). Estas complicações são de ocorrência rara e freqüentemente relacionada com técnica incorreta. Assim esses fatos não devem impedir a utilização de enxertos autógenos, quando sua aplicação for indicada.

Na implantodontia a necessidade de correção de pequenos ou de grandes defeitos ósseos para a colocação de implantes e posterior reabilitação tornou-se prática rotineira e necessária (Kuabara M.R. et al.¹⁴, 2000). Há controvérsias e discussões a respeito da utilização de materiais para enxerto e

* Texto escrito segundo as normas da revista Journal of Applied Oral Science, anexo E.

reconstrução óssea, podendo ser utilizados tanto o osso autógeno quanto materiais alógenos e aloplásticos (Tanaka F.Y. et al.²⁶, 2001). No entanto, os melhores resultados têm sido relatados com o osso autógeno.

O enxerto ósseo autógeno pode ser obtido de área extra-bucal como a crista ilíaca; osso da calvária; osso da costela; clavícula e tíbia, porém todas elas exigem a presença de um médico especialista para sua remoção e um centro cirúrgico hospitalar com a presença do anestesiológico, aumentando invariavelmente o custo do procedimento para o paciente. Quando se elege como área doadora região intra-bucal, pode-se utilizar o mento e a região de linha oblíqua para reconstrução parcial da maxila. Quando se necessita de quantidade maior de tecido ósseo pode-se acessar o mento e a região de linha oblíqua bilateralmente, cuja manobra, no entanto ocasionaria o aumento do tempo cirúrgico. Além disso, pode provocar o estresse do paciente e necessidade de maior quantidade de tubetes anestésicos o qual pode até ultrapassar o limite máximo recomendável. Porém, quando se deseja realizar todo esse procedimento num só tempo operatório que incluiriam a incisão de quatro áreas intra-bucalis distintas o prudente seria a realização deste procedimento sob anestesia geral, devido aos fatores acima citados. Sugerir ao paciente realizar este procedimento sob anestesia geral aumenta o custo do procedimento e ou acaba provocando insegurança para o paciente, visto que muitos apresentam medo da anestesia geral e do âmbito hospitalar. Desta forma, uma das opções seria a realização da intervenção cirúrgica em duas etapas. Na primeira etapa reconstruiria um dos lados da maxila e após recuperação da morbidade local da região doadora e receptora faria a reconstrução do outro lado. Tal procedimento, no entanto aumentaria o tempo de reabilitação protética devido o período de convalescença e o risco de provocar prejuízo na consolidação óssea do enxerto por se tratar de áreas contíguas. Uma outra possibilidade seria realização deste procedimento cirúrgico sob anestesia local em dois tempos operatórios. No primeiro ato operatório, seria realizada a remoção do enxerto das regiões de mento e retro-molar bilateral. Decorrido um período de 12 a 30 horas seria realizado o segundo

ato operatório que incluiria o preparo e adaptação do enxerto na região receptora. Para manutenção e conservação da vitalidade das células contidas no enxerto ósseo autógeno, seria utilizada a solução de Euro Collins[®] que constitui o meio utilizado para conservação de órgãos para transplante.

Baseando-se nas propriedades e comprovações científicas da utilização do Euro Collins[®] como meio de perfusão e estocagem órgãos como: coração, rins, pâncreas, córneas e outros em condições de serem transplantados, tornam-se oportuno avaliar este meio como forma de manter a vitalidade celular do tecido ósseo autógeno para situações clínicas que permita a execução em dois tempos operatórios, criação de banco de osso autógeno ou até mesmo como meio de armazenamento para manter as melhores propriedades de viabilidade celular do enxerto ósseo, quando se requer período extra-corpóreo longo para adaptação ao leito receptor. Tratando-se de reconstrução de maxila utilizando-se de enxerto ósseo autógeno de calota craniana o tempo de remoção do enxerto até sua adaptação na maxila pode-se levar horas e aí também a melhor forma de se manter este enxerto com viabilidade celular ainda é uma incógnita e não existe ainda um consenso do que utilizar. Segundo (Piermattei and Flo²⁰,1997) após a obtenção, o enxerto de osso esponjoso autógeno deve ser aplicado o mais rapidamente possível. No entanto, se for necessária à estocagem até o momento da transferência para a área receptora, o enxerto deve ser mantido envolto em compressa de umedecida com sangue ou colocada em cuba e coberta com gaze umedecida em solução salina fisiológica a 9% ou Ringer (Shena²², 1983; Piermattei and Flo²⁰, 1997). A exposição ao meio ambiente por 30 minutos ou mais diminui a viabilidade celular. Por outro lado a elevação da temperatura acima de 42 graus centígrados, devido à luminosidade da sala cirúrgica, induz à morte celular (Fox⁵, 1984). A falta de consenso e a carência de dados na literatura referentes a algumas situações específicas como foram citadas no transcorrer desta introdução, estimula a realização deste trabalho de pesquisa cujos resultados nortearão e darão subsídios para atividade clínica utilizando-se de enxerto ósseo autógeno. Assim sendo o presente trabalho tem por objetivos:

1) Avaliar se a solução de Euro Collins[®] apresenta a propriedade de manter as células do enxerto ósseo autógeno com vitalidade.

2) Analisar a viabilidade celular do enxerto ósseo por análise microscópica e imunoistoquímica.

Material e Método

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”.

(Sócrates)



2) Material e Método*

O presente estudo apresentou as seguintes etapas:

- a) Parecer da Comissão de ética na Experimentação Animal (CEEA),
- b) Cirurgias experimentais,
- c) Obtenção e preparo das peças para avaliação microscópica e imunoistoquímica,
- d) Avaliação microscópica e imunoistoquímica.

Foram utilizados 43 ratos machos de mesma linhagem (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com peso variando entre 290 a 350g todos procedentes do Biotério Central UNESP-Araçatuba. Os animais após obtenção dos enxertos retirados da calvária foram sacrificados. Na fase cirúrgica, os animais receberam medicação pré-anestésica injetável de cloridrato de tiazina (10 mg/Kg de peso corpóreo), intramuscular; e após verificação dos sinais de sedação, os mesmos foram anestesiados com solução anestésica injetável de cloridrato de Ketamina (100 mg/Kg de peso corpóreo) também por via intramuscular. Na região da calota craniana todos os animais foram submetidos depilação manual. Após a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (PVPI) foi realizada incisão linear na região mediana da calota craniana expondo o osso parietal direito e esquerdo. A seguir com o auxílio de descoladores foi realizado o descolamento do retalho possibilitando a exposição dos dois ossos parietais. Na seqüência as peças do enxerto foram removidas com auxílio de trefina de 5 mm de diâmetro acoplada em micro-motor de baixa rotação, utilizando-se peça de mão angulada sob constante irrigação com solução de soro fisiológico 0,9% estéril.

* Figuras referentes à metodologia científica e experimental estão ilustrados no anexo C.

As peças foram removidas com auxílio de um Holleback 3S, preservando as meníngeas do encéfalo e a sutura sagital mediana, local por onde percorre a veia sagital mediana.

Todas as peças do enxerto foram acondicionadas individualmente em tubos de ensaio estéreis de 5 ml com tampa (Vacuum II®) as quais foram devidamente identificadas de acordo com o grupo e mantidas dentro do tubo de ensaio conforme cada condição do grupo. As peças que deveriam ficar resfriadas foram mantidas no gelo acondicionadas em isopores de 17 litros com 2/3 de gelo picado, onde a temperatura manter-se-ia por volta de 3°C.

Períodos do experimento:

Imediato (Controle).

Tempo de 6 horas.

Tempo de 12 horas.

Tempo de 24 horas.

Tempo de 30 horas.

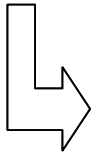
Grupos Experimentais:

(Grupo I)-Grupo Soro.

(Grupo II)-Grupo Solução Euro Collins®.

(Grupo III)-Grupo Seco em Temperatura Ambiente.

(Grupo IV)-Grupo Gelo (Seco).

	Grupos Experimentais →	Grupo Soro Fisiológico	Grupo Solução de Euro Collins®	Grupo seco Temp. ambiente	Grupo Gelo em meio seco
Períodos					
Imediato 	6 peças				
	Tempo 6 horas	5 peças	5 peças	5 peças	5 peças
	Tempo 12 horas	5 peças	5 peças	5 peças	5 peças
	Tempo 24 horas	5 peças	5 peças	5 peças	5 peças
	Tempo 30 horas	5 peças	5 peças	5 peças	5 peças
Total de peças por grupo		20 peças	20 peças	20 peças	20 peças
Total de peças: 86 peças					
De cada modelo experimental foram obtidas 2 peças totalizando 43 ratos.					

Após o período experimental determinado para cada grupo, as peças foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% durante 6 horas. No transcorrer deste período as peças foram mantidas resfriadas em isopores com gelo. Decorridas às 6 horas de fixação as peças foram lavadas em solução salina de tampão fosfato (PBS), utilizando-se agitador orbital ajustado para ciclo de 10 minutos por 3 vezes. Após a lavagem, as peças foram submetidas à descalcificação em EDTA 5% por 60 dias aproximadamente, com trocas semanais. Após a descalcificação, as peças foram novamente lavadas em PBS e passadas para a etapa de crioproteção em sacarose 30% por 48 horas à temperatura de 4° C. Os cortes foram realizados em micrótomo de congelação obtendo-se cortes transversais com 16 micrometros de espessura e montadas em lâminas previamente gelatinizadas.

Após a obtenção dos cortes congelados, uma lâmina de cada grupo foi submetida à coloração por hematoxilina e eosina (HE), para análise histológica em microscopia óptica e o restante foram submetidas ao processamento imunistoquímico. Os anticorpos primários utilizados durante o processamento imunistoquímico foram específicos para a marcação de Osteoprotegerina -OPG (Rabbit anti-opg - Santa Cruz Biotechnology), proteína produzida pelos osteoblastos e envolvida nos processos de formação óssea (Simonet, et al.²³,1997); RANK (Rabbit anti-rank - Santa Cruz Biotechnology) e RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology). A expressão dessas proteínas em osteoblastos e osteócitos serviram como índice para se avaliar a viabilidade do tecido ósseo.

Os anticorpos secundários são anti-coelho biotilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-rabbit IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories) e anti-cabra biotilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure mouse anti-goat IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories).

Ao término da revelação, as lâminas permaneceram em estufa onde após secagem completa os cortes foram desidratados em série crescente de álcool, imersão em xilol e montagem das lamínulas com permount.

A análise tanto dos cortes corados em HE como dos cortes submetidos às reações imunoistoquímicas foram realizada em microscopia óptica.

Resultados

“Os dias prósperos não vêm por acaso, nascem de muita persistência”.

(Henry Ford)



Resultados*

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para a identificação das proteínas Osteoprotegerina (OPG), RANK e RANKL nos cortes congelados, obtidos da calota craniana dos ratos.

Os grupos experimentais foram determinados com o objetivo de analisar a interferência do meio de conservação, bem como do tempo, sobre a capacidade de preservação celular.

A imunoistoquímica é uma ferramenta metodológica que permite a identificação de proteínas, ou seja, de antígenos, presentes no interior das células. Portanto, as proteínas são identificadas de acordo com os anticorpos utilizados nas reações e as marcações sempre aparecerão nas células que contêm as proteínas presentes no citoplasma ou dispostas como receptores de membrana.

No experimento do presente trabalho, as reações imunoistoquímicas foram realizadas para identificar a presença de OPG, RANK e RANKL. A expressão destas proteínas evidenciou-se nos osteócitos marcados pela Diaminobenzidina, quando a reação imunoistoquímica foi revelada. Em algumas situações, pôde-se observar também que as lacunas dos osteócitos apareciam com as marcações imunoistoquímicas pela DAB.

Os osteócitos mostraram-se imunomarcados sempre na periferia do corte (Figura 1). À medida que se afastava das bordas do corte, as marcações decresciam e o centro do corte mostrava-se sempre com ausência de células imunomarcadas.

* Figuras ilustrativas dos cortes histológicos no final desta sessão e no anexo D.

Na análise imunoistoquímica a viabilidade celular foi evidenciada pela coloração marrom-acastalhada dos osteócitos, quando esses expressavam as proteínas OPG, RANK e RANKL.

Foi realizada a coloração por hematoxilina e eosina como orientação para a análise da citoarquitetura. Observou-se que nos grupos em que a conservação foi realizada a seco, por 30 horas (Figura 2), não foi possível identificar a presença dos núcleos dos osteócitos, corados com hematoxilina, diferente dos demais grupos e períodos. Portanto, vale destacar que, mesmo que a coloração com hematoxilina e eosina mostrasse a presença de núcleos celulares corados, inclusive no centro do corte (Figura 3), foram consideradas viáveis apenas as células que estavam marcadas por expressarem as proteínas analisadas neste estudo.

Observou-se que no grupo imediato-controle (Figura 4), no qual o fragmento da calota craniana foi fixado imediatamente após a sua remoção e depois foi realizado o processamento imunoistoquímico de rotina, foram observadas marcações para a OPG.

Na conservação da calota em gelo (Figura 5), sem imersão em líquidos, notou-se que as células expressavam a RANKL no período de 6 horas de conservação. À medida que aumentou o tempo de conservação no meio estudado, houve uma diminuição na quantidade de células imunomarcadas. No período de 30 horas, neste mesmo grupo, não foi possível observar imunomarcações das proteínas estudadas.

Nos fragmentos de calota craniana mantidos à temperatura ambiente e sem imersão em líquidos, observou-se que após o período de 30 horas, não havia expressão significativa de RANKL nas células da calota craniana (Figura 6).

No grupo em que a conservação dos fragmentos foi realizada em soro fisiológico, foi notado que no período de 6 horas, havia pequena expressão de OPG nas células (Figura 7).

A conservação das calotas cranianas na solução de Euro Collins mostrou que em todos os períodos analisados, foi possível observar a expressão de todas

as proteínas estudadas. A expressão destas proteínas manteve-se em todos os períodos analisados até 30 horas de conservação. Dentre elas, notou-se uma maior imunomarcção para a OPG no período de 30 horas de conservação (Figura 8 e 9).

Experimentos controle foram realizados, nos quais a omissão do anticorpo primário durante o processamento da reação imunistoquímica mostraram que as marcações observadas foram específicas (Figura 10).

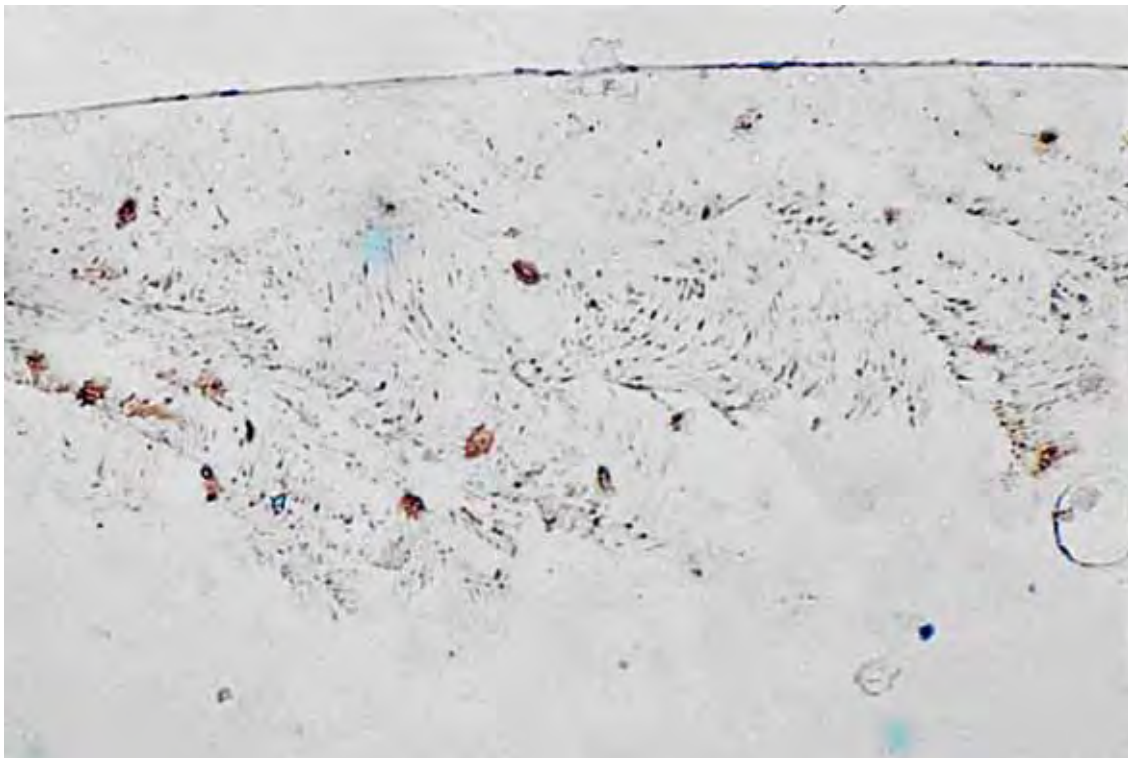


FIGURA 1-Grupo Euro Collins 24 horas – OPG, borda da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).

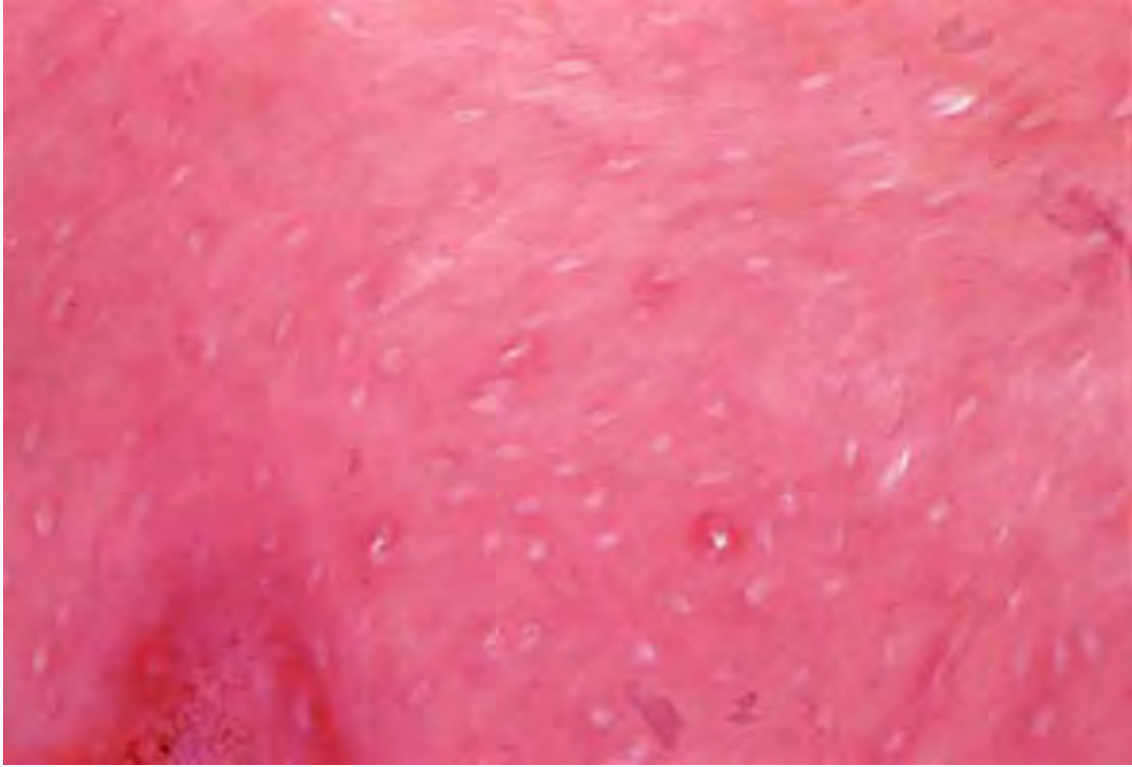


FIGURA 2-Grupo seco ambiente 30 horas (original, 160x, HE).

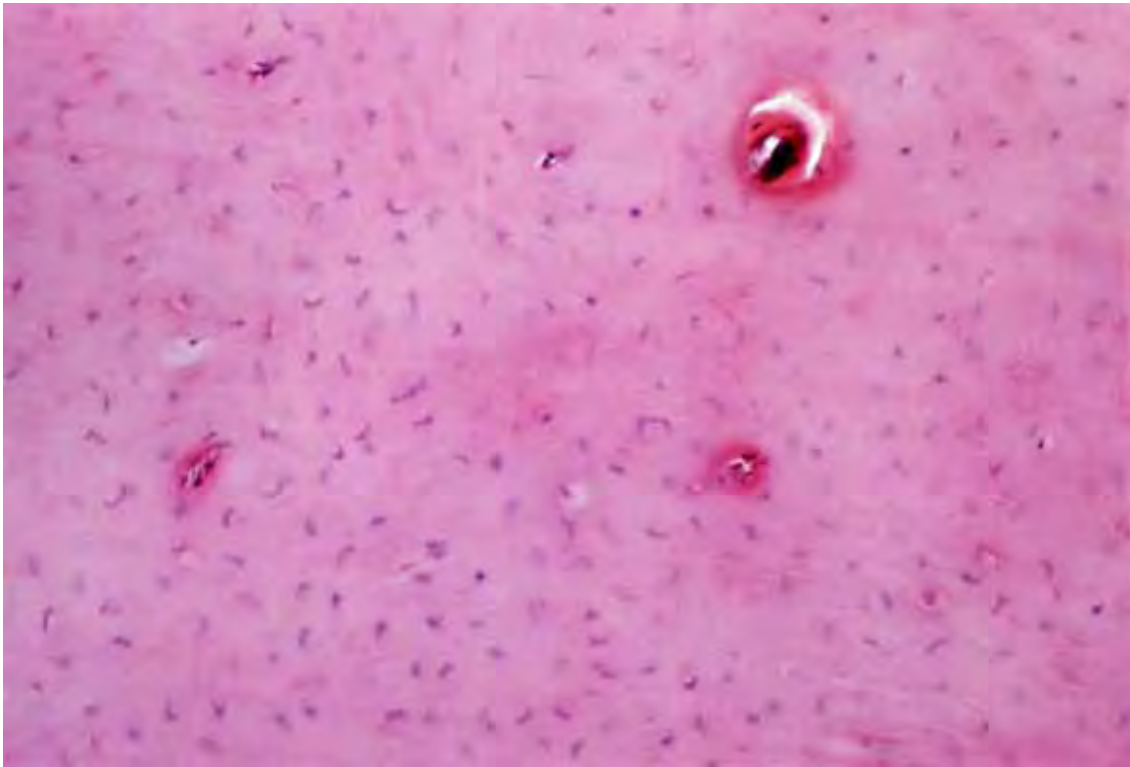


FIGURA 3-Grupo seco gelo 30 horas (original, 160x, HE).

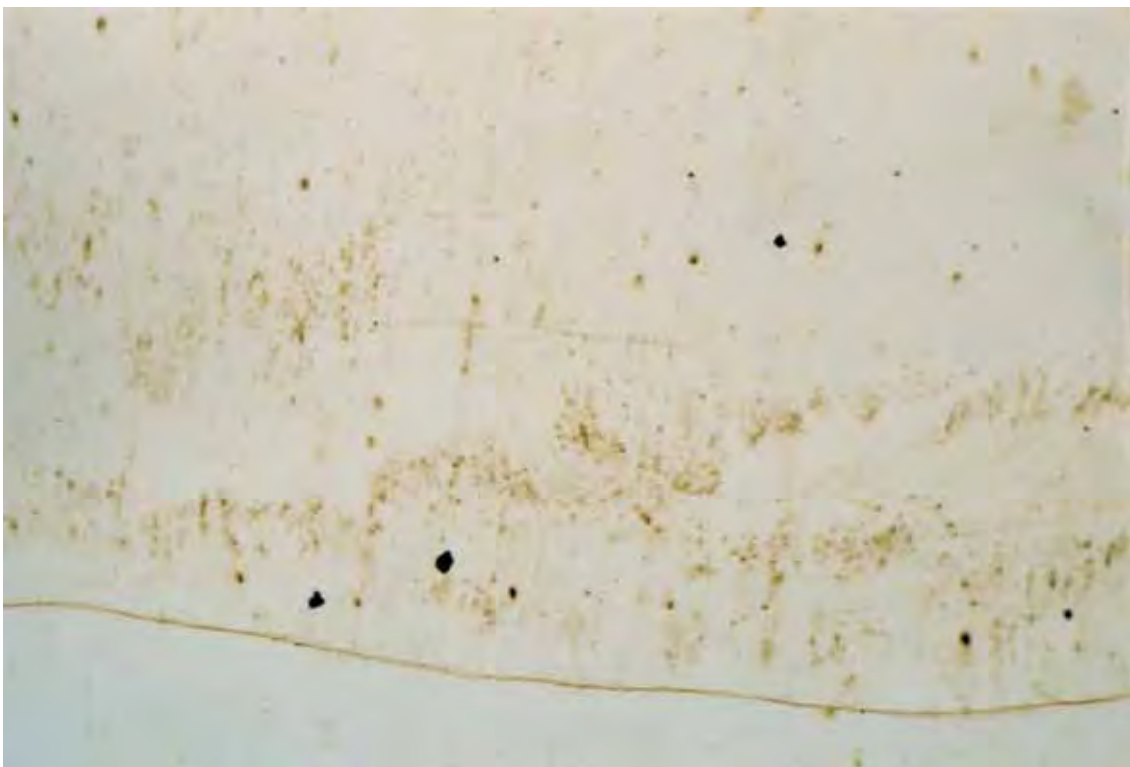


FIGURA 4 - Grupo imediato – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).

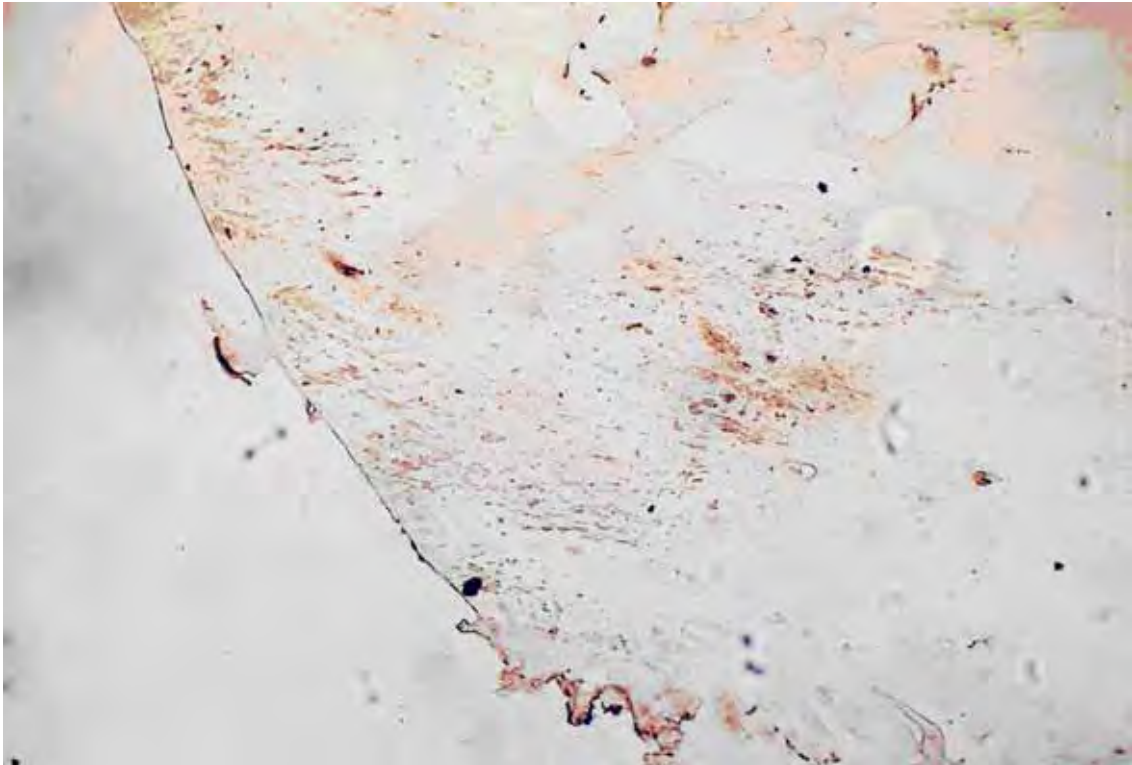


FIGURA 5 - Grupo seco gelo 6 horas - RANKL, periferia da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).



FIGURA 6-Grupo seco ambiente 6 horas - RANKL (original, 63x, Diaminobenzidina) .

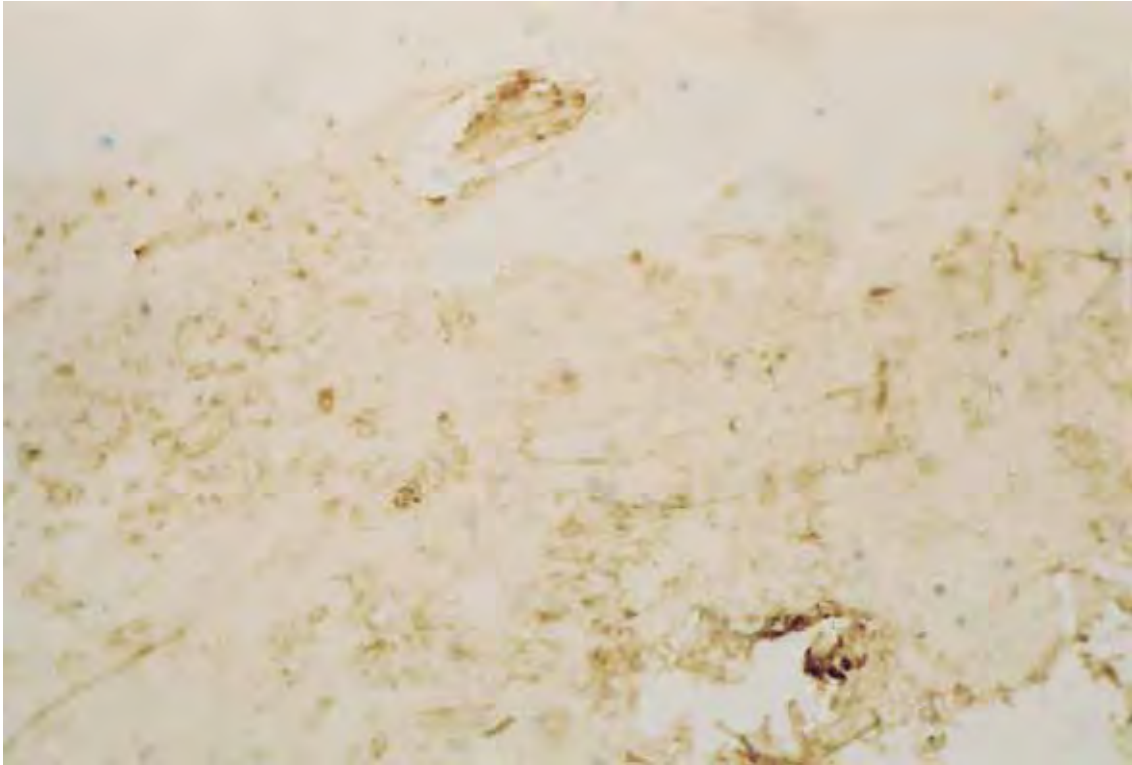


FIGURA 7 - Grupo soro fisiológico 6 horas – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).

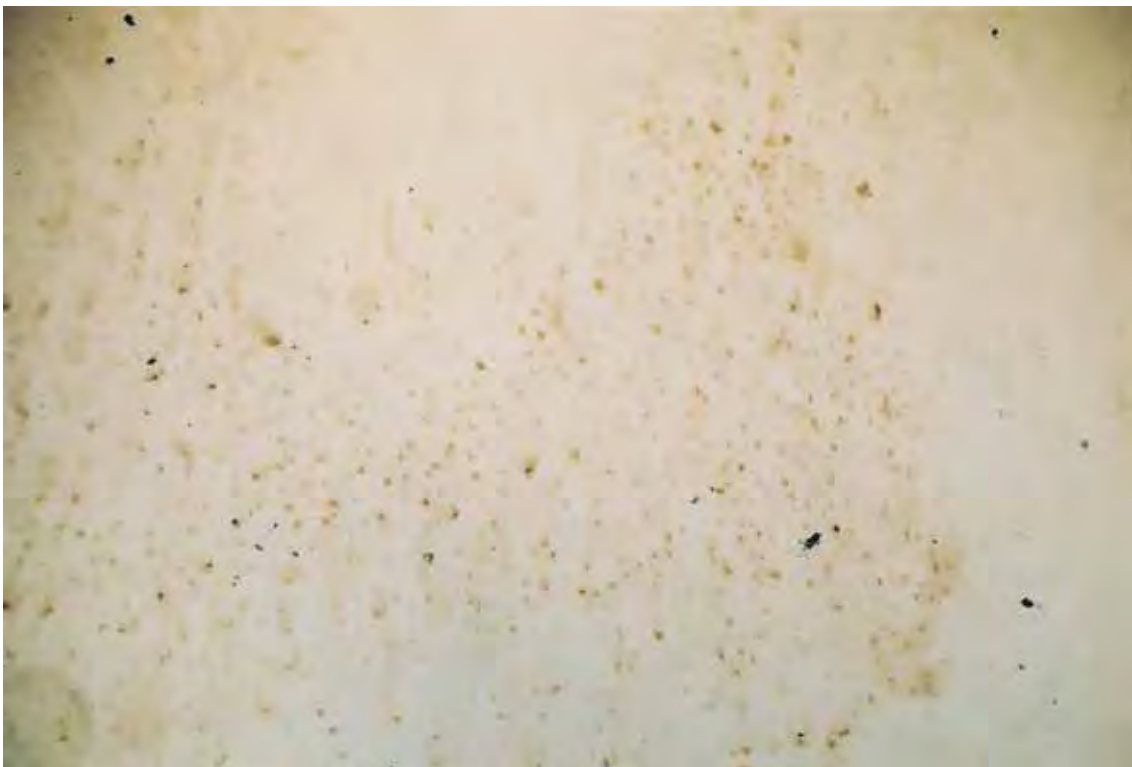


FIGURA 8 - Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).

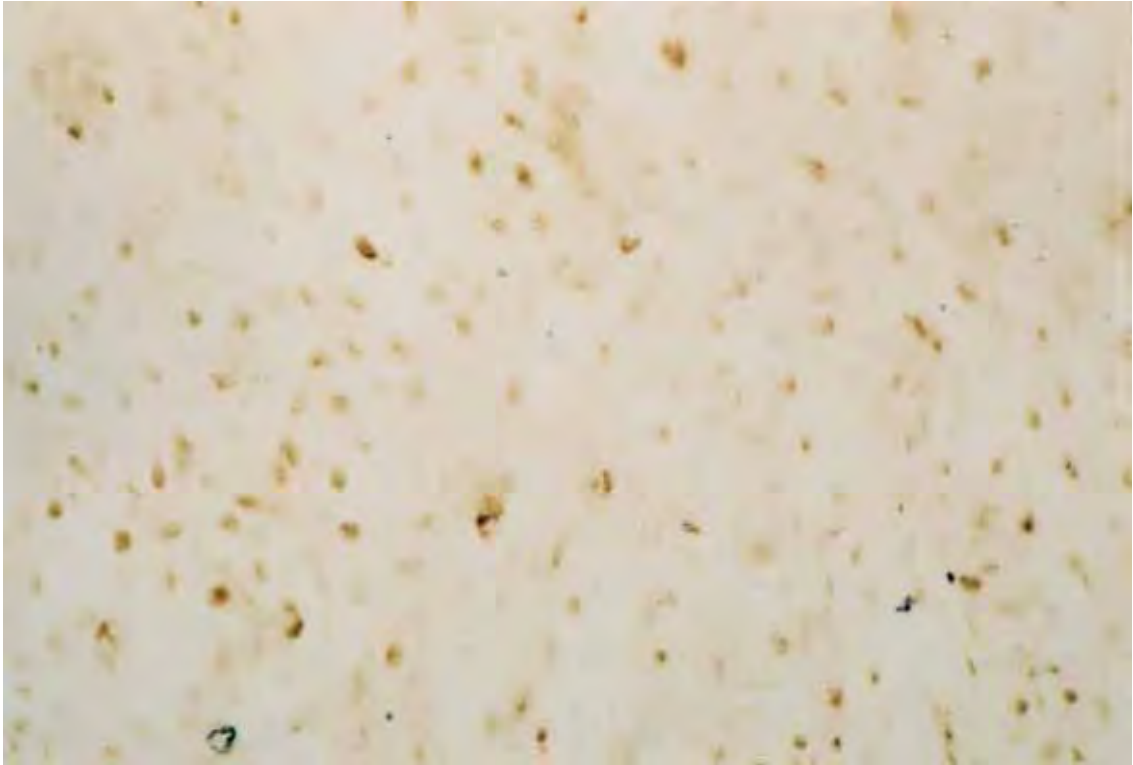


FIGURA 9 - Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 160x, Diaminobenzidina).

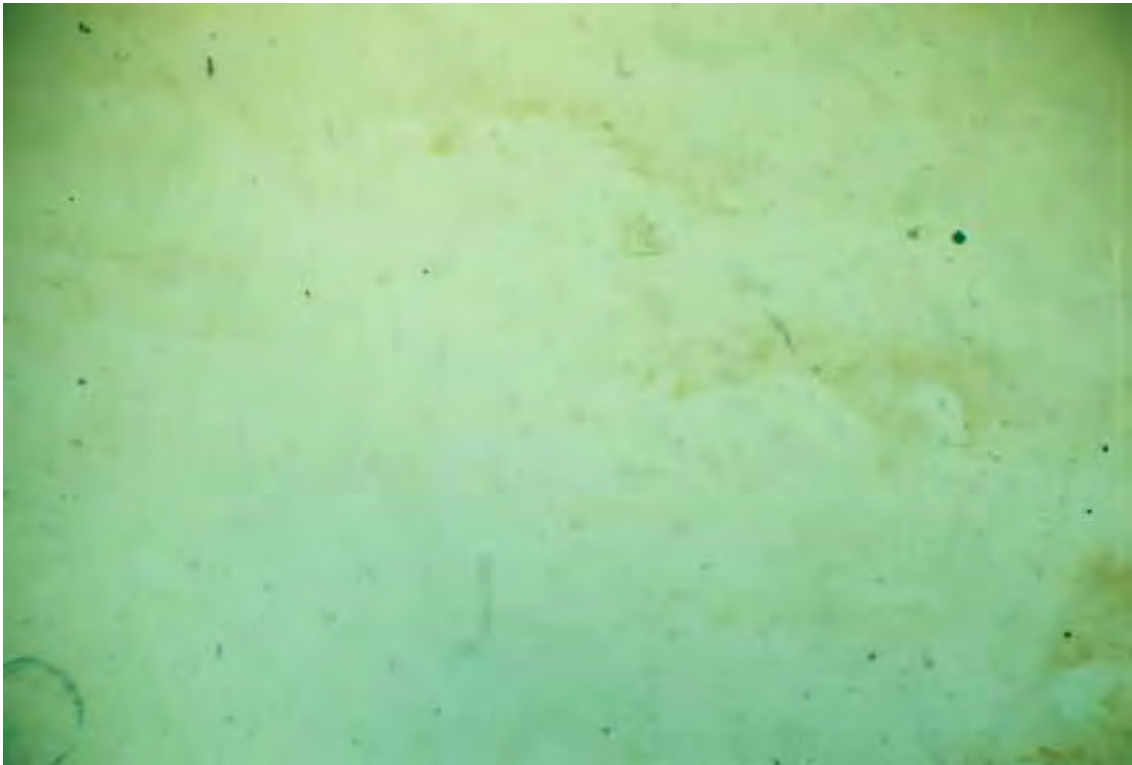


FIGURA 10-Grupo controle da imuno (original, 63x, Diaminobenzidina).

Discussão

“Semeia um pensamento e colherás um desejo; semeia um desejo e colherás a ação; semeia a ação e colherás um hábito; semeia o hábito e colherás o caráter”.

(Tihamer Toth)



4) Discussão

Para a compreensão do mecanismo de incorporação, manutenção e remodelação óssea é imprescindível o conhecimento da fisiologia óssea, que por sua vez, esta fundamentada na composição bioquímica e molecular do tecido ósseo, bem como suas propriedades físico-químicas. Partindo desta prerrogativa, sabe-se que o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e um material intercelular calcificado, denominado de matriz óssea (Junqueira and Carneiro¹², 1995) e dentre as duas funções mais importantes do tecido ósseo, está a de manter a integridade do esqueleto, ou seja, suporte estrutural e a homeostasia de cálcio, visto que 99% deste mineral encontra-se em todo o organismo, está presente no tecido ósseo, o qual atua como um verdadeiro reservatório de cálcio. O tecido ósseo é constituído de matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). As células correspondem a uma pequena parte da massa óssea, mas são responsáveis tanto pela função de regulação da distribuição do conteúdo do componente inorgânico e, portanto, pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral), quanto pela contínua reabsorção e formação da matriz óssea, fazendo com que o sistema esquelético responda a forças mecânicas geradas pela sustentação de pesos e atividade física (homeostase esquelética).

A matriz orgânica extracelular do tecido ósseo é quase que exclusivamente (90%) composta por proteína, colágeno, proteoglicans, glicoproteínas, enzimas, fatores de crescimento e proteolípides (Bianco AC, Lazaretti-Castro M³, 1999).

Sabe-se que a neoformação óssea pode ocorrer a partir de três estádios, a osteogênese, osteoindução e osteocondução (Garg⁶,1999) ; e que no caso do osso autógeno é o único com propriedade osteogênica, ou seja, tem a capacidade de

formar tecido ósseo mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas o que caracteriza esta qualidade, pois compõe-se de células ósseas viáveis, as quais produzem matriz orgânica e também fatores de crescimento para a formação do tecido ósseo (Vasconcelos, et al.²⁷, 1999).

Os enxertos ósseos são utilizados como coadjuvantes no tratamento de fraturas, perdas e defeitos ósseos na área médica. A literatura sobre enxerto ósseo começa em 1682, com Van Meeken o qual transferiu o osso do crânio do cão para o defeito craniano no homem, com sucesso (Rogers²¹, 1930). O cirurgião foi forçado a retirar o transplante para evitar a excomunhão pela igreja.

Nas últimas décadas, foram idealizadas novas técnicas reconstrutivas, como a fixação rígida de fraturas, enxerto de tecidos e cirurgias microscópicas. Em geral, estes procedimentos foram direcionados à traumatologia e a reabilitação oncológica e mais recentemente, aplicados a outras áreas da cirurgia bucal. (Joos and Kleinheinz¹¹, 2000).

A partir da extração dentária, inicia-se um processo de perda óssea alveolar contínuo e progressivo, podendo estar, ainda, acompanhado de outros agravantes, como a pneumatização do seio maxilar, acarretando deficiência ósseas em altura e espessura, as quais restringem ou mesmo impossibilitam, a colocação de implantes osseointegrados. A demanda para este tipo de tratamento vem aumentando, forçando o desenvolvimento de técnicas para reconstrução e adequação de rebordos alveolares atroficos (Jensen et al.¹⁰, 1990)

Breine and Branemark⁴, em 1980, foram os primeiros a avaliarem o uso do enxerto ósseo autógeno e implantes para reconstrução de rebordos atroficos. O osso autógeno é ainda, o melhor material para reconstrução de rebordos, é considerado por muitos como “padrão ouro” entre as opções terapêuticas (Groeneveld et al.⁷, 1999).

Oklund, et al.¹⁹, em 1986 demonstrou que é da sobrevivência das células na superfície do enxerto, que resulta a superioridade dos enxertos autógenos recém obtidos sobre os enxertos autógenos congelados ou implantes ósseos.

Albrektsson,² em 1980, não satisfeito com as análises microscópicas

estáticas existentes até então, utilizadas para avaliar o processo de reparo dos enxertos ósseos corticais e medulares, utilizou o que denominou de método microscópico vital, instalando câmaras de titânio ocas, separadas por duas esferas de vidro numa distância de 100 micras, nas metáfises de tíbias de coelhos, a fim de estudar de maneira dinâmica “in vivo” e “in situ” os diferentes estádios do processo de reparo dos enxertos ósseos. Para que isto fosse possível, a câmara e o osso circunjacentes foram removidos com o auxílio de uma broca trefina e enxertados em outra extremidade, ou reinsertos no mesmo local. Os enxertos medulares apresentaram início de revascularização aos 15 dias pós-cirúrgicos e término após 20 dias, quando então, evidenciou-se o processo de osteogênese e o aumento de massa óssea trabecular. Os enxertos corticais apresentaram revascularização mais lenta, completada no 30º dia. Neste período, as fases de reabsorção e osteogênese ocorriam concomitantemente no mesmo enxerto. As cavidades menores foram preenchidas por osso primário, ao mesmo tempo em que outras foram criadas. Aos 35 e 40 dias, a fase osteogênica já havia sido superada pela reabsorção, até que a massa óssea reduzisse significativamente, para que outra fase osteogênica predominasse. Calculou-se o índice máximo de penetração vascular nos enxertos medulares e corticais, obtendo-se os valores de 0,2mm/dia a 0,4mm/dia e 0,15 mm/dia a 0,3mm/dia, respectivamente. Aproximadamente, a mesma densidade vascular existente anteriormente à colocação do enxerto foi necessária para que a remodelação óssea acontecesse.

Para que os eventos de incorporação dos enxertos autógenos sigam o curso normal, alguns cuidados são necessários a fim de se manter a integridade do fragmento ósseo a ser utilizado. Sabe-se que um fator importante que interfere no processo de reparo ósseo é o trauma nele causado durante sua manipulação, principalmente durante as técnicas de osteotomia (Albrektsson¹, 1980; Okamoto, et al.¹⁸ 1994). O mesmo sucede nos procedimentos de enxertia óssea.

Confirmando esta teoria, Albrektsson¹, em 1980, realizou um trabalho em coelhos para verificar a resposta dos tecidos a receberem enxertos ósseos frente a vários níveis de trauma, além de observar a velocidade de revascularização e

remodelação óssea na área receptora. A sobrevivência dos enxertos foi testada por meio de análise histoquímica uma vez que a simples presença de osteócito nas lacunas não confirmava a viabilidade óssea. Verificou-se que o tempo de revascularização foi proporcional à intensidade do trauma; ou seja, quanto maior o trauma, maior o tempo para o início da revascularização e, conseqüentemente, da remodelação óssea. A análise histoquímica demonstrou que apenas os enxertos minimamente traumatizados apresentaram atividade da enzima diaforase, sendo esta produzida apenas por células metabolicamente ativas.

Os métodos de armazenamento dos enxertos podem determinar as condições de viabilidade de seu contingente celular. Steiner and Ramp²⁵, 1988, testaram vários meios de armazenamento para enxertos ósseos autógenos e seus efeitos sobre o metabolismo de glicose e síntese de colágeno. Usaram soro fisiológico a 0,9%, água destilada e dextrose 5% em solução Ringer lactato. O estudo sugeriu que os enxertos deveriam ser armazenados em soro fisiológico ou dextrose 5% em solução Ringer lactado por até cinco horas. A água destilada não foi recomendada. Além disto, a temperatura do meio de armazenamento exerce influência sobre as células. Marx, et al.¹⁵ em 1979, documentaram que 94% da viabilidade celular é mantida até quatro horas de armazenamento em temperatura ambiente. Soluções com temperaturas elevadas aumentam o índice de morte das células devido à demanda elevada de oxigênio. Apesar das temperaturas menores que a ambiente não serem comumente aceitas, acredita-se que sejam associadas a um discreto aumento no índice de sobrevivência celular.

Um fator importante é que o enxerto não deve ser imerso em solução isotônica ou tratadas com antibióticos por serem tóxicos para as células (Piermattei and Flo²⁰, 1997).

Partindo-se da premissa que a solução de Euro Collins é utilizada para estocagem hipotérmica de órgãos por períodos de até 30 a 40 horas (Soc. Bras. de Nefrologia e Soc. Bras. Urologia²⁴, 2002), é oportuno e com significado clínico muito importante pesquisar a possibilidade de conservação do osso, visto que se trata de um tecido cuja complexidade morfofuncional é menor que a de

um órgão, o que pode-se tornar um excelente meio de armazenamento do enxerto ósseo até a sua completa adaptação ao leito receptor. Isto viabiliza e dá versatilidade nos processos reconstitutivos dentro da implantodontia, pois se pode tornar um meio de conservação de tecido ósseo em casos de eventuais bancos de ossos autógenos.

A utilização da imunohistoquímica como ferramenta metodológica se faz de maneira muito precisa, pois se trata de uma das poucas opções disponíveis para se avaliar a viabilidade celular dos enxertos, após os diferentes protocolos e períodos adotados neste experimento. Porém durante a realização deste experimento foram encontradas algumas situações em que houve a necessidade de padronizar a técnica de imunohistoquímica, pois as peças não foram perfundidas inicialmente, apenas fixadas em paraformaldeído o que diferencia da tramitação rotineira nos trabalhos de imunohistoquímica. No entanto a utilização da calota craniana de ratos se mostrou um modelo de fácil execução e padronização das amostras. Não obstante deve-se considerar a dificuldade de se obter cortes congelados do osso da calota, porém é ainda a melhor maneira de se obter as reações de imunohistoquímica visto que neste processo se conserva o epitopo, isto é o sítio de ligação dos anticorpos utilizados nas reações.

Na análise da imunohistoquímica pode-se evidenciar a viabilidade celular pela capacidade das células expressarem cada proteína na dinâmica do tecido ósseo, ou seja: OPG é uma proteína expressada por osteoblastos e osteócitos em atividade osteogênica (Simonet, et al.²³ 1997); a RANKL é uma proteína relacionada a osteoblastos em situação de estímulo para reabsorção óssea (pela ligação da RANKL a RANK, presente na membrana dos pré-osteoclastos); a RANK é uma proteína presente em pré osteoclastos e neste trabalho pode-se notar a expressão da RANK em osteócitos e osteoblastos o que sugere o metabolismo ósseo e conseqüentemente a viabilidade celular.

De acordo com os resultados obtidos: a expressão da OPG indica atividade dos osteoblastos. Assim sendo, pode-se dizer que a solução de Euro Collins demonstrou ser o meio de armazenamento superior ao soro fisiológico

0,9% em todos os períodos, visto que até 30 horas havia expressão celular semelhante ao grupo imediato. Estes achados vão de encontro com o trabalho de McAnulty¹⁶ em 1999, o qual obteve o melhor resultado com relação à manutenção da viabilidade óssea de fragmentos esponjosos obtidos de coelhos quando se utilizou também da solução de Euro Collins como meio de armazenamento do enxerto.

O grupo soro fisiológico a 0,9% mostrou que existem células viáveis até o período de 6 horas devido à expressão da OPG e RANKL, porém com menor expressão que o Euro Collins. A temperatura baixa parece ter influência na manutenção da viabilidade celular conforme Marx, et al.¹⁵ em 1979. Nesse experimento a temperatura não teve influência positiva no que se refere à manutenção da viabilidade celular e estes achados também vão de encontro com o trabalho de McAnult¹⁶ de 1999, o qual também observou que o soro resfriado não teve resultado tão significativo quando comparado à solução resfriada de Euro Collins.

Na análise microscópica dos cortes obtidos e corados em hematoxilina e eosina pode-se notar que os núcleos celulares foram marcados pela eosina nos mesmos períodos em que se nota atividade celular pela análise de imunohistoquímica. A ausência de coloração e marcação do núcleo celular nos períodos em que também não foram observados atividade celular pelas reações com o anticorpo, são achados sugestivos de que a ausência de coloração e evidenciação do núcleo celular no enxerto ósseo significa apoptose celular e/ou necrose celular. Trabalhos de co-localização para OPG e RANKL deverão ser realizados para analisar quais dessas proteínas predominam nas células do enxerto nos diferentes períodos e meios de conservação. Considerando-se que este estudo é inicial, a co-localização e estudos onde se faz a quantificação das células viáveis consistirão numa próxima etapa a ser realizada.

De acordo com a metodologia empregada foi possível analisar a superioridade da solução de Euro Collins[®] sobre as formas mais rotineiras aplicadas na prática das cirurgias reconstrutivas, na qual se utiliza o soro

fisiológico como padrão no armazenamento do enxerto ósseo até a sua adaptação ao leito receptor. Esses resultados vêm nortear e dar suporte científico na forma e maneira que se tem de armazenar o enxerto ósseo visando otimizar ao máximo de atividade osteogênica nos processos de reconstrução óssea. Notadamente os resultados deste trabalho também abrem o prisma para novas pesquisas, visto que a literatura aponta que o meio de armazenamento em solução de Belzer apresenta melhores resultados que o Euro Collins[®] no que se refere à conservação de pâncreas transplantados.

Conclusão

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”.

(John Ruskin)



5) Conclusão

Dentro das condições do presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1) A solução de Euro Collins® se mostrou superior ao grupo soro fisiológico como forma de manter o enxerto ósseo com células viáveis;

- 2) A solução de Euro Collins® manteve as células do enxerto ósseo viáveis até 30 horas;

- 3) A imunohistoquímica mostrou ser a ferramenta metodológica de grande valor para análise da viabilidade celular;

Referências

“Não existe vento favorável para aquele que não sabe para onde vai”.

(Arthur Schopenhauer)



6) Referências*

1. Albrektsson, T. The healing of autologus bone grafts after varying degrees of surgical trauma. *J Bone Joint Surg.* 1980 a; 62(3):403-10.
2. Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1980b; 14(1):1-12.
3. Bianco AC, Lazaretti-Castro M. Fisiologia. In: .Aires MM. Fisiologia do metabolismo osteomineral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan . 1999. p.855-876.
4. Breine U, Branemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. *Scand J Plast Reconstr Surg.*1980; 14(1): 23-48.
5. Fox SM. Cancellous bone grafting in the dog: an overview. *J Am Anim Hosp Assoc.*1984; 20:840-48.
6. Garg A.K.. Graffiting materials in repair and restoration. In: Lynch SE,

* Referências nas normas da revista *Journal of Applied Oral Science*.

- Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence Books. 1999; p.83-101.
7. Groeneveld EHJ, Van Den Bergh JP.A, Holzmann P, Ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone. Comparison with non-grafted sites in a series of case reports. Clin Oral Implants Res. 1999; 10(6):499-509.
 8. Hauser MS. Management of ocular and orbital trauma In: Peterson LJ. Principles of oral and maxillofacial surgery. Philadelphia: J.B. Lippincott. 1992; 509-46.
 9. Jackson IT, Acham M, Bite U, Marx R. Update on cranial bone graft. Ann Plast Surg.1987; 18(1):37-40.
 10. Jensen J, Simonsen EK., Sindet-Pedersen S. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with bone grafting and osseointegrated implants: a preliminary report. J Oral Maxillofac Surg. 1990; 48(1): 27-32.

11. Joos U, Kleinheinz J. Reconstruction of the severely resorbed (class VI) jaws: routine or exception? *J Cranio Maxillofac Surg.* 2000; 28(1):1-4.
12. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995.p. 108-26.
13. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg.*1992; 50(3):241-9.
14. Kuabara MR, Vasconcelos LW, Carvalho PSP. Técnicas cirúrgicas para obtenção de enxerto ósseo autógeno *Rev Fac Odontol Lins.* 200; 12(1/2):44-51.
15. Marx RE, Snyder RM, Kline SN. Cellular survival of human marrow during placement of marrow cancellous bone grafts. *J Oral Surg.* 1979; 37(10):712-8.
16. McAnulty JF. Effect of various short-term storage methods on viability of cancellous bone fragments. *Am J Vet Res.*,1999; 60(1) 63:7.

17. Okamoto T, Gabrielli MFR, Marcantonio E, Gabrielli MAC. Transplante autógeno de cartilagem hialina de costela, preservada em glicerina, após remoção do pericôndrio, para processo malar de ratos. Estudo Histológico (Parte II). Rev Odontol Univ. São Paulo. 1991; 5(2):112-7.
18. Okamoto T, Yamamoto ME, Sonoda CK. Processo de reparação óssea após osteotomia com instrumento rotatório de alta rotação. Rev Bras Odontol. 1994; 51(1): 21-5.
19. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King, SE. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts, and processed autografts and allografts in canine skull defects. Clin Orthop Relat Res. 1986; (205):269-91.
20. Piermattei DL, Flo GL. Bone grafting. In: Piermattei DL, Flo GL. Small animal orthopedics and fracture repair. 3.ed. Philadelphia: Saunders.1997; 147-153.
21. Roger SL. The history of craniotomy. Ann Med Hist. 1930; 2: 495.

22. Shena III CJ. The procurement of cancellous bone for grafting in small animal orthopedic surgery: a review of instrumentation, technique, and pathophysiology. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 19:695-701.
23. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
24. Sociedade Brasileira de Nefrologia e Sociedade Brasileira de Urologia. Transplante renal- manuseio do doador e receptor. São Paulo: Associação Médica Brasileira. 2002.
25. Steiner M, Ramp WK. Short-term storage of freshly harvested bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 1988; 46(10):868-71.
26. Tanaka FY, Sanches MG, Okamoto T. Implante do composto matriz orgânica de osso bovino liofilizado, hidroxiapatita absorvível e aglutinante em alvéolo dental. Estudo microscópico em ratos. *Salusvita.* 2001; 20(2):113-27.

27. Vasconcelos LW O emprego de cirurgias avançadas na viabilização de implantes. In: Vanzillota PS, Salgado LPS. Odontologia integrada: atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro; 1999; 23-50.
28. Ziccardi VB, Lalikos JF, Sotereanos GC, Patterson GT. Retroperitoneal hematoma as a complication of anterior iliac crest harvest: report of case. J Oral Maxillofac Surg. 1992; 50(10):1113-6.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR COMPARANDO OS MEIOS DE CONSERVAÇÃO UTILIZADOS PARA ENXERTO ÓSSEO DE CALOTA CRANIANA. ESTUDO MICROSCÓPICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS" sob responsabilidade de TETUO OKAMOTO, FÁBIO YOSHIO TANAKA, ROBERTA OKAMOTO e IDELMO RANGEL GARCIA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado **AD REFERENDUM** pela CEEA em 01 de novembro de 2005, de acordo com o protocolo nº 121/05.

Araçatuba, 01 de novembro de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente



1) Revisão da Literatura

1.1) Enxerto Ósseo autógenos.

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e um material intercelular calcificado, denominado de matriz óssea (Junqueira and Carneiro¹⁰, 1995) e dentre as suas funções mais importantes está a de manter a integridade do esqueleto. Assim, o suporte estrutural e homeostasia de cálcio, visto que 99% deste mineral encontrado em todo organismo, está presente no tecido ósseo, o qual atua como um verdadeiro reservatório de cálcio.

Do ponto de vista macroscópico, a estrutura óssea pode ser classificada em relação a sua densidade em osso cortical (compacto) e medular (trabecular), uma vez que as características histológicas são as mesmas (Junqueira and Carneiro¹⁰, 1995). Basicamente encontram-se dois tipos de ossificação, a intramembranosa que se forma a partir de membranas conjuntivas e a endocondral que se forma ao longo das bordas de uma cartilagem (Junqueira and Carneiro¹⁰, 1995). Apesar da embriogênese, não existem evidências de diferenças bioquímicas, morfológicas ou funcionais entre os ossos de diferentes origens (Hollinger, et al.⁸, 1999).

Sabe-se que a neoformação óssea pode ocorrer a partir de três estádios, osteogênese, osteoindução e osteocondução; e que no caso do osso autógeno estes estádios ocorrem como uma sobreposição de eventos, permitindo a uma formação óssea mais rápida (Garg⁴, 1999).

O estádio da osteogênese ocorre quando o enxerto é suprido de células capazes de formação óssea (osteoblastos viáveis). A osteoindução representa a capacidade do enxerto de estimular a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente (área receptora) com subsequente neoformação óssea a partir da transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos pela ação de um ou mais agentes indutores. No caso da osteocondução, o material de

enxerto ósseo conduz o crescimento e permite a aposição óssea a partir do remanescente ósseo da área receptora (Garg⁴, 1999).

Os autoenxertos, ou enxertos autógenos, apresentam vantagens sobre os demais pela ausência de imunogenicidade e pela presença de células viáveis com capacidade osteogênica, mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas (Schenk¹⁵, 1994).

As primeiras bases científicas para estudo dos enxertos ósseos, foram demonstradas por Ollier¹² em 1867, quando relatou a transferência de osso e perióstio e acreditava que ambos permaneciam vivos, baseado na osteogênese que o próprio autor observou no enxerto.

Quase 30 anos mais tarde, em 1893, Barth¹ foi o primeiro a discordar de Ollier¹², pois o mesmo observou nos seus estudos que vários dias após a transferência do enxerto ósseo, este se apresenta sem vitalidade e que somente com a invasão gradual de células oriundas do leito receptor, ocorreria o repovoamento com células vivas, denominando muito mais tarde e mantido até os dias atuais de osteocondução.

Phemister¹³ (1914) concluiu definitivamente que algumas células osteogênicas da superfície do enxerto ósseo sobreviviam por difusão de nutrientes advindos do leito receptor, demonstrando em seu artigo intitulado de “O transplante de osso e o poder regenerativo de seus constituintes”.

Braine and Branemark², em 1980, foram os primeiros a avaliarem o uso do enxerto ósseo autógeno e implantes para reconstrução de rebordos atróficos. A partir deste trabalho, diferentes técnicas de reconstrução têm sido utilizadas na reabilitação de pacientes parcial ou totalmente desdentados que apresentam deficiência ou ausência de osso alveolar. De um modo geral, podem-se agrupar estas técnicas nos seguintes procedimentos: técnica de reconstrução com enxerto tipo onlay, baseada na fixação de grandes blocos ósseos sobre a crista do rebordo alveolar; técnica de reconstrução tipo veneer, onde o enxerto é posicionado sobre a face vestibular ou lingual, envolvendo ou não a crista para obtenção de aumentos em altura e espessura; técnica inlay, onde o enxerto é

posicionado no interior de defeitos ósseos, normalmente associada a ostectomias completas maxilares (Triplett¹⁸, 1996), procedimentos de levantamento de seio maxilar ou fossa nasal (Neyt et al¹¹, 1997).

1.2) Solução de Euro Collins®

Este produto tem aplicação com comprovação científica, como solução utilizada para perfusão gravitacional e/ou estocagem hipotérmica de órgãos. Os protocolos de preservação de órgãos variam entre as diversas equipes de transplantes, seja por disponibilidade da solução, custos, experiência própria, crença científica ou protocolos de pesquisas. Como solução utilizada para preservação de órgão pode-se destacar: solução de Belzer da University of Wisconsin (UW) conhecida como Viaspan cujo país de origem EUA. Forma de Apresentação. Bolsa/Infusão. Concentração. Fabricante. Dupont Pharma; Euro Collins (EC); solução de Celsior (CS) e Custodiol (HTK). De acordo com o Projeto Diretrizes intitulado como Transplante Renal-Manuseio do Doador e Receptor, elaborado pela (Sociedade Brasileira de Nefrologia e Sociedade Brasileira de Urologia em 30 de setembro de 2002¹⁶) em conjunto com a Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina as soluções preconizadas para perfusão e estocagem de rins a 4 graus centígrados são a solução de Euro Collins ou solução de Belzer. A solução de Euro Collins é um produto internacional, cuja representação, produção e comercialização é realizada pela filial FRESENIUS KABI BRASIL LTDA e em função da sua disponibilidade, custos e carência de dados na literatura referentes a algumas situações específicas de nossa realidade estimula-se a realização deste trabalho de pesquisa.

1.3) Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica: a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL

Sabe-se hoje que várias proteínas têm participação na diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, bem como na diferenciação de macrófagos em osteoclastos. Estudos direcionados à identificação de fatores de crescimento e de proteínas efetivamente envolvidas no processo de reparação óssea e na regulação da atividade osteoblástica/osteoclástica estão sendo possibilitados com o surgimento de técnicas como a imunistoquímica, hibridização *in situ*, PCR, etc.

Dentre as proteínas ósseas identificadas e envolvidas nos processos de remodelação/reabsorção óssea podemos destacar a Osteoprotegerina (OPG), a RANKL e RANK como marcadores das atividades celulares dentro da dinâmica da remodelação óssea.

A expressão destas proteínas vêm sendo analisada em biópsias de tecido ósseo de pacientes portadores de enfermidades como mieloma múltiplo (Roux, et al.¹⁴, 2002), artrite reumatóide (Hofbauer and Heufelder⁹, 2001) desordens osteoclásticas (Helfrich⁶, 2003) e principalmente no diagnóstico de osteoporose (Hofbauer and Schoppert⁷, 2001).

Na membrana dos osteoclastos e em células dendríticas esta presente a RANK, uma proteína receptora que controla a osteoclastogênese e o metabolismo do cálcio. O ligante da RANK (RANKL) é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo e pelos linfócitos T ativados, podendo promover a reabsorção óssea ao ligar-se a RANK. Sua expressão é limitada às áreas de reabsorção óssea e linfonodos.

A osteoprotegerina é uma proteína também produzida por osteoblastos e células do estroma ósseo e que se liga a RANKL, impedindo sua ligação a RANK (Stejskal, et al.¹⁷, 2001). A OPG inibe a osteoclastogênese impedindo a maturação dos osteoclastos. Além do tecido ósseo, a osteoprotegerina pode ser detectada em outros tecidos do trato digestivo, coração, pulmão, fígado, rim, cérebro e até cartilagem (Stejskal, et al.¹⁷2001). O grau e a atividade da reabsorção óssea dependem principalmente do balanço entre a OPG e a RANKL; fatores que aumentam a expressão da RANKL na maioria reduzem OPG e vice-

versa (Stejskal, et al.¹⁷2001). Embora supostamente a osteoprotegerina e a RANKL possuam muitas outras funções no organismo (influência na resposta imune, origem de calcificações vasculares e no metabolismo do cálcio em geral, metabolismo das glândulas mamárias durante a gravidez, etc.), estas proteínas têm sido estudadas principalmente com a finalidade de se analisar a dinâmica da remodelação/reabsorção que ocorre dentro da homeostasia óssea. Estudos mostram que camundongos com deficiência na expressão da OPG apresentam osteoporose (Bucay, et al.³, 1998). Isto parece ocorrer devido à expressão destas proteínas, que também têm sido detectadas em células do ligamento periodontal, sugerindo sua participação como moduladores dos processos de reabsorção que ocorrem no periodonto de inserção (Hasegawa, et al.⁵, 2002).

Referências

1. Barth A. Uber histologische befunde narch kknochen-implantation. Arch. Klin. Chir., v.43 (suppl.32),p.409-13,1893.
2. Breine U, Branemark PI. Reconstruction of alveolar jaw bone. Scand J Plast Reconstr Surg, 1980; 14(1): 23-48.
3. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS.) Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev, 1998; 12:1260-1268.
4. Garg A.K..Grafting materials in repair and restoration. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE.Tissue engineering: applications in maxillofacial

- surgery and periodontics. Chicago: Quintessence Books; 1999. p.83-101.
5. Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A., Oguchi H, Shirakawa T. Expression of receptor activator of N. F. [kappa] B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, 2002; 37 (6): 405-411.
 6. Helfrich MH. Osteoclast diseases. *Microsc Res tech*, 2003; 61(6):514-32.
 7. Hofbauer LC, Shhoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet*, 2001; 358(9278):257-9.
 8. Hollinger JO., Buck DC, Bruder SP. Biology of bone healing: its impact on therapy In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence Books; 1999. p.17-53.
 9. Houfbauer L C, Heufelder A.E. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor [kappa] B ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2001; 44 (2):253-259.
 10. Junqueira LC, CarneiroJ. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, CarneiroJ. *Histologia básica*. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995.p. 108-26.
 11. Neyt LF. et al. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with a combination of sinus augmentation, onlay bone grafting, and implants. *J*

- Oral Maxillofac Surg. 1997;55(12):1397-401.
12. Ollier L. Traite experimental et clinique de la regeneration des os et de la production artificielle du tissue osseux. Paris: P. Masson et Fils; 1867. p.128.
 13. Phemister D. There fale of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg. Gynecol.Obstet., v.19, p.303-9, 1914.
 14. Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guichon-Mantel A, Femand, JP, Milgron E, Xavier M. Rank (receptor activator of nuclear factor – [kappa]B) and Rankl expression in multiple myeloma. British Journal of Haematology, 2002;117(1): 86-92.
 15. Schenk RK. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago, Quintessence books,;1994. p.49-100.
 16. Sociedade Brasileira de Nefrologia e Sociedade Brasileira de Urologia. Transplante renal- manuseio do doador e receptor. São Paulo: Associação Médica Brasileira; 2002.
 17. Stejskal D, Bartek J, Pastorková R, Růžeka V, Oral I, Horalík D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. Biomed. Papers, 2001; 145(2), 61-64.
 18. Triplett RG, SchowSR. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. J Oral Maxillofac Surg. 1996; 55 (12) :486-94.



FIGURA 11-Ratos (*Rattus norvegicus albinus*.Wistar) acondicionados em gaiolas (Biotério e Centro Cirúrgico Experimental “Ilídio Teodoro”)-UNESP.



FIGURA 12-Ratos machos com peso corporal variando entre 250 a 300 gramas.



FIGURA 13 - Anestesia por via intramuscular.



FIGURA 14-Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina.



FIGURA 15-Tricotomia.

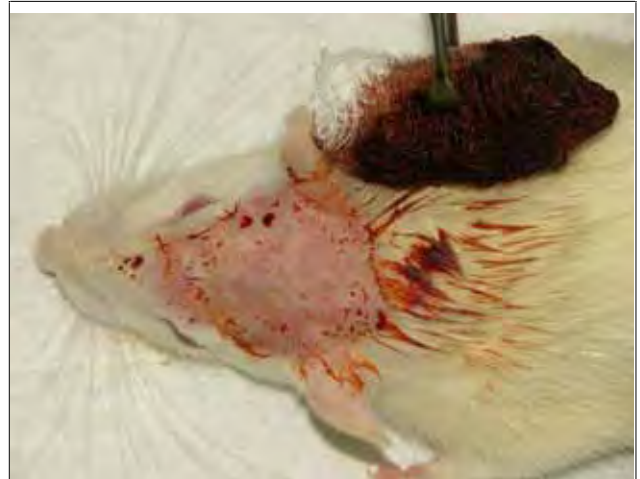


FIGURA 16-Antissepsia com PVPI.



FIGURA 17-Incisão com lâmina 15.



FIGURA 18-Descolamento do retalho mucoperiosteal com descolador de Molt e Holleback 3S.

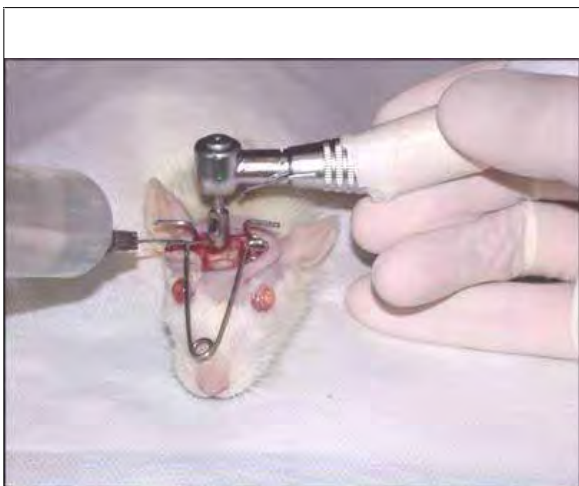


FIGURA 19-Osteotomia com broca trefina e irrigação com foro fisiológico 0,9% .



FIGURA 20-Área osteotomizada.



FIGURA 21-Remoção do osso da calota com auxílio do Holleback 3 S.



FIGURA 22-Peça removida. Preservação das meníngeas.



FIGURA 23- Acondicionamento em frascos identificados.

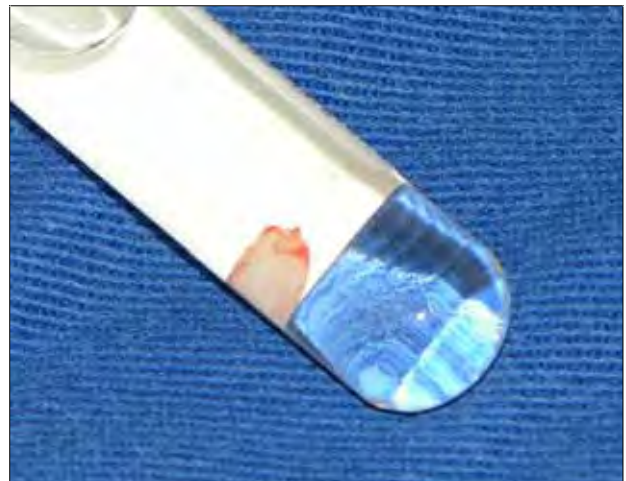


FIGURA 24-Acondicionamento em soro fisiológico 0,9%.



FIGURA 25-Solução de Euro Collins.

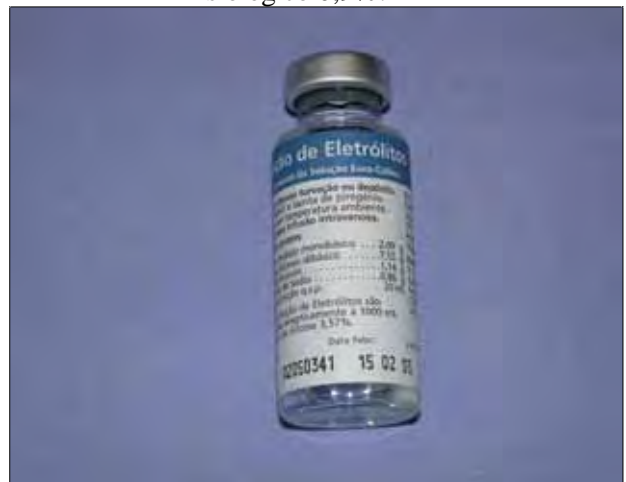


FIGURA 26-Ativador da Solução de Euro Collins.

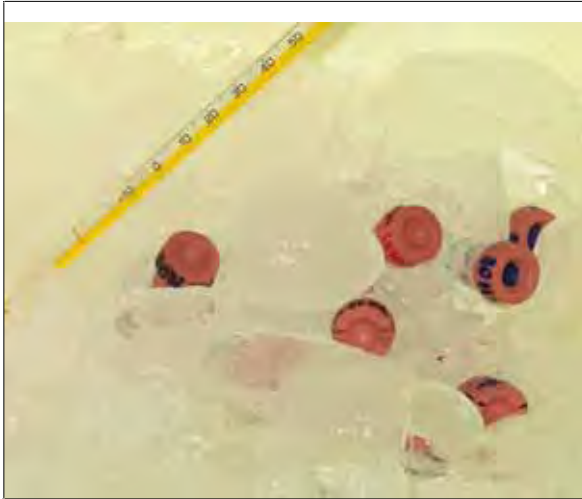


FIGURA 27-Conservação em isopor com gelo.



FIGURA 28- Conservação em temperatura aproximada de 3 graus Centígrados.



FIGURA 29- Peças acondicionadas para tramitação laboratorial .



FIGURA 30- Peças lavadas em agitador orbital.



FIGURA 31-Peças em EDTA com trocas semanais.



FIGURA 32- Peças conservadas em solução de sacarose.



FIGURA 33-Micrótomo de congelção.



FIGURA 34-Inclusão da peça em sacarose.



FIGURA 35-Corte com espessura de 16 micrometros.



FIGURA 36-Colocação dos cortes em lâminas gelatinizadas.



FIGURA 37-Lâminas gelatinizadas.



FIGURA 38- Secagem das lâminas.



FIGURA 39-Protocolo Imunoistoquímica.



FIGURA 40- Lavagem com PBS.

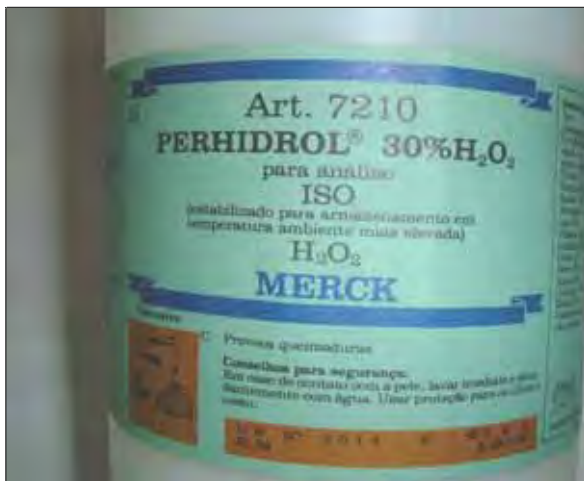


FIGURA 41-Inativação da Peroxidase endógena.



FIGURA 42-Ciclos de lavagem.



FIGURA 43-Anticorpo primário.



FIGURA 44- Reação do anticorpo primário.



FIGURA 45-Anticorpo secundário.



FIGURA 46- Reação do anticorpo secundário.



FIGURA 47-Incubação do complexo ABC.



FIGURA 48-Revelação.



FIGURA 49-Histológico em HE.

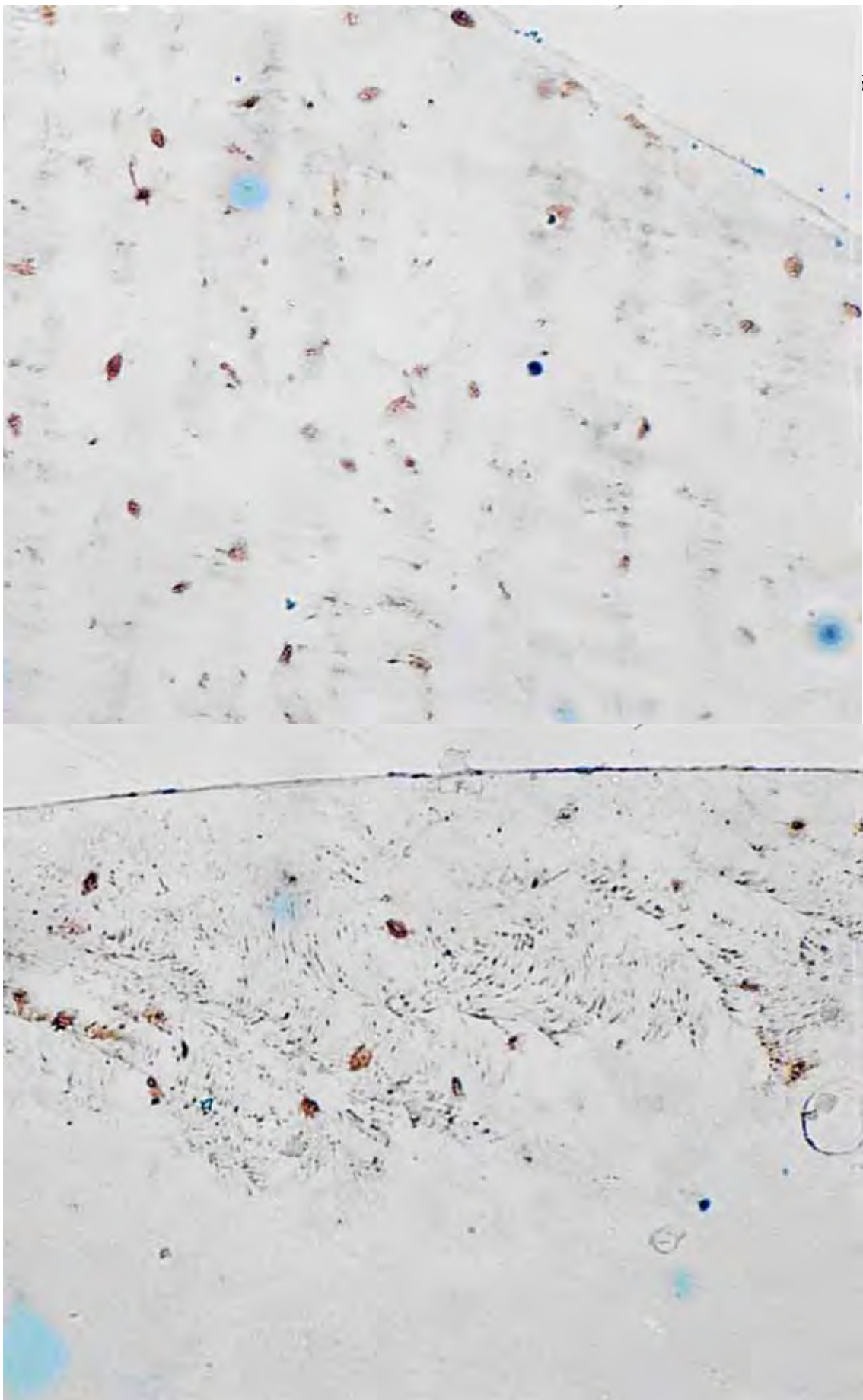


FIGURA 2- Grupo Euro Collins 24 horas – OPG, borda da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).



FIGURA 3- Grupo soro fisiológico 6 horas – OPG, meio da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).



FIGURA 4- Grupo seco ambiente 30 horas (original, 63x, HE)

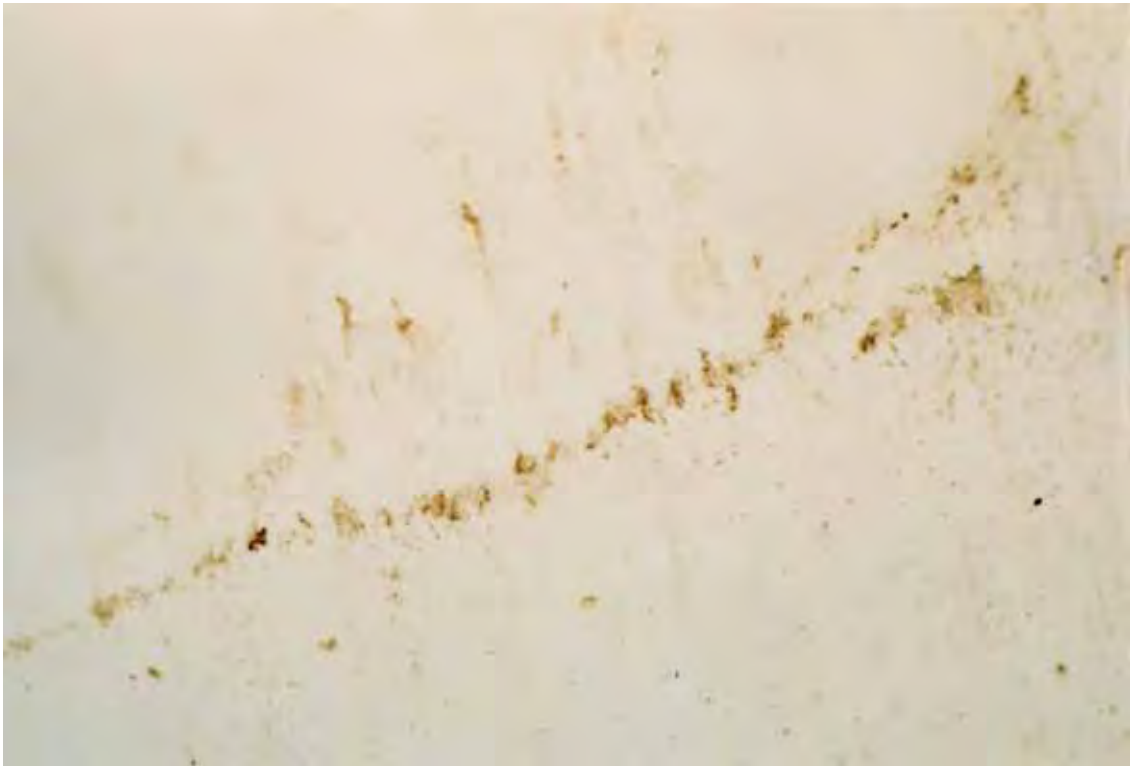


FIGURA 5 - Grupo inmediato – OPG (original, 160x, Diaminobenzidina).

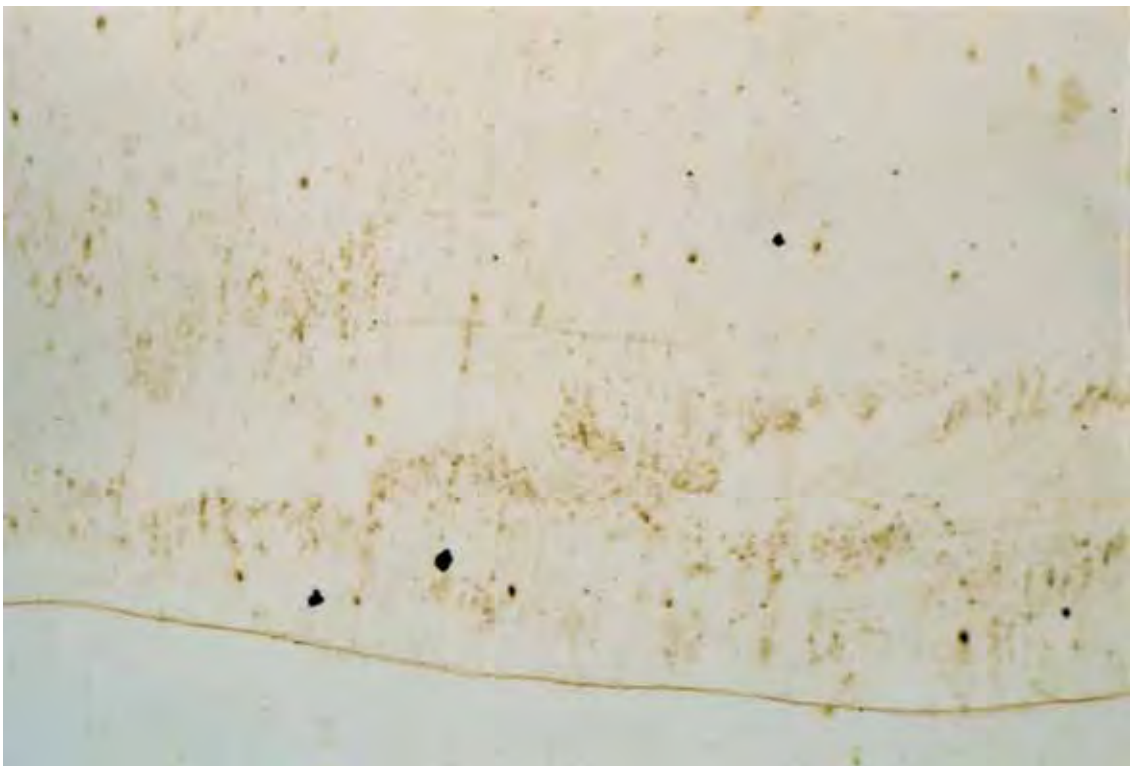


FIGURA 6 - Grupo inmediato – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).

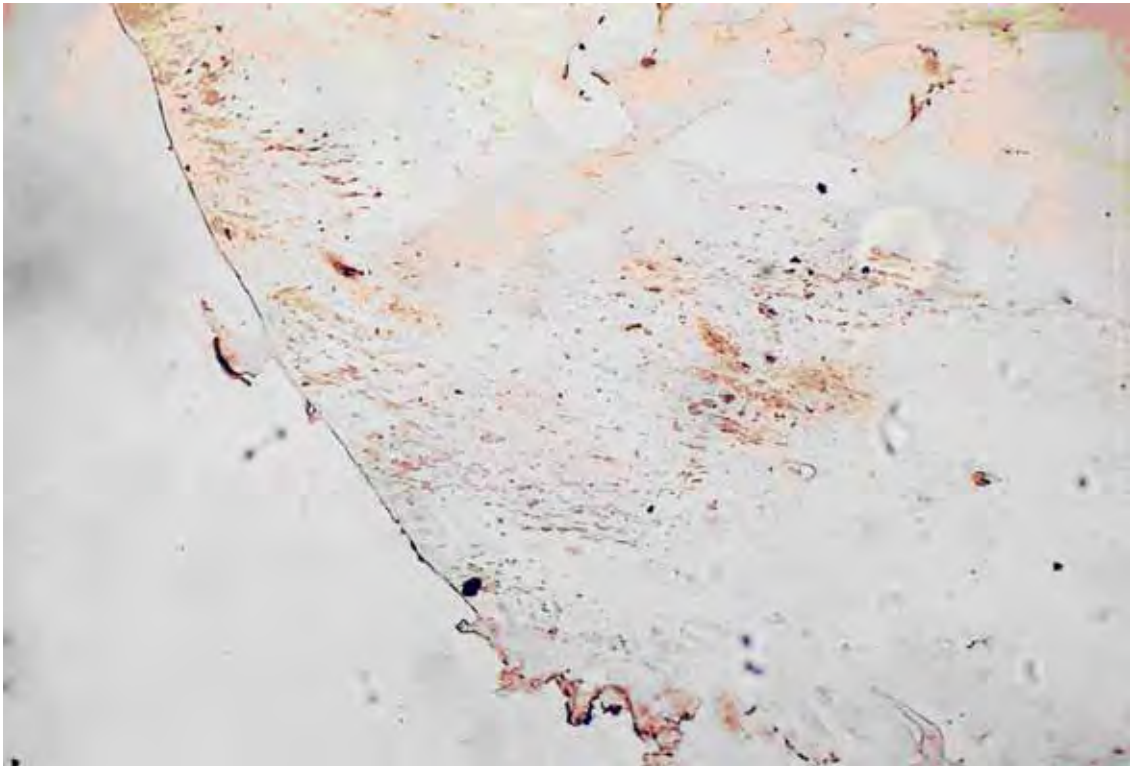


FIGURA 7 – Grupo seco gelo 6 horas – RANKL, periferia da calota (original, 63x, Diaminobenzidina).



FIGURA 8- Grupo seco ambiente 6 horas – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina)



FIGURA 9-Grupo seco ambiente 6 horas – RANK (original, 63x, Diaminobenzidina)



FIGURA 10-Grupo seco ambiente 6 horas – RANKL (original, 63x, Diaminobenzidina)

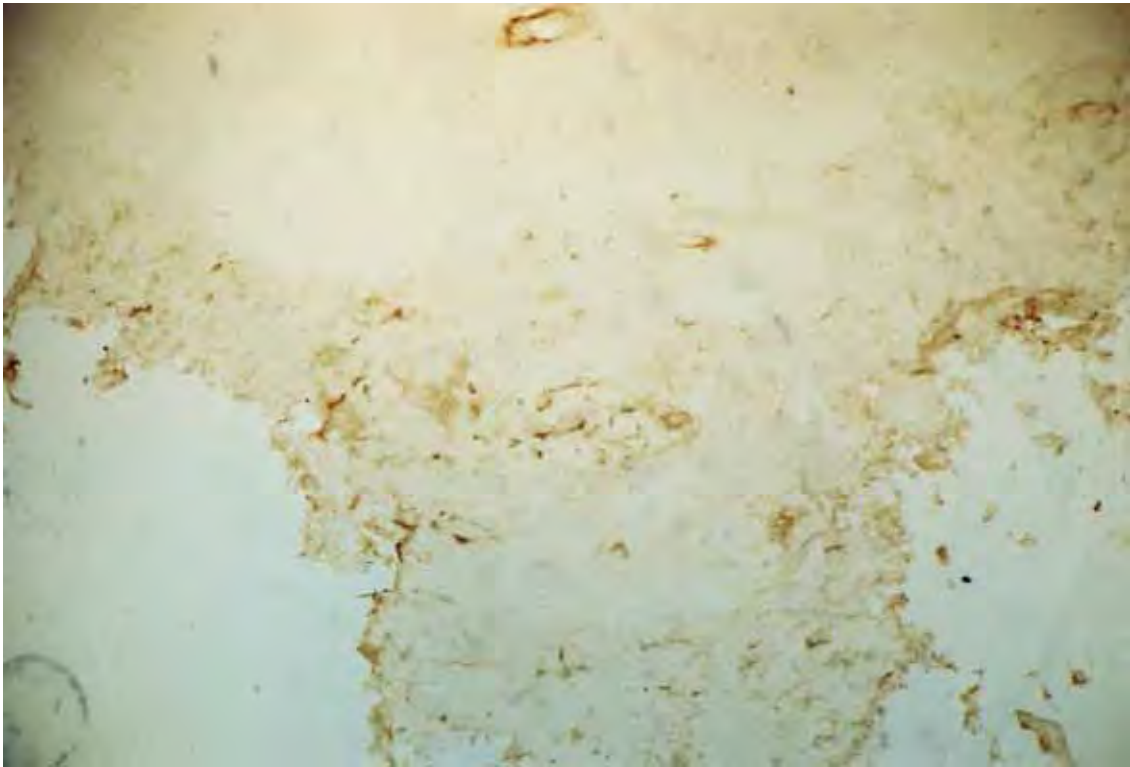


FIGURA 11 - Grupo soro fisiológico 6 horas – RANK (original, 160x, Diaminobenzidina).



FIGURA 12 - Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 63x, Diaminobenzidina).

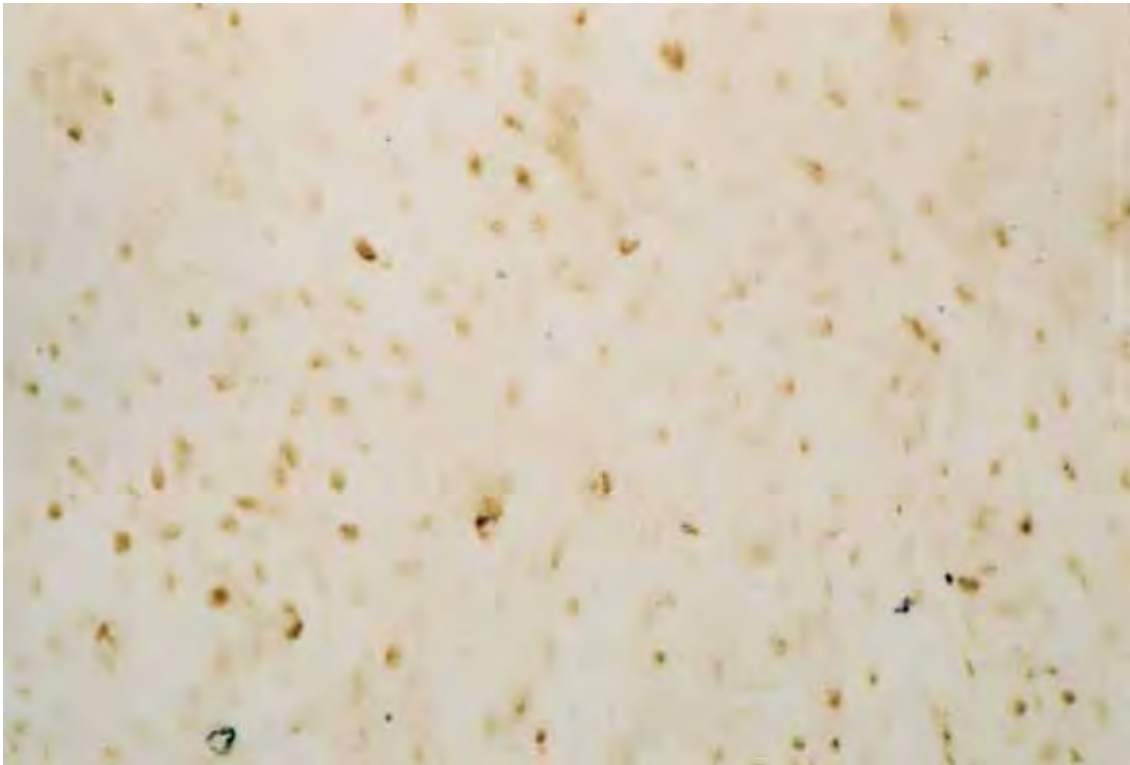


FIGURA 13 - Grupo Euro Collins 30 horas – OPG (original, 160x, Diaminobenzidina).

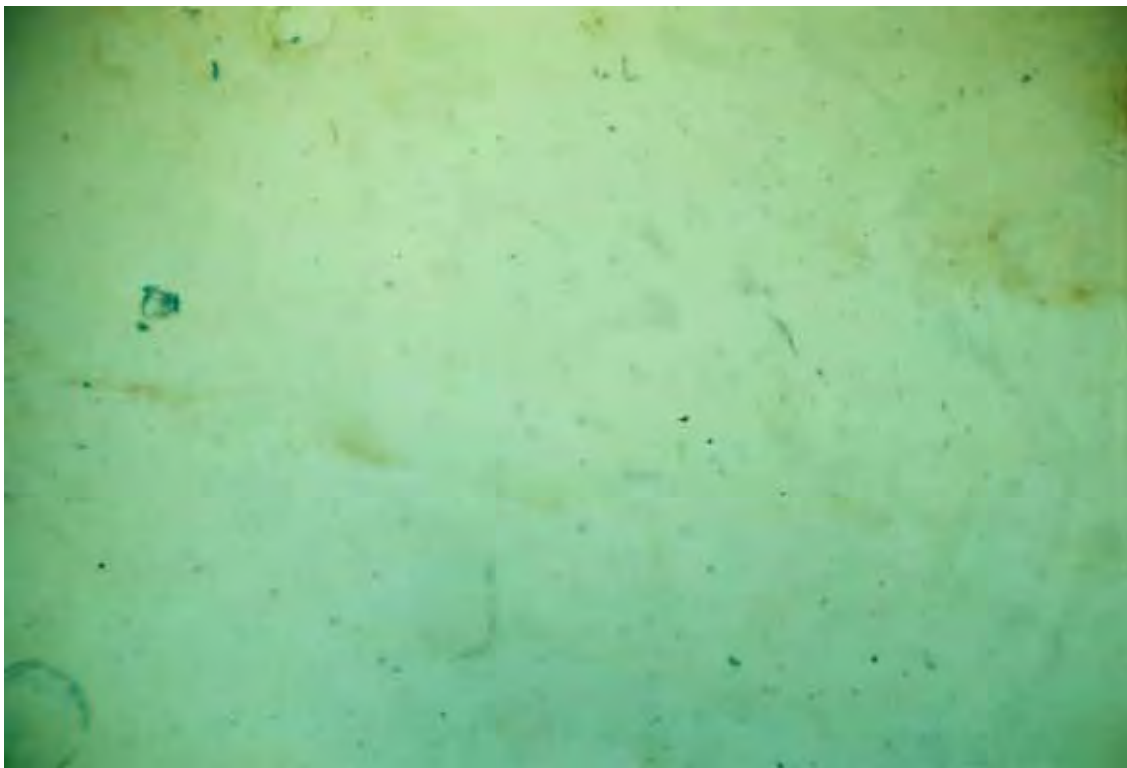


FIGURA 14-Grupo controle da imuno (original, 63x, Diaminobenzidina).

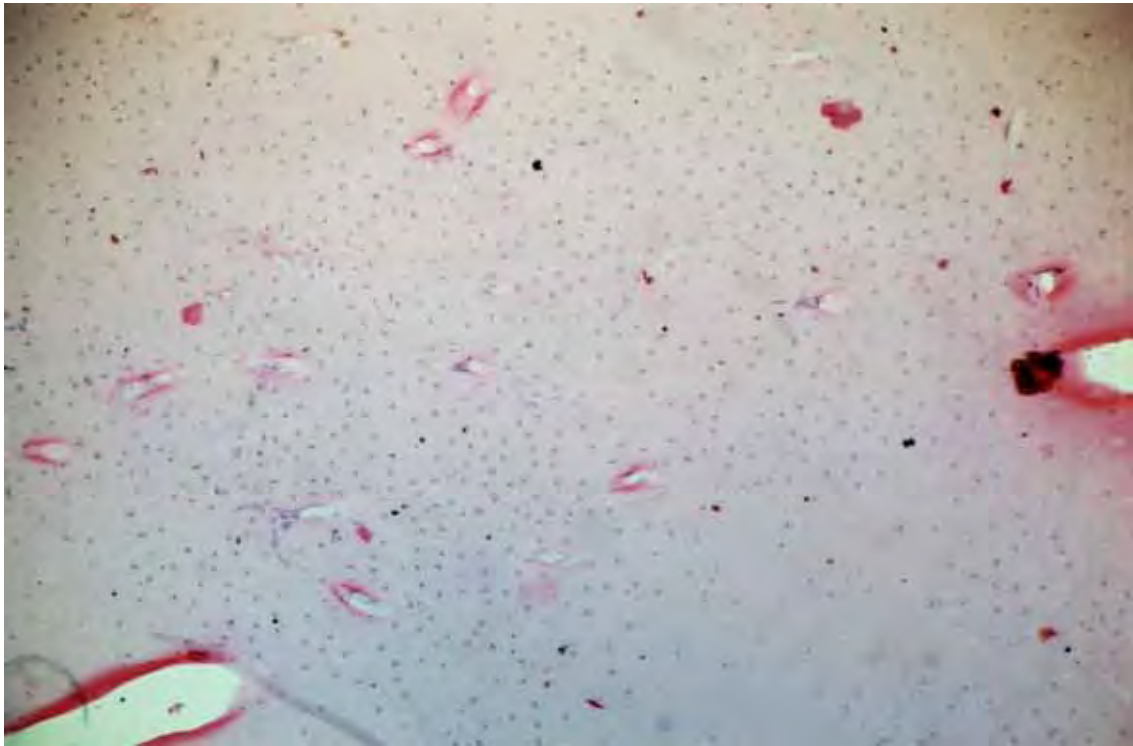


FIGURA 15-Grupo inmediato (original, 63x, HE).

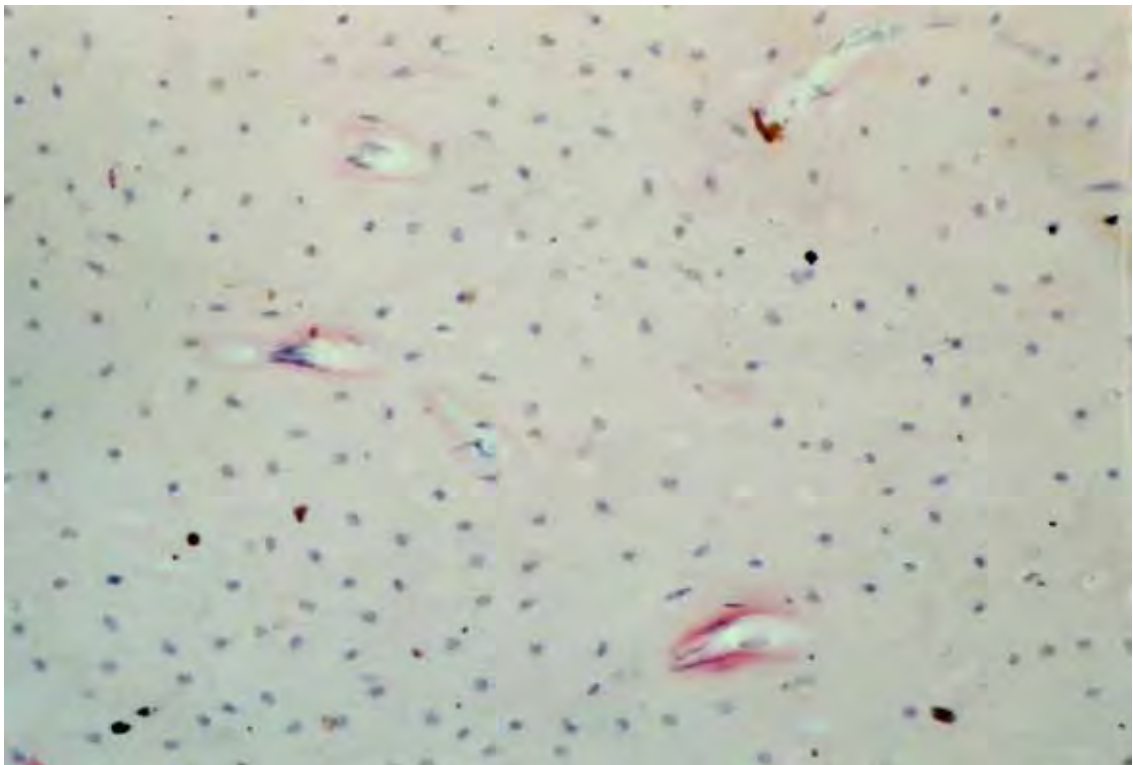


FIGURA 16-Grupo inmediato (original, 160x, HE).

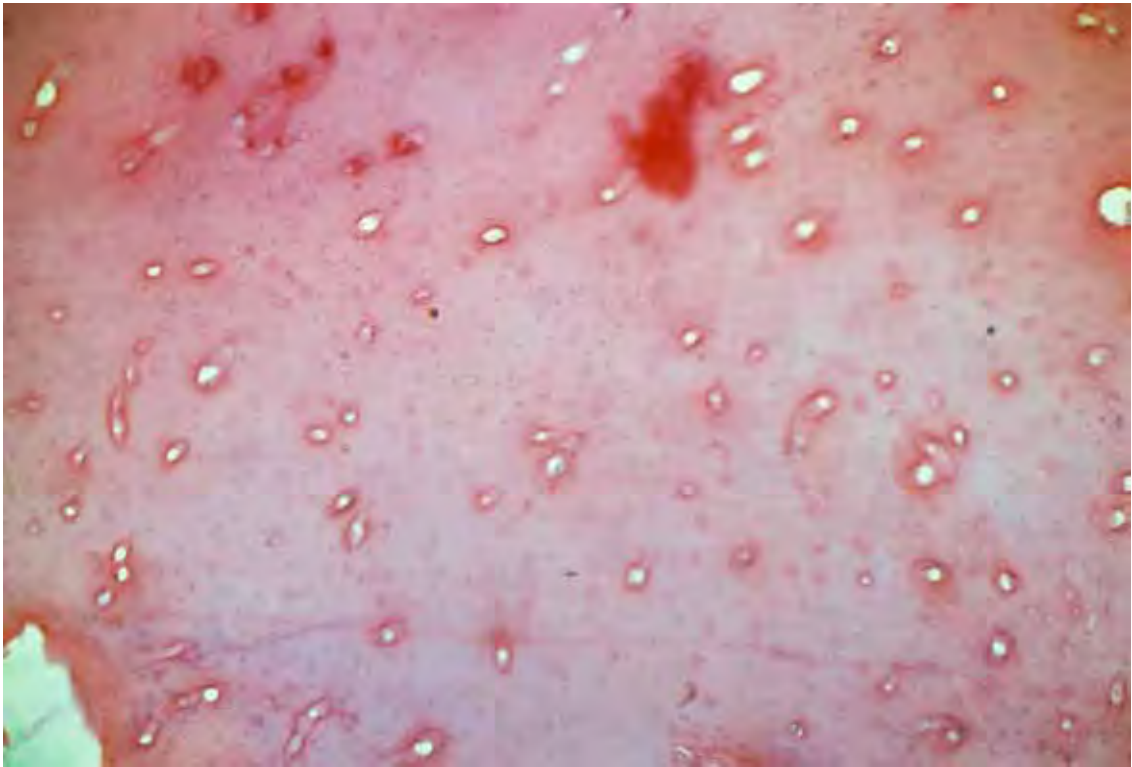


FIGURA 17- Grupo soro fisiológico 12 horas (original, 63x, HE).

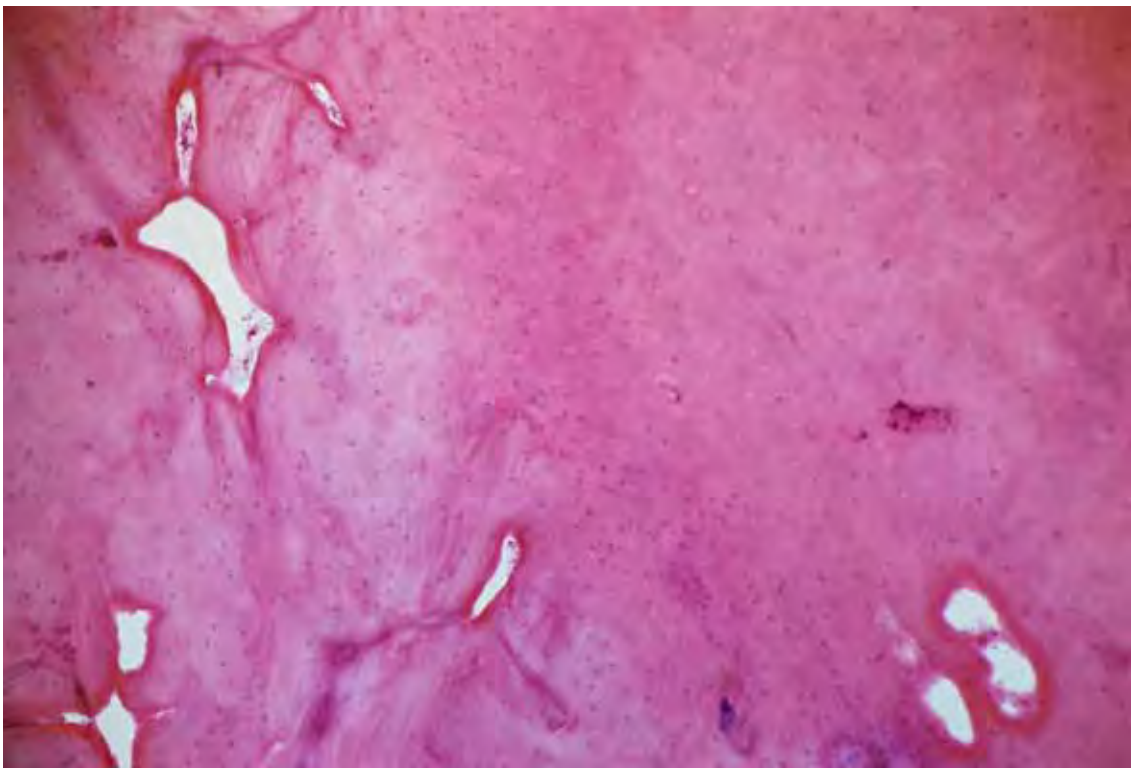


FIGURA 18-Grupo Euro Collins 30 horas (original, 63x, HE)

JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

(Para instruções em português, consulte: www.fob.usp.br/revista.normas.htm)

Manuscripts and related correspondence should be addressed to:

Journal of Applied Oral Science
Faculdade de Odontologia de Bauru
Serviço de Biblioteca e Documentação
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla 9-75
Vila Universitária
17012-901 – BAURU – SP – BRASIL
Website: <http://www.fob.usp.br/revista>

The Journal of Applied Oral Science is published every three months and its scope is the publication of basic and applied studies, in English.

The criteria for publication in the Journal are the following:

- Chronology of approval of the manuscript
- Limit of number of pages in each issue

Mission

The Journal of Applied Oral Science is committed in publishing the scientific and technologic advancements achieved by the dental community, following the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels.

Objectives

The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations and invited literature reviews in the field of Dentistry and related specialties.

1 – GENERAL GUIDELINES

1.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

1.2 Only papers written in English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts.

1.3 The JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE has the right to submit all manuscripts to the Scientific Committee, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be reevaluated by the Publication Committee and Editorial Board. The refused manuscripts will be returned to the authors.

1.4 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Scientific Committee and Editorial Board.

1.5 The date of receipt of the original paper will be published at the end of the paper in the occasion it is published.

1.6 Each author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

1.7 Color illustrations will not be published, unless if absolutely necessary and at the discretion of the Editorial Board. In this case, the authors must assume the corresponding costs.

2 – PRESENTATION OF THE MANUSCRIPT

The manuscripts submitted to the Journal of Applied Oral Science should be written according to the following guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group).

Submission of the manuscript:

2.1 The manuscripts should be sent in 3½ floppy disks or CD-Rom,

typed in the software Word for Windows (.doc file), together with 3 (three) hard copies, including 3 sets of black and white original illustrations and one digitized copy in accordance with item 2.6. The authors are advised to keep a copy of the manuscript and illustrations.

2.2 The first page of the paper should contain just the following: title in Portuguese and English, name of the authors followed by their main title, complete address of the corresponding author, to whom correspondence should be sent, phone, fax and email. The subsequent page should contain the title in Portuguese and English, yet with no identification of the authors, followed by the paper itself.

2.3 The manuscript should be sent together with a letter signed by all authors (Submission Form), assuming full responsibility for the content of the manuscript submitted to the Journal for publication, which will be printed on the Journal.

Technical normalization:

2.4 The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 paper, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests in case the material is lost.

2.5 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be presented in separate pages at the final of the manuscript, consecutively numbered with Arabic numerals according to the order they appear on the text, containing the number of the illustration, the first author's surname and an arrow indicating the top of the figure on its back. Graphs and drawings should be in black and white or gray shades.

2.6 Photographs may be sent in original black and white color and digitized in .jpg format with at least 300dpi. These illustrations should be provided in separate files and not inserted in the Word document when submitted by conventional mail, and sent in attached files when sent by email (see items 2.1 through 2.5).

2.7 The corresponding legends should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a list, preceded by the corresponding number. The approximate areas on the text where the illustrations should be inserted must be indicated.

2.8 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numerals. The legend shall be placed on their top.

2.9 Footnotes should be indicated by an asterisk and restricted to the least amount possible.

2.10 Citation of the authors on the text may be performed in two manners:

a) **Just numeric:** ... and interfere with the bacterial system and tissue system¹⁴, or

b) **alphanumeric:**

- one author – Silva²³ (1986)
- two authors – Silva and Carvalho²³ (1987)
- three or more authors: Silva, et al.²³ (1989)

Structure of the manuscript

OPENING

a) **Heading:**

Title of the manuscript and subtitle, if necessary. Type the title and subtitle of the manuscript in English followed by the title and subtitle in Portuguese.

b) **Abstract:** should comprise at most 250 words, highlighting the objective, materials and methods, results and conclusions.

c) **Uniterms:** (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and to the DeCS (Descritores em Ciências da Saúde, available on <http://decs.bvs.br/>) for the uniterms in Portuguese.

JOURNAL OF APPLIED ORAL SCIENCE

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

(Para instruções em português, consulte: www.fob.usp.br/revista.normas.htm)

TEXT

- a) Introduction - summary of the rationale and proposal of the study including just proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.
- b) Material and Methods - the materials and methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed if applicable.
- c) Results - presents the outcomes in logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained on tables and illustrations should not be repeated on the text and just important findings should be highlighted.
- d) Discussion - this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned on the introduction or results should not be repeated. Only findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings, as well as their limitations.
- e) Conclusion(s) (if any)

Abbreviations - the complete term to which an abbreviation is defined should precede its first appearance in the text, except if it is a standard unit of measurement.

REFERENCE MATERIAL

- a) Resumo: abstract in Portuguese.
- b) Unitermos: version of the uniterms in Portuguese.
- c) Acknowledgements (if any) - thank any people who have significantly contributed to the study. Indicate any grants received together with the funding agency and the grant number.

References:

The references must follow the Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver, JAMA, 1997;277:927-34.

- All references should be cited on the text. They should be alphabetically ordered by the surname of the author and numbered in increasing order. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE, and the LILACS and BBO - Bibliografia Brasileira de Odontologia.
- Personal communications and unpublished data with no publication date should not be included in the reference list.
- The use of abstracts as references should be avoided.
- The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression et al.
- At most 30 references may be cited.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

Papers published in journals:

Veja KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1; 124(11):980-3.

In case the journal cited is continuously numbered, the following style may be used (the month and number may be omitted):
Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. *Caries Res* 1992; 26:188-93.

Papers with more than 6 authors:

The first 6 authors are cited, followed by the expression et al.

Parkin DM, Clayton D, Black, RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. *Br J Cancer* 1996; 73:1006-12.

Papers without authors' names:

Seeing nature through the lens of gender. *Science* 1993; 260:428-9.

Volume with supplement and/or Special Number:

Ismail A. Validity of caries diagnosis in pit and fissures [abstract n. 171]. *J Dent Res* 1993; 72(sp. issue):318.

Entire issue:

Dental Update. Guildford 1991 Jan/Feb; 18(1).

Abstracts presented in congresses:

Matsumoto MA, Sampaio Góes FCG, Consolaro A, Nary Filho H. Análise clínica e microscópica de enxertos ósseos autógenos em reconstruções alveolares. In: Anais da 16a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO; 1999 set. 8-11; Águas de São Pedro (SP). São Paulo : SBPqO; 1999. p. 49, resumo A173.

Paper presented in congress and published in journals:

Cefaly DFG, Ribeiro LL, Navarro MFL. Effect of time on the diametral tensile strength of resin modified glass ionomer cements [abstract 50]. *J Dent Res* 1988; 77(5):1149 [apresentada na 14th Annual Meeting of the Brazilian Society for Dental Research, 1997 Sep 6-10, Águas de São Pedro, São Paulo]

Monograph, Dissertation and Thesis:

Pereira AC. Estudo comparativo de diferentes métodos de exame, utilizados em odontologia, para diagnóstico da cárie dentária. São Paulo; 1995. [Master Dissertation - Faculdade de Saude Publica da USP].

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

3 - ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE EDITORIAL BOARD AND SCIENTIFIC COMMITTEE.

Checklist:

- Three copies of the paper, figures and tables, 3 sets of original black and white photographs or digitized at 300dpi in separate files in .tif, .gif or .jpg format;
- Manuscript: 1.5 spacing, comprising the references, legends for figures, tables and figures in separate pages;
- Structured abstract with at most 300 words;
- References: 1.5 spacing, in alphabetical order, following the guidelines of the Journal (up to 30);
- Tables: 1.5 spacing with legends on top;
- Submission form signed by all authors.