

Eleonor Álvaro Garbin Junior

Avaliação comparativa do processo de reparo do osso alógeno fresco congelado, em bloco, e do enxerto ósseo autógeno. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do "Campus de Araçatuba – UNESP", para obtenção do grau de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de Concentração: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAL).

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho.

Araçatuba-SP
2008

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

| | |
|-------|--|
| G213a | <p>Garbin Junior, Eleonor Alvaro Avaliação do processo de reparo do osso alógeno fresco congelado, em bloco, e do enxerto ósseo autógeno : análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos / Eleonor Alvaro Garbin Junior. – Araçatuba : [s.n.], 2008 85 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008 Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho</p> <p>1. Bancos de ossos 2. Enxerto ósseo; 3 Implantes dentários 4. Materiais biocompatíveis</p> <p>Black D7 CDD 617.64</p> |
|-------|--|

Dados Curriculares

Eleonor Álvaro Garbin Junior

- NASCIMENTO: 27 de outubro de 1975 – Guarapuava-PR
- FILIAÇÃO: Eleonor Álvaro Garbin
Teresinha Luiza Rodrigues
- 1994 – 1997: Curso de Graduação em Odontologia – Unipar – Umuarama-PR.
- 1998 – 2002: Professor colaborador das Disciplinas de Anestesiologia e Cirurgia do Curso de Odontologia da Unipar – Umuarama-PR.
- 1999 – 2001: Curso de Pós-Graduação em odontologia, nível de Mestrado, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP.
- 2002 – 2008: Professor efetivo das Disciplinas de Farmacologia, Cirurgia I e do Curso de Residência em Cirurgia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.
- 2006 – 2008: Coordenador do Curso de Especialização em Implantodontia da ABO-Cascavel-PR.
- 2005 - 2008: 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

À minha filha Julia Inês Garbin.

Que este trabalho, de alguma forma, sirva como inspiração na busca de seus ideais. Como exemplo de que com planejamento, dedicação e determinação os nossos objetivos podem ser alcançados. Siga sempre em frente. Papai lhe ama muito.

“...Nem mesmo o céu, nem as estrelas;

Nem mesmo a mar e o infinito;

São maiores que o meu amor por você...”

Ao meu pai Eleonor Álvaro Garbin.

Costuma-se dizer que a estrutura da família é o princípio fundamental da formação de uma pessoa. Chego agora ao fim de mais uma jornada. Possivelmente seja a conquista profissional mais importante de minha vida. E neste momento, gostaria de compartilhar contigo e também com outras queridas pessoas que infelizmente não estão mais entre nós, e que tão importantes foram para mim, toda a minha alegria e satisfação. Sem dúvida o senhor é o principal responsável por esta conquista, pois conseguiu, através do exemplo de homem que sempre foi mostrar-me a importância da busca de nossos ideais, baseado sempre nos princípios dos valores da honestidade, simplicidade, caráter e educação. A você meu pai os meus eternos agradecimentos.

A minha esposa e companheira Carina.

Por compreender a importância da realização deste curso; Por suportar os momentos de minha ausência; Por se fazer presente nos momentos de dificuldades e apreensões e por ser a esposa e mãe maravilhosa que é. “Por você: eu dançaria tango no teto, eu subiria os trilhos do metrô...”.

A toda minha família, em especial a minha mãe Teresinha, Tia Helena e meus irmãos: Eduardo, Cryssie e Ghenwa.

Agradeço pelo apoio, incentivo e toda participação indireta durante o transcorrer desta jornada.

Agradecimentos Especiais

A Deus, que nos permite a vida e oferece condições para traçarmos e percorrermos o nosso caminho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Osvaldo Magro Filho.

Agradeço profundamente por ter me aceito como seu orientado, pela presença real e orientação segura durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e pela paciência nos momentos de maiores dificuldades. Admiro-lhe por sua competência, capacidade e maneira de conduzir as diversas situações profissionais e pessoais. Mais do que um grande professor você se tornou para mim um importante amigo. Muito obrigado pelos ensinamentos transmitidos e pela convivência agradável durante toda a pós-graduação.

Ao professor Dr. Idelmo Rangel Garcia

Grande exemplo de dedicação à profissão e de competência. Agradeço pela oportunidade de poder ter cursado o Doutorado nesta casa que sempre muito bem me acolheu e pelas palavras de apoio e gestos de amizade durante a Pós-Graduação.

Ao professor Dr. Michel Saad Neto.

Agradeço-lhe por todos os momentos em que prontamente me recebeu, em sua sala, concedendo-me valiosos conhecimentos e sábias palavras. O senhor é um grande exemplo de dedicação ao ensino e é aquele mestre que todo aluno um dia gostaria de ser.

Ao professor Dr. Tetuo Okamoto, professora Dra. Roberta Okamoto e professor Dr. Luiz Antonio Violin (Unicamp), pela valiosa colaboração neste trabalho com o auxílio na interpretação dos resultados.

Aos colegas de Pós-Graduação Thallita Pereira Queiroz, Jéssica Lemos e Francislei Ávila Souza, agradeço pelos preciosos auxílios durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, sob a direção do Prof. Dr. Paulo Botacin, pelas condições oferecidas para a realização do curso de Doutorado.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – na pessoa do Coordenador do Curso de Odontologia, Professor Alexandre Weber, pela disponibilização de afastamento das atividades de ensino, em momentos importantes, para conclusão do curso de Doutorado.

Aos colegas do curso de Doutorado: André Doto Sotovia, Liliane Sheidegger da Silva Zaneti, Paulo Almeida Jr, Paulo Domingos Ribeiro Junior e Luiz Francisco Coradazi (Doutorado em Implantodontia). E ainda aos amigos do curso de Mestrado: Leandro de Carvalho Cardoso, Thais da Silveira Rodrigues, Carolina Chianteli Cláudio Coutinho, Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Flávia Priscila Pereira e Marcos Heidy Guskuma. Agradeço pelos agradáveis momentos de convivência e compartilhamento de conhecimentos durante a Pós-Graduação.

Aos funcionários do departamento de cirurgia: Dirce, Bernardete, Gilmar, Cleide e Paulo, pela imensa contribuição nas diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação: Marina, Valéria e Diogo, pela prestatividade e eficiência nas suas funções.

A todos os funcionários da biblioteca que me auxiliaram em diversos momentos da elaboração desta Tese.

Epígrafe

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos aos desafios. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque ter consciência não nos obriga a ter teorias sobre as coisas, só nos obriga a ser conscientes. E, quando acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso”.

Henfil

Resumo

Resumo

GARBIN-JUNIOR, E.A. Avaliação comparativa do processo de reparo do osso alógeno fresco congelado, em bloco, e do enxerto ósseo autógeno. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos. [tese] – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Com a finalidade de recuperar rebordos alveolares atroficos para posterior reabilitação com implantes osseointegrados, além do enxerto ósseo autógeno, o osso alógeno fresco congelado recentemente tem sido empregado. O objetivo deste estudo foi analisar comparativamente o reparo dos enxertos ósseos autógenos e alógenos congelado em bloco, através de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica em coelhos. Material e método: vinte um animais foram anestesiados para a realização da cirurgia experimental onde, na região de ângulo de mandíbula esquerdo foi fixado um bloco ósseo autógeno de 0,8 cm de diâmetro, utilizando-se parafuso, e no lado direito foi fixado, da mesma forma, um bloco ósseo tratado pelo Banco de Tecidos Músculo-Esquelético. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos de 15, 45, 120 e 180 dias. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina e eosina e pela técnica de imunoistoquímica para avaliar atividades de reabsorção e neoformação óssea. Resultados: a análise histométrica mostrou não haver diferença estatística entre os grupos em relação à interface óssea leito receptor/enxerto ósseo aos 15 dias, contudo, analisando o bloco enxertado, notou-se maior revascularização, reabsorção e substituição óssea no grupo osso

autógeno, fato este comprovado estatisticamente pela análise imunoistoquímica. Nos períodos tardios, o osso autógeno foi substituído em todas as amostras, enquanto no grupo do osso alógeno fresco congelado foi sempre possível encontrar osso desvitalizado junto ao parafuso de fixação. Conclusão: o processo de reparo apresentou maior dinâmica para o grupo enxerto ósseo autógeno em relação ao osso alógeno fresco congelado. A substituição do enxerto autógeno foi completa enquanto no grupo do osso alógeno fresco congelado foi encontrado, ainda nos períodos tardios de avaliação, tecido sem remodelação e acelular, porém incorporado à interface do leito receptor.

Palavras-chave: Bancos de ossos; Enxerto ósseo; Implantes dentários; Materiais biocompatíveis.

Abstract

Abstract

GARBIN-JUNIOR, E.A. Comparative evaluation of the healing process between freeze allogenic graft and autogenous bone graft in block. Histological, histometric and imunoistochemical analyses in rabts. Theses – Dental School of Araçatuba – Universidade Estadual Paulista; 2008.

The autogenous bone graft and the freeze allogenic bone graft have being used to reconstruct atrophic alveolar ridge to allow the use of osteointegrated implants rehabilitation. The aim of this study was to compare the healing process of autogenous and allogenic bone graft using the histological, histometrical, imunoistochemical analyses in rabts. Material and Methods: twenty one animals had surgery done to allow fixation of 0.8 cm diameter of autogenous tibia bone graft on the left mandibular angle, and allogenic tibia bone graft on the right madibular angle. Five animals from each group were sacrificed at 15, 45, 120, and 180 postoperative days. The histological cuts were stained by hematoxililn and eosin and imunohistochemical technique to evaluate the bone formation and resorption. Results: the histometric analyses of bone formation between the bone graft interface and mandibular bone showed no statistical difference on the 15 days, but, the graft surface evaluation showed more revascularization, resorption and bone formation on the autogenous bone graft group and it was confirmed stasticially by the imunoistochemical analyses. On the lastest groups (120 and 180 postoperative days), the autogenous bone was totally replaced but on the allogenic group it was possible to find

non vital bone next to the fixation screw. Conclusion: the bone repair showed more dynamic activity on the autogenous graft group and it was totally replaced. The allogenic graft was incorporated but, on the latest sacrificed groups, it was not totally replaced.

Keywords: Bone Banks; Bone Graft; Dental Implants; Biocompatible Materials.

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração da fase cirúrgica.57

- A. Remoção do enxerto ósseo autógeno da tíbia;
- B. Fixação do enxerto autógeno na região de ângulo mandibular esquerdo;
- C. Preparo do osso alógeno congelado;
- D. Fixação do osso alógeno congelado na região de ângulo mandibular direito.

Figura 2: Ilustração da análise histológica – 15 dias.....58

- A. Grupo enxerto autógeno 15 dias – HE 63X. Enxerto autógeno posicionado sobre o leito receptor (L.R.). Trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta);
- B. Grupo enxerto autógeno 15 dias – HE 63X. Grande quantidade de vasos neoformados e canais de nutrição invadindo o enxerto a partir do leito receptor (setas). Na interface observa-se osso neoformado (O.N.);
- C. Grupo osso alógeno congelado 15 dias – HE 63X. Bloco de osso alógeno congelado (E.Al.) em contato com o leito receptor, exibindo poucas regiões de revascularização (seta). Na interface inferior de contato observam-se regiões de osso neoformado (O.N);
- D. Grupo osso alógeno congelado 15 dias – HE 120X. Bloco de osso alógeno congelado (E.Al.) exibindo regiões pouco vascularizadas e sem viabilidade celular (setas).

Figura 3: Ilustração da análise histológica – 45 e 120 dias.....59

- A. Grupo enxerto autógeno 45 dias – HE 63X. Bloco de enxerto autógeno (E.A) bem vascularizado (setas) e incorporado ao leito receptor;
- B. Grupo osso alógeno congelado 45 dias HE 63X. Bloco de osso alógeno congelado (E.Al.) pouco vascularizado e osteócitos sem vitalidade;

- C. Grupo enxerto autógeno 120 dias – HE 160X. Bloco de enxerto autógeno exibindo osso neoformado (O.N.), vascularizado e incorporado;
- D. Grupo osso alógeno congelado 120 dias – HE 160X. Tecido ósseo neoformado junto ao leito receptor (O.N.) e regiões de lacunas de osteócitos sem vitalidade (setas).

Figura 4: Ilustração da análise histológica – 180 dias.....60

- A. Grupo enxerto autógeno 180 dias – HE 63X. Observa-se o tecido ósseo junto ao parafuso de fixação (P) totalmente remodelado, revascularizado e com viabilidade celular;
- B. Grupo osso alógeno congelado 180 dias – HE 63X. Osso alógeno congelado (E.A1.) exibindo extensas regiões de osteócitos sem vitalidade (setas).

Figura 5: Ilustração da análise imunoistoquímica – 15 e 45 dias - OC.....61

- A. Grupo enxerto autógeno – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica super-positiva para a OC (setas);
- B. Grupo osso alógeno congelado – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica pouco positiva para a OC (seta);
- C. Grupo enxerto autógeno – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica super positiva para OC (setas);
- D. Grupo osso alógeno congelado – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica pouco positiva para OC (setas).

Figura 6: Ilustração da análise imunoistoquímica – 15 e 45 dias – TRAP62

- A. Grupo enxerto autógeno 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Grande número de osteoclastos marcados (setas);
- B. Grupo osso alógeno congelado – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Poucos osteoclastos marcados (setas);
- C. Grupo enxerto autógeno – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Pouca evidência de osteoclastos marcados (setas);

D. Grupo osso alógeno congelado – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Pouca evidência de osteoclastos marcados (setas).

Figuras em anexo

| | |
|---|----|
| Figura 7: Abordagem em tíbia para remoção do osso do animal doador..... | 74 |
| Figura 8: Tíbia esposta para remoção | 74 |
| Figura 9: Tíbia removida..... | 74 |
| Figura 10: Acondicionamento do osso para envio ao banco de ossos | 74 |
| Figura 11: Recebimento do osso alógeno na data da cirurgia dos animais receptores .. | 74 |
| Figura 12: Forma de anéis de tíbia embalados individualmente..... | 74 |
| Figura 13: Bloco ósseo sendo preparado com broca trefina de 8 mm | 75 |
| Figura 14: Acesso ao leito receptor..... | 75 |
| Figura 15: Preparo do leito receptor do osso alógeno – ângulo da mandíbula direito... | 75 |
| Figura 16: Fixação do bloco de osso alógeno com parafuso de titânio 1,5 x 8 mm | 75 |
| Figura 17: Acesso a tíbia direita para remoção do enxerto autógeno | 75 |
| Figura 18: Remoção do enxerto com broca trefina de 8 mm..... | 75 |
| Figura 19: Bloco ósseo sendo removido | 76 |
| Figura 20: Adaptação e fixação do enxerto autógeno - ângulo mandibular esquerdo .. | 76 |
| Figura 21: Programa Imagelab 2000. Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor | 77 |
| Figura 22: Seleção da extensão total da interface enxerto/leito receptor..... | 77 |
| Figura 23: Cálculo da área total da interface enxerto/leito receptor | 77 |
| Figura 24: Demarcação das regiões de neoformação óssea na interface | 77 |
| Figura 25: Cálculo da área de neoformação óssea na interface | 78 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Porcentagem de osso neoformado na interface entre o enxerto e leito receptor | 64 |
| Tabela 2: Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para a OC – período de 45 dias | 64 |
| Tabela 3: Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para a OC – período de 45 dias | 65 |
| Tabela 4: Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para a TRAP – Período de 15 dias | 65 |
| Tabela 5: Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para a TRAP – Período de 45 dias | 66 |

Lista de Gráficos

- Gráfico 1: Representação gráfica da % de ocorrências de médias percentuais da formação óssea na interface leito receptor/enxerto, para os grupos enxerto autógeno e osso alógeno, no período de 15 dias.....79
- Gráfico 2: Representação gráfica da porcentagem de ocorrências de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 15 dias e com os grupos experimentais enxerto autógeno e osso alógeno, relativos a proteína OC80
- Gráfico 3: Representação gráfica da porcentagem de ocorrências de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 45 dias e com os grupos experimentais enxerto autógeno e osso alógeno, relativos a proteína OC81
- Gráfico 4: Representação gráfica de valores obtidos em imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 15 dias para o enxerto autógeno e osso alógeno, relativos a enzima TRAP.....82
- Gráfico 5: Representação gráfica de valores obtidos em imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 45 dias para o enxerto autógeno e osso alógeno, relativos a enzima TRAP.....83

Lista de Abreviaturas

- EDTA - Ácido etileno-amino-tetracético
- HE - Hematoxilina e eosina;
- OC - Osteocalcina
- PVPI - Polivinil pilorridona iodo
- TRAP - Enzima lisossomal fosfatase ácida resistente

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 24 |
| 2. Proposição | 29 |
| 3. Material e Método | 31 |
| 4. Resultado | 38 |
| 5. Discussão | 43 |
| 6. Conclusão | 50 |
| 7. Referência..... | 52 |
| Figuras | 58 |
| Tabelas | 65 |
| Anexos | 68 |
| A Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal | 69 |
| B Normas para publicação no periódico selecionado | 70 |
| C Ilustração da fase cirúrgica | 75 |
| D Ilustração da análise histométrica..... | 78 |
| E Ilustração gráfica | 79 |

Introdução

1 Introdução

O conceito de osseointegração revolucionou a terapia de tratamento para indivíduos com edentulismo, abrindo novos caminhos no campo da cirurgia reconstrutiva pré-protética ¹. Contudo, para que os implantes osseointegráveis possam ser instalados na cavidade bucal em posições estratégicas é necessário, entre outros requisitos, um bom remanescente ósseo no rebordo alveolar. A atrofia óssea causada pela perda dental muitas vezes inviabiliza o tratamento com próteses implanto-suportadas ^{2,3}.

Quando o objetivo da reconstrução óssea é possibilitar a posterior instalação de implantes osseointegráveis, é fundamental que após a total revascularização e consolidação do enxerto, este sofra mínima perda do volume original e que seja substituído por osso vital, fornecendo condições favoráveis para o processo de promoção e manutenção da osseointegração ⁴.

O osso autógeno é considerado o melhor material para a reconstrução destas atrofias alveolares. Suas propriedades biológicas de osteogênese, osteoindução e osteocondução desencadeiam uma série de eventos que culminam na sua revascularização, incorporação e remodelação, o que permite a reabilitação com implantes osseointegráveis de forma previsível ^{4,5}.

Entretanto, a obtenção do enxerto ósseo autógeno aumenta a morbidade do procedimento, uma vez que requer uma área doadora, que geralmente é selecionada de acordo com o defeito ósseo a ser corrigido. Regiões intra e extra bucais podem ser

eleitas, sendo que, em algumas situações, faz-se necessário a intervenção em ambiente hospitalar e sob anestesia geral, o que aumenta os custos do procedimento e muitas vezes desperta receios e insegurança para o paciente ^{3,4}.

Outras opções de enxertia têm sido mencionadas para substituir ou para serem utilizadas associadas ao enxerto ósseo autógeno como o osso alógeno, osso heterógeno e os materiais aloplásticos. Contudo, os resultados de pesquisas recentes confirmam a superioridade do enxerto autógeno principalmente em relação aos aspectos biológicos ^{6,7,8}.

Dentre as inúmeras opções de materiais utilizados com a finalidade de recuperar a estrutura óssea perdida, o osso homogêneo, homólogo ou alógeno como também é conhecido, tem ocupado lugar de destaque. Este tipo de tecido ósseo tem a característica de ser originado da mesma espécie que os receptores, porém de genótipo diferente. O tecido é obtido de doadores vivos e/ou de cadáveres, sendo processado, armazenado e fornecido pelos chamados Bancos de Tecidos Músculo-Esqueléticos ^{9,10,11,12}.

Na cirurgia buco-maxilo-facial a aplicação do osso alógeno é citada inicialmente em situações de preenchimento de cavidades ósseas e císticas, aumento do rebordo alveolar, defeitos de fenda alveolar, reconstrução de mandíbula pós exérese tumoral e em cirurgia ortognática¹³. Com o objetivo específico de reconstrução alveolar para posterior reabilitação com implantes osseointegráveis, encontram-se descrições literárias a partir do final da década de 90 ^{14,15,16,17,18}.

Existem várias técnicas de preparo do osso alógeno com a finalidade de reconstrução óssea. Os principais objetivos são a diminuição de sua antigenicidade e manutenção das características osseointegráveis.

Assim, pode-se dispor do tecido ósseo alógeno fresco; fresco e armazenado congelado em diferentes temperaturas; liofilizado e liofilizado e desmineralizado. Estes métodos de tratamento causam diferenças biológicas durante a incorporação óssea, que parecem influenciar nos resultados da enxertia óssea alógena ^{9,20,21,22}.

A facilidade de aquisição em quantidade desejada junto aos Bancos de Tecidos Músculo-Esqueléticos, somada a vantagens atribuídas ao material como: redução do tempo cirúrgico e de anestesia, diminuição da morbidade pós-operatória por não necessitar de intervenção em região doadora e possibilidade de grandes reconstruções sob anestesia local, tem impulsionado a utilização do osso alógeno fresco congelado dentro das cirurgias reconstrutivas alveolares com a finalidade de reabilitação com implantes osseointegráveis ^{14,15,16,17,18,23}.

A lei 9.434, de 4/02/1997 e a lei complementar 10.211 de 23/03/2001, dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante. A organização da sistemática dos serviços prestados pelos Bancos de Tecidos Músculo-Esqueléticos no Brasil foi redigida pela portaria número 1686 de setembro de 2002, da ANVISA, baseada nas regras da American Association of Tissue Banks e European Association of Tissue Banks (1995) ^{24,25}. Sendo que, atualmente, é permitido ao cirurgião-dentista, após cadastro no Sistema Nacional de Transplante, fazer uso deste tipo de tecido quando de indicação clínica.

Entretanto, diversas dúvidas quanto a riscos potenciais de transmissibilidade de doenças, como a AIDS e hepatite, permanecem e são freqüentes. Da mesma forma, a falta de uma padronização e/ou de consenso e ainda de informação sobre a metodologia de tratamento do tecido ósseo até o seu congelamento, e a interferência destes processos

no fenômeno da reparação, é um fato que desperta certa apreensão por parte dos cirurgiões na aplicabilidade deste tipo de osso ^{12, 11, 25}.

Assim, este trabalho de pesquisa se justifica devido à relevância clínica do assunto abordado e a necessidade de maiores esclarecimentos sobre a dinâmica do processo de reparo do osso alógeno fresco congelado com a finalidade de posterior reabilitação com implantes osseointegráveis, uma vez que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura estão relacionados ao uso do osso alógeno congelado na medicina, principalmente na reabilitação ortopédica.

Proposição

2 Proposição

O objetivo deste trabalho foi de avaliar, em mandíbulas de coelhos, o processo de reparo do osso alógeno congelado e do enxerto ósseo autógeno, em bloco, por meio da análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

**Material e
Método**

3 Material e Método

Foram utilizados 21 coelhos, machos brancos (Nova Zelândia), variação *albinus*, adultos e com peso corporal variando de 3 a 4 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho, Primor) e água “*ad libitum*”, em condições climatizadas e água canalizada, no biotério do Campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da mesma Faculdade, sob o protocolo número 83/2005 (anexo A).

Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum, pesados e sedados, via intramuscular, pela combinação de 50 mg/kg de Ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil).

Foi feita tricotomia região de ângulo mandibular bilateral e tibia direita, e o mesmo animal foi dividido em 2 grupos sendo o lado esquerdo da mandíbula chamado de Grupo Osso Autógeno e o lado direito da mandíbula Grupo Osso Alógeno Congelado.

Grupo Osso Autógeno - Após antissepsia e anestesia local com cloridrato de mepivacaína a 2% com adrenalina 1:100.000 (Mepivacaína – DFL, Brasil), acessou-se cirurgicamente a face superior interna da tibia direita, por incisão e divulsão, até

exposição do tecido ósseo próximo à articulação tibia/femur. Com o auxílio de uma broca trefina de 8 mm de diâmetro (SIN, São Paulo, Brasil), montada em peça de mão reta e motor elétrico com rotação de 2.000 rpm (Driller BLM 600 plus, São Paulo, Brasil), sob irrigação com solução de soro fisiológico a 0,9%, foi removido um bloco cortical de tecido ósseo que foi mantido imerso na mesma solução acima citada até o momento de sua fixação no leito receptor (figura 1a). O tecido cutâneo da tibia foi suturado com fio nylon 5.0 (ETHICON – Johnson & Johnson Indústria e Comércio Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil).

Na seqüência, foi executada incisão cutânea na região do ângulo mandibular do lado esquerdo, divulsão, exposição óssea e seqüente preparo do leito receptor com leve decorticação usando broca diamantada número 6, também sob constante irrigação com solução fisiológica.

O bloco de osso autógeno foi fixado no leito receptor com o auxílio de um parafuso de titânio de 1,5 mm de diâmetro por 8 mm de comprimento (SIN, São Paulo, Brasil) (figura 1b). Procedeu-se a sutura, por planos, com fio de nylon 5.0.

Grupo Osso Alógeno Congelado - obtenção do osso alógeno - Um dos animais foi previamente sacrificado para a obtenção do osso alógeno, através de injeção endovenosa de Pentobarbital Sódico (1,2 ml/kg Hypnol 3%, Fontoveter, Itapira, Brasil) e sua tibia direita foi removida e encaminhada ao Banco de Tecidos Músculo-Esquelético – UNIOSS Ltda - do Hospital Universitário de Marília-SP. Os processos de captação óssea, acondicionamento e encaminhamento seguiram as orientações do referido banco de tecidos (Anexo C).

Já no Banco de Tecidos o enxerto foi submetido a um processo pré-estabelecido de tratamento descontaminador, para posteriormente ser acondicionado e congelado a -70°C . Não foi executado qualquer processo de liofilização, desmineralização ou esterilização.

Após todos os procedimentos realizados pelo Banco de Ossos, o tecido ósseo congelado foi transportado e mantido de acordo com as instruções do fornecedor até seu uso.

Com a broca tipo trefina de 8 mm, sob constante irrigação, um círculo foi removido do anel da tíbia congelada (figura 1c) e mantido em solução fisiológica até ser fixado sobre ao leito receptor no ângulo mandibular do lado direito, da mesma maneira descrita no Grupo Osso Autógeno (figura 1d).

No pós-operatório, os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1 ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica (1 mg/Kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses. O sacrifício dos animais foi realizado nos períodos de 15, 45, 120 e 180 dias pós-operatórios, com 5 animais em cada período.

Processamento laboratorial

As mandíbulas foram dissecadas, osteotomizadas de forma a incluir todo o enxerto nas peças, e encaminhadas ao laboratório para fixação, descalcificação, remoção do parafuso, inclusão em parafina e obtenção dos cortes seriados, dispondo o

enxerto no seu sentido longitudinal, em relação ao parafuso, de forma a observar o enxerto e seu leito receptor.

Foi feita a coloração pela hematoxilina e eosina para avaliação histológica qualitativa e histométrica através de microscopia óptica.

Análise histométrica

A análise histométrica, considerando a interface enxerto leito receptor, foi feita para o período inicial de 15 dias, com o objetivo de analisar a quantidade de trabéculas ósseas neoformadas nesta região. Cinco lâminas de cada animal foram analisadas.

Para a realização das mensurações, foi utilizado uma lupa com objetiva de aumento Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação de imagem (JVC, TK 1270, Color Vídeo Câmera Sony, Tóquio, Japão). A seguir as imagens foram levadas ao programa Imagelab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá), onde foram realizadas as quantificações, em porcentagem, das áreas de neoformação óssea na interface do leito receptor com o enxerto. Os valores de porcentagem da área selecionada foram obtidos e apresentados em forma de planilha para análise estatística (Anexo D).

Análise imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foram usados como anticorpos primários a OC (OC, Goat (cabra) anti-oc – Santa Cruz Biotechnology^R, USA) e TRAP (TRAP, Goat anti-trap – Santa Cruz Biotechnology^R, USA). O anticorpo secundário

biotinilado foi anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey anti-goat – Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA). O sinal da reação foi ampliado com o sistema Streptavidina-Biotina (Kit DAKO, DAKO Co, USA) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB, DAKO Co, USA) como cromógeno. Foram realizados controles imunoistoquímicos, para avaliação da efetividade e especificidade das reações.

Foi analisado o padrão de expressão de cada proteína para cada grupo no período de 15 e 45 dias, buscando envolver toda a extensão dos blocos. Para verificar a expressão da proteína osteocalcina (OC), a análise foi realizada considerando-se os seguintes escores: marcações negativas (-), positivas (+), super-positivas (++), e hiperpositivas (+++) das células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em freqüências de médias percentuais de 0%, 20 % (10 a 30%), 60 % (50 a 70%) e 90% (80 a 100%), conforme metodologia proposta por Queiroz et al (2008) ²⁶, seguindo-se os escores acima mencionados.

Para a análise da expressão da enzima TRAP, procedeu-se a contagem do número das marcações na extensão de todo o bloco de enxerto em ambos os grupos.

A análise foi realizada pelo mesmo avaliador, sendo que este desconhecia o grupo que estava sendo avaliado.

Análise Estatística

Os resultados obtidos pela análise histométrica e imunoistoquímica tiveram sua normalidade testada e comprovada pelo método de Kolmogorov e Smirnov. Assim, os dados foram tratados pelo teste paramétrico t pareado.

Resultado

4 Resultado

Análise histológica descritiva

Os resultados obtidos serão descritos em função dos períodos pós-operatórios das ocorrências verificadas nos dois grupos experimentais.

15 DIAS

Grupo Osso Autógeno: O enxerto encontra-se posicionado sobre o leito receptor, e na sua superfície externa, encontra-se faixa tecido conjuntivo composto por fibroblastos, fibras colágenas e vasos neoformados (figura 2a) O tecido conjuntivo entre o enxerto e a superfície óssea apresenta grande número de fibroblastos ao lado de linfócitos e macrófagos. Observa-se ainda, osso neoformado entre o leito receptor e o enxerto ósseo e revascularização no interior dos canais de nutrição (figura 2b).

Grupo Osso Alógeno Congelado: o tecido ósseo implantado permanece junto ao leito receptor. No espaço entre o bloco ósseo e o tecido ósseo pré-existente, encontram-se delgadas trabéculas ósseas neoformadas (figura 2c). Permanecem extensas áreas com tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos, linfócitos e macrófagos. Percebem-se poucas áreas com revascularização nos canais de nutrição e osso sem vitalidade (figura 2d).

45 DIAS

Grupo Osso Autógeno: neste período, percebe-se a remodelação do enxerto ósseo, com sinais evidentes de maior incorporação junto ao leito receptor, em relação ao período anterior (figura 3a). Observam-se diversas regiões com intensa vascularização e atividade osteogênica junto ao enxerto ósseo. Tecido ósseo neoformado pode ser observado em diversas regiões.

Grupo Osso Alógeno Congelado: em todos os espécimes, o osso implantado encontra-se em contato com a superfície óssea receptora e observam-se discretas regiões de neovascularização, e grande quantidade de osso sem vitalidade. Osso neoformado, em pouca expressão, é percebido próximo à interface inferior do osso (figura 3b).

120 DIAS

Grupo Osso Autógeno: o tecido ósseo autógeno, em todos os espécimes, encontra-se incorporado ao tecido ósseo (figura 3c). O tecido ósseo neoformado e vascularizado se apresenta uniformemente ocupando toda a extensão do enxerto.

Grupo Osso Alógeno Congelado: em todos os espécimes, o osso implantado encontra-se incorporado ao tecido ósseo (figura 3d). Notam-se, em alguns pontos, tecido ósseo neoformado em contato com o osso alógeno, e ainda áreas de osso sem substituição.

180 DIAS

Grupo Osso Autógeno: o tecido ósseo enxertado, já remodelado, apresenta-se em sua totalidade vascularizado e em atividade, caracterizando osso maduro. É possível notar o

espaço antes ocupado pelo parafuso à direita, comprovando que a área adjacente foi ocupada por enxerto ósseo (Figura 4a).

Grupo Osso Alógeno Congelado: A interface de reparo é semelhante ao enxerto autógeno, contudo regiões de lacunas vazias de osteócitos podem ser observadas ao longo da extensão do bloco (Figura 4b). O espaço antes ocupado pelo parafuso comprova localização do osso.

Análise Histológica Quantitativa

O percentual da área ocupada por osso neoformado, entre o bloco ósseo e o leito receptor, para os dois grupos, é apresentado na tabela 1. Não houve diferença estatística ($p=0,416$) entre os 2 grupos ao nível de 5% de significância.

Análise Imunoistoquímica

OC - Em ambos os grupos, nos períodos de 15 e 45 dias, ao longo do bloco ósseo analisado, foram observadas regiões marcadas positivamente para a OC. As marcações apresentaram-se mais expressivas no grupo osso autógeno aos 15 dias (Figura 5a) que no osso alógeno congelado (Figura 5b), sendo que no período de 45 dias, as marcações foram ainda de maior evidência para o grupo osso autógeno (Figura 5c) que no osso alógeno congelado (Figura 5d). As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados dos escores anotados para cada animal. Não houve diferença estatística aos 15 dias e houve diferença estatística aos 45 dias, sendo maior expressão da atividade de deposição mineral no grupo osso autógeno.

TRAP – Tanto aos 15 quanto aos 45 dias, foi observado maior atividade de reabsorção para o grupo osso autógeno em relação ao osso alógeno congelado. As figuras 6a, 6b,

6c, e 6d mostram tal fato. As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados anotados para cada grupo aos 15 e 45 dias e houve diferença estatística nos dois períodos.

Discussão

5 Discussão

Para a execução deste trabalho experimental foi selecionada a utilização da tíbia do coelho, como região doadora, tanto para obtenção do osso alógeno como do enxerto autógeno. Esta preferência foi dada considerando-se o fato de que esta região é uma das de eleição pelos profissionais que executam a reconstrução alveolar com tecido ósseo proveniente de Banco de Tecidos Músculo-Esquelético. A tíbia tem a característica de ser essencialmente cortical, sendo empregada, principalmente na forma de bloco, quando se almeja aumento ósseo em espessura nas reconstruções.

Apesar da similaridade de resultados, no tocante à interface enxerto/leito receptor para ambos os grupos, sugerida pela análise histológica e histométrica, as diferenças do ponto de vista reparacional foram bastante significativas quando considerado a análise do bloco enxertado.

As quantidades expressivas de vasos sanguíneos neoformados adentrando na superfície inferior do bloco de enxerto autógeno em meio a canais de nutrição e início de atividade osteogênica, observados no período inicial de avaliação, condizem com achados literários que mencionam que os canais vasculares pré-existent são penetrados por vasos sanguíneos e células reabsortivas, o que permite a revascularização do tecido e posterior substituição óssea^{2,27}.

Tal acontecimento foi pouco expressivo no grupo osso alógeno congelado, confirmando as afirmações de que o seu reparo é deficiente e lento já na fase inicial de revascularização e tende a persistir por tempos tardios^{27,9}.

Acredita-se que as falhas ou mesmo deficiências do processo de reparo no tecido ósseo alógeno congelado possam ser atribuídas ao atraso ou comprometimento do processo inicial da revascularização, que podem ser imunologicamente mediadas^{4,9,28}.

A análise imunoistoquímica fornece importantes informações a respeito do comportamento celular, de acordo com a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo ósseo durante o processo de reparo^{31,32}.

Assim, a expressiva diferença de imunomarcção positiva obtida para a TRAP e OC verificada no grupo do enxerto autógeno, aos 15 e 45 dias, confirma a superioridade da dinâmica do processo de reparo neste tipo de enxerto, uma vez que caracteriza a maior presença de reabsorção e deposição mineral através da expressão celular, respectivamente.

Não se procedeu à análise imunoistoquímica nos demais períodos de tempo, em virtude da dificuldade encontrada de delimitar a exata região do enxerto, principalmente no caso do autógeno, que se apresentava em fase avançada de remodelação.

Em relação ao preparo cirúrgico do leito receptor, este foi realizado com o objetivo de aproximar a medula óssea da área receptora, fonte de vasos sanguíneos e células osteogênicas, e o leito receptor. Esta manobra facilita a revascularização e a transformação celular, que produz novo osso e consolida o enxerto³¹.

A incorporação do osso alógeno congelado não é sinal de sucesso, uma vez que outros tipos de implantes também apresentam estas características⁸. O osso autógeno foi incorporado e mostrou-se com vitalidade nos períodos tardios, fato este comprovado histológica e imunoistoquimicamente, o que não foi observado com o osso alógeno congelado.

A extensa perda da vitalidade óssea observada em ambos os grupos analisados, demonstrada pelas lacunas vazias de osteócitos, coincide com as observações de Mowlem (1963)²⁶, Burchardt & Enneking (1978)⁴ e Albrektson (1980)², que relatam em pesquisas com enxertos autógenos, a grande perda da vitalidade celular que é verificada no bloco de enxerto, mesmo com cobertura de periósteo, mantendo-se vivas apenas as células da periferia as quais exercem forte função osteogênica.

Ainda, segundo os mesmos autores, a formação óssea é conduzida por células sobreviventes do enxerto e pela habilidade da matriz óssea em induzir diferenciação de células osteoprogenitoras na área receptora. Embora enxerto e leito tenham contribuições individuais para o processo, é a soma de suas interações que determina o sucesso ou a falência do enxerto.

Esta importante consideração talvez possa explicar os achados encontrados no grupo osso autógeno, aos 45 dias, com grande parte das regiões ocupadas por novos osteócitos viáveis, numerosos canais vasculares com conteúdo celular e regiões de neoformação óssea. Diferentemente do grupo osso alógeno congelado, o qual exibiu predominância de lacunas vazias de osteócitos e pouca vascularização.

Adeptos do uso do osso alógeno congelado argumentam que o arcabouço mineral ósseo preservado dos enxertos será preenchido por novos osteócitos do leito receptor após a osteointegração. Logo, afirmam que a perda da viabilidade celular observada após a criopreservação não contra-indica a sua utilização, uma vez os enxertos não dependem de células vivas para se regenerar e sim da matriz óssea, onde se encontram as proteínas morfogenéticas, responsáveis diretas pela osteoindução^{7,27}.

Contudo, tem sido considerado que tecidos modificados podem servir como pobre fonte de indução, dependendo do tratamento a que foram submetidos, sendo a sua principal propriedade a osteocondução, atuando como uma espécie de plataforma para a deposição de novo osso ³³. Esta consideração pode ser confirmada, neste experimento, através da inexpressiva marcação celular imunoistoquímica observada no grupo do osso alógeno congelado, sugerindo a ausência de osteoindução.

Ressalta-se que neste estudo, no grupo do osso alógeno congelado, em virtude possivelmente do atraso do processo de inicial de revascularização, mesmo no período mais tardio de 180 dias, pode ser constatado ao longo do parafuso de fixação do bloco ósseo, áreas de tecido necrótico, característico de ausência de vascularização. O que não foi observado no enxerto autógeno, o qual se apresentou, no mesmo período de tempo avaliado, completamente revascularizado, com células viáveis e com o processo de remodelação estabelecido.

Esta verificação corrobora com citações literárias na área da ortopedia que afirmam que a total remodelação do osso alógeno congelado pode nunca ocorrer, permanecendo a manutenção de áreas de tecido não vital mesmo em longos períodos pós-enxertia ^{34,14}.

Desta forma, certa apreensão pode ser despertada no que diz respeito ao uso deste biomaterial com a finalidade de posterior instalação de implantes osseointegráveis, uma vez que a manutenção do volume ósseo enxertado pode não significar sucesso do enxerto ao final de determinado período. A não revascularização de um enxerto pode mantê-lo estruturalmente inalterado por prazo indefinido, uma vez

que as células responsáveis pela reabsorção não tem acesso ao osso. Desta forma, nem reabsorção nem osteogênese ocorrem sem que o osso seja revascularizado^{28,2}.

O osso revascularizado pode responder o tempo todo a mudanças nas condições de carga por um remodelamento adaptativo e, até que seja totalmente revascularizado, o osso não deve sofrer carga por não ter potencial fisiológico para remodelar^{2,6,30}. Estes dados talvez possam estar relacionados aos altos índices de insucessos, citados na literatura, que variam em torno de 10 a 20 %, em regiões de instalação de fixações osseointegráveis reconstituídas com osso alógeno congelado em bloco^{15,16,35}.

Métodos de preservação e modificação têm sido experimentados para reduzir a antigenicidade do osso alógeno, e assim tentar melhorar as suas propriedades biológicas. Os enxertos de ossos alógenos frescos podem causar reações imunes inaceitáveis a sua aplicação clínica. O congelamento destes, diminui de forma considerável esta resposta imune do hospedeiro, preservando as propriedades biomecânicas e talvez, segundo alguns autores, osteoindutivas do osso, o que não foi observado no presente experimento^{36,37,38}.

No que se refere ao risco de transmissão de doenças, relata-se que mesmo respeitando-se o período de seis meses com congelamento a -80°C , preconizado pela *American Association of Tissue Banks*, triagem dos pacientes doadores e o processamento laboratorial do tecido, podem-se ter resquícios celulares com potencial de crescimento em cultura, embora isso ocorra em menos de 3% dos casos³⁹.

Infecções por HIV, hepatite C e respostas imunes sistêmicas tem sido reportadas com o uso deste tipo de tecido^{20,41,47,48}. Sendo que, atualmente, é estimado um risco de transmissão de HIV na ordem de $1/1.667.000$ ^{36,40,25}.

Com o objetivo de assegurar uma melhor qualidade dos tecidos em termos de biossegurança, alguns bancos de tecidos têm utilizado técnicas complementares de tratamento ósseo como o óxido de etileno e a irradiação gama. Contudo, ambos os métodos podem ser discutíveis do ponto de vista da efetividade e comprometimento das propriedades biológicas do tecido ^{41,12}.

O tecido ósseo alógeno congelado utilizado neste experimento não foi submetido a qualquer cuidado de esterilização pelo banco de tecidos a que foi enviado, da mesma forma que o osso humano também não é submetido, segundo fontes do próprio estabelecimento. Portanto não pode ser considerado qualquer influência destes métodos complementares de tratamento neste presente estudo.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho experimental reafirmam a maioria das pesquisas com relação à inferioridade do processo de reparo do osso alógeno fresco congelado quando em comparação com o enxerto autógeno ^{9,31,14,12}.

Deve-se ainda considerar que o protocolo de tratamento do osso alógeno fresco congelado não é padronizado entre os bancos de tecidos, sendo possível que resultados diferentes do ponto de vista do reparo possam ser observados em outros experimentos.

Em vista dos resultados observados, os enxertos autógenos são os recomendados para aumentar áreas atróficas de rebordo quando o objetivo é aplicá-los com a finalidade de se obter uma integração óssea com os implantes.

Conclusão

6 Conclusão

Com base nos resultados observados a partir das condições metodológicas experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

- O processo de reparo apresentou maior dinâmica para o grupo osso autógeno em relação ao grupo osso alógeno congelado. A substituição do enxerto autógeno foi completa enquanto no grupo osso alógeno congelado foi encontrado, mesmo nos períodos tardios de avaliação, tecido sem remodelação e acelular, porém incorporado à interface do leito receptor.

Referências
Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

1. Branemark PI. Introduction to osseointegration. In: Branemark PI, Zarb G, Albrektsson T. Tissue integrated protheses: osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintesense, 1985:41-42.
2. Albrektsson, T. In vivo studies of bone grafts. Acta Orthop Scand. 1980;51:9-17
3. Van Der Berg JPA, Ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB. Preinplant surgery of the bony tissues. J Prsthet Dent. 1998;80(2):175-183.
4. Burchardt H, Enneking WF. Transplantation of bone. Surg Clin North Am. 1978; 58(2):403-427.
5. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. J Foot Ankle Surg. 1996;35(5):413-417.
6. Douglas CR, Douglas NA. Fisiologia do osso. In: Douglas CR. Patofisiologia oral, vol. II, 1ª. reimpressão, Pancast, 2000. cap.51, p.201-245.
7. Boyne PJ. Introduction of bone repair by various bone grafting materials. Hard tissue growth repair and mineralization. Ciba Found. Symp. 1973;11:121-141.
8. Young C, Sandsted P, Skogund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999;14:72-76.
9. Urist MR. Practical applications of basic research on bone graft physiology. 1976;1-26;
10. Perrot DH, Smith RA, Kaban LB. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. Int J Oral Maxillofac Surg. 1992;21:260-265.
11. Buck BE, Theodore I, Malinin I. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. Clinical orthopaedics and related research. 1994;303:8-17.

12. Feofiloff ET, Jesus-Garcia R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos. Protocolo do banco de ossos da escola paulista de medicina. *Rev Brás Ortop.* 1996;31(11):895-903.
13. Ellis III E, Sinn D, Use of homologous bone in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51:1181-1193.
14. Figueiredo MN, Bastos AS, Spin-Neto R, Marcantonio-Junior EM, Marcantonio E. Enxerto ósseo homólogo como alternative na enxertia do rebordo maxilar atrófico. *ImplantNews.* 2008;5(3):269-274.
15. Rocha RSR, Rocha FA, Moraes JR. Homoenxerto ósseo congelado: relatos de casos clínicos. *ImplantNews.* 2006;3(6):579-584;
16. Macedo LGS, Monteiro ASF, Macedo NL, Mazzucchelli-Cosmos LA. Osso humano fresco congelado em reconstruções ósseas: estudo retrospectivo e relato de casos. *ImplantNews.* 2006;4(1):50-56.
17. Baptista AD, Sorrilha A, Tormes TAM, Abdoune YA, Croci AT, Camargo OP, Oliveira CR. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. 2003;11(4):220-224
18. Pinholt EM, Hannaes HR, Donath K, Bang G. Titanium implant insertion into dog alveolar ridges augmented by allogenic material. *Clin Oral Impl Res.* 1994;5:213-219.
19. Anderson KJ. The behavior of autogenous and homogenous bone transplants in the anterior chamber of the rat's eye. A histological study of the effect of the size of the implant. *J Bone Joint Surg Am.* 1961;43-A:980-995.
20. Simonds RJ, Scott D, Holmberg MD, Richard L, Hurwits MD, Theresa R. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *New England J Med.* 1992;326(11):726-732.
21. Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol.* 1994;65(12):1128-1133

22. Petrunaro PS, Salomon A. Localized Ridge augmentation with allogenic bloc grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Implant Dentistry*. 2005;14(2):139-146
23. Raghoobar GM, Batemburg RH, Vissink A, Reintsema H. Augmentation of localized defects of the anterior maxillary ridge with autogenous bone before insertion of implants. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(10):1180-1185.
24. Portaria GM/MS 1686, de 20/09/2002. Publicado em <http://www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/legisla%C3%A7%C3%A3o-sanitaria/estabelecimentos-de-saude/banco-de-leite-de-sangue-de-celulas-de-cord%C3%A3o-umbilical-e-outros-org%C3%A3os/Portaria_1686.pdf>. Acessado em 20/06/2008.
25. Piattelli A, Scarano A, Piattelli. Microscopic and histochemical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in association with implant placement: a case report. *Int J Periodontol Res Dent*. 1998;18(4):355-361.
26. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margomari R, Pereira-Filho VA, Garcia-Junior IR. Evaluate of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:1233-1240.
27. Mowlem R. Bone grafting. *British Journal of Plastic Surg*. 1963;8:293-304.
28. LaTrenta GS, McCarthy JG, Curring CB. The growth of vascularized onlay bone transfers. *Annals of Plastic Surgery*. 1987;18(6):511-516.
29. Lieberman JR, Dalwisk A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery American*. 1984;84-A:1032-1044.
30. Coradazzi LF, Garcia-Junior, Manfrin TM. Evaluation of autogenous bone grafts, particulate or collected during osteotomy with implant burs: histologic and histomorphometric analysis in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(2):201-207.

31. Carvalho PSP, Vasconcelos LW, PI J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(4):565-570.
32. Marx RE, Garg A, Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dentistry*. 1998;7(4):267-275.
33. Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop Rel Research*. 1985;200:322-342.
34. Mizutani A, Fujita T, Watanabe S, Sakakida K, Okada Y. Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *International Orthop*. 1990;14(3):231-340.
35. Ullmark G, Obrant KJ. Histology of impacted bone-graft incorporation. *J Arthroplasty*. 2002;17(2):150-157
36. Navarro WJ. Estudo retrospectivo multicentro com enxerto ósseo alógeno fresco congelado na reconstrução dos maxilares com a finalidade de implantes dentais. (Dissertação de mestrado); Florianópolis-SC:Universidade Federal de Santa Catarina;2002.
37. Ijiri S, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Notoya K. Effect of sterilization on bone morphogenetic protein. *J Orthop Res*. 1994;12(5):628-636.
38. Bos GD, Goldberg MD, Zika JM, Heiple KG, Powell AE. Immune responses of rats to frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg*. 1983;65A(2):239-246
39. Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE. The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg*. 1975;57(2):216-220.
40. Simpson D, Kakarala G, Hampson K, Steele N, Ashton B. Viable cells survive in fresh frozen human bone allograft. *Acta Orthop*. 2007;78(1):26-30.
41. Aho Aj, Hirn M, Aro HT, Heikkila JT, Meurman O. Bone bank service in Finland. Experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank 1972-1995. *Acta Orthop Scand*. 1998;69(6):599-565.

42. Smith RA, Ingels J, Lochemes JJ, Dutkwski JP, Pifer LL. Gamma Irradiation of HIV-1. *J Orthop Res.* 2001;19(5):815-819.
43. Dziedzic-Goclawska A, Kaminski A, Uhrynowska I, Stachowicz W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. *Cell and Tissue Banking.* 2005;6:201-219.
44. Friedlander GE, Imune responses to osteochondral allografts. *Current Knowledge and future directions. Clin Orthop.* 1983; 174:54-66.
45. Pruss A, Kao M, Garrel TV, Frommelt L, Gurtler L, Benedix F, Pauli G. Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the “Marburg bone bank system”. *Biologicals.* 2003;31:75-82.
46. Dumas A, Gaudin-Audrain C, Mabillean G, Massin P, Hubert L, Baslé MF. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials.* 2006;27:4204-4211.
47. Eppley B.L, Pietrzak, W.S, Blanton M.W. Allograft and aloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *The Journal of Craniomaxillofacial Surgery.* 2005;16(6): 980-987.
48. McAllister DR, Joice MJ, Menn BJ, Vengsness-JR T. The current status of tissue regulation. 2007;35(2):2147-2158.

Figuras

Figuras

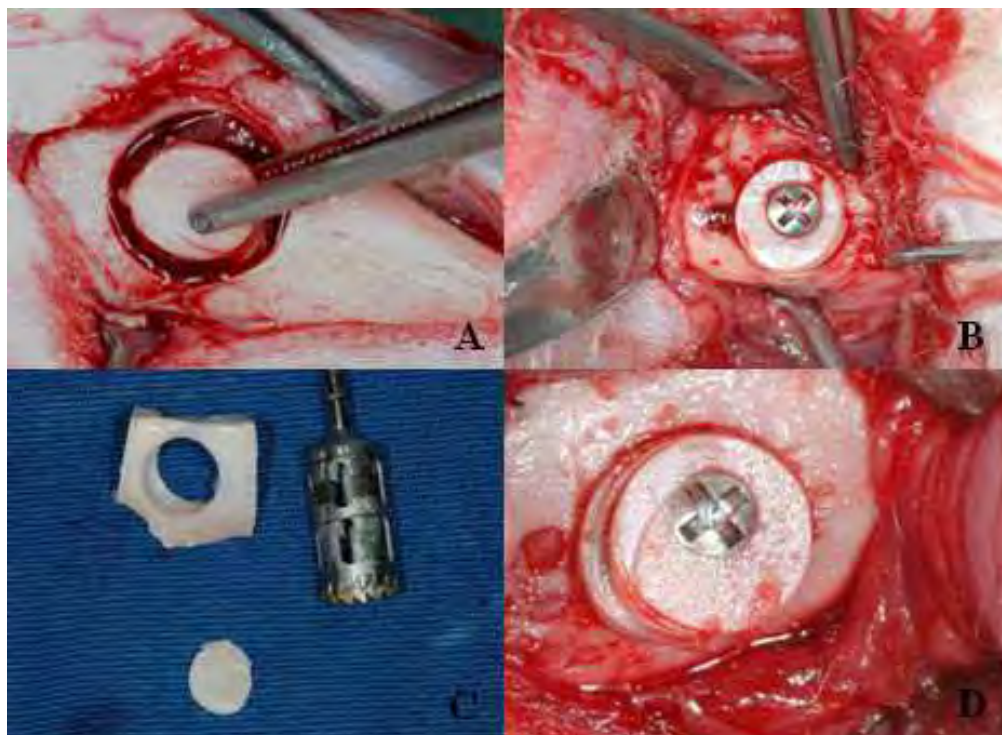


Figura 1. Ilustração da fase cirúrgica.

- A) Remoção do enxerto ósseo autógeno da tíbia;
- B) Fixação do enxerto autógeno na região de ângulo mandibular esquerdo;
- C) Preparo do osso alógeno congelado;
- D) Fixação do osso alógeno congelado na região de ângulo mandibular direito.

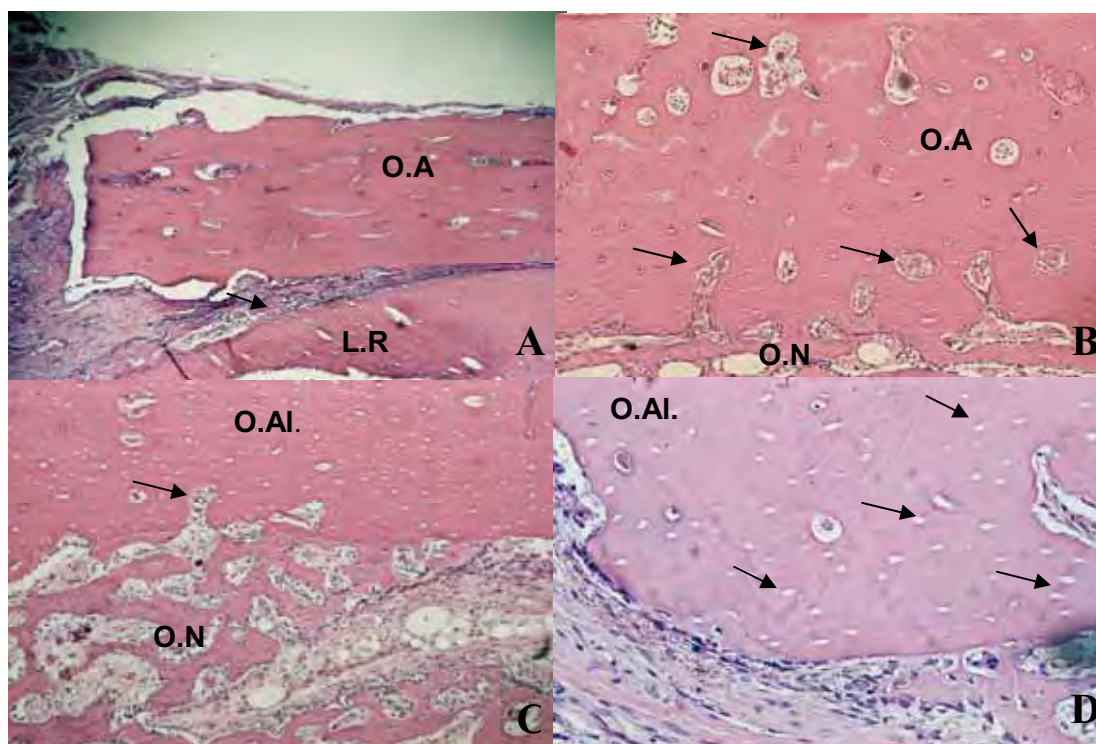


Figura 2. Ilustração da análise histológica – 15 dias.

- A) Grupo osso autógeno 15 dias – HE 48X. Osso autógeno (O.A) posicionado sobre o leito receptor (L.R.). Trabéculas ósseas neoformadas na interface em meio a tecido conjuntivo (seta);
- B) Grupo osso autógeno 15 dias – HE 63X. Grande quantidade de vasos neoformados dispersos pelo bloco de enxerto e canais de nutrição invadindo o enxerto a partir do leito receptor (setas). Na interface, osso neoformado (O.N.);
- C) Grupo osso alógeno congelado 15 dias – HE 63X. Bloco de osso alógeno congelado (O.AL.) em contato com o leito receptor, exibindo poucas regiões de revascularização (seta). Na interface observam-se regiões de osso neoformado (O.N.);
- D) Grupo osso alógeno congelado 15 dias – HE 160X. Bloco de osso alógeno (O.AL.) exibindo regiões pouco vascularizadas e sem viabilidade celular (setas).

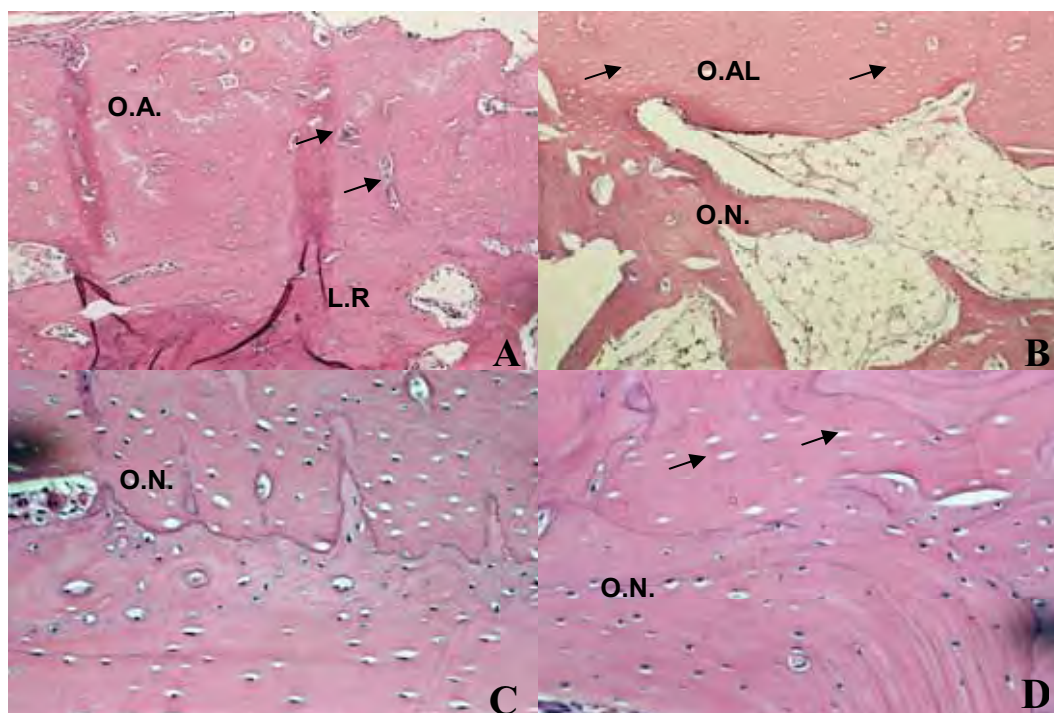


Figura 3. Ilustração da análise histológica – 45 e 120 dias.

- A) Grupo osso autógeno 45 dias – HE 63X. Bloco de enxerto autógeno (O.A) bem vascularizado (setas) e incorporado ao leito receptor (L.R.);
- B) Grupo osso alógeno congelado 45 dias – HE 63X. Bloco de osso alógeno congelado (O.AL) pouco vascularizado e osteócitos sem viabilidade (setas);
- C) Grupo osso autógeno 120 dias – HE 160X. Bloco de enxerto autógeno exibindo osso neoformado (O.N), vascularizado e incorporado.
- D) Grupo osso alógeno congelado 120 dias – HE 160X. Tecido ósseo neoformado junto ao leito receptor (O.N) e regiões de lacunas de osteócitos sem vitalidade (setas);

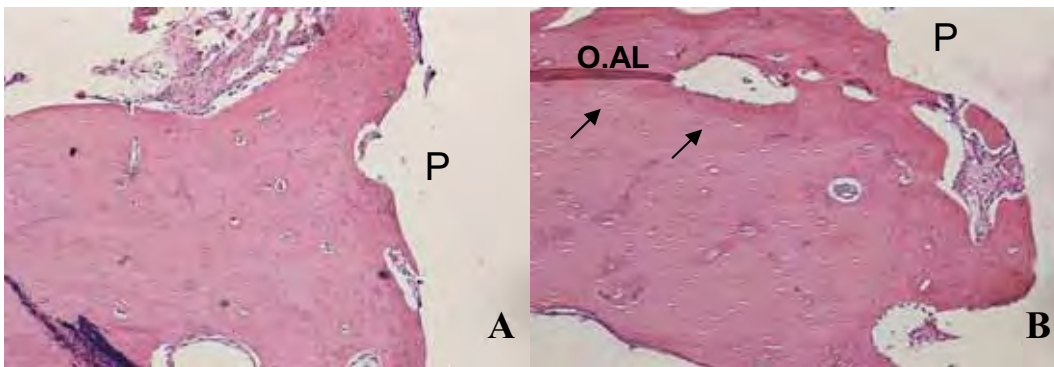


Figura 4. Ilustração da análise histológica – 180 dias.

- A) Grupo osso autógeno 180 dias – HE 63X. Observa-se o tecido ósseo junto ao parafuso de fixação (P) totalmente remodelado, revascularizado e com viabilidade celular;
- B) Grupo osso alógeno congelado 180 dias – HE 63X. Osso alógeno congelado (O.AL.) exibindo extensas regiões de osteócitos sem viabilidade (setas).

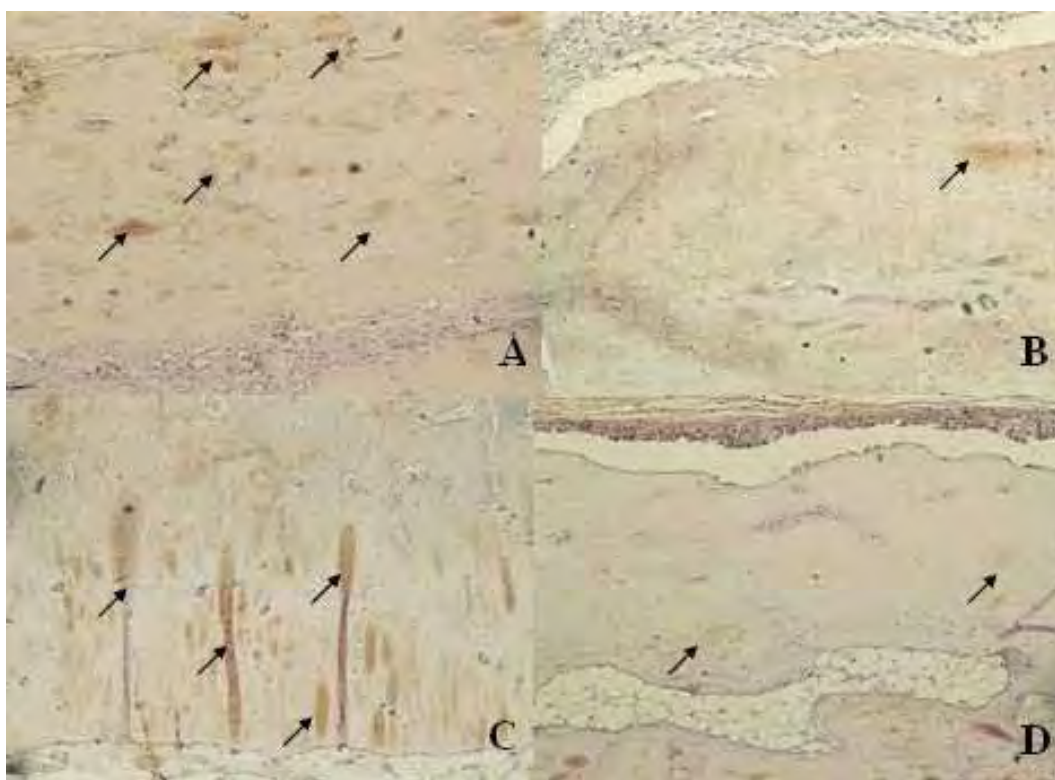


Figura 5. Ilustração da análise imunoistoquímica – 15 e 45 dias – OC.

- A) Grupo osso autógeno – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica superpositiva para a OC (setas);
- B) Grupo osso alógeno congelado – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica pouco positiva para OC (seta);
- C) Grupo osso autógeno – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica superpositiva para OC (setas);
- D) Grupo osso alógeno congelado – 45 dias. Marcação imunoistoquímica pouco positiva para OC (setas).

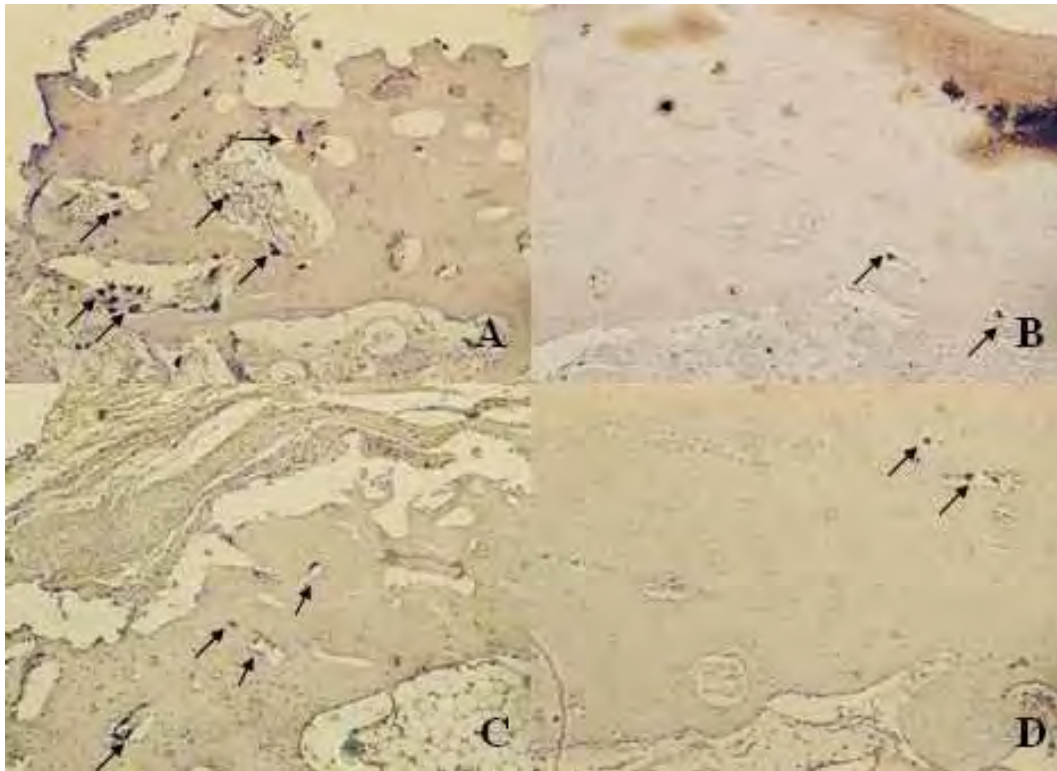


Figura 6. Ilustração da análise imunoistoquímica 15 e 45 dias – TRAP.

- A) Grupo osso autógeno – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Grande número de osteoclastos marcados (setas);
- B) Grupo osso alógeno congelado – 15 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Poucos osteoclastos marcados (setas);
- C) Grupo osso autógeno – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Evidência de osteoclastos marcados (setas);
- D) Grupo osso alógeno congelado – 45 dias 63X. Marcação imunoistoquímica para a TRAP. Pouca evidência de osteoclastos marcados (setas)

Tabelas

Tabelas

Tabela 1. Índices percentuais da formação óssea trabecular na interface leito receptor/enxerto ósseo. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,416$).

| Animais | Osso Autógeno | Osso Alógeno |
|----------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 42,87% | 48,12% |
| 2 | 43,54% | 29,29% |
| 3 | 36,74% | 40,07% |
| 4 | 38,09% | 38,61% |
| 5 | 46,41% | 36,27% |
| Média | 41,53±4,013 | 38,47±6,797 |

Tabela 2. Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para OC – período de 15 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,1763$).

| Animais | Osso Autógeno | Osso Alógeno |
|----------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | ++ (60%) | ++ (60%) |
| 2 | ++ (60%) | + (20%) |
| 3 | + (20%) | + (20%) |
| 4 | +++ (90%) | ++ (60%) |
| 5 | ++ (60%) | + (20%) |
| Média | 2±0,55 ou 58±25 | 1,6±0,71 ou 36±22 |

Tabela 3. Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para OC – período de 45 dias. Houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,003$).

| Animais | Osso Autógeno | Osso Alógeno |
|----------------|----------------------|---------------------|
| 1 | +++ (90%) | ++ (60%) |
| 2 | ++ (60%) | + (20%) |
| 3 | +++ (90%) | + (20%) |
| 4 | +++ (90%) | + (20%) |
| 5 | +++ (90%) | + (20%) |
| Média | 84±13,42 | 28±17,89 |

Tabela 4. Valores obtidos em marcação imunoistoquímica para TRAP – período de 15 dias. Houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0004$)

| Animais | Osso Autógeno | Osso Alógeno |
|----------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 34 | 12 |
| 2 | 36 | 11 |
| 3 | 38 | 13 |
| 4 | 25 | 6 |
| 5 | 25 | 10 |
| Média | 31,6±6,19 | 10,4±2,7 |

Tabela 5. Valores obtidos em marcação imunohistoquímica para TRAP – período de 45 dias. Houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,0285$)

| Animais | Osso Autógeno | Osso Alógeno |
|----------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 10 | 5 |
| 2 | 9 | 4 |
| 3 | 5 | 4 |
| 4 | 8 | 7 |
| 5 | 8 | 5 |
| Média | 8\pm1,87 | 5\pm1,23 |

Anexos

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética
em Experimentação Animal
(CEEA).

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

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS HOMÓGENOS EM BLOCO E EM PARTÍCULAS. ANÁLISE HISTOMÉTRICA E IMUNOHISTOQUÍMICA EM COELHOS" sob responsabilidade de OSVALDO MAGRO FILHO, ELEONOR ÁLVARO GARBIN JÚNIOR e IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 13 de setembro de 2005, de acordo com o protocolo nº 83/05.

Araçatuba, 13 de setembro de 2005.


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

Anexo B – Normas para publicação

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

Author Guidelines

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:
www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. *No paper version is required.*

Acceptable material.

Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant field are invited.

Number of authors.

Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts.

Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted

manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines.

Manuscripts that are not prepared according to these guidelines will be returned to the author before review.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47).
See www.icmje.org.
- **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
- **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- **Abstract/key words.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.

- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
- **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.
- **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.

- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.*

Black & white—Submit three sets of high-quality glossy prints. Should the quality prove inadequate, negatives will be requested as well. Photographs should be unmounted and untrimmed.

Radiographs—Submit the original radiograph as well as two sets of prints.

Color—Color is used at the discretion of the publisher. No charge is made for such illustrations. Original slides (35-mm transparencies) must be submitted, plus two sets of prints made from them. When a series of clinical images is submitted, tonal values must be uniform. When instruments and appliances are photographed, a neutral background is best.

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

Electronic Files—May be accepted if original figures (as specified above) are unavailable. Resolution must be at least 300 dpi; files saved in .tiff or .eps format are preferred.

Legends—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (published in issues 1 and 4 and accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634)

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

Anexo C – Ilustração da fase cirúrgica

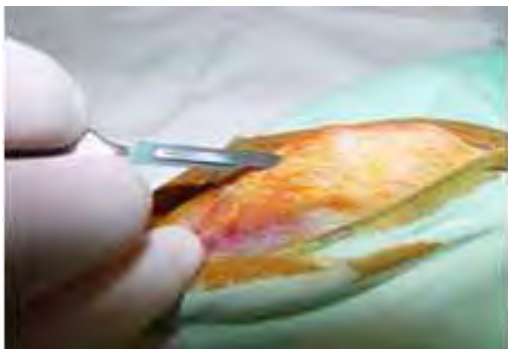


Figura 7. Abordagem para remoção do osso alógeno do animal doador.



Figura 8. Tíbia exposta para remoção.



Figura 9. Tíbia removida.



Figura 10. Acondicionamento do osso para envio ao banco de tecidos.



Figura 11. Recebimento do material na data da cirurgia dos animais receptores.



Figura 12. Forma de anéis de tíbia embalados individualmente.



Figura 13. Preparo do bloco de osso alógeno congelado



Figura 14. Acesso ao leito receptor



Figura 15. Preparo do leito receptor do osso alógeno – ângulo da mandíbula lado direito.



Figura 16. Fixação do osso alógeno com parafuso de 1.5 x 8 mm



Figura 17. Acesso a tibia direita para remoção do enxerto autógeno.



Figura 18. Remoção do enxerto autógeno com trefina de 8 mm.



Figura 19. Bloco ósseo sendo removido.



Figura 20. Adaptação e fixação do enxerto autógeno - ângulo mandibular esquerdo.

Anexo D – Ilustração da Análise Histométrica

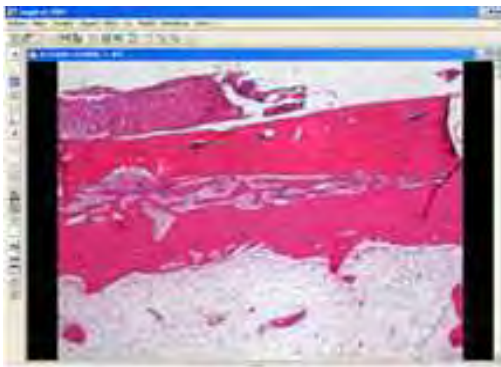


Figura 21. Programa Imagelabe 2000. Imagem da extensão total do enxerto sobre o leito receptor.

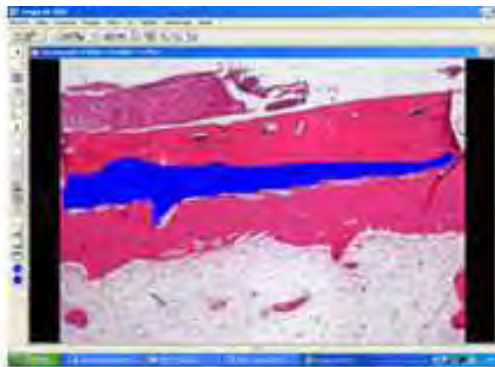


Figura 22. Seleção da extensão total da interface enxerto/leito receptor.



Figura 23. Cálculo da área total da interface enxerto/leito receptor.

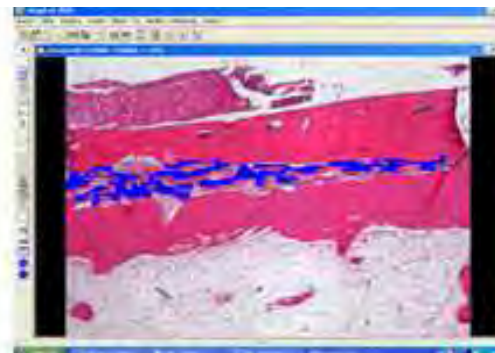


Figura 24. Demarcação das regiões de neoformação óssea na interface enxerto/leito receptor.



The image shows a screenshot of a software application window titled 'NEO' with a menu bar (Arquivo, Editar, Ferramentas, Ajuda) and a toolbar. The main area contains a spreadsheet with several sections. The top section has columns for 'Data', 'Local', 'Tipo de Lesão', 'Gravidade', 'Evolução', 'Tratamento', and 'Resultado'. Below this is a larger table with columns for 'Data', 'Local', 'Tipo de Lesão', 'Gravidade', 'Evolução', 'Tratamento', 'Resultado', 'Área de Neoformação Óssea', and 'Área de Resorção Óssea'. The data is organized into rows, with some cells highlighted in yellow. The bottom section of the spreadsheet contains a summary table with columns for 'Data', 'Local', 'Tipo de Lesão', 'Gravidade', 'Evolução', 'Tratamento', 'Resultado', 'Área de Neoformação Óssea', and 'Área de Resorção Óssea'. The interface also shows a Windows taskbar at the bottom with the system clock set to 12:00.

Figura 25. Cálculo da área de neoformação óssea na interface.

Anexo E-Gráficos

Gráfico 1. Representação gráfica da % de ocorrências de médias percentuais da formação óssea na interface leito receptor/enxerto, para os grupos osso autógeno e osso alógeno congelado, no período de 15 dias.

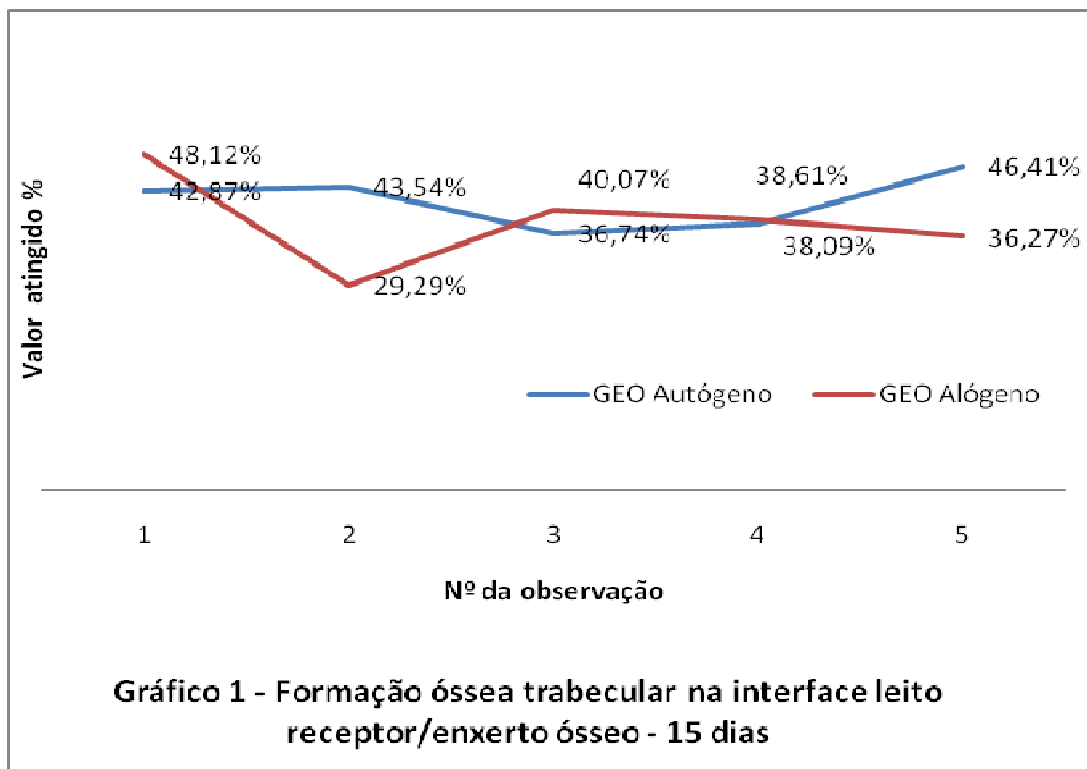


Gráfico 2. Representação gráfica da porcentagem de ocorrências de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 15 dias para os grupos experimentais osso autógeno e osso alógeno congelado, relativos a proteína OC.

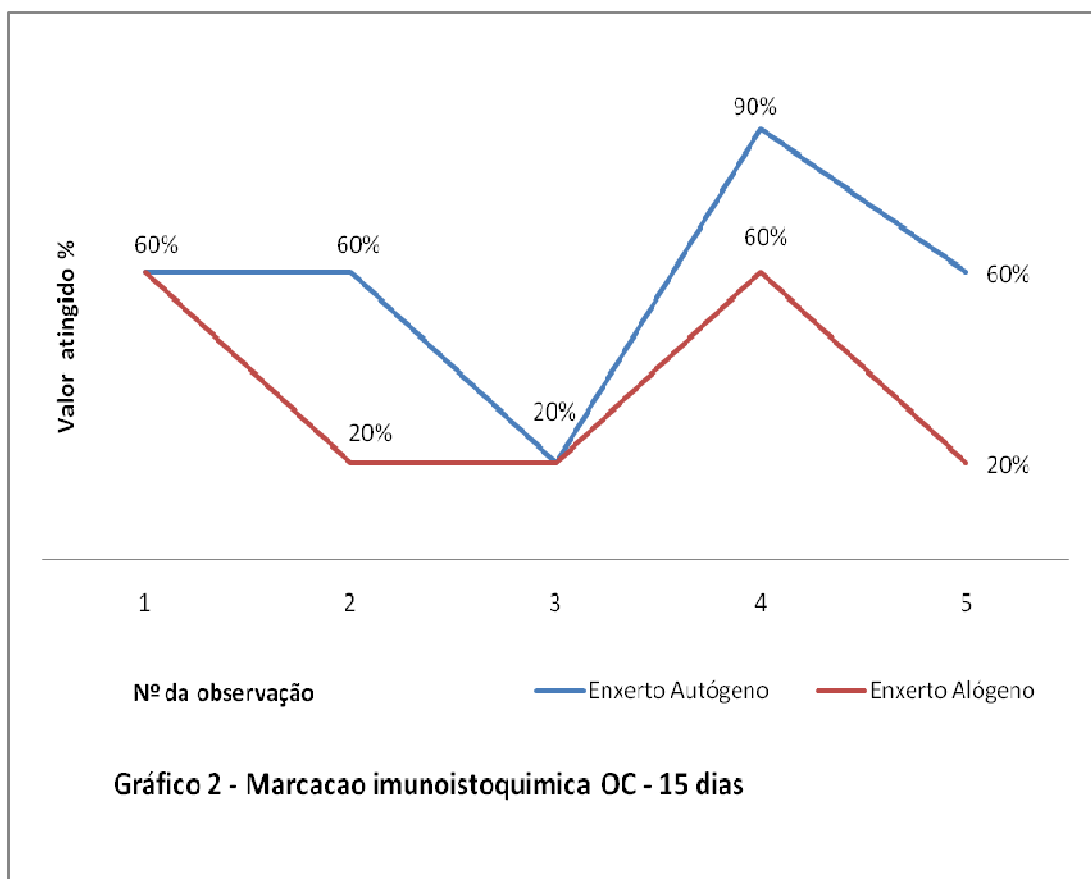


Gráfico 3. Representação gráfica da porcentagem de ocorrências de médias percentuais de imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 45 dias para os grupos experimentais osso autógeno e osso alógeno congelado, relativos a proteína OC.

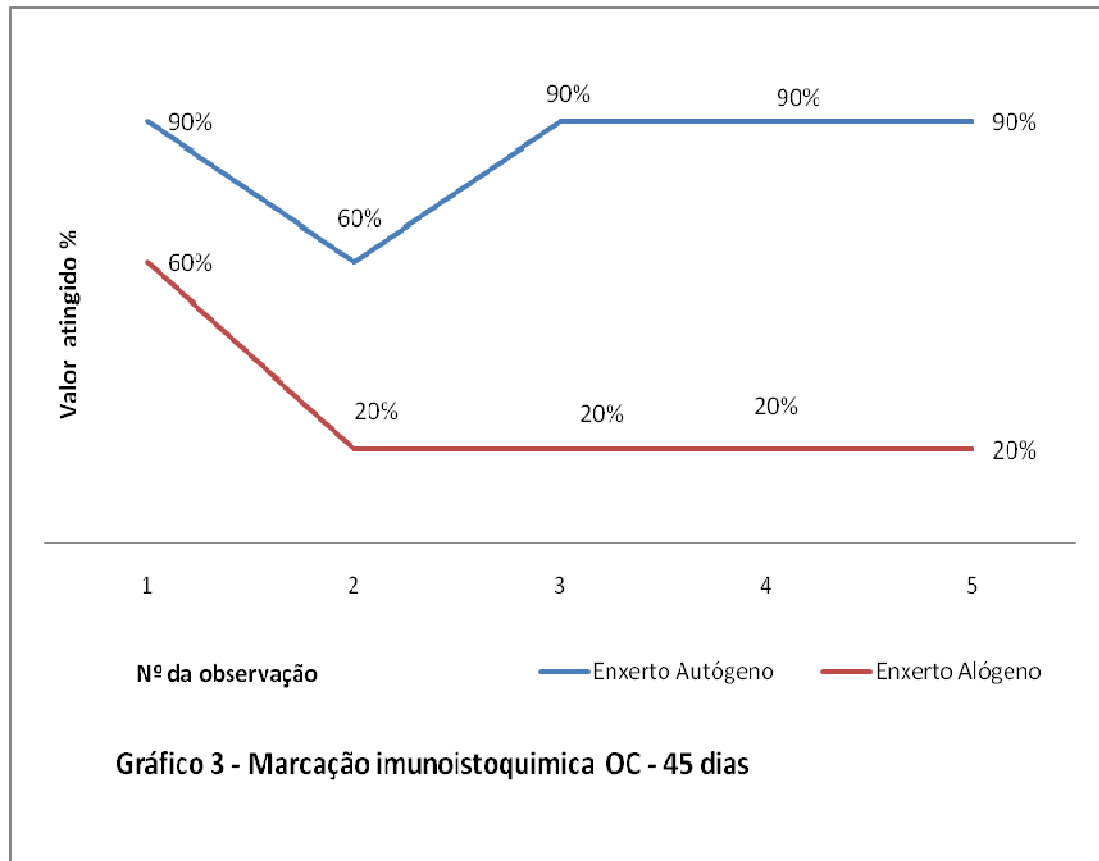


Gráfico 4. Representação gráfica de valores obtidos em imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 15 dias para os grupos osso autógeno e osso alógeno congelado, relativos a enzima TRAP.

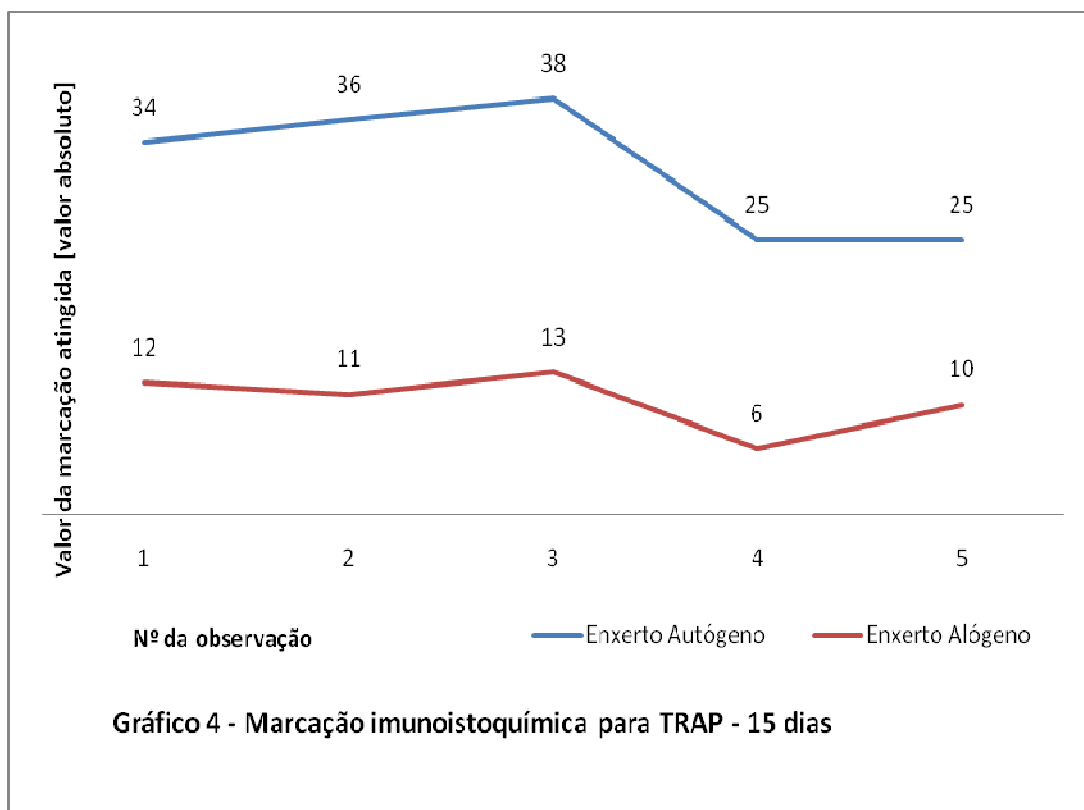
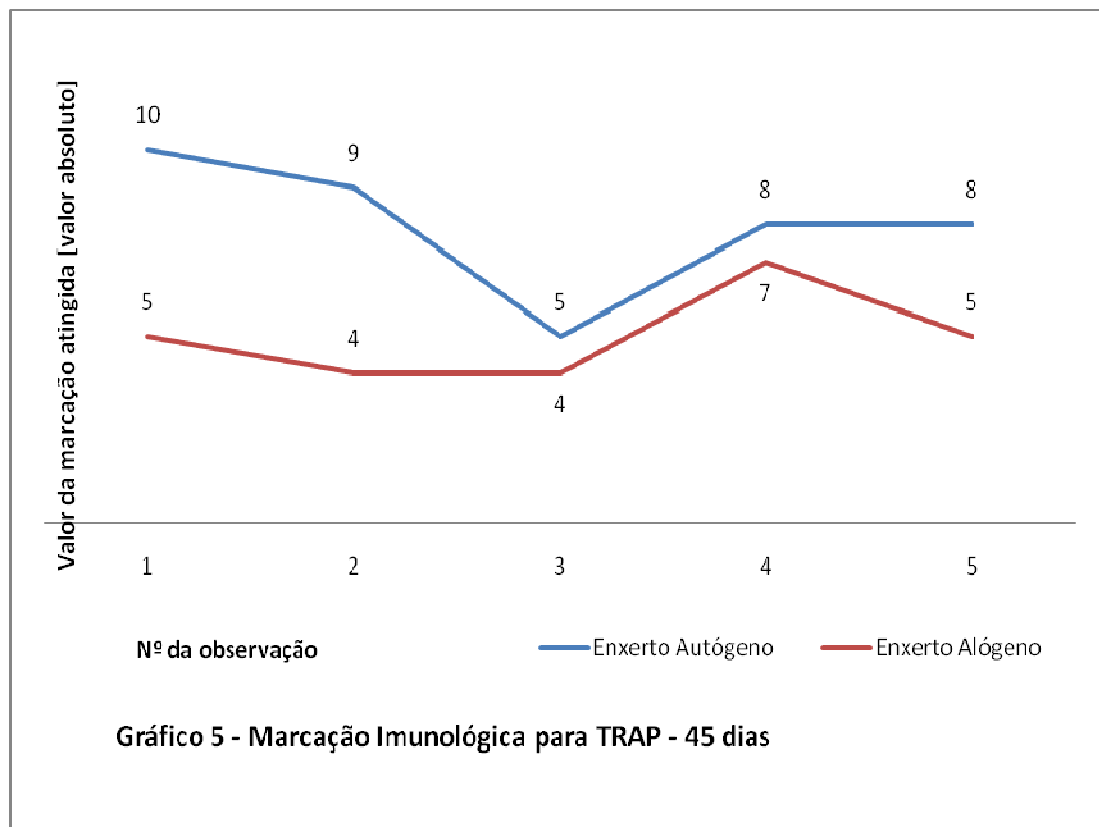


Gráfico 5. Representação gráfica de valores obtidos em imunomarcações celulares de acordo com o período de avaliação de 45 dias para os grupos osso autógeno e osso alógeno congelado, relativos a enzima TRAP.



Autorizo a reprodução deste trabalho, para fins acadêmicos,
desde que respeitado os direitos autorais.
Araçatuba, Agosto de 2008.

Eleonor Álvaro Garbin Junior