

Rodolpho Valentini Neto

Avaliação do cimento de fosfato-carbonato de cálcio no reparo ósseo de defeitos não-críticos em tíbia de rato. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

**ARAÇATUBA-SP
2009**

Rodolpho Valentini Neto

Avaliação do cimento de fosfato-carbonato de cálcio no reparo ósseo de defeitos não-críticos em tibia de rato. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

Programa de Pós-graduação em Odontologia, nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

Mestrando: Rodolpho Valentini Neto

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

ARAÇATUBA-SP
2009

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

V161a Valentini Neto, Rodolpho
 Avaliação do cimento de fosfato-carbonato de cálcio no reparo
ósseo de defeitos não-críticos em tibia de rato: análise histológica,
histométrica e imunoistoquímica/Rodolpho Valentini Neto.
-- Araçatuba: [s.n.], 2009.
 53 f. : il. + CD ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira

1. Cimentos para ossos. 2. Carbonato de cálcio. 3. Substitutos
ósseos. 4. Regeneração óssea

Black D72
CDD 617.6

Dedicatória

Aos meus pais, Rodolpho e Inês,

pela vida, amor, confiança, força e educação humanista. Em todos os momentos de dificuldade, que não foram poucos, a lembrança dos dois me deu ânimo para continuar buscando meus sonhos. Obrigado.

Aos meus irmãos, Janaina, Pablo e Pedro,

pelo companheirismo e exemplo de perseverança e determinação.

À Marina,

pelo amor dedicado, paciência e compreensão. Por me ensinar a cuidar e amar.

Obrigado, amor meu! Só enquanto eu respirar...

Agradecimentos Especiais

Ao Dr. Daisaku Ikeda,

filósofo e presidente da Soka Gakkai Internacional, associação humanista preservadora dos valores do Budismo de Nitiren Daishonin, e franco incentivador da paz, cultura e educação no mundo todo. Obrigado aos associados da Brasil - Soka Gakkai Internacional, por me permitirem partilhar desta escola humanista.

Aos familiares,

Vó Niná, tia Ana, tia Rosa, tia Concita e toda família do Rio de Janeiro.

Vó Nilce, tio Reinaldo, tia Fátima e toda família de São Paulo e Paraná.

Aos meus familiares de coração, tia Isa, Carol, Jacqueline, Débora, Sonja, Beth, Sandra e respectivas famílias.

Mesmo à distância, sempre senti o carinho de todos.

Ao prof. Walter Leal de Moura,

amigo e professor que me adotou intelectualmente desde a faculdade e me fez acreditar que poderia chegar longe. Sua obstinação sempre me foi inspiradora.

Ao prof. Eduardo Hochuli,

pela orientação compreensiva e paciente. Obrigado pelos ensinamentos e pela confiança depositada!

Ao prof. Idelmo,

líder como poucos, que une benevolência à rigurosidade. Exemplo de profissional e professor que, apesar de atarefado, sempre se demonstrou solícito, acessível e disposto.

Ao prof. Osvaldo,

por toda amizade e confiança. Pessoa rara, que exerce magnetismo por sua simpatia e humanismo no trato com todos.

Ao prof. Wilson Poi,

pela educação humanística transmitida em todos os ensinamentos, em todos os temas. Professor apaixonado, educador, mestre inspirador. Obrigado.

À profa. Roberta Okamoto,

professora dedicada e abnegada, que pacientemente deu suporte a mim e a este trabalho.

À Cleide,

que nos recebe vindos de longe, mesmo sem nunca ter nos visto, como uma mãe alegre pelo retorno dos filhos. Obrigado por tudo!

Ao Abrahão,

Irmão que só descobri em Araçatuba. Amigo paciente. Agradeço por tê-lo como companheiro para dividir os fardos e as alegrias vividos nesta jornada. Exemplo pessoal e profissional a ser seguido. Obrigado de coração!

À Thallita e Jéssica,

por serem pessoas iluminadas e profissionais incansáveis. Devo muito às duas. Abnegada e carinhosamente, acolheram-me neste universo de pesquisa, ensino e companheirismo. Muito obrigado!

Ao Marcos Guskuma,

pela paciência e presteza sempre demonstradas com este “retirante”. No princípio desta jornada, abrigou-me gentilmente em sua casa. Pessoa sábia e benevolente, exemplo de espírito elevado! Muito Obrigado!

Ao Walter Betoni,

pelo apoio e amizade honesta e generosa. Profissional desprendido de vaidades e rico em realizações e aspirações. Obrigado.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP,

Pela contribuição direta na minha formação profissional, através de sua estrutura física, laboratórios, clínicas, salas de aula e centros cirúrgicos experimentais nas áreas de ensino, pesquisa e extensão; e pela contribuição na formação pessoal, através de seu material humano valoroso.

Aos amigos de Pós-Graduação Flávia e Albanir,

pela paciência e orientação na minha chegada e pelo apoio nos plantões e nas pesquisas.

Aos amigos Doutorandos

Leandro, Carol, Thaís, Paulo Almeida, Paulo Faria, Francisley, Nicolás, Martha, Amílcar, Érika, Lucas, Eloá, Karina e Michel Messoria, pelos momentos de trabalho e amizade.

Aos amigos do Mestrado,

Pedro, Cassiano, Fernando, Jônatas, Walter e Heloisa, pelos plantões divididos e pela convivência fraterna.

Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,

Dirce, Bernadete, Gilmar, Paulo, Antonia, pelo profissionalismo e competência, mas principalmente pelo carinho e amizade. Obrigado!

Aos professores da Cirurgia,

Alessandra, Cristiane e Michel, que auspiciosamente contribuem para a formação de todos, como profissionais e seres humanos.

Aos estagiários da Cirurgia,

Pâmela, Igor e todos os demais que compartilharam a convivência maravilhosa que podemos desfrutar na CTBMF da FOA/UNESP.

Aos funcionários da Pós-graduação,

Diogo, Marina e Valéria, pela ajuda e paciência! Obrigado!

Epígrafe

“... embora tenha ensinado dia e noite a meus discípulos, todos, criando a dúvida, abandonaram a fé. O que é costumeiro no tolo é esquecer nas horas cruciais, o que prometera nas horas normais...”

Buda Nitiren Daishonin

VALENTINI NETO, R. **Avaliação do cimento de fosfato-carbonato de cálcio no reparo ósseo de defeitos não-críticos em tibia de rato. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.** [Dissertação] – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, 2009.

Resumo

Proposição: Este estudo teve como objetivo avaliar, através de estudo microscópico por análises histológica, histométrica e imunoistoquímica, o comportamento ósseo frente à presença de cimento de fosfato-carbonato de cálcio em defeitos experimentais.

Materiais e Método: Foram confeccionados defeitos não-críticos em tíbias de 30 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), em dois grupos, Controle e Tratado. As lâminas foram obtidas nos períodos de 10, 20 e 30 dias pós-operatórios e as imagens teciduais foram analisadas qualitativa e quantitativamente.

Resultados: Não houve diferença estatística na área de neoformação óssea entre os grupos controle e tratado ($P=0,258$) e entre a expressão de RANK-L e OPG ($P=0,589$). Observou-se também áreas mínimas de invasão de tecido conjuntivo e perióstio com presença tardia do cimento em áreas distintas do defeito.

Conclusão: De acordo com a metodologia aplicada, foi possível concluir que o uso de cimento de fosfato-carbonato de cálcio não alterou significativamente o processo de regeneração óssea em tíbias de rato.

Palavras-chave: Cimentos para ossos. Carbonato de cálcio. Substitutos ósseos. Regeneração óssea.

VALENTINI NETO, R. **Evaluation of calcium phosphate-carbonate cement in bone repair of non-critical defects in tibia of rat. Histologic and histometric analysis.** [Dissertation] - University of Dentistry, UNESP - São Paulo State University, Araçatuba, 2009.

Abstract

Proposition: This study had as objective evaluates, through histological, histometric and imuno-histochemical microscopic analysis, the bone behavior face to the presence of calcium phosphate-carbonate cement in experimental defects.

Materials and Method: Non-critical defects were made in tibias of 30 adult male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), in two groups, Control and Treated. The slices were obtained in the periods of 10, 20 and 30 postoperative days. The snapped images were quantitative and qualitative analyzed.

Results: There was not statistics difference in the bone formation area (AO) between the groups control and treated ($P=0,258$) and between RANK-L and OPG expressions ($P=0,589$). It was also observed minimal areas of invasion of conjunctive tissue and periosteum with presence of the cement in areas different of the defect.

Conclusion: In agreement with the applied methodology, it was possible to conclude that the use of calcium phosphate-carbonate cement didn't alter significantly the process of bone repair in rat tibias.

Key words: Bone cement. Calcium carbonate. Bone substitutes. Bone regeneration.

Lista de Figuras

Figura 1 – Cimento de fosfato-carbonato de cálcio utilizado no grupo tratado.

Figura 2 – Aspecto do acesso à tíbia.

Figura 3 – Imagem processada para formato 8-bit color, grupo controle, 10 dias, 2,5x.

Figura 4 – Grupo controle, 10 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 5 – Grupo controle, 10 dias, HE, 160x

Figura 6 – Grupo tratado, 10 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 7 – Grupo tratado, 10 dias, HE, 160x

Figura 8 – Grupo controle, 20 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 9 – Grupo controle, 20 dias, HE, 160x

Figura 10 – Grupo tratado, 20 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 11 – Grupo tratado, 20 dias, HE, 160x

Figura 12 – Grupo controle, 30 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 13 – Grupo controle, 30 dias, HE, 160x

Figura 14 – Grupo tratado, 30 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

Figura 15 – Grupo tratado, 30 dias, HE, 160x

Figura 16 – Gráfico representando o percentual de área de osso no defeito, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos.

Figura 17 – Grupo tratado, 20 dias, biomaterial em áreas adjacentes ao defeito (setas) e osteogênese, HE, 2,5x

Figura 18 – Gráfico representando a variação da média dos escores para OPG, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

Figura 19 – Gráfico representando a variação da média dos escores para RANK-L, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

Figura 20 – Composição demonstrando imunomarcagem de OPG nos grupos controle e tratado, em todos os períodos, DAB com contra-coloração por hematoxilina de Harris, 160x

Figura 21 – Composição demonstrando imunomarcagem de RANK-L nos grupos controle e tratado, em todos os períodos, DAB com contra-coloração por hematoxilina de Harris, 160x

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela representando o percentual de área de osso no defeito, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos.

Tabela 2 – Tabela representando o método de quantificação através de escores da expressão qualitativa de OPG e RANK-L.

Tabela 2 – Tabela representando a média dos escores de expressão encontrados para OPG e RANK-L, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos.

Lista de Abreviaturas

AO – Área de Osso

cm – centímetros

FDA – Food and Drug Administration/USA

g – grama

HE – Hematoxilina e eosina

mg – miligrama

mg/kg – miligramas por quilo

ml – mililitros

OPG – Osteoprotegerina

RANK-L – Proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear kB

µm – micrômetro

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo “Júlio Mesquita Filho”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODO	19
4 RESULTADO	25
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	31

REFERÊNCIAS

FIGURAS

TABELAS

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA

1 Introdução *

Patologias como deformidades dento-faciais congênitas, neoplasias e injúrias por trauma, quando tratadas cirurgicamente, podem resultar em defeitos ósseos que culminarão em déficits funcionais e estéticos. A correção destes defeitos consiste na restauração das estruturas perdidas, podendo ser substituídas por implantes dos mais variados materiais aloplásticos ou enxertia de ossos. Sem dúvida, o uso de enxerto autógeno é considerado a melhor alternativa para correção destes defeitos. No entanto sua utilização está associada a significantes desvantagens, incluindo morbidade no sítio doador, perda sanguínea, imprevisibilidade na reabsorção e aumento do tempo operatório^{1,2}, além de disponibilidade limitada em casos de grandes reconstruções³⁻⁵. Devido a estas desvantagens, grande parte das pesquisas recentes tem empreendido tempo em desenvolver materiais aloplásticos capazes de substituir osso em reconstruções crânio-faciais, suplantando as limitações dos enxertos autógenos, por permitirem quantidade ilimitada de material disponível, facilidade no preparo e uso, e diminuição potencial de morbidade em um segundo sítio cirúrgico¹.

Os compostos de apatita geralmente utilizados em reconstruções são altamente cristalinos e biologicamente inertes, resultando em limitações na capacidade de serem substituídos por osso nativo. A partir do final da década de noventa, estudos demonstraram que uma nova forma de cimento de fosfato-carbonato de cálcio (NORIAN CRS; Synthes Maxillofacial, USA), poderia ser satisfatória no uso em defeitos craniofaciais. O fosfato de cálcio possui propriedades que o transformam em um substituto ósseo de interesse para reconstrução, como

* Normas da revista Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Anexo B).

osteocondutividade, reabsorbilidade e resistência mecânica^{2,6}. Para otimizar a regeneração óssea, principalmente em grandes defeitos ou em casos de fraturas ósseas, é importante a presença de um material que seja reabsorvível e que promova reparação⁷.

Os cimentos de fosfato de cálcio são a segunda geração de substitutos ósseos de hidroxiapatita. Há nos Estados Unidos pelo menos quatro cimentos de fosfato de cálcio aprovados pelo FDA para uso clínico⁸ e, mais recentemente, o cimento de fosfato monocálcico, quimicamente mais estável, Norian Craniofacial Repair System monocalcium phosphate bone cement (Synthes Maxillofacial, West Chester, Pa.), têm sido usado para reparo cirúrgico de defeitos ósseos⁹⁻¹².

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura demonstrando as propriedades dos cimentos de fosfato-carbonato de cálcio realiza uma variedade de testes biomecânicos e físicos^{13,14}, porém não inclui análises moleculares e celulares da resposta tecidual esclarecedoras. O uso da imunomarcagem destas proteínas moduladoras da biologia óssea para nos indicar a tendência das respostas biológicas e celulares na presença do cimento de fosfato-carbonato de cálcio, comparados à reparação tecidual sem a presença do mesmo, elucidando o comportamento tecidual frente ao trauma e a presença do referido material, foi o objetivo maior deste trabalho, buscando colaborar com a comunidade científica atuante neste campo.

2 Proposição

A proposta deste estudo foi avaliar a regeneração óssea de defeitos criados cirurgicamente em tíbias de ratos preenchidos com cimento de fosfato-carbonato de cálcio, através de análises histológica, histométrica e imunoistoquímica.

3 Material e Método

Para o presente estudo foram utilizados 30 ratos machos brancos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), adultos e peso corporal de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas com dieta padrão de ração sólida e água *ad libitum*, em condições de temperatura ambiente, no Biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Esse estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Anexo A).

Em cada animal, foram confeccionados dois defeitos ósseos, com diâmetro de broca tronco-cônica carbide cirúrgica no. 703 (2,1mm), até o rompimento completo da cortical óssea, sendo um defeito em cada face medial das tíbias, que constituíram dois grupos experimentais:

Grupo Controle – Na tíbia direita, foi confeccionado o defeito, como descrito anteriormente, sendo preenchido apenas por coágulo local.

Grupo Tratado – Na tíbia esquerda, confeccionado o defeito, procedeu-se o preenchimento com cimento de fosfato-carbonato de cálcio NORIAN CRS (Synthes Maxillofacial, USA)(FIGURA 1), manipulado e preparado rigorosamente conforme as instruções do fabricante. Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e receberam anestesia geral pela combinação de 70mg/kg de Ketamina intramuscular (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo,

Brasil) e 6,5mg/Kg de cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer SA – Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental a ser utilizado, delimitação da área a ser operada por campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis.

Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Após a sedação dos animais, foi realizada tricotomia das porções mediais das tíbias e anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), sucedido por Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico 10% (Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Foi realizada uma incisão com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha), de aproximadamente 3 cm de comprimento, na porção medial da tíbia, e, a seguir, os tecidos moles foram divulsionados e afastados com o auxílio de descoladores de perióstio, expondo o osso para confecção do defeito (Figura 2).

No defeito correspondente ao grupo controle, foi aguardado o preenchimento apenas com coágulo sanguíneo. O defeito correspondente ao grupo tratado foi preenchido com o cimento de fosfato-carbonato de cálcio. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio mononylon 5-0 (Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com pontos interrompidos no plano epitelial. Após a sutura foi realizada nova anti-sepsia

da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico 10% (Riodeine tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico® (Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas durante todo o experimento.

Sacrifício e coleta do material

Os animais foram sacrificados com uma dose três vezes maior que a dose para ação anestésica (0,25mg/kg) de Tiopental sódico (Laboratório Abbott do Brasil Ltda) administrada por via intramuscular, nos períodos pós-operatórios de 10, 20 e 30 dias, com 5 animais em cada período experimental correspondente para os grupos Controle e Tratado. As tíbias foram removidas e o tecido mole excedente eliminado.

Processamento Laboratorial

As peças foram fixadas em solução de formol tamponado 10% durante 48 horas, à temperatura ambiente. Passado este período, as peças foram descalcificadas em ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 18% por aproximadamente 60 dias, à temperatura ambiente, com trocas semanais da solução. Após a descalcificação completa das peças, estas foram lavadas em água corrente por 24 horas e passaram pelas etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, para posterior obtenção dos cortes com 5µm de espessura, realizados em micrótomo. Os cortes, longitudinais e abrangendo toda a extensão do defeito, foram montados nas lâminas utilizando-se solução de albumina.

Parte dos cortes obtidos foi corada por hematoxilina e eosina, para realização

das análises histológica e histométrica do tecido ósseo formado ou não na região do defeito e outra parte foi submetida ao método de detecção pela imunoperoxidase.

O processamento imunistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunistoquímica em Tecido Ósseo do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, financiado pela FAPESP (processo 04/07562-5).

As reações imunistoquímicas foram realizadas com o objetivo de detectar a presença de osteoprotegerina (OPG) e da proteína ligante do receptor ativador fator nuclear kB (RANK-L), proteínas que sinalizam as respostas de reabsorção e neoformação óssea nas células do tecido ósseo.

Após o preparo do tecido através do bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas, foram realizadas as incubações dos anticorpos primários, tomando-se o cuidado para realizar a incubação de um anticorpo específico por lâmina histológica. Os anticorpos primários utilizados foram anticorpos policlonais produzidos em cabras e contra as proteínas Osteoprotegerina (SC 21038) e RANK L(SC 7626) ambos os anticorpos primários são de fabricação de Santa Cruz Biotechnology.

O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anticabras, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). O sinal das reações foi amplificado, utilizando-se o kit Streptavidina-Biotina (DAKO), e a revelação das reações foi realizada através da Diaminobenzidina (DAKO) como cromógeno. A revelação pela diaminobenzidina foi bloqueada em água destilada; os cortes receberam contra coloração por hematoxilina de Harris, e foram desidratados e imersos em xilol para montagem das lamínulas com Permount.

As células positivas para seus respectivos anticorpos foram coradas em

marrom (diaminobenzidina). A porcentagem de células positivas para as proteínas analisadas foi avaliada através da contagem manual das células marcadas em áreas previamente determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e foram estabelecidos escores.

Para a realização das mensurações, foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento de 10/0,25 Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação de imagem (AxioCam MRc-5 Zeiss, Alemanha) e conectado a um microcomputador Pentium IV com software analisador de imagens digitalizadas AxioLab Release 4.5 (Zeiss, Alemanha). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos TIFF e analisadas através do software de quantificação ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, USA). Através do software ImageJ, as imagens foram processadas em imagens de 8-bit color (Figura 3). As áreas de interesse foram selecionadas pela ferramenta *Wand tracing* e medidas em pixels quadrados.

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente (AO) dos bordos ao centro dos defeitos. Os dados obtidos nas análises foram transformados de valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos. Para a comparação entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney por meio do programa estatístico Sigma Stat, v 3.10 (Systat, USA).

A expressão das proteínas osteoprotegerina (OPG) e proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK-L), envolvidas na biologia óssea de remodelação¹⁵, foi quantificada através de escores semi-quantitativos (Tabela 2), sendo assumidos os valores 0 para nenhuma expressão, 1 para expressão leve, 2 para expressão moderada e 3 para expressão protéica fortemente marcada nas lâminas. As médias dos dados obtidos foram submetidas a testes estatísticos não-

paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

4 Resultado

Análise Qualitativa

Aos 10 dias Pós-operatórios

Grupo Controle: Apresentou intensa proliferação e diferenciação óssea recobrando quase toda a cavidade, permanecendo, apenas na região central, tecido conjuntivo rico em fibras colágenas e vasos sangüíneos. Esta proliferação óssea era constituída por um trabeculado delgado, com espaços medulares amplos e intensa atividade osteoblástica (Figuras 4 e 5).

Grupo Tratado: Observou-se a permanência do cimento em áreas do defeito, envolvido por nenhum tecido conjuntivo com características de reações inflamatórias. Em várias regiões, o material encontrou-se envolto por tecido ósseo imaturo. A proliferação óssea era constituída por trabeculado discretamente menos delgado quando comparado ao grupo controle, com espaços medulares amplos e intensa atividade osteoblástica (Figuras 6 e 7).

Aos 20 dias Pós-operatórios

Grupo Controle: O processo de reparo apresentou-se praticamente completo, com tecido ósseo neoformado caracterizado por cortical reorganizada em quase todas as lâminas. Amplos espaços intertrabeculares ainda são vistos (Figuras 8 e 9).

Grupo Tratado: Observou-se a permanência do cimento em áreas adjacentes ao defeito, envolvido por tecido com características de neoformação óssea periférica aos “núcleos residuais” do cimento. A proliferação óssea era constituída por um cortical mais espessa e em quantidade significativa (Figuras 10 e 11).

Aos 30 dias Pós-operatórios

Grupo Controle: O processo de reparo apresentou-se completo, com tecido ósseo neoformado e cortical remodelada (Figuras 12 e 13).

Grupo Tratado: Ainda observou-se a permanência do cimento em áreas do defeito ou adjacentes, envolvido por tecido com características de neoformação óssea periférica ao cimento remanescente. A proliferação óssea na cortical estava completa, porém mais discretamente delgada (Figuras 14 e 15).

Análise Quantitativa

Em relação à variável AO (Tabela 1), notou-se grande variação dos valores percentuais médios que (Figura 16), nos levou à utilização de procedimentos estatísticos não-paramétricos de análise dos dados. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado e não identificou diferença significativa entre as AO dos grupos, em todos os períodos ($p=0,200$). Aplicou-se também a o teste de Mann-Whitney, comparando grupo a grupo por período, que confirmou a ausência de significância estatística entre a diferença de AO nos grupos avaliados ($p=0,258$).

Análise Imunoistoquímica Semi-Quantitativa

Na análise semi-quantitativa (Tabela 2), a expressão das proteínas RANK-L e OPG (Tabela 3) foi avaliada e comparada de maneiras distintas. Dentro do grupo controle, conforme o esperado no reparo fisiológico, observou-se através do teste de Mann-Whitney, a ausência de diferença estatisticamente significante entre a expressão de OPG(FIGURA 18) e RANK-L(FIGURA 19) ($P=0,519$). No grupo

tratado, a diferença entre as expressões das duas proteínas analisadas, através do mesmo teste não-paramétrico, também não foi estatisticamente significativa ($P=0,589$). Comparando-se a expressão das proteínas OPG e RANK-L (Figuras 20 e 21), entre os grupos tratado e controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P=0,589$) utilizando-se o teste não-paramétrico de análise de variância de Kruskal-Wallis.

5 Discussão

Atualmente, há grande interesse no desenvolvimento de materiais capazes de ajudar no reparo ósseo. O desenvolvimento e popularização de tratamentos como implantes dentais endósseos aumentaram a demanda de enxertos de osso. Com o propósito de avaliar os diferentes substitutos ósseos, foram empregadas numerosas metodologias. Moghadam em 2004¹⁶ e Clokie em 2002¹⁷ avaliaram biomateriais alo gênicos e aloplásticos, inclusive cimento de fosfato de cálcio, em calvária de coelhos, usando coágulo como grupo de controle em defeitos circulares de 15 mm. Estes autores obtiveram resultados onde a porcentagem de formação de osso no grupo tratado com o biomaterial era mais baixa (17.11%). Vários estudos têm mostrado que, apesar de possuírem propriedades biológicas boas, os cimentos de fosfato de cálcio não possuem resistência física suficiente para defeitos críticos, sendo o limite de 4,5 cm², estabelecido para o cimento avaliado pela FDA¹³. Defeitos excessivamente grandes também podem conduzir para formação de tecido fibroso e neoformação insuficiente¹⁸.

No estudo presente, o preenchimento natural do defeito por coágulo sanguíneo local serviu como o grupo de controle devido à sua representação do reparo fisiológico. Os resultados obtidos, analisados estatisticamente, demonstraram não haver diferença entre a formação de osso nos grupos tratado e controle. No entanto, observando-se as lâminas do grupo tratado, percebeu-se uma discreta imaturidade do tecido ósseo neoformado, nos tempos mais avançados, conforme outros resultados⁸ descritos na literatura científica.

É sabido que o cimento progressivamente perde força e cristalinidade com o passar do tempo¹³. Juntando-se a isto, na análise imunoistoquímica, percebeu-se

um aumento na expressão de RANK-L e OPG no último período do grupo tratado (Figuras 18 e 19). Pode-se inferir, a partir destas informações, que possivelmente o organismo, neste período mais avançado, continuou a reabsorver/remodelar (osso e material) por ação osteoclástica¹⁹ e a depositar matriz calcificada, em substituição às áreas ocupadas pelo cimento. Em algumas lâminas pôde-se notar deslocamento do biomaterial para dentro do canal medular da tíbia ou até mesmo a deposição subperiosteal do material sobre a cortical (Figura 17), no entanto, houve formação de osso nestas regiões para onde o cimento se deslocou. O cimento demonstrou-se eficaz como osteocondutor e como barreira biológica para tecido conjuntivo em defeitos não-críticos, permanecendo tardiamente no sítio receptor e sendo substituído com o decorrer do tempo.

A descoberta relativamente recente do receptor ativador do fator nuclear kB (RANK) e seu ligante (RANKL) tem esclarecido o processo de diferenciação osteoclástica²⁰. O RANKL se liga ao RANK sobre a superfície das células osteoclásticas. A osteoprotegerina é um fator inibitório da osteoclastogênese, por competição ao RANK. Tanto a RANKL como a OPG atuam como reguladores positivo e negativo da osteoclastogênese, respectivamente, e acredita-se em ação reguladora concomitante na remodelação óssea²⁰⁻²². Nos resultados da análise semi-quantitativa, a expressão das proteínas RANK-L e OPG manteve-se sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, permanecendo o comportamento celular no reparo frente à presença do material sem diferença significativa do comportamento fisiológico. Confirmou-se o equilíbrio na expressão das proteínas observadas no estudo, corroborando com os achados histológicos e histométricos. Apesar de estatisticamente insignificante, percebeu-se aumento na expressão de OPG no período de 30 dias no grupo tratado (Figura 18), enquanto no mesmo

período do grupo controle, observou-se redução. Este aumento talvez seja devido à tentativa do organismo de compensar o aumento de RANK-L (Figura 19), também observado aos 30 dias do mesmo grupo.

A escolha deste modelo experimental foi realizada devido ao nível de conhecimento e manejo do mesmo, colaborando com a linha de pesquisa desta instituição. Porém, realizado o estudo, notou-se a possibilidade de o sítio escolhido – a cortical tibial – não ter sido a melhor opção. Devido à presença do canal medular relativamente vazio, com trabéculas parcas, houve deslocamento do biomaterial para o interior do mesmo. No entanto, o cimento estimulou nitidamente a formação de osso dentro da medular do osso tibial. Fica o questionamento da escolha de outros sítios, como a calvária ou mandíbula, onde a possibilidade de deslocamento do biomaterial ficaria reduzida.

Ressalta-se, porém, que estatisticamente não houve diferença na variável AO no reparo ósseo dos defeitos tratados com cimento de fosfato-carbonato de cálcio ou coágulo local e a expressão das proteínas envolvidas na remodelação óssea manteve-se equilibrada nos grupos.

6 Conclusão

Baseados nestes resultados, conclui-se que o uso de cimento de fosfato-carbonato de cálcio não alterou de forma significativa o reparo ósseo de defeitos não-críticos em tibia de rato.

REFERÊNCIAS**

1. Smartt JM-Jr, Karmacharya J, Gannon FH, Ong G, Jackson O, Bartlett SP, Poser RD, Kirschner RE. Repair of the immature and mature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate cement: Assessment of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity. *Plast Reconstr Surg* May;115(6):1642-50, 2005
2. Losee JE, Karmacharya J, Gannon FH, Slemp AE, Ong G, Hunenko O, Gorden AD, Bartlett SP, Kirschner RE. Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement: interaction with bioresorbable mesh. *J Craniofac Surg*. Jan;14(1):117-24, 2003
3. Becker W, Becker BE, Cafesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J. Periodontol.*, v.65, p.1128-1133, 1994
4. Becker W, Clokie C, Sennerby L, Urist MR, Becker BE. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. *J. Periodontol.* v.69:414-421, 1998
5. Trejo PM, Weltman R, Cafesse R. Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. *J. Periodontol* v.71: 1852-1861, 2000
6. Acarturk O, Lehmicke M, Aberman H, Toms D, Hollinger JO, Fulmer M. Bone healing response to an injectable calcium phosphate cement with enhanced radiopacity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* Jul.86(1): 56-62, 2008

** Normas da revista *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* (Anexo B).

7. Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 1(3):255-260, 2004
8. Genecov DG, Kremer M, Agarwal R, Salyer KE, Barcelo CR, Aberman HM, Opperman LA. Norian craniofacial repair system: compatibility with resorbable and nonresorbable plating materials. *Plast-Reconstr-Surg*, Nov 120(6):1487-95, 2007
9. Goodman SB, Bauer TW, Carer D et al. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment: Laboratory and initial clinical results. *Clin Orthop* 348:2, 1998
10. Mahr MA, Bartley, GB, Bite U et al. Norian craniofacial repair system bone cement for the repair of craniofacial skeletal defects. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 16:93, 2000
11. Karmacharya J, Losee JE, Gannon FH et al. Repair of the pediatric craniofacial skeleton with a calcium phosphate bone mineral substitute (Norian CRS): Analysis of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity. *Plast Surg Forum* 23:30, 2000
12. Sanchez-Sotelo J, Munuera L, Madero R. Treatment of fractures of the distal radius with a remodelable bone cement: A prospective, randomized study using Norian SRS. *J Bone Joint Surg (Br.)* 82: 856, 2000
13. Zins JE, Moreira-Gonzalez A, Parikh A, Arslan E, Bauer T, Siemionow M. Biomechanical and histologic evaluation of the Norian craniofacial repair system and Norian Craniofacial Repair System Fast Set Putty in the long-term reconstruction of full-thickness skull defects in a sheep model *Plast Reconstr Surg* May; 121(5): 271e-282e, 2008

14. Collinge C, Merk B, Lautenschlager EP. Mechanical evaluation of fracture fixation augmented with tricalcium phosphate bone cement in a porous osteoporotic cancellous bone model. *J Orthop Trauma* Feb; 21(2): 124-8), 2007
15. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* 8: 147–159, 2002
16. Moghadam HG, Sándor GKB, Holmes HHI, Clokie CML. Histomorphometric Evaluation of Bone Regeneration Using Allogeneic and Alloplastic Bone Substitutes. *J Oral Maxillofac Surg* 62:202-213, 2004
17. Clokie CM, Moghadam HG, Jackson MT et al. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 13:111, 2002
18. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, Böhner M, Frei C, Boeckel I, von Rechenberg B. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* Feb;33(1):37-44, 2005
19. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro. *J Biomed Mater Res* Dec5;37(3):346-52, 1997
20. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodont Res* 39:42–49, 2004
21. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319, 1997

22. Shalhoub V, Faust J, Boyle WJ et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem* 72:251–261, 1999
23. Crotti, TN, Smith MD, Findlay DM, Zreiqat H, Ahern MJ, Weedon H, Hatzinikolous G, Capone M, Holding C, Haynes DR. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF κ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* v.25:565-573, 2004
24. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Caparelli C, Morony S, Oliveira-Dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphnode organogenesis. *Nature*, v.397:315-323, 1999
25. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and Clinical Applications. J. Bone Joint Surg Am* v.84-A, 1032-1044, 2002
26. Rogers A, Eastell R. REVIEW: Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator for Nuclear Factor $\kappa\beta$ Ligand: Clinical Utility in Metabolic Bone Disease Assessment. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(11):6323–6331, 2005
27. Thorwarth M et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)- an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, 26:2575-2584, 2005
28. Woo, KM, Choi Y, Ko SH, Ko JS, Oh KO, Kim KK. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med* 34:347-352, 2002

Figuras



Figura 1 – Cimento de fosfato-carbonato de cálcio utilizado no grupo tratado



Figura 2 – Aspecto do acesso à tibia

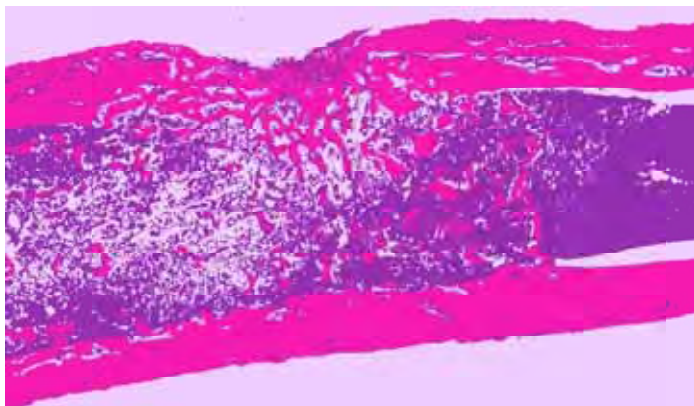


Figura 3 – Imagem processada para formato 8-bit color, grupo controle, 10 dias, 2,5x

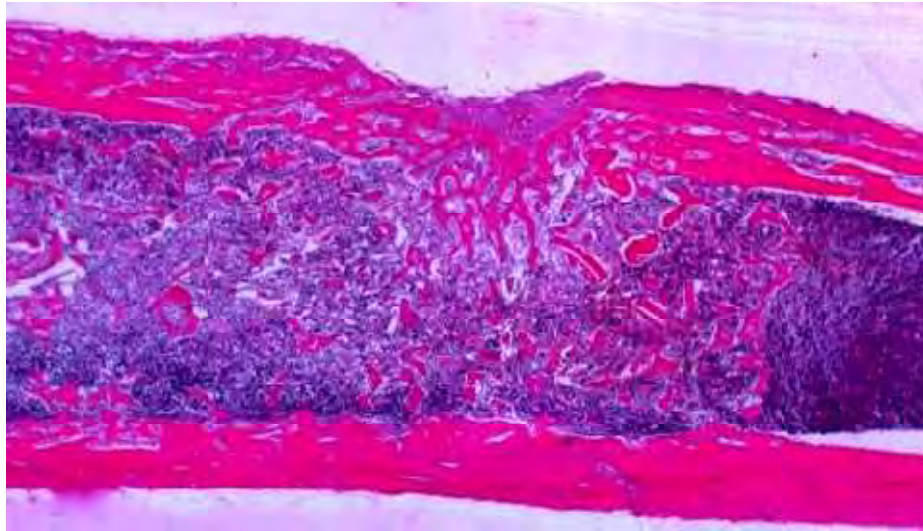


Figura 4 – Grupo controle, 10 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

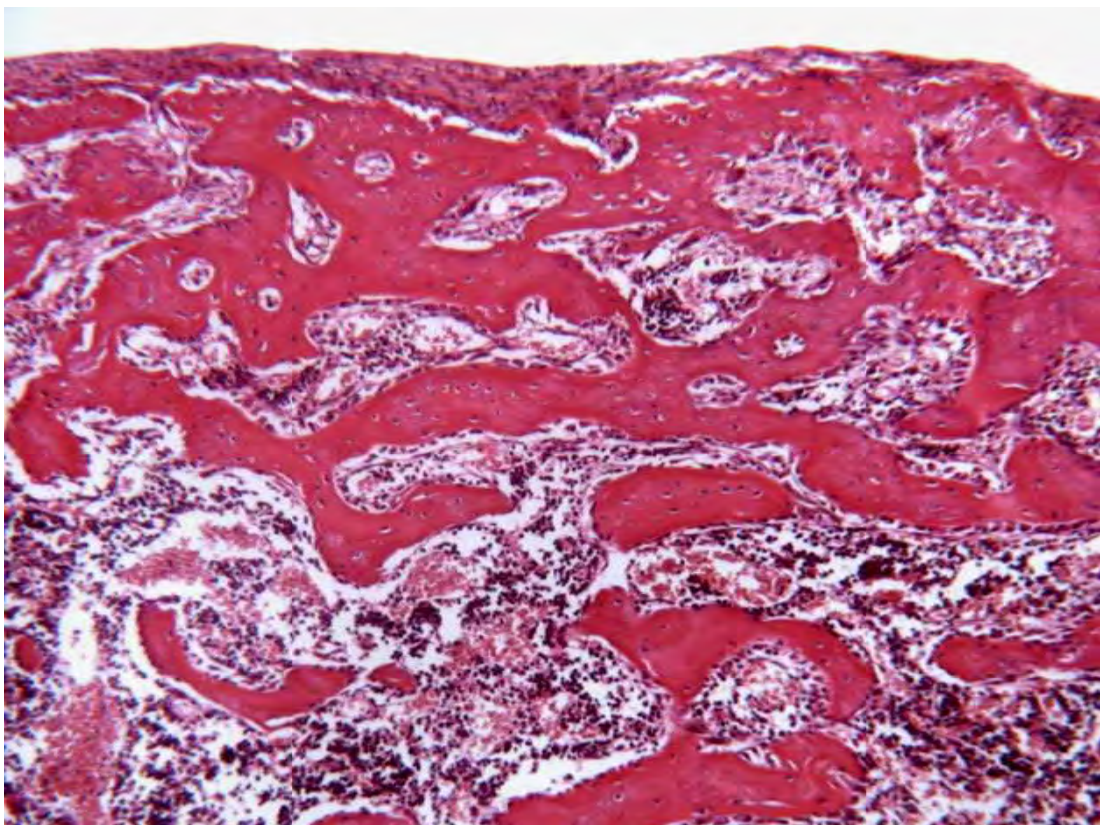


Figura 5 – Grupo controle, 10 dias, HE, 160x

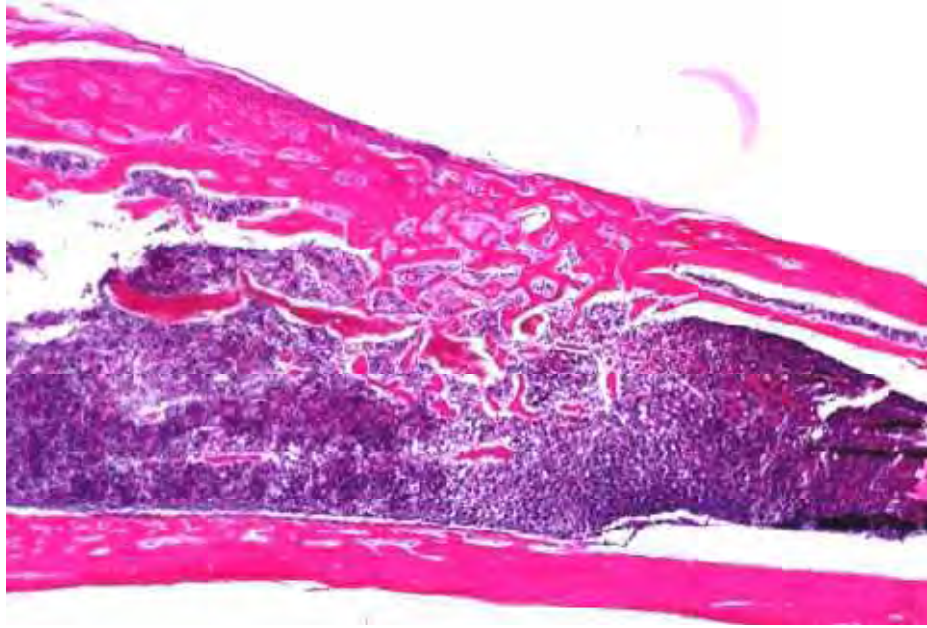


Figura 6 – Grupo tratado, 10 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

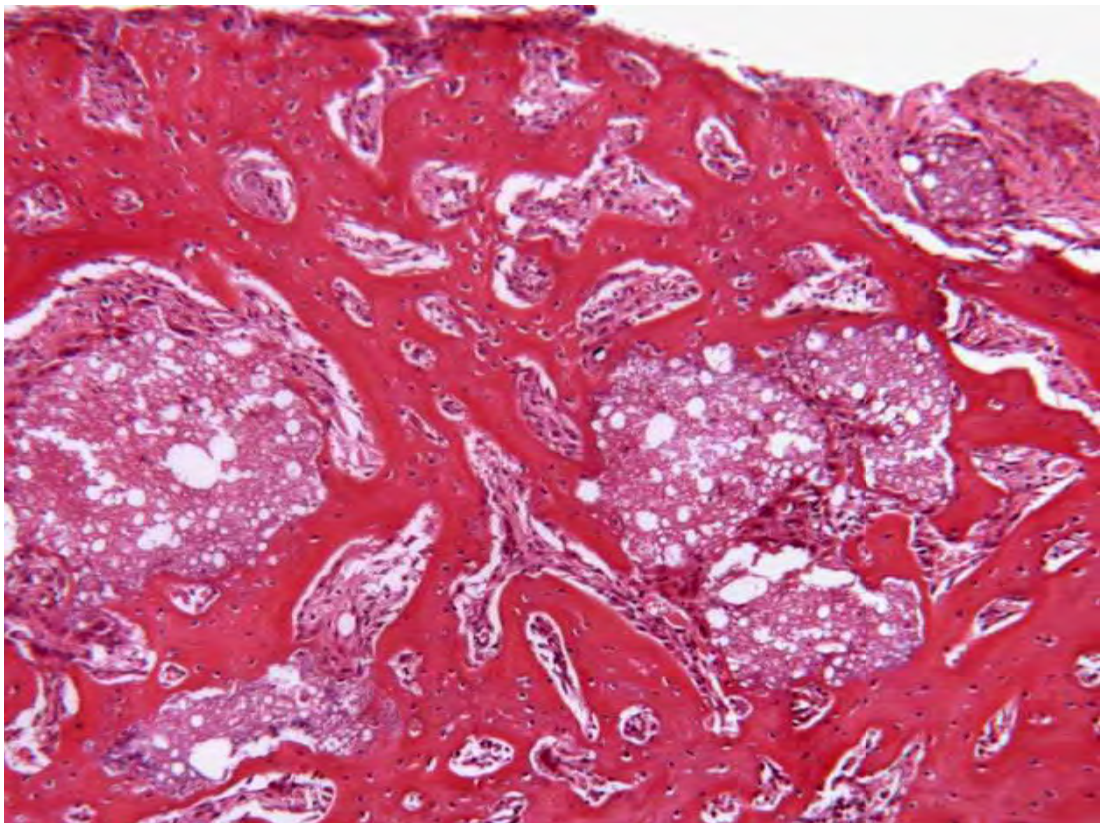


Figura 7 – Grupo tratado, 10 dias, HE, 160x

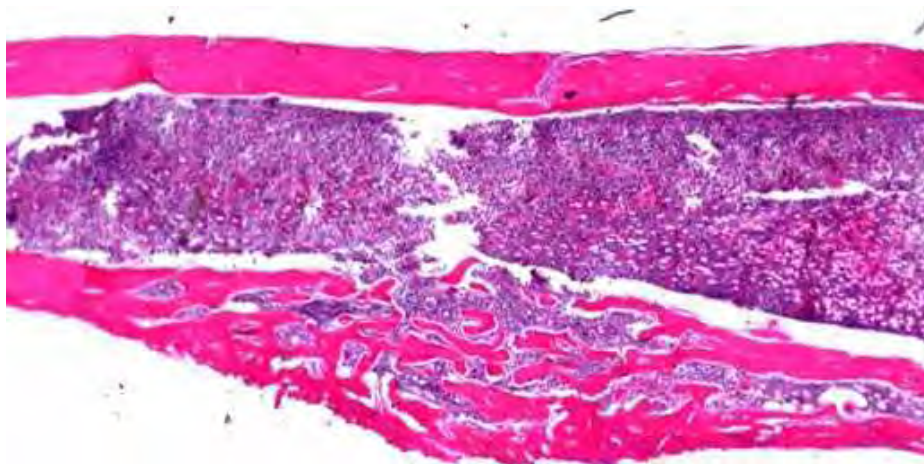


Figura 8 – Grupo controle, 20 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

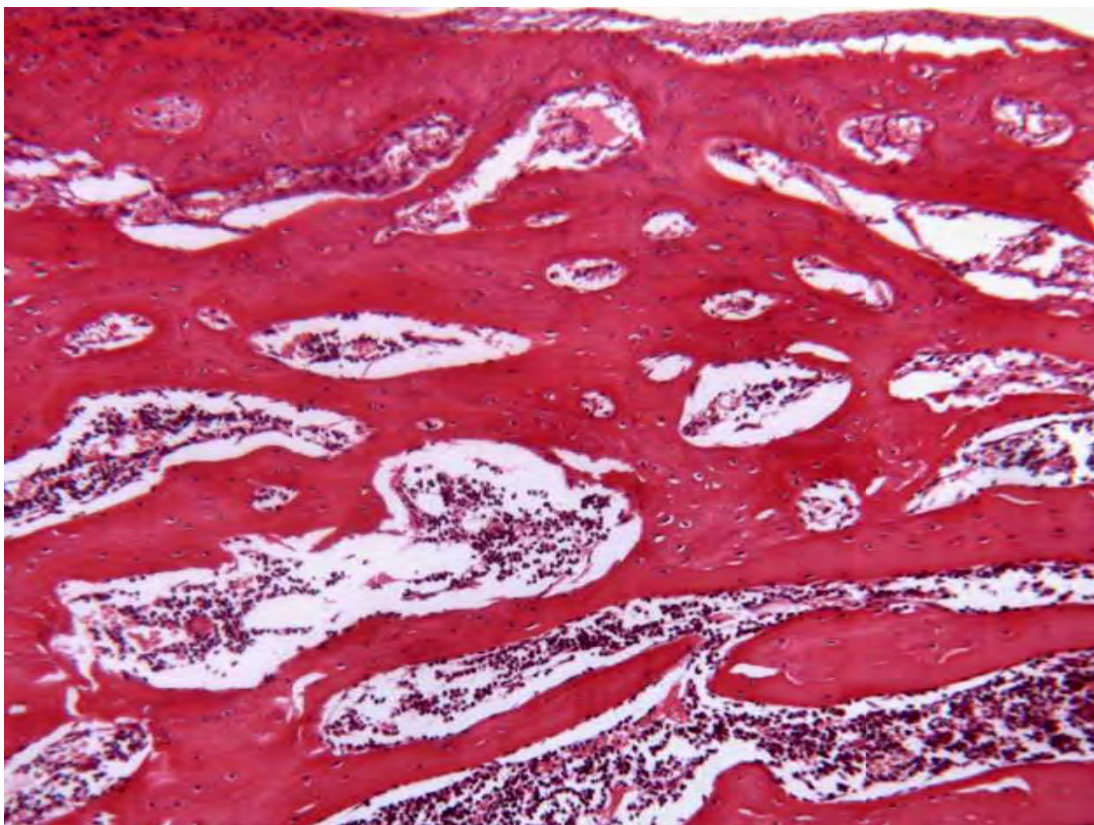


Figura 9 – Grupo controle, 20 dias, HE, 160x

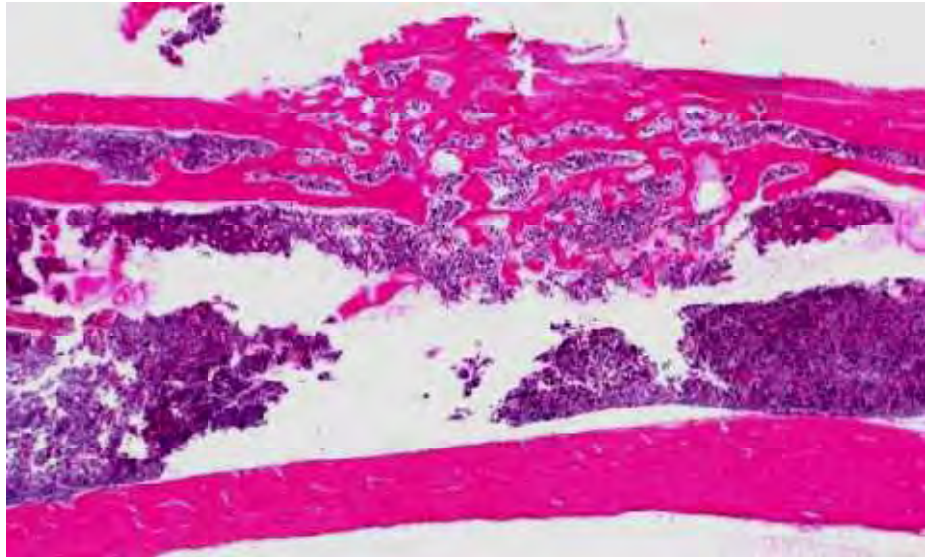


Figura 10 – Grupo tratado, 20 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

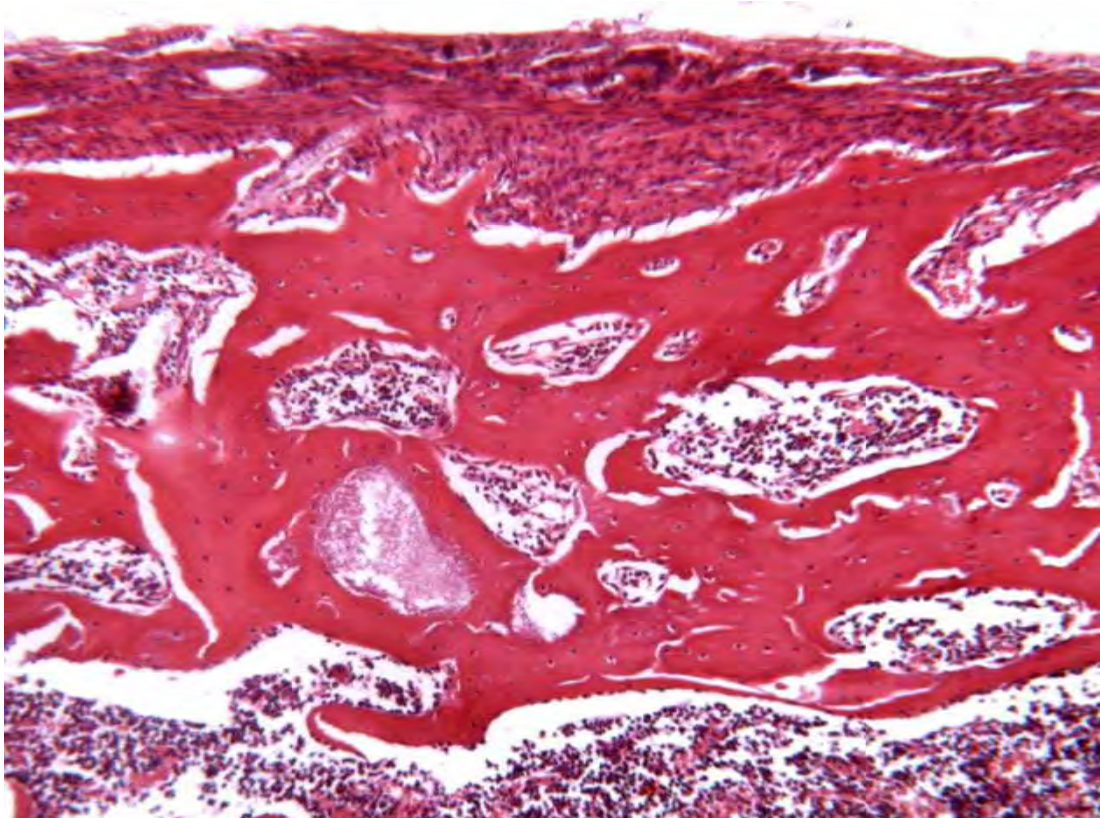


Figura 11 – Grupo tratado, 20 dias, HE, 160x

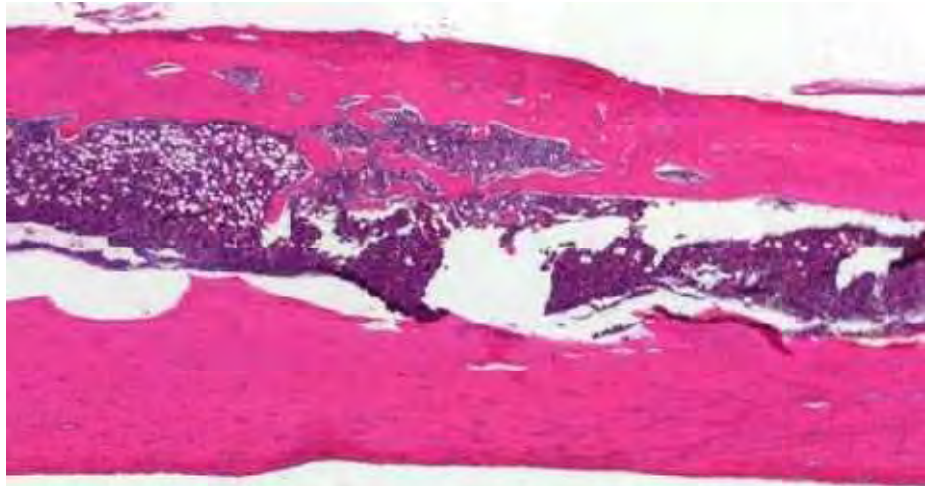


Figura 12 – Grupo controle, 30 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

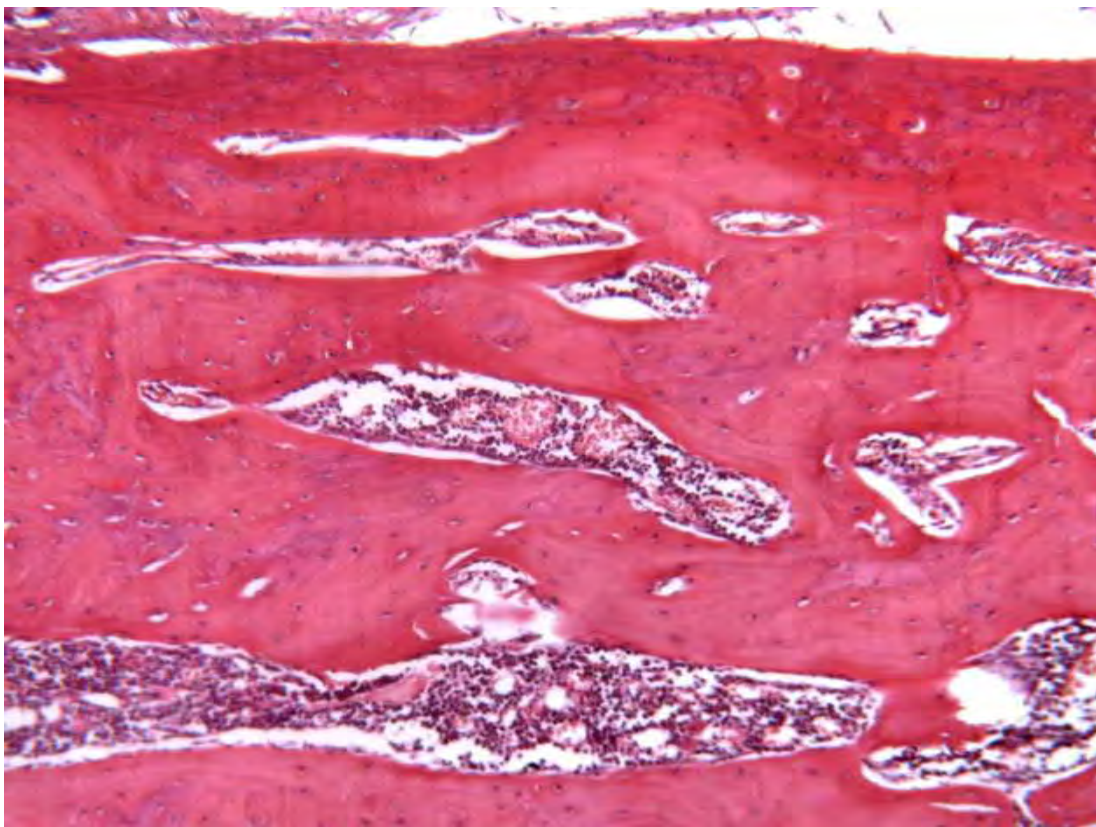


Figura 13 – Grupo controle, 30 dias, HE, 160x

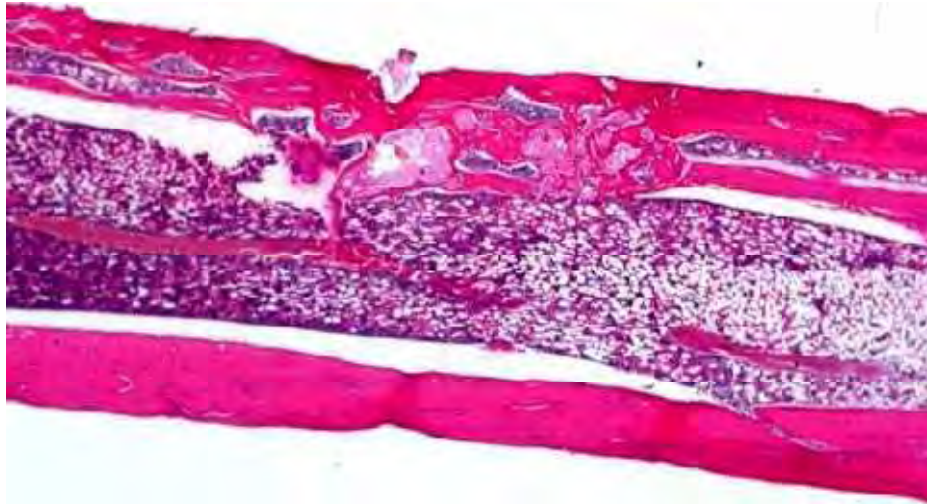


Figura 14 – Grupo tratado, 30 dias, aspecto geral do defeito, HE, 2,5x

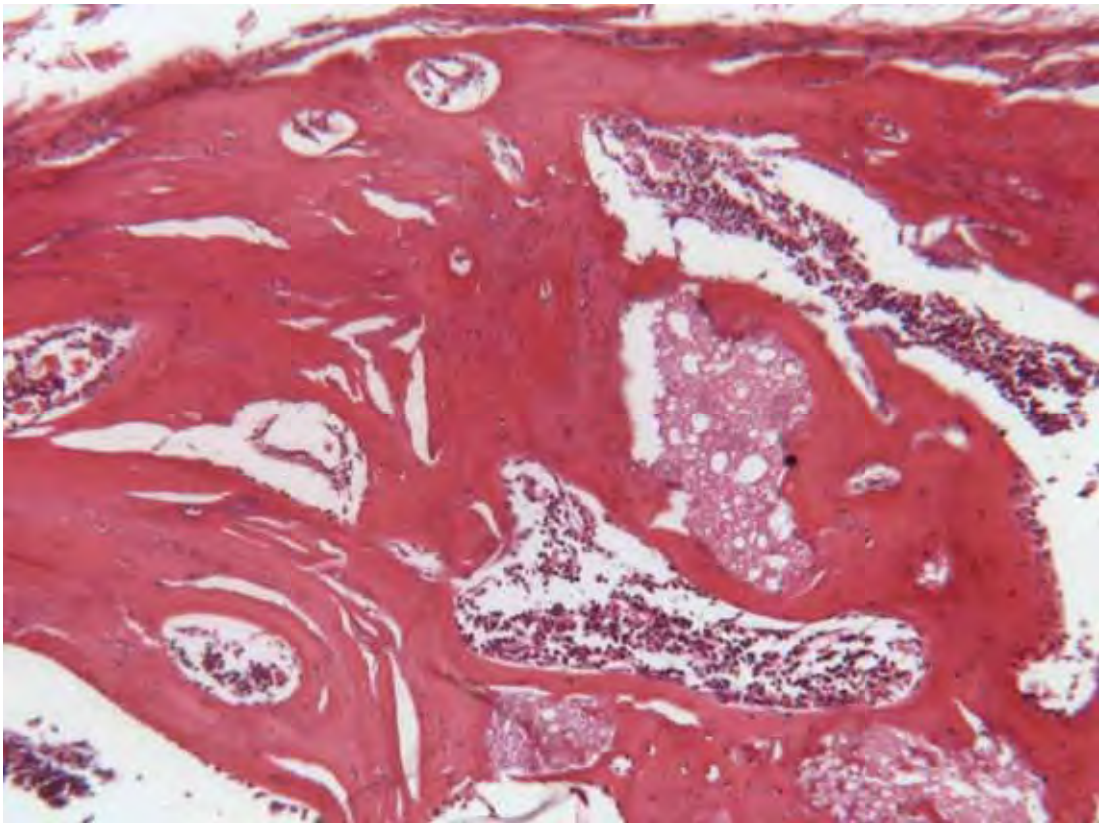


Figura 15 – Grupo tratado, 30 dias, HE, 160x

% Área de osso no defeito

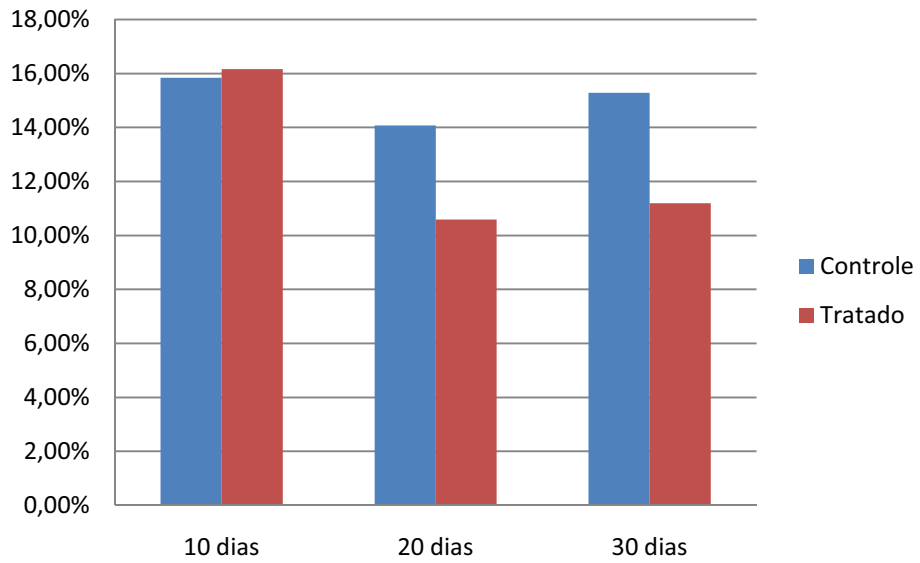


Figura 16 – Gráfico representando o percentual de área de osso no defeito, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

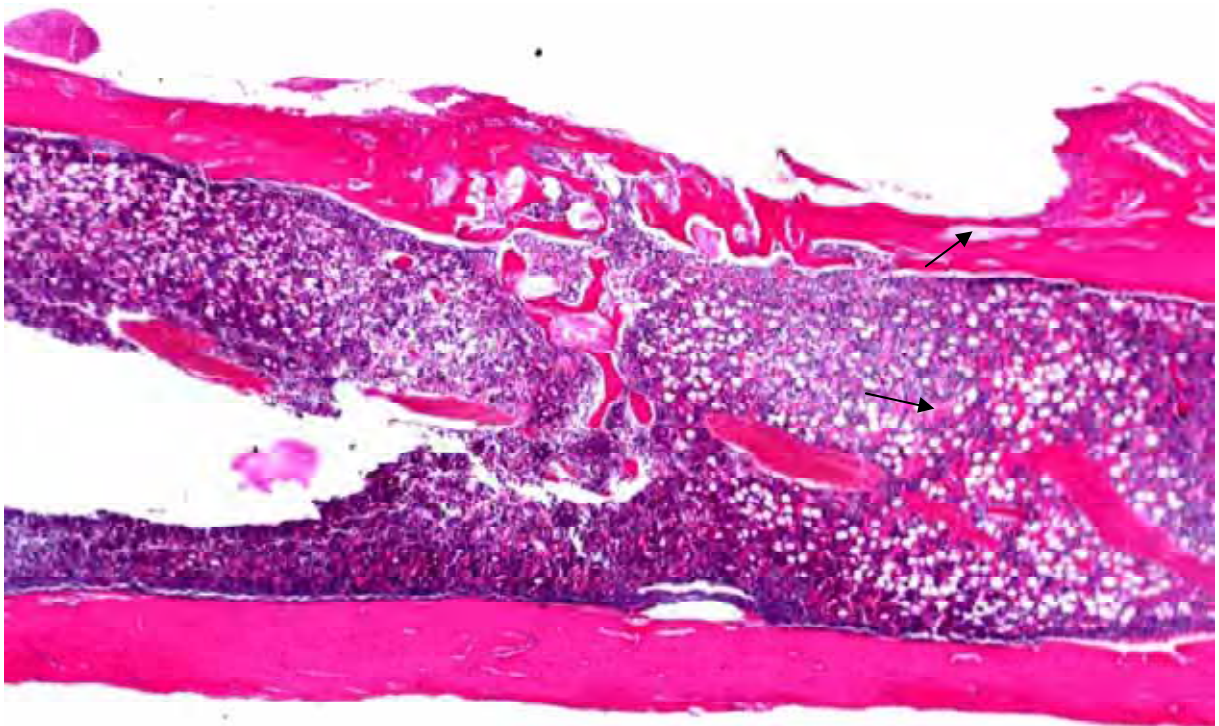


Figura 17 – Grupo tratado, 20 dias, biomaterial em áreas adjacentes ao defeito (setas) e osteogênese, HE, 2,5x

Expressão Média de OPG

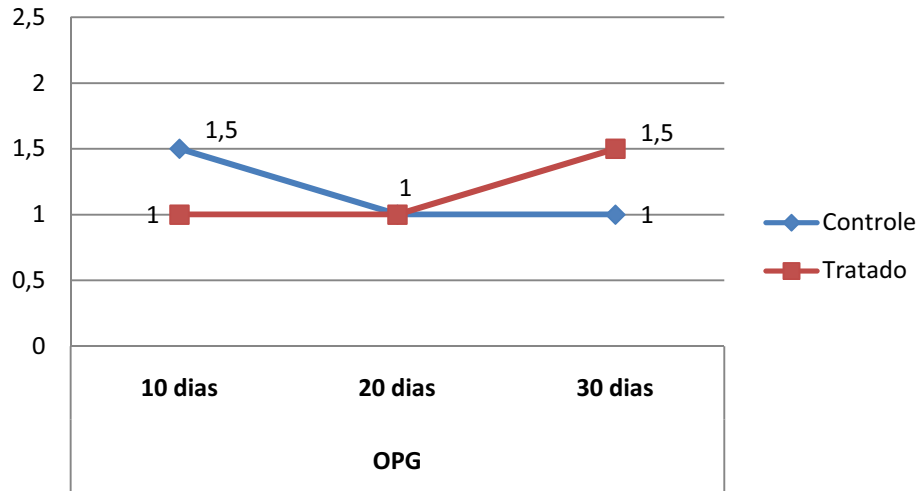


Figura 18 – Gráfico representando a variação da média dos escores para OPG, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

Expressão Média de RANK-L

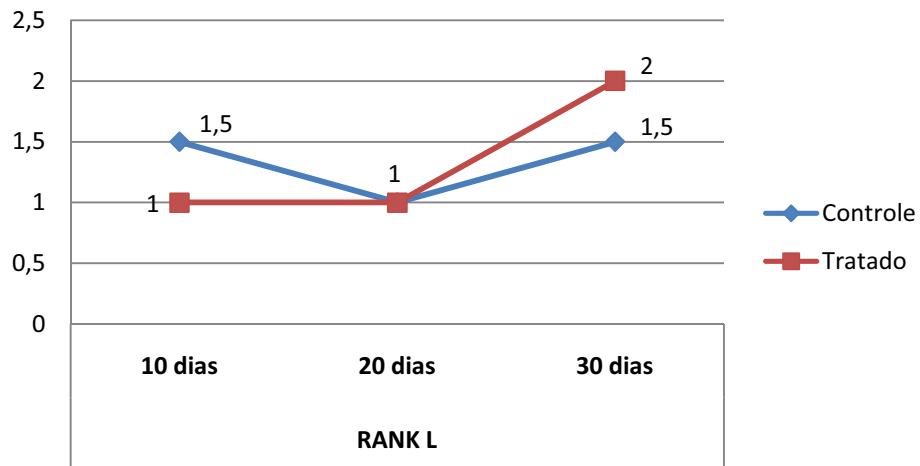


Figura 19 – Gráfico representando a variação da média dos escores para RANK-L, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

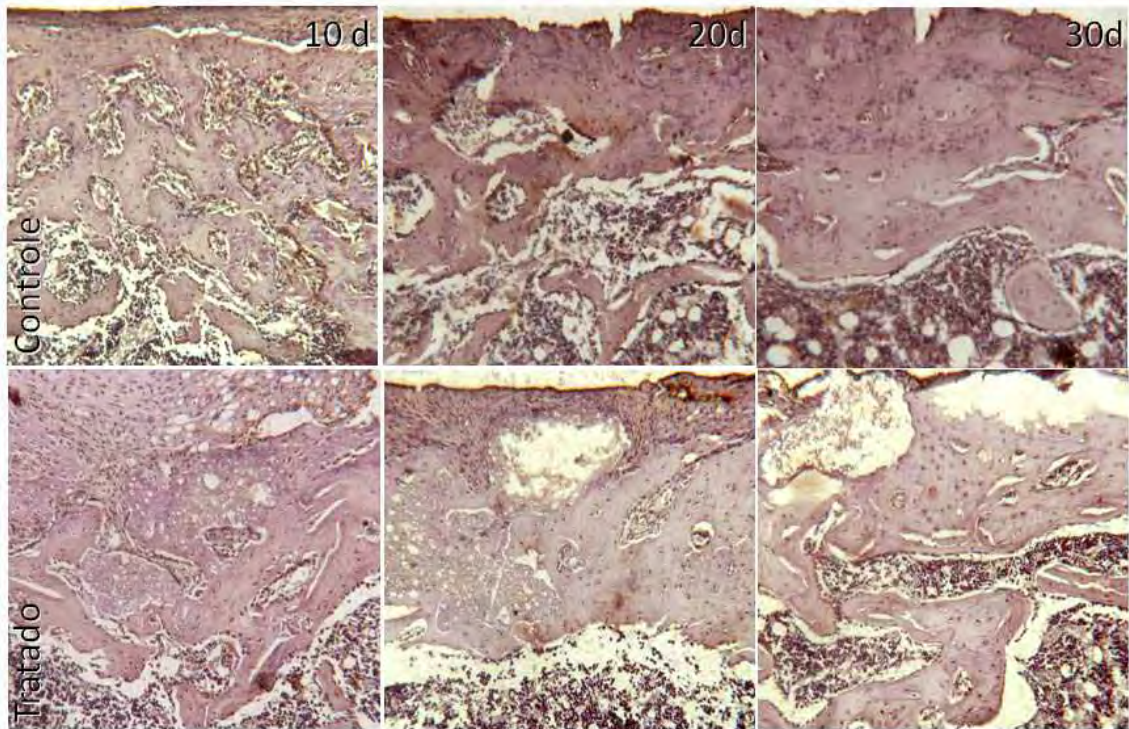


Figura 20 – Composição demonstrando imunomarcção de OPG nos grupos controle e tratado, em todos os períodos, DAB com contra-coloração por hematoxilina de Harris, 160x

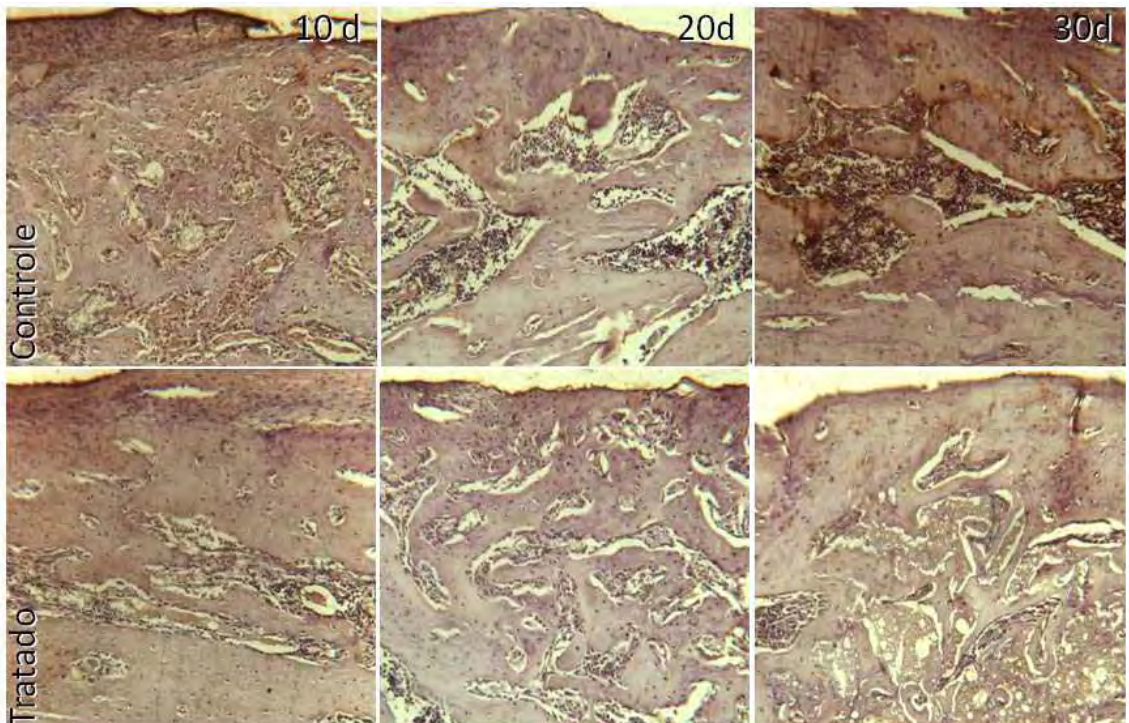


Figura 21 – Composição demonstrando imunomarcção de RANK-L nos grupos controle e tratado, em todos os períodos, DAB com contra-coloração por hematoxilina de Harris, 160x

Tabelas

% de área de osso no defeito total			
	10 dias	20 dias	30 dias
Controle	15,840%	14,078%	15,286%
Tratado	16,164%	10,588%	11,188%

Tabela 1 – Tabela representando o percentual de área de osso no defeito, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

Expressão de OPG e RANK-L				
	Ausente	Leve	Moderada	Forte
Escores	0	1	2	3

Tabela 2 – Tabela representando o método de quantificação através de escores da expressão qualitativa de OPG e RANK-L

Expressão média de OPG e RANK-L						
	10 dias		20 dias		30 dias	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Rank-L	1,5	1	1	1	1,5	2
OPG	1,5	1	1	1	1	1,5

Tabela 3 – Tabela representando a média dos escores de expressão encontrados para OPG e RANK-L, nos grupos controle e tratado, em todos os períodos

Anexo A

Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

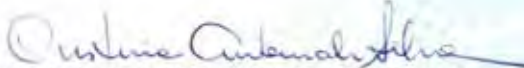


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO-CARBONATO DE CÁLCIO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS NÃO CRÍTICOS EM TÍBIA DE RATO. ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA" sob responsabilidade do Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO e colaboração de RODOLPHO VALENTINI NETO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 28 de setembro de 2007 de acordo com o protocolo no. 2007-005291.

Araçatuba, 16 de outubro de 2007.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Anexo B

Normas da Revista

Guide for Authors

Notice to Contributors

Reprints of the notice are available from the Editor-in-Chief and are also available at www.joms.org. The JOURNAL publishes articles reflecting a wide range of opinions and techniques, provided they are original, contribute new information, and meet the standards of scientific thought, rational procedure, and literary presentation.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/joms>, authors will be guided through the electronic submission process; original source files (text documents in Word, image files in TIFF or EPS) are required. The author should specify a category designation for the manuscript (original investigation, review article, letter to the editor, etc) and choose a set of classifications from the list provided online. All authors must download and fill out the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office (juliush@ohsu.edu). All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be sent via e-mail.

All author correspondence may be directed to the Editorin- Chief:

Dr Leon A. Assael
Oral and Maxillofacial Surgery
School of Dentistry?SD-522
Oregon Health & Science University
611 SW Campus Dr
Portland, OR 97239
Phone: (503) 494-0293
Fax: (503) 494-0294
E-mails: assaell@ohsu.edu, juliush@ohsu.edu

Original articles are considered and accepted for publication on the condition that they have not been published, or submitted for publication, elsewhere. The Editor reserves the right to edit manuscripts to fit articles within the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. A title page should be included with each article that lists the title, the authors' names, degrees, affiliations, complete mailing address (including street number), and the telephone number, fax number, and e-mail address for the corresponding author. Titles of articles should be descriptive but as concise as possible. A structured abstract (introductory summary) of no more than 250 words should be included. It should be divided into four sections labeled *Purpose, Materials (or Patients) and Methods, Results, and Conclusions*.

All Contributors to *JOMS* should refer to the Consort statement on clinical research design and the Helsinki statement on medical protocols and ethics.

Consort statement:

⇒ <http://www.consort-statement.org/statement/revisedstatement.htm>

Helsinki:

⇒ <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>

References. Type with double spacing. All references given must be cited in numerical order in the text. Bibliographies and reading lists are not used. For journal references, give the author's name, article title, journal name as abbreviated in Index Medicus, volume, pagination, and year.

1. Regezi JA, Batsakis JG, Courtney RM: Granular cell tumors of the head and neck. *J Oral Surg* 37:402, 1979

For books, give the author's name, book title, location and name of publisher, and year of publication (exact page numbers are required for direct quotations):

1. Skinner EW, Phillips RW: *Science of Dental Materials* (ed 5). Philadelphia, PA, Saunders, 1960, p 246

Figures. All figures must be numbered and cited in the text in order.

Legends. All submitted figures require a legend. For photomicrographs, magnification and stain should be specified.

Photographs. Photographs should be high-quality, sharp images. Color art and color photography submissions are encouraged. Images must be high-resolution digital illustrations (EPS or TIFF files); Powerpoint is acceptable for review purposes, but not of sufficient quality for publication. Authors may contact Elsevier for more information or should download a copy of the Specifications for Supplying Digital Artwork from www.us.elsevierhealth.com/subguide.

Tables. Each table should be logically organized and should supplement the article. Each table should be numbered consecutively and cited in the body of the text in order. Title and footnotes should be on the same page with the table. Do not draw vertical rules in tables.

Acknowledgments. Only persons who have made significant contributions to an article can be acknowledged.

Permission and Waivers. These should accompany the manuscript when it is submitted for publication. Include the following statement in the covering letter: In consideration of the *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in the event that such work is published in the JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. Permission of original author and publisher must be obtained for direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that is not your own. (Up to 100 words of prose material usually can be quoted without getting permission, provided the material quoted is not the essence of the complete work.) **Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Waivers**

must be obtained for full-face photographs unless eyes are masked to prevent identification. Waiver forms are available from the Editor-in-Chief.

Financial Interests. As specified in the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment, any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors. A covering letter at the time of submission should inform the Editor about pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will discuss with the authors how best to disclose the relevant information.