JÚLIO MACIEL SANTOS DE ARAÚJO

Avaliação comparativa do processo de incorporação de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos.

ARAÇATUBA – SÃO PAULO

2015

JÚLIO MACIEL SANTOS DE ARAÚJO

Avaliação comparativa do processo de incorporação de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Implantodontia).

Doutorando: Julio Maciel Santos de Araújo.

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Coorientadora: Profa. Ass. Doutora Daniela Ponzoni.

ARAÇATUBA – SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A663a

Araújo, Júlio Maciel Santos de.

Avaliação comparativa do processo de reparo de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno : estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos / Júlio Maciel Santos de Araújo. - Araçatuba, 2015

67 f. : il. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Coorientadora: Profa. Daniela Ponzoni

1. Transplante ósseo 2. Implantação dentária 3. Transplante autólogo I. T.

Black D7

CDD 617.64

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais que sempre me incentivaram e deram todo o apoio necessário a realização desse sonho.

Meu pai, Geraldo Maciel de Araújo (*in memoriam*), obrigado por tudo que o senhor fez enquanto pode, todos os ensinamentos e todo o apoio que me deu quando quis e precisei estudar. Pena não ter você comigo nesse momento tão importante, pena ter te perdido no início dessa trajetória, e que na verdade só estou nela devido ao seu espelho. Sempre me imaginei seguindo a pós-graduação e me tornando algo parecido com o que você foi. Deu certo, talvez não possa dizer que realizei meu sonho totalmente, ele foi em parte, acho que na verdade a maior jornada se iniciará, e farei o possível para que se orgulhe de mim. Te amo.

Minha mãe, Maria de Fátima Santos de Araújo, não tenho palavras para agradecer todo apoio dado durante toda a minha vida, mas acho que foi seu papel, Mãe é Mãe. Apesar de todas as dificuldades tenho certeza que está tão feliz quanto eu nesse momento. Feliz pelas coisas que estão acontecendo, e pelo que estou colhendo por tudo que plantei durante esse anos. A Senhora sabe que não foi fácil, mas posso dizer que tudo está sendo muito gratificante. Continuarei na luta pois quero que meus filhos tenham a oportunidade de ter tudo que vocês me proporcionaram. Te amo.

Dedico também a minha esposa, Raíssa de Lima Gadelha, obrigado por estar sempre ao meu lado nesses longos 8 anos de viagens, alguns longos períodos sem se ver, obrigado mais uma vez por toda compreensão e apoio. De certo modo estou fechando esse ciclo, mas como você me conhece estou sempre tentando iniciar alguns outros. Acho que nesses 12 anos juntos conseguimos construir muita coisa, de namorados “de menor”, agora somos casados e responsáveis por uma família. Que continuemos nessa harmonia. Te amo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOA-UNESP, por ter me dado a oportunidade de estudar nessa Instituição maravilhosa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Professor Idelmo Rangel Garcia Júnior, não tenho palavras para descrever o bom sentimento que eu sinto pelo senhor. Tenho que agradecer desde o momento que me aceitou como Orientando, até os ensinamentos no hospital, na clínica e nos corredores. Professor é aquele que compreende a dificuldade do aluno, mostra o caminho e deixa as portas abertas para que ele se sinta a vontade de buscar aprendizado. A serenidade e a calma com que conduz as situações o tornam um Professor diferente, um Professor que me agrada e que com certeza me espelho. Durante toda minha vida procurei buscar em cada pessoa, alguma coisa boa para engrandecer minha personalidade. Com certeza tenho várias suas para levar comigo e me tornar uma melhor pessoa e um melhor Professor. Não vou te prometer ser o melhor, como de fato não sou, mas prometo ao senhor que procurarei ser melhor a cada dia e honrar o Título que a Faculdade está me dando, e de certa forma o senhor como meu Orientador. Grande abraço.

À minha co-orientadora Professora Daniela Ponzoni. Obrigado pela orientação na pesquisa, por ter me aceito como Co-orientando quando as coisas não estavam favoráveis, pelos conselhos dados quando do início da minha jornada. Muito Obrigado. Grande abraço.

Ao Professor Francisley Ávila por todo apoio dado durante minha estadia em Araçatuba. Com todo respeito, posso dizer que você foi um “Pai” pra mim, acho que “Tio” condiz mais com nossa diferença de idade. Brincadeiras a parte, obrigado por ter me ajudado em todos os aspectos em que ajudou, desde delineamentos, a cirurgias experimentais e cirurgias hospitalares. Muito proveitoso o tempo que estivemos juntos, os papos no jantar nas saídas das clínicas e o conhecimento adquirido nos muitos momentos que estivemos juntos nessa jornada. Levo grandes recordações de Araçatuba, e devido ao nosso intenso contato na Faculdade sentirei muita falta do seu convívio. Espero continuar o laço de amizade tanto intelectual como pessoal. Grande abraço.

À Professora Roberta Okamoto, obrigado por toda ajuda com meu trabalho, obrigado pela forma educada e delicada que sempre me tratou. Tenho certeza que a senhora gravará o nome nesta Faculdade assim como o Professor Tetuo Okamoto gravou, e ficarei muito feliz que pude compartilhar em algum momento disso. Parabéns e meu muito obrigado. Grande abraço.

AGRADECIMENTOS

À Professora Alessandra Aranega e ao Professor Celso Sonoda, professores de primeira linha e pessoas da melhor qualidade. Obrigado pela oportunidade de conviver com vocês.

A todos os colegas de pós-graduação que direta e indiretamente contribuíram para a minha formação durante esse tempo. Timóteo, Lamis, André, Rodrigo, Julierme, Igor, Leonardo, Sabrina, Rafael, Julio César, Ana Paula, Willian Morais, Willian Caetano, Tarik, Gustavo, Cristian, Igor Putini, Eduardo, Pilar, Monica, Griza, Luan... espero não ter esquecido de ninguém. Todos vocês foram muito importantes durante esse tempo, embora o convívio não tenha sido grande, o aprendizado foi intenso enquanto existiu.

As funcionárias da Pós-graduação: Valéria, Lilian e Cristiane. Obrigado pelo apoio. Parabéns pela forma que conduzem esta secretaria.

Aos grandes Renato e Paulo, obrigado por tudo.

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação da neoformação óssea em função dos tempos e materiais. (Página 66)

Figura 2. 63x. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor incorporada, com trabéculas ósseas. (Página 41)

Figura 3. 63x. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor sem incorporação, com infiltrado inflamatório associado a região e o bloco parcialmente degradado. (Página 42)

Figura 4. 63x. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor incorporada, com trabéculas ósseas e células adiposas associadas a região. (Página 43)

Figura 5. 63x. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor sem incorporação, com infiltrado inflamatório associado e poucas trabéculas ósseas associadas a região e o bloco parcialmente degradado. (Página 44)

Figura 6. 250x. OC. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea. (Página 45)

Figura 7. 250x. OC. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão. (Página 46)

Figura 8. 250x. OC. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação de moderada a intensa (Score 2/3) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea. (Página 47)

Figura 9. 250x. OC. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea. (Página 48)

Figura 10. 250x. TRAP. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação osteoclástica, sugerindo substituição óssea. (Página 49)

Figura 11. 400x. TRAP. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação de leve a moderada (Score 1/2)

para a enzima em questão demonstrando uma menor ação osteoclástica. (Página 50)

Figura 12. 400x. TRAP. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão demonstrando uma menor ação osteoclástica. (Página 51)

Figura 13. 250x. TRAP. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão demonstrando uma ação osteoclástica. (Página 52)

Figura 14. Tíbia tricotomizada, antissepsia realizada. (Página 53)

Figura 15. Tíbia tricotomizada sendo anestesiada para vasoconstrição local. (Página 53)

Figura 16. Tíbia sendo incisada por planos. (Página 54)

Figura 17. Tíbia sendo incisada por planos. (Página 54)

Figura 18. Tíbia exposta para retirada de enxerto autógeno com broca trefina de 8mm. (Página 55)

Figura 19. Tíbia exposta para retirada de enxerto autógeno com broca trefina de 8mm. (Página 55)

Figura 20. Defeito criado para retirada do bloco de enxerto autógeno. (Página 56)

Figura 21. Defeito criado e enxerto autógeno retirado para implantação no leito receptor. (Página 56)

Figura 22. Bloco de enxerto autógeno. (Página 57)

Figura 23. Mandíbula sendo anestesiada para acesso ao leito receptor. (Página 57)

Figura 24. Incisão feita por planos. (Página 58)

Figura 25. Dissecção para acessar o leito receptor. (Página 58)

Figura 26. Dissecção realizada sobre a margem mandibular onde será fixado o bloco de enxerto autógeno. Ramo mandibular esquerdo. (Página 59)

Figura 27. Incisão realizada sobre a margem mandibular onde será fixado o bloco de enxerto autógeno. Ramo mandibular esquerdo. (Página 59)

Figura 28. Mandíbula esquerda exposta para recebimento do bloco de enxerto autógeno. (Página 60)

Figura 29. Bloco de enxerto autógeno posto em posição. (Página 60)

Figura 30. Bloco de enxerto autógeno sendo fresado em posição no leito receptor. (Página 61)

Figura 31. Bloco de enxerto autógeno sendo parafusado junto ao leito receptor. (Página 61)

Figura 32. Bloco de enxerto autógeno parafusado em posição no leito receptor. (Página 62)

Figura 33. Exposição do ramo mandibular direito para recebimento do bloco bifásico. (Página 62)

Figura 34. Mandíbula direita exposta. (Página 63)

Figura 35. Mandíbula direita exposta e bloco bifásico em posição. (Página 63)

Figura 36. Bloco bifásico sendo fresado em posição no leito receptor. (Página 64)

Figura 37. Bloco bifásico sendo parafusado no leito receptor. (Página 64)

Figura 38. Bloco bifásico parafusado. (Página 65)

Figura 39. Bloco bifásico parafusado e região sendo suturada por planos. (Página 65)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação da neoformação entre os materiais para cada um dos dois tempos. (Página 66)

Tabela 2. Comparação da neoformação entre os tempos para cada um dos dois materiais. (Página 67)

Tabela 3. Comparação das manifestações entre cada proteína para cada tempo. (Página 67)

Tabela 4. Comparação das manifestações entre cada proteína para cada material. (Página 67)

Tabela 5. Comparação da manifestação entre os materiais, em função do tempo e da proteína. (Página 67)

LISTA DE ABREVIATURAS

TRAP	Fosfatase ácida tartrato-resistente
OC	Osteocalcina
HA	Hidroxiapatita
β-TCP	Beta tricálcio-fosfato
rh-BMP2	Proteína morfogenética recombinante humana do tipo 2
BMP	Proteína morfogenética humana
BCP	Bloco de Hidroxiapatita + Beta tricálcio-fosfato
e-HAC	Hidroxiapatita de colágeno equino
kg	Quilogramas
mg	Miligramas
mm	Milímetros
rpm	Rotações por minuto
ml	Mililitro
HE	Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Introdução.....17

Proposição 21

Materiais e Métodos 22

Resultados 27

Discussão.....30

Conclusão 35

Referências.....36

Anexos

Anexo A – Normas para publicação.....39

Anexo B – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....40

Anexo C - Fotografias das Lâminas Histológicas.....41

Anexo D – Ilustrações da Fase Cirúrgica da Metodologia Experimental.....53

Anexo E – Tabelas Estatísticas.....66

Avaliação comparativa do processo de incorporação de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos.

Comparative evaluation of the block synthetic biphasic incorporation, and autogenous bone. Histological, histometric and immunohistochemical study in rabbits.

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*

Araújo JMS. Avaliação comparativa do processo de incorporação de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

Proposição: O objetivo desse trabalho foi avaliar a interface enxerto/leito receptor de um bloco sintético bifásico, composto de 60% de hidroxiapatita e 40% de beta tricálcio fosfato (β-TCP) por meio de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 12 coelhos *albinus* que foram submetidos à cirurgia de enxerto ósseo aposicional em bloco para ganho em espessura. O enxerto autógeno foi removido da tíbia com o auxílio de uma broca trefina de 8 mm e parafusado na mandíbula esquerda, enquanto o bloco teste bifásico, composto de 60% de HA e 40% de β-TCP, foi parafusado na mandíbula direita. Os animais sofreram eutanásia após 2 e 8 semanas do procedimento cirúrgico e a peça foi removida para processamento e análises. Os resultados obtidos tiveram sua normalidade testada para definir o teste estatístico indicado. **Resultados:** Na análise histométrica, podemos observar que o grupo autógeno demonstrou maiores taxas de neoformação óssea nos dois tempos estudados quando comparados ao grupo do biomaterial, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa. Quando comparamos os tempos estudados em cada material, o grupo autógeno teve um aumento considerável da segunda para a oitava semana, porem não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas. O grupo biomaterial não teve um aumento significativa de neoformação óssea durante o período de reparo. Na imunoistoquímica, com relação ao tempo, podemos observar que a enzima TRAP mostrou maior manifestação no período de 2 semanas do que no período de 8 semanas considerando os dois materiais estudados. No quesito material, a proteína OC mostrou mais evidente no grupo autógeno de uma forma geral. Quando se avaliou material e tempo em cada proteína isoladamente não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. **Conclusão:** O bloco testado manteve valores de neoformação óssea inferiores ao bloco controle, demonstrando menor potencial de integração. A sua composição se mostrou confiável para reconstruções alveolares em espessura com intuito de preenchimento. Mais estudos com diferentes modelos de estudo e métodos devem ser analisados, de preferência associados a componentes celulares com o intuito de acharmos um substituto ideal para enxertos autogénos.

Palavras- chave: enxerto ósseo, biomaterial, reparação óssea.

Araújo JMS. Comparative evaluation of the two-phase synthetic block incorporation process, and autogenous bone. Histological, immunohistochemical and histometric study in rabbits [thesis]. Araçatuba: Faculty of Dentistry, São Paulo State University; 2015.

ABSTRACT

Proposition: The purpose of this study was to evaluate the interface graft / recipient bed of a two-phase synthetic block, consisting of 60 % hydroxyapatite and 40 % beta tricalcium phosphate (β -TCP) by histological analysis, histometric and immunohistochemistry. **Methods:** We used 12 albinus rabbits that underwent appositional bone graft surgery block to gain in thickness. The autogenous graft was removed from the tibia with the aid of a trephine drill 8 mm and screwed into the left jaw, while the biphasic pattern block, composed of 60 % HA and 40% β -TCP, was screwed in the right jaw. The animals were euthanized after 2 and 8 weeks of surgery and the piece was removed for processing and analysis. The results were tested for normality define the statistical test indicated. **Results:** In histometric analysis, we can see that the autogenous group showed higher rates of bone formation in both times studied compared to the biomaterial group, demonstrating a statistically significant difference. When we compare the times studied in each material, the autogenous group had a significant increase from the second to the eighth week, however, there was no statistically significant differences. The biomaterial group remained during the repair period. In immunohistochemistry, with respect to time, we can see that the TRAP enzyme showed greater expression in the two weeks period than 8 weeks considering the two materials studied. In the item material, OC protein was more evident in the group of autogenic general. When assessing the material and time each protein alone were no statistically significant differences. **Conclusion:** The block kept tested values of bone formation below the control block, showing less potential for integration. Its composition has proven reliable for alveolar reconstruction in thickness to fill order. Further studies with different study models and methods to be analyzed, preferably associated with cellular components in order to we find an ideal substitute for autogenous grafts.

Keywords: bone graft, biomaterial, bone repair.

INTRODUÇÃO

Uma das constantes preocupações de profissionais como cirurgiões-dentistas é a perda óssea ocorrida após procedimentos cirúrgicos, traumas sobre o esqueleto, e lesões que acometam o tecido ósseo. Desde épocas remotas, a busca por técnicas de tratamento que possam recuperar a perda de tecido ósseo tem sido uma constante entre os pesquisadores e cirurgiões. Nesse ínterim, o uso de biomateriais substitutos ósseos tem sido preconizado, em função de várias pesquisas realizadas que comprovaram a sua eficácia para estimular o reparo ósseo[1].

Os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os osteogênicos referem-se aos materiais orgânicos capazes de estimular a neoformação óssea a partir de osteoblastos. Os osteoindutores são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e condroblastos estimulando a formação óssea no local ou mesmo em um sítio heterotópico. Os materiais osteocondutores (geralmente inorgânicos) permitem a aposição de um novo tecido na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras[2,3].

Durante o planejamento para reabilitação com implantes dentais do paciente edêntulo, é necessária a observância da quantidade e qualidade do osso remanescente desse paciente[4]. Sendo identificada a deficiência, o profissional pode lançar mão de enxertos biológicos, de origens autógena, homógena e heterógena. O enxerto autógeno, onde o doador é o próprio receptor, é o padrão ouro. Ele é o único que possui propriedade osteogênica, ou seja, osteoblastos presentes no tecido produzem uma neoformação óssea no leito receptor, não produzindo qualquer tipo de reação imune. Porém as fontes do material são limitadas e se faz necessária uma

segunda intervenção cirúrgica para retirada deste, aumentando a morbidade cirúrgica e os custos do procedimento[5]. O enxerto homógeno, onde o doador é da mesma espécie do receptor; e o heterógeno, onde o doador é de uma espécie diferente do receptor, possuem o risco de transmissão de doenças infecciosas e reação antigênica. Com isso, devido aos problemas relacionados com os enxertos de origem biológica, é de importância o estudo e desenvolvimento dos substitutos ósseos de origem sintética, que busquem se aproximar das propriedades benéficas dos enxertos autógenos, sem que o paciente sofra com as desvantagens desse material.

Os ossos maxilares edêntulos sofrem uma perda gradual em espessura ao longo dos anos, com uma intensa perda no primeiro ano de até dez vez mais do que nos anos subsequentes[6]. Com isso cada vez mais o profissional precisa adequar o rebordo do paciente para receber implantes dentais. Os enxertos em bloco são o material de eleição para o aumento em espessura dos rebordos alveolares.

Quando a técnica cirúrgica apropriada e o material de enxerto são selecionados para um determinado sítio, a morfologia original deste pode ser recuperada. Contudo, se a seleção recair em uma técnica e/ou material de enxerto inadequados, pode haver reabsorção do material e falha na integração com os tecidos circunvizinhos[4].

Para que um material enxertado seja incorporado à área com sucesso, quatro condições são necessárias: (1) osteoblastos devem estar presentes no sítio, (2) o suprimento sanguíneo do sítio deve ser suficiente para suprir o material enxertado, (3) o material tem que estar estável durante o reparo, e (4) o retalho mucoperióstico deve estar suturado sem tensão[7].

A proteínas óssea morfogenética recombinante humana do tipo 2 (rh-BMP 2) também têm sido utilizadas com o intuito de incrementar a neoformação óssea. As BMP's presentes na matriz extracelular do osso desmineralizado são capazes de induzir células mesenquimais indiferenciadas a formarem células osteoprogenitoras[8,9,10].

Alguns autores[9] avaliaram dois blocos ósseos compostos de hidroxiapatita e beta tricácio fosfato na proporção de 20/80, combinados ou não ao colágeno, como carreadores para a rhBMP-2. Foram feitos quatro grupos: BCP; BCP-Colágeno; BCP + rhBMP-2; BCP-Colágeno + rhBMP-2. Os espécimes foram fixados com parafuso em calvária de coelhos, e após oito semanas foram sacrificados para que pudesse ser feita a análise histológica e histométrica. Foi observado uma maior formação óssea nos grupos que continham a rhBMP-2, porém com uma maior integração entre o osso neoformado e a calvária dos animais no grupo BCP-Colágeno + rhBMP-2. Os autores concluíram que o BCP-Colágeno apresentou um grande potencial osteoindutivo, podendo ser um candidato a carreador da rhBMP-2 devido a sua estabilidade volumétrica, a facilidade de manuseamento e suas propriedades de remodelamento. Porém sua indicação para aumento em espessura dos rebordos alveolares dos maxilares é *off-label*, ou seja, o fabricante não a indica para este tipo de procedimento, apenas para preenchimento de defeitos ósseos, alvéolos pós-cirúrgicos e cirurgia de levantamento de assoalho de seio maxilar.

Outros[11] avaliaram características mecânicas, biocompatibilidade e propriedades osteocondutivas de dois blocos ósseos como substitutos ao enxerto autógeno. Um bloco era de hidroxiapatita e colágeno equino (eHAC), e o outro era o bloco do Bio-Oss. Foi feito o aumento em espessura em mandíbulas de 96 ratos, e peça foi coletada nos períodos de 1 e 3 meses. O bloco eHAC apresentou-se rígido

e de fácil fixação enquanto o bloco Bio-Oss apresentou-se quebradiço e de difícil fixação. A formação e o crescimento ósseo foi maior no bloco eHAC do que no bloco do Bio-Oss, porém ambos obtiveram menor formação e crescimento do que o bloco autógeno no mês 1 e 3. O osso autógeno mostrou previsibilidade na formação óssea nos dois tempos de avaliação. O bloco eHAC apresentou previsibilidade no mês 1, e uma tendência no mês 3.

Portanto é essencial que se continue a investigação dos possíveis substitutos ósseos, para que se encontre um material com as propriedades do enxerto autógeno, sem a morbidade que esse trás aos pacientes.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar, em mandíbulas de coelho, o processo de reparo de bloco bifásico, hidroxiapatita 60% e beta tricácio-fosfato (β-TCP) 40%, e do osso autógeno, em bloco, por meio de análise histológica, histométrica e imunoistoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 12 coelhos, machos brancos (Nova Zelândia), variação *albinus*, adultos e com peso corporal variando de 3 a 4kg. 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 submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da mesma Faculdade, e obteve parecer favorável sob protocolo nº 2013-01113.

Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum, pesados e sedados, via intramuscular, pela combinação de 50 mg/kg de Ketamina (Vetaser – 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 na região de ângulo mandibular bilateral e tíbia direita, e o mesmo animal foi dividido em 2 grupos sendo o lado esquerdo da mandíbula chamado de Grupo Autógeno e o lado direito da mandíbula de Grupo Biomaterial.

Grupo Autógeno – Após antissepsia e anestesia local com cloridrato de mepivacaína a 2% com adrenalina 1:100.000 (Mepivacaína – DFL, Brasil), foi acessado cirurgicamente a face superior interna da tíbia direita, por incisão e divulsão, até exposição do tecido ósseo próximo à articulação tíbia/fêmur. 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. O tecido cutâneo da tíbia foi suturado com fio nylon 5.0 (Ethicon – Johnson & Johnson Indústria e Comércio Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil).

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

O bloco de osso autógeno foi fixado, pelo método *lag screw*, 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). Procedeu-se sutura, por planos, com fio de nylon 5.0.

Grupo Biomaterial - Com a broca trefina de 8 mm, sob constante irrigação, um círculo foi removido do bloco do sintético bifásico e mantido em solução fisiológica até ser fixado sobre o leito receptor no ângulo mandibular do lado direito, da mesma maneira descrita no Grupo Autógeno.

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. A eutanasia dos animais foi realizada nos períodos de 2 e 8 semanas de pós-operatório, com 6 animais em cada período, nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Processamento Laboratorial

As mandíbulas foram dissecadas, osteotomizadas de forma a incluir todo o enxerto nas peças, e submetidas ao processamento laboratorial de 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 coloração pela hematoxilina e eosina para avaliação histológica qualitativa e histométrica por meio de microscopia óptica.

Análise Histométrica

A análise histométrica, considerando a interface do leito receptor, foi feita com o objetivo de analisar a quantidade de trabéculas ósseas neoformadas nesta região, duas lâminas de cada animal foram analisadas.

Para a realização das mensurações foi utilizada uma lupa objetiva de aumento Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) acoplada a uma câmera de captação de imagem (JVC, TK 1270, Color Vídeo Câmera Sony, Tókio, 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 de neoformação óssea na região. Os valores de porcentagem da área selecionada foram obtidos e apresentados em forma de planilha para análise estatística.

Análise Imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foram usados como anticorpos primários a OC (OC, Goat (cabra) anti-oc, Santa Cruz Biotecnology®, USA) e TRAP (TRAP, Goat anti-trap, Santa Cruz Biotecnology®, USA). O anticorpo secundário biotinilado foi o anti-goat produzido em burro (donkey anti-goat, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA). O sinal da reação foi ampliado com o sistema Streptovidina-Biotina (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 nos períodos testados, 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 (0), positivas (1), super-positivas (2), e hiperpositivas (3) das células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo.

Para análise da expressão da enzima TRAP, foi realizada a contagem do número das marcações na extensão de todo o bloco de enxerto em ambos os grupos, da mesma forma utilizada na proteína OC.

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

Análise Estatística

O banco de dados foi construído e analisado no SPSS (Versão 21). Verificou-se, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e pelo exame visual dos gráficos, que a distribuição da variável neoformação era não paramétrica entre os grupos de tempo e material, por esse motivo, optou-se teste Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados em tabelas com as descrições das médias dos Ranks (provenientes do teste Mann-Whitney), média aritmética, seu desvio padrão e a mediana. Foi usado nível de significância de 95%, $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Análise Histológica

Foi observada integração histológica nos blocos do Grupo Autógeno no período de 2 e 8 semanas de eutanásia. A interface demonstrou um trabeculado ósseo condizente com a união do enxerto com o leito receptor. Não havia tecido conjuntivo interposto, nem sinais de reação de corpo estranho.

Não foi possível observar integração histológica nos blocos do Grupo Biomaterial no período de 2 e 8 semanas de eutanásia. No período de 2 semanas a interface possuía um tecido inflamatório associado ao leito receptor, com partículas do biomaterial envoltas por poucas trabéculas ósseas. No período de 8 semanas foi possível observar uma quantidade maior de osso ao redor das partículas. Em ambos os tempos pode ser observado a degradação e falta de incorporação do bloco.

Análise Histométrica

Os resultados iniciam apresentando os dados da Tabela 1 que comparam a neoformação óssea (%) entre os materiais para cada tempo. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas para os dois tempos. O material autógeno apresentou medianas mais elevadas que o biomaterial para ambos os tempos ($p = 0,004$). Quando observamos as médias no tempo de duas semanas o Grupo Autógeno obteve mais que o dobro da porcentagem de formação óssea no período, 30,74% contra 13,16% do Grupo Biomaterial, demonstrando uma neoformação óssea precoce, característica do material osteogênico. No tempo de oito semanas o Grupo Autógeno continuou a neoformar possibilitando um incremento na quantidade formada de osso.

A Tabela 2 compara agora a neoformação óssea entre os tempos por material. Nesse modelo, apenas para o Grupo Autógeno verifica diferença estatisticamente significativa. Com o tempo de oito semanas apresentando maior mediana que o de duas semanas (p = 0,009). Quando partimos para analisar a média observamos um incremento de 38,5% de novo osso formado no segundo tempo estudado quando comparado ao primeiro, confirmando o potencial do Grupo Autógeno e comprovando porque é considerado o “Padrão Ouro”. No Grupo Biomaterial não foi observada diferença estatisticamente significativa, com as médias praticamente iguais: 13,16% de osso no período de duas semanas contra 14,39% de osso no período de oito semanas.

A Figura 1 apresenta graficamente as comparações descritas das tabelas anteriores. Mostrando as maiores médias de osso neoformado no Grupo Autógeno, com maior formação no período de oito semanas, e o Grupo Biomaterial com pouco osso neoformado, sem nenhum aumento significativo com o passar do tempo.

Análise Imunoistoquímica

A Tabela 3 mostra que na enzima TRAP houve diferença estatisticamente significativa (p = 0,01) de manifestação entre os tempos, não fazendo distinção há um Grupo específico. Apenas mostrando que sua manifestação no geral foi menor na oitava semana demonstrando uma menor ação de remodelação óssea. O período de oito semanas apresentou uma mediana menor (Med = 1,00) quando comparado ao de 2 semanas (Med = 1,50). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os tempos quando a manifestação da proteína OC foi estudada.

Quando se é observada as manifestações das proteínas entre os materiais estudados sem levar em conta a variável tempo, tem-se, como visto na Tabela 4 uma diferença estatisticamente significativa (p = 0,03) da manifestação da proteína OC, do Grupo Autógeno para o Grupo Biomaterial. Tendo o primeiro, a média dos Ranks (Média dos Ranks = 24,00) maior quando comparada ao do Grupo Biomaterial, isso mesmo com a mediana apresentando o mesmo valor.

A Tabela 5 apresenta a comparação da manifestação entre os materiais, em função do tempo e da proteína. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Porém é possível destacar que, na proteína OC no tempo de duas semanas, o Grupo Biomaterial apresentou uma mediana menor que o Grupo Autógeno, com uma significância próxima da aceita no presente trabalho (p = 0,09). O que sugere a necessidade de outros trabalhos que possam confirmar este achado ou mesmo refutá-lo.

DISCUSSÃO

Durante o planejamento para reabilitação com implantes dentais do paciente edêntulo, é necessária a observância da quantidade e qualidade do osso remanescente desse paciente[4]. Sendo identificada a deficiência, o profissional pode lançar mão de enxertos biológicos, de origens autógena, homógena e heterógena. O enxerto autógeno, onde o doador é o próprio receptor, é o padrão ouro. Ele é o único que possui propriedade osteogênica, ou seja, osteoblastos presentes no tecido produzem uma neoformação óssea no leito receptor, não produzindo qualquer tipo de reação imune. Porém as fontes do material são limitadas e se faz necessária uma segunda intervenção cirúrgica para retirada deste, aumentando a morbidade cirúrgica e os custos do procedimento[5]. O enxerto homógeno, em que o doador é da mesma espécie do receptor; e o heterógeno, em que o doador é de uma espécie diferente do receptor, possuem o risco de transmissão de doenças infecciosas e reação antigênica. Portanto, devido aos problemas relacionados com os enxertos de origem biológica, é de importância o estudo e desenvolvimento dos substitutos ósseos de origem sintética, que busquem se aproximar das propriedades benéficas dos enxertos autógenos, sem que o paciente sofra com as desvantagens desse material.

Vários biomateriais sintéticos tem sido testados com o intuito de restabelecer a espessura de rebordos atrofiados. Diante disso, nosso trabalho buscou elucidar quão satisfatório seria a integração do Bloco Bifásico (60% Hidroxiapatita, 40% β-TCP). Alguns trabalhos já vem investigando os resultados do uso desse biomaterial[12,13,14,15,16], em um trabalho[12] blocos de β-TCP foram usados em aumentos ósseos mandibulares em coelhos, onde o controle foi o bloco disponível comercialmente e o teste foi um bloco modificado hidrotermicamente, que possuía

menor porosidade e microestrutura em forma de bastonete. Os animais foram eutanasiados na 6ª, 12ª e 24ª semanas. Em relação a neoformação óssea o bloco controle apresentou na 6ª semana uma maior quantidade de neoformação óssea em seu interior comparados ao bloco teste, porém nas 12ª e 24ª semanas o bloco teste ultrapassou o controle nesse quesito. Os autores atribuíram o fato ao intenso colapso sofrido pelo bloco controle com significante reabsorção do material enxertado. No bloco teste, houve biorreabsorção do enxerto e subsequente substituição por osso neoformado, enquanto sua arquitetura original foi mantida durante o período de observação. Quando comparamos nossos resultados com os encontrados nesse trabalho, que utilizou o mesmo modelo animal, podemos observar o mesmo padrão de neoformação óssea entre os grupos controle. No nosso trabalho obtivemos uma porcentagem de 13,16% e 14,39% de osso neoformado na 2ª e 8ª semanas respectivamente do Grupo Biomaterial, comparados aos valores encontrados no grupo controle do trabalho dos autores supracitados de 10,71% e 12,31% quando avaliados na 6ª e 12ª semanas. O bloco teste apresentou um incremento na neoformação com o passar dos tempos testados se comportando de uma forma parecida com nosso Grupo Autógeno, talvez devido a sua maior densidade, que manteve a arquitetura externa, associado à uma microporosidade diferenciada.

Esses resultados corroboram com outro estudo[13], que buscaram investigar as diferenças na osteogênese e reabsorção em blocos de β-TCP e HA implantados no osso parietal de ratos. Os animais foram eutanasiados na 4ª, 8ª e 24ª semanas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na neoformação óssea nas semanas 4 e 8, porem na 24ª semana o bloco de HA apresentou um montante de osso neoformado estatisticamente significativo maior no seu interior quando

comparado com o bloco de β-TCP. O autor também associou essa deficiência na formação a fragmentação do bloco β-TCP, associada a sua reabsorção. Ainda nesse estudo, dois resultados devem ser levados em consideração: o teste de força compressiva realizado que mostrou que o bloco de HA possuía 3x mais força que o bloco de β-TCP; e o teste de solubilidade que demonstrou a maior solubilidade do bloco de β-TCP em relação ao bloco de HA. Esses achados sugerem o bom caminho adotado no nosso trabalho em usar um bloco que associa a capacidade mecânica-estrutural da HA com a capacidade do β-TCP em produzir uma angiogênese precoce devido a sua maior solubilidade e capacidade de penetração. Porém mesmo com esse reforço, o bloco ainda se fragmentou nos tempos mais tardios, o que indica uma formação óssea aquém do esperado, pois como o próprio autor sugere, a formação óssea no interior do bloco é um requisito para sua manutenção estrutural.

Uma lacuna observada no nosso trabalho foi um grupo que utilizasse o bloco sintético associado a suprimentos sanguíneos ou semeadura de células para que pudéssemos ter um resultado ponderado quando se compara o sintético ao natural. Autores sugerem[14] que células que crescem em um tubo de ensaio se comportem diferentes daquelas de substitutos ósseos in vivo. Então, requisitos como: semeadura de células, crescimento ósseo e substituição óssea por reabsorção devem ser considerados separadamente. Outro trabalho[15] estudou em mandíbulas de porco que foram eutanasiados na 8ª semana, dois blocos de β-TCP, um deles associados a proteínas morfogenéticas ósseas no tocante a formação óssea no seu interior. No momento da eutanásia, o bloco teste, ou seja, aquele associados as proteínas, obtiveram 22,1% de formação óssea contra 1,87% do bloco controle. Os autores sugerem que essa implantação precoce de blocos semeados por células

podem promover um ambiente mais propício para angiogênese aprimorando a deposição óssea no interior do bloco. Os autores ainda apontam um potencial para o biomaterial em novos estudos com maior tempo de implantação, já que esse estudo foi avaliado a osteogênese e angiogênese precoce. Talvez devido ao modelo animal usado, nosso bloco teste mostrou um maior potencial de formação óssea no seu interior. O defeito criado por esse trabalho (3 paredes), onde foi retirado um segmento da mandíbula do animal, deixando a área sem contato ósseo bem maior que a área de contato ósseo, deve ter sido o principal motivo desse resultado tão negativo do bloco controle. Porém, há de se observar o potencial do bloco testado de formar osso num defeito tão crítico, interessante observar os resultados desse bloco teste numa área de maior contato ósseo. Outro motivo que pode ter contribuído para o resultado negativo foi a fixação do bloco realizada apenas por suturas, ao contrário do nosso trabalho que foram utilizadas fixações rígidas com parafusos. Ainda podemos associar o fato à degradação e ao colapso sofrido pelo bloco de β-TCP quando utilizado sem associação com nenhum outro biomaterial[13, 16].

Esse estudo[16] testou um bloco bifásico semelhante ao usado no nosso estudo, porém de marca comercial diferente, associado a uma câmara de PLA/PGA. Em um grupo a câmara estava preenchida com sangue e a outra estava vazia. A justificativa do autor em usar esse bloco bifásico foi que os componentes da HA suportam a massa do enxerto com suas partículas duras, e a rápida degradação do β-TCP aumenta a substituição dos seus produtos de degradação por vasos sanguíneos e osso lamelar maduro. O lado teste mostrou significativamente maior quantidade de osso formado que o lado controle. Dos 22 espécimes estudados, 11 de cada grupo, 14 mantiverem sua estrutura externa (10 do teste e 4 do controle), as

outras 8 desmoronaram (7 do controle e 1 do teste), sendo que as do teste desmoronaram parcialmente, e a do controle teve um desabamento severo. Os autores realçam a vantagem de se usar esses dois materiais associados a componentes celulares para reconstruções ósseas alveolares. Esse trabalho vem demonstrar quanto o incremento celular vem ajudar na neoformação óssea. Quando comparamos esse estudo (coelhos eutanasiados em 12 semanas) com o nosso trabalho, observamos uma grande diferença quando comparamos os grupos controle. No nosso estudo tivemos as 2ª e 8ª semanas 13,16% e 14,39% de neoformação óssea contra 0,5% a 9,5% de osso encontrado nas câmaras na 12ª semana deste trabalho. O que leva-se a pensar que a câmara sem nenhum preenchimento celular trouxe um efeito negativo isolando o bloco do ambiente, impedindo que houvesse contato celular. No grupo teste o autor encontrou neoformação óssea de 11,5% a 37,5%, sendo comparado tanto ao nosso grupo controle nos valores mais baixos, quanto ao nosso grupo teste nos valores mais alto, evidenciando um potencial para uma formação óssea melhor, porém sem a confiabilidade da osteogênese proveniente dos enxertos autógenos.

CONCLUSÃO

- O bloco testado manteve valores de neoformação óssea inferiores ao bloco controle, demonstrando menor potencial de integração.
- A sua composição mostrou uma interação celular satisfatória, confiável para reconstruções alveolares em espessura com o intuito de preenchimento.
- Mais estudos com diferentes modelos de estudo e métodos devem ser analisados, de preferência associados a componentes celulares com o intuito de acharmos um substituto ideal para enxertos autogénos.

REFERÊNCIAS

1. Limeira Júnior FA: Avaliação do Reparo Ósseo com o Uso de Osso Anorgânico e Membrana Reabsorvível após Irradiação com Laser Diodo 830nm. Salvador, 2001. 177p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, 2001.

2. Reddi AH: Extracelular matrix and bone morphogenetic proteins: molecular approaches to dentin and periodontal repair. In*:* GENCO, R. et al. Molecular pathogenesis of periodontal disease. Washington: American Society for Microbiology 1994;35:439-44.

3. Sicca CM et al.: Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. Rev. FOB 2000;8(1/2);1-10.

4. Smiler D, Soltan M: The Bone-Grafting Decision Tree: A Systematic Methodology for Achieving New Bone. Implant Dent 2006;15(2);122-28.

5. Rios ALBB: Comportamento Biológico de Implantes de Osso Bovino Anorgânico em Arco Zigomático de Ratos. Estudo Histológico. Rev. Odontol. UNESP 1996;25;87-101.

6. Tallgreen A: The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed longitudinal study covering 25 years. J Prosthet Dent 1972;27;120-132.

7. Smiler D: Bone grafting: Materials and modes of action. Pract Periodontics Aesthet Dent 1998;8;413-16.

8. Boyne PJ et al.: De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg 2005 ;63 ;1693-1707.

9. Kim JW et al.: Volumetric bone regenerative efficacy of biphasic calcium phosphate-collagen composite block loaded with rhBMP-2 in vertical bone augmentation model of a rabbit calvarium. J Biomed mater Res A 2012;100(12);3304-13.

10. Pansegrau KJ et al. : A comparative study of osseointegration of titanium implants in autogenous and freeze-dried bone grafts. J Oral Maxillofac Surg 1998;56;1067-74.

11. Zecha PJ et al.: Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rats. Int J Oral Maxilofac Surg 2011;40(5);533-42.

12. Ono D et al.: Lateral bone augmentation with newly developed β-tricalcium phospate block: an experimental study in the rabbit mandible. Clin Oral Impl Res 2011;22;1366-71.

13. Fujita R et al.: Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and β-tricalcium phospate blocks. J Oral Maxillofac Surg 2003;61;1045-53.

14. Bohner M et al.: Synthesis and characterization of porous β-tricalcium phosphate blocks. Biomaterials 2005;26;6099-6105.

15. Konopnicki S et al.: Tissue-Engineered boné with 3-dimensionally printed β-tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: An in vivo pilot in a porcine mandible model. J Oral Maxillofac Surg 2015;73;1016.e1-1016.e11.

16. Almasri M, Altalibi M. Efficacy of reconstruction of alveolar bone using an alloplastic hydroxyapatite tricalcium phosphate graft under biodegradable chambers. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2011;49;469-473.

ANEXOS

Anexo - A

JOMI

The International Journal of
ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS

GUIDELINES FOR AUTHORS

MANUSCRIPT SUBMISSION
Submit manuscripts via JOMI's online submission service:
www.manuscriptmanager.com/jomi
Manuscripts should be uploaded as a 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 on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE 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 in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES
All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

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 http://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.** The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.
- **Article text.** Currently there is no article page limit (within reason).
- **Acknowledgments.** Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Legends.** Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- **Tables.** Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- **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 should be included parenthetically at first mention.
- **Numbers.** Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

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. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. Int J Oral Maxillofac Implants 2010;25:525–531.

Book reference style:
1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Chicago: Quintessence, 1999:269–286.

ARTICLE ACCEPTANCE
Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to:

Managing Editor
JOMI
Quintessence Publishing Co, Inc
4350 Chandler Drive
Hanover Park, IL 60133

Email: jomi.submit@quintbook.com

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES
When preparing final images to send, consider the following points:
- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM
The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

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, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS
Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.

Anexo – B

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS araçatuba
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

FLS. 69
PROC. 11301/13
RUB.

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação comparativa do processo de reparo de bloco sintético bifásico, e do osso autógeno. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em coelhos"**, Processo FOA nº 2013-01113, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 16 de dezembro de 2013.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Abril de 2015.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Maio de 2015.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Comparative evaluation of the block synthetic biphasic repair, and autogenous bone. Histological, histometric and immunohistochemical study in rabbits"**, Protocol FOA nº 2013-01113, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 16, 2013.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 30, 2015.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 30, 2015.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça – CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo – C

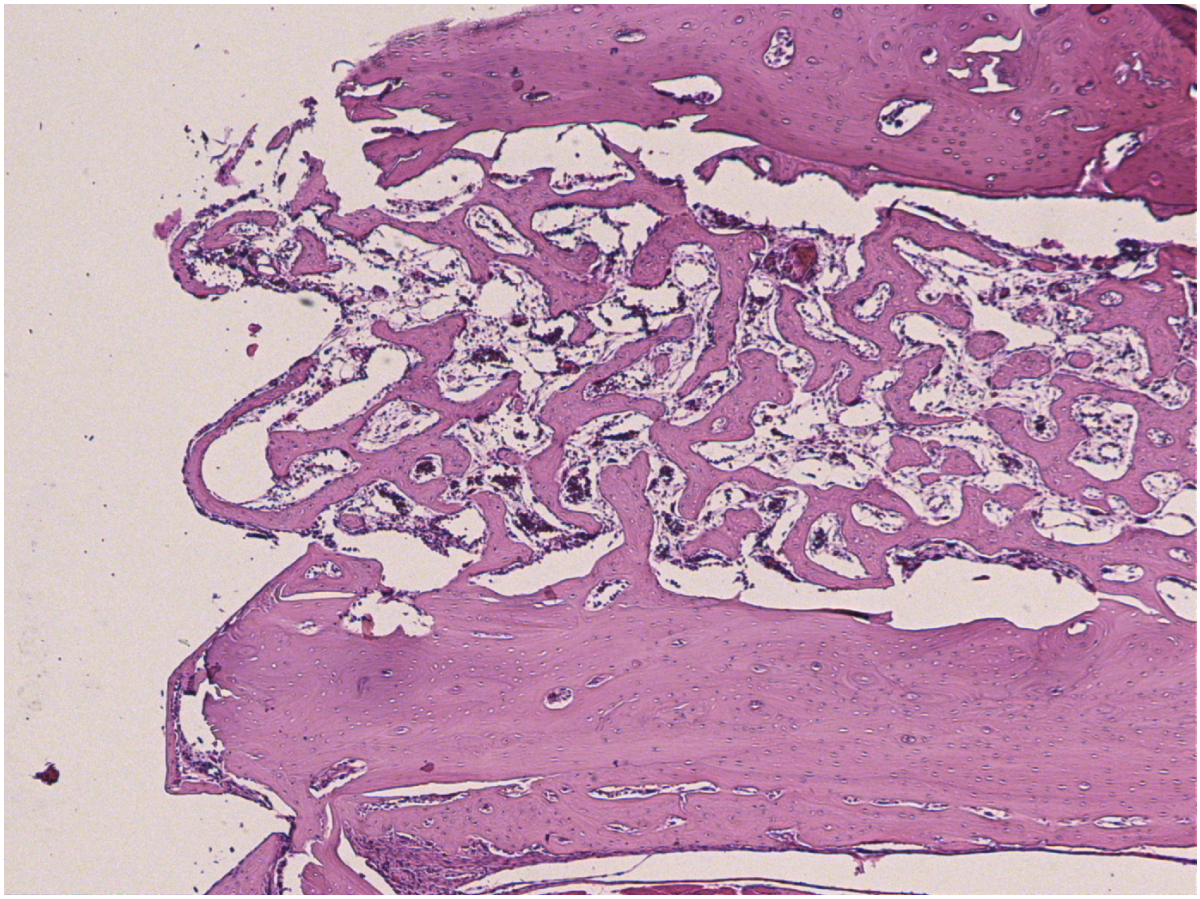

Figura 2. 63x. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor incorporada, com trabéculas ósseas.

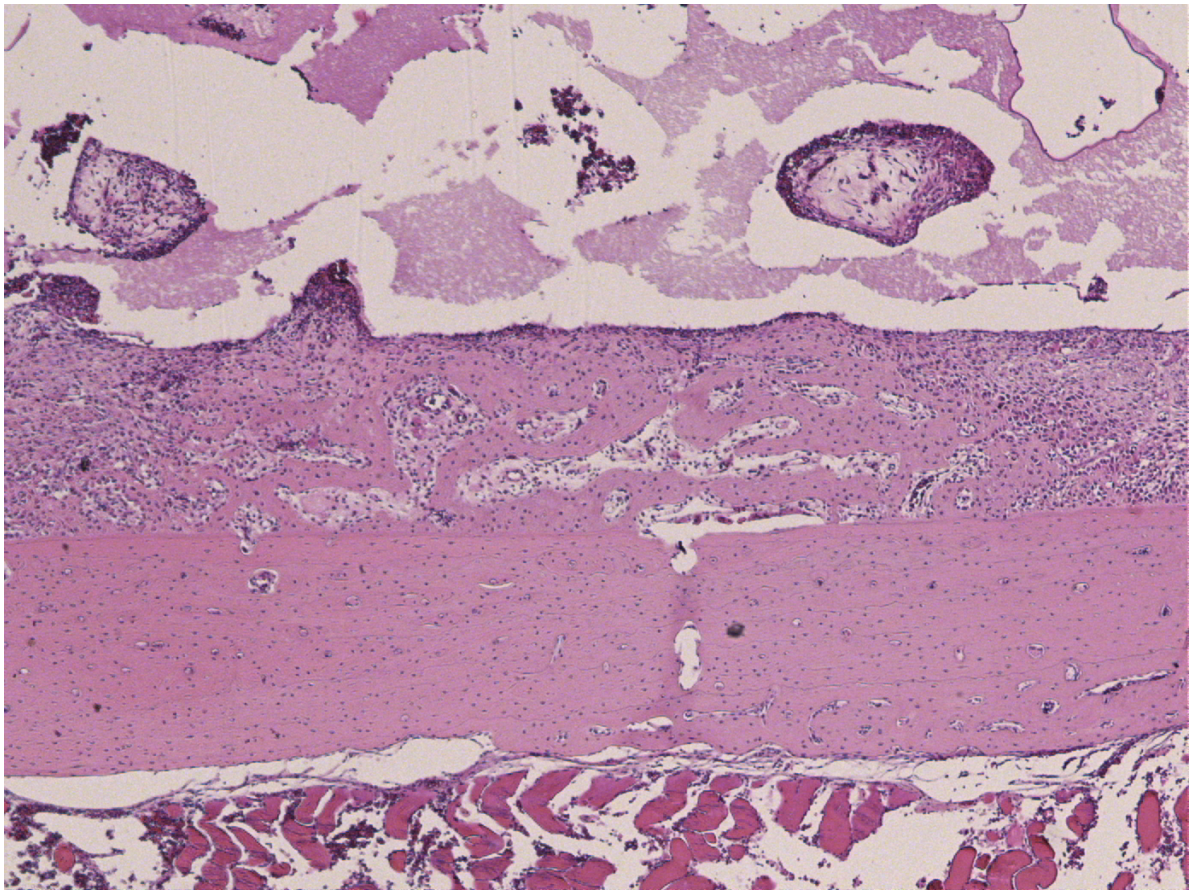

Figura 3. 63x. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor sem incorporação, com infiltrado inflamatório associado a região e o bloco parcialmente degradado.

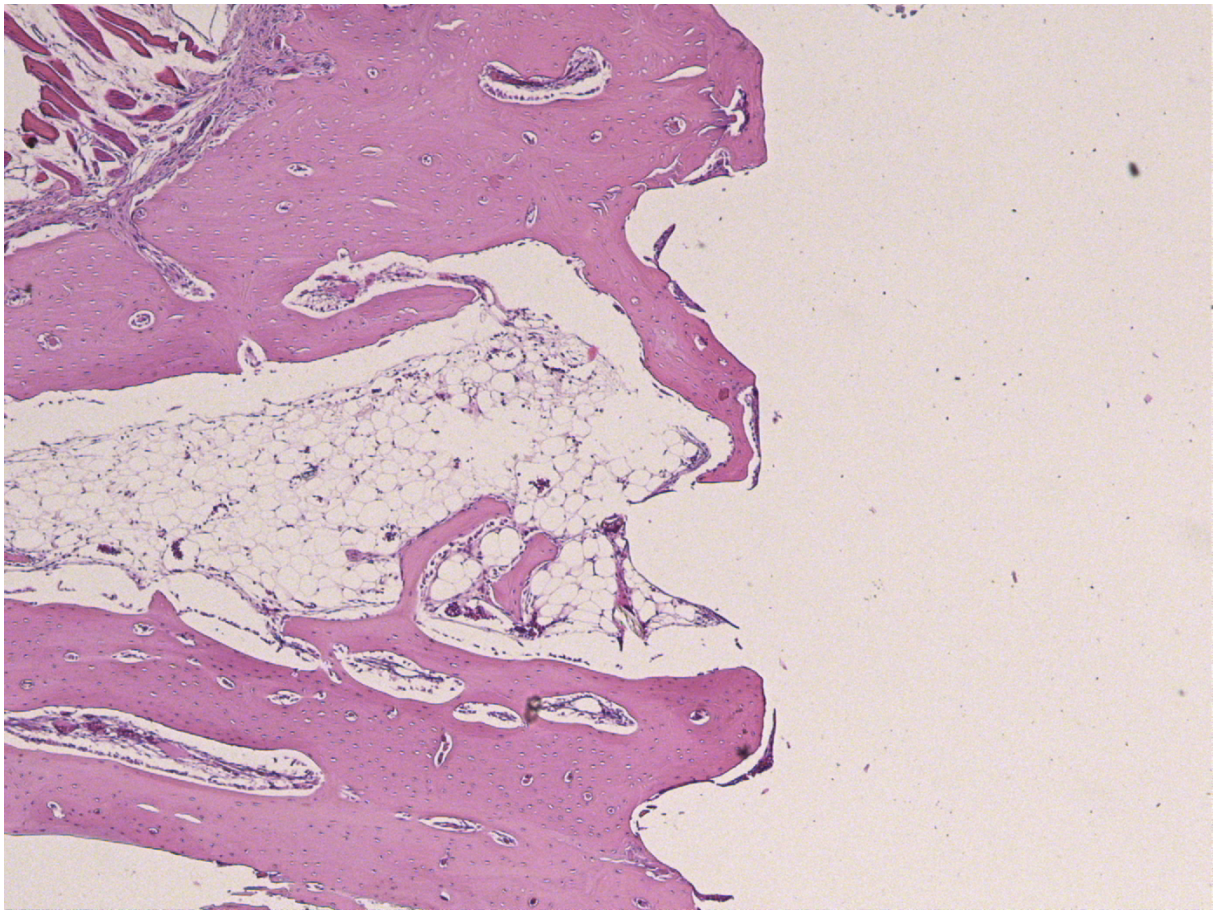

Figura 4. 63x. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor incorporada, com trabéculas ósseas e células adiposas associadas a região.

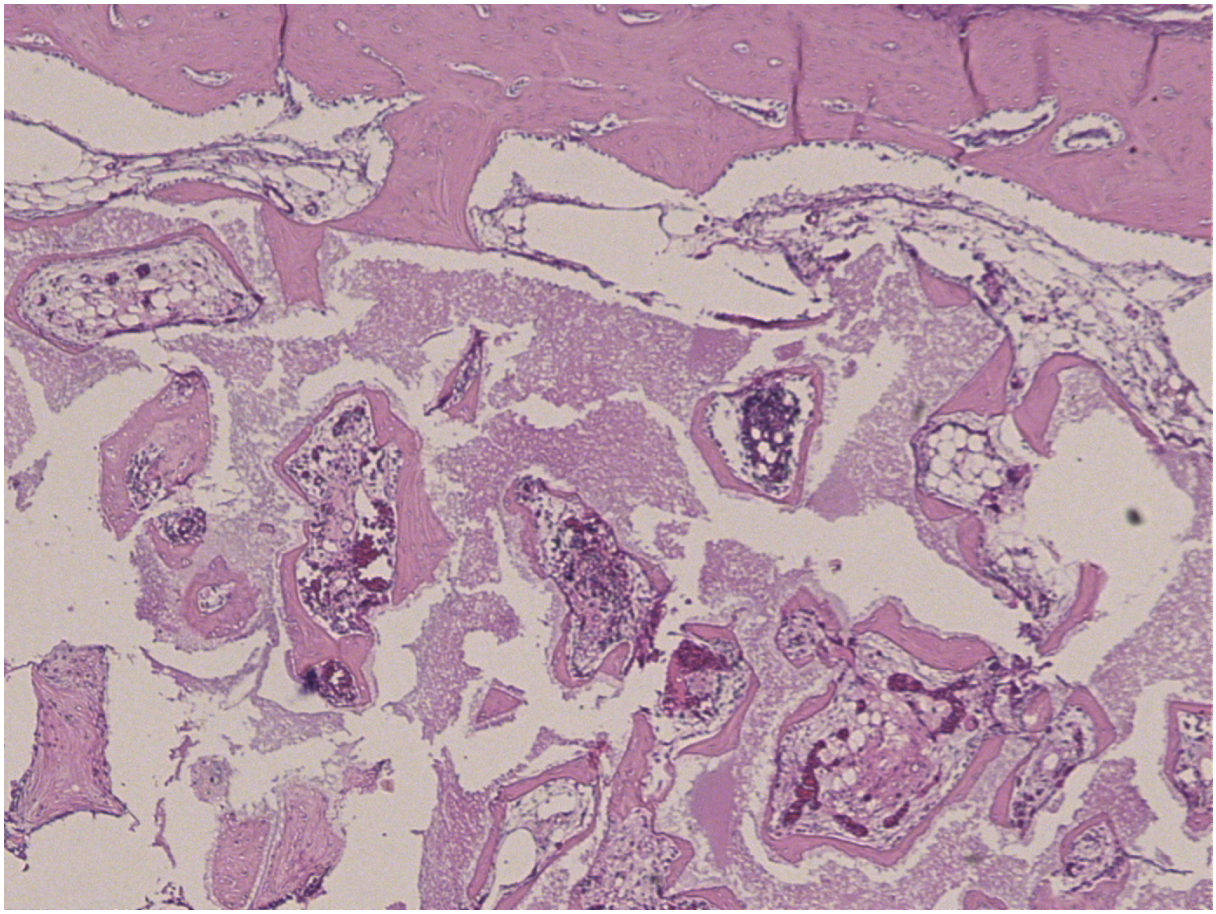

Figura 5. 63x. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado a interface enxerto/leito receptor sem incorporação, com infiltrado inflamatório associado e poucas trabéculas ósseas associadas a região e o bloco parcialmente degradado.

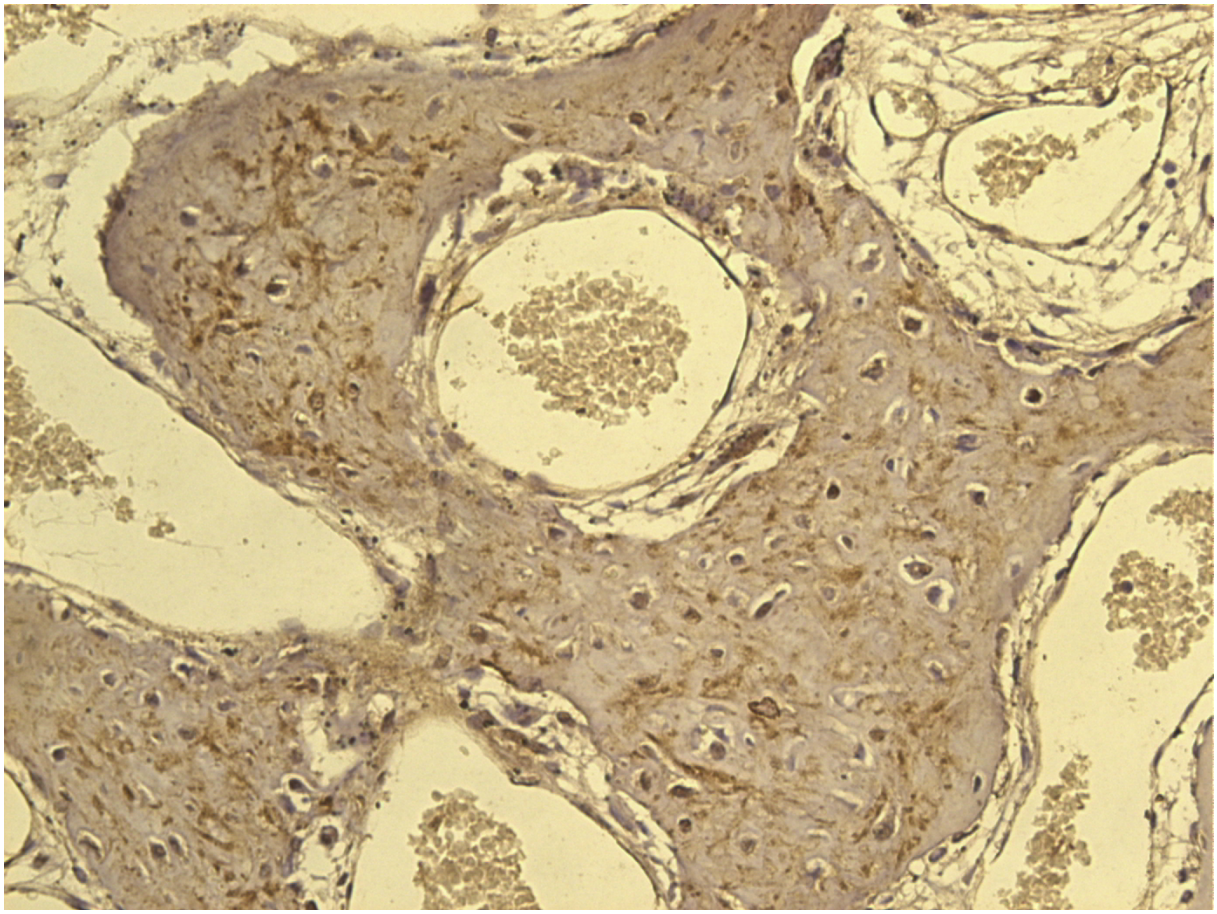

Figura 6. 250x. OC. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea.

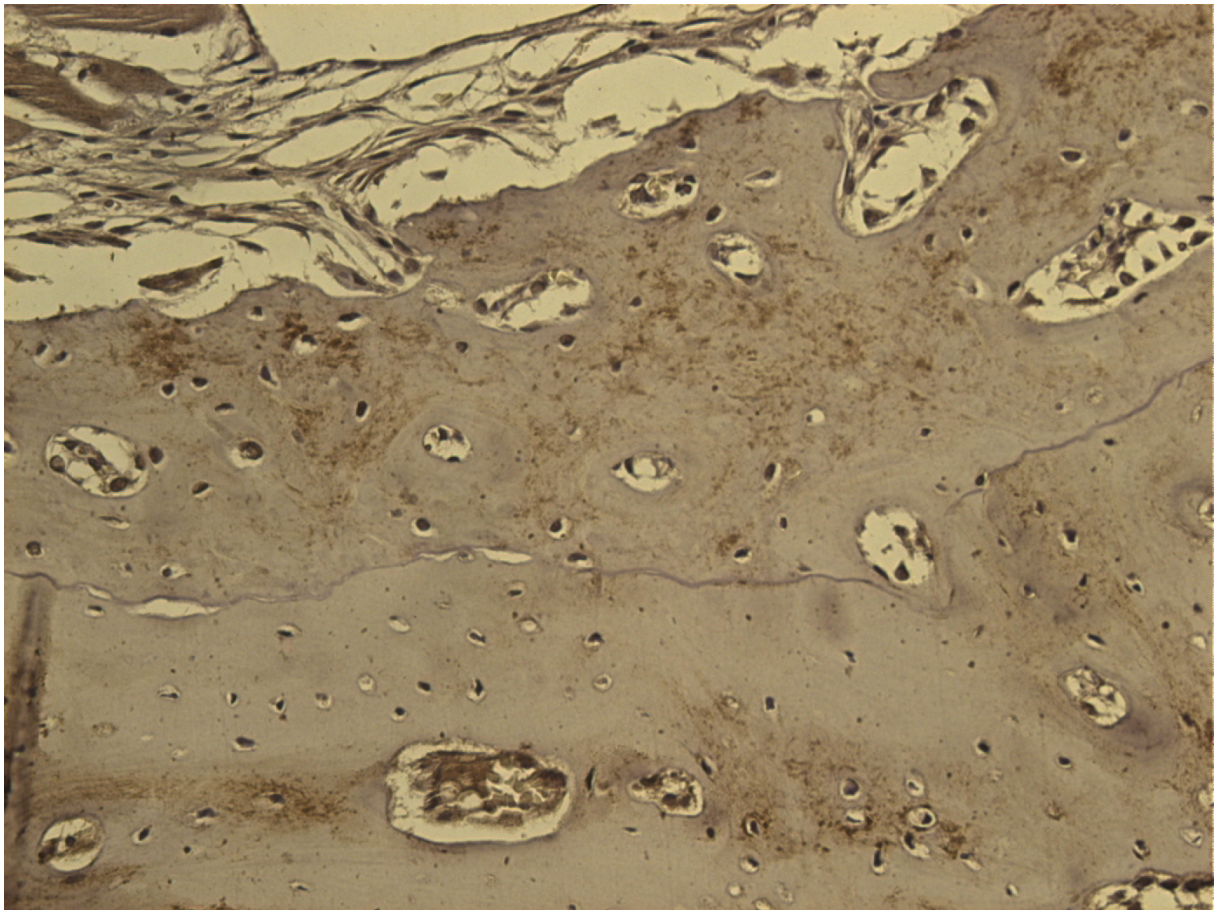

Figura 7. 250x. OC. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão.

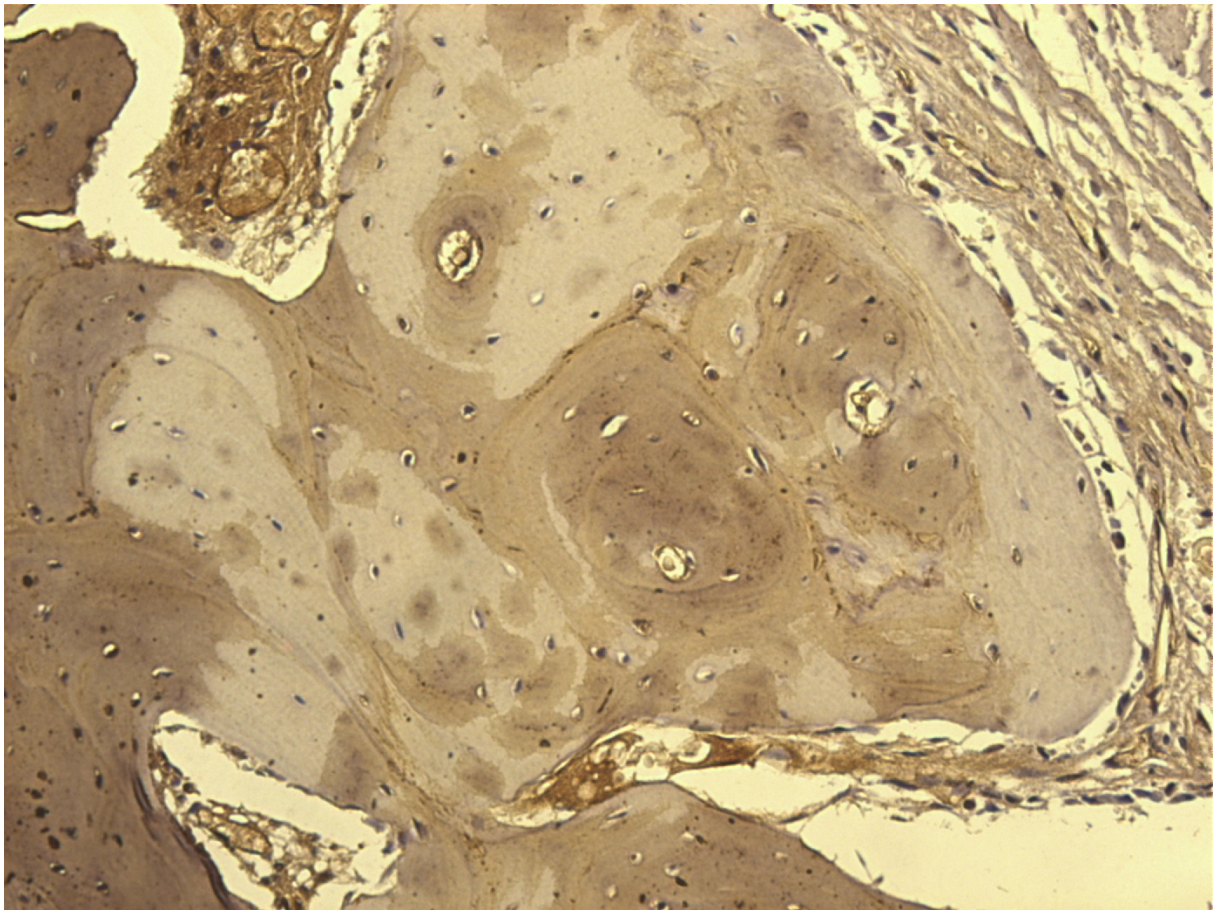

Figura 8. 250x. OC. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação de moderada a intensa (Score 2/3) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea.

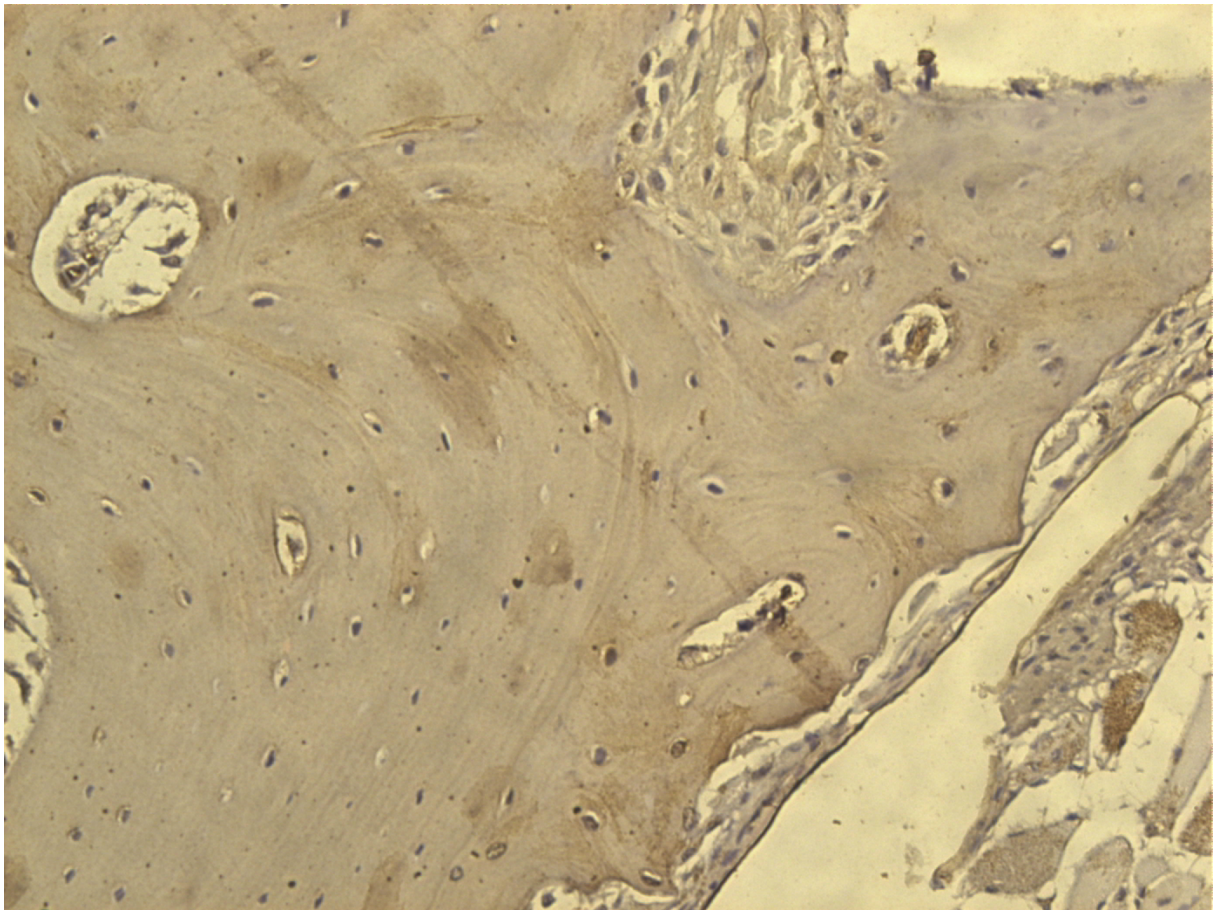

Figura 9. 250x. OC. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação de deposição óssea.

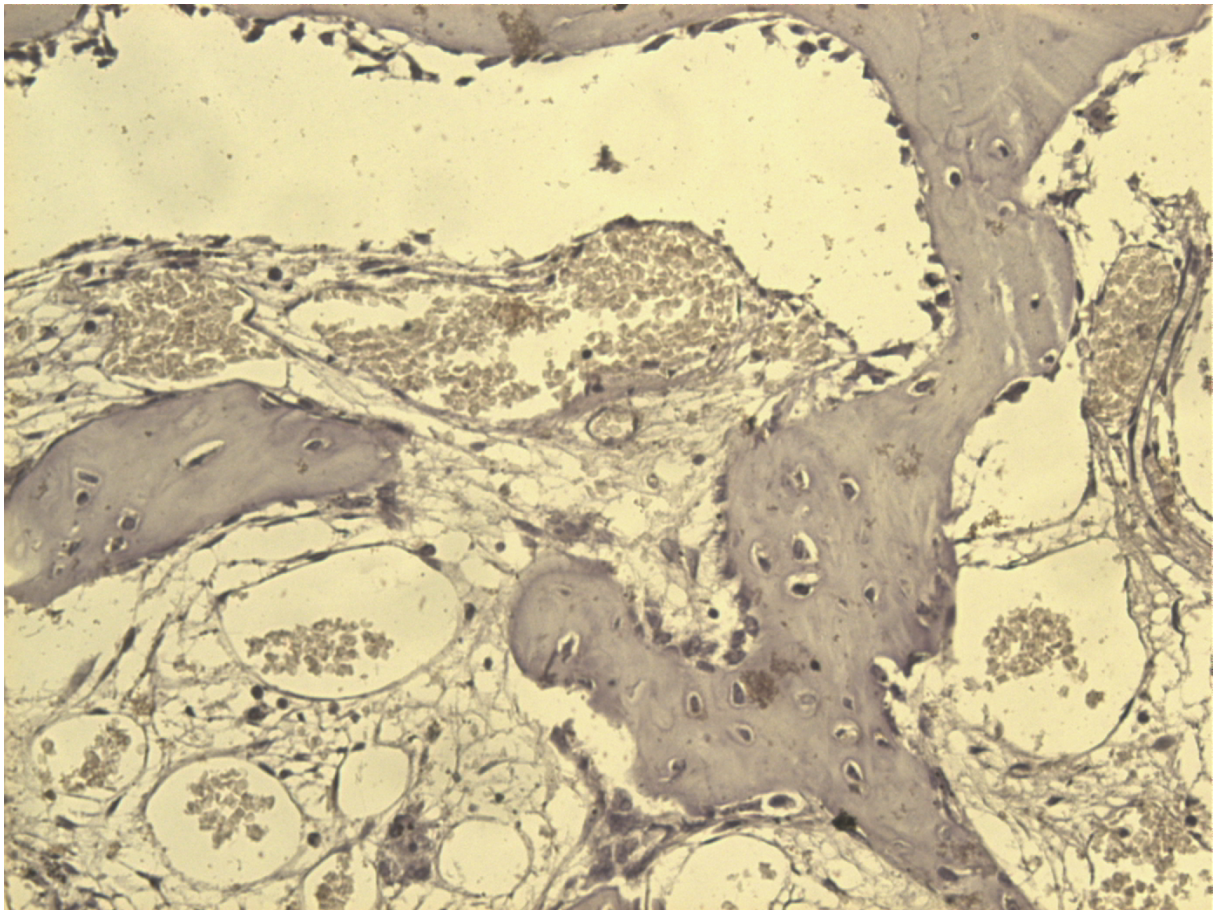

Figura 10. 250x. TRAP. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação moderada (Score 2) para a enzima em questão demonstrando uma ação osteoclástica, sugerindo substituição óssea.

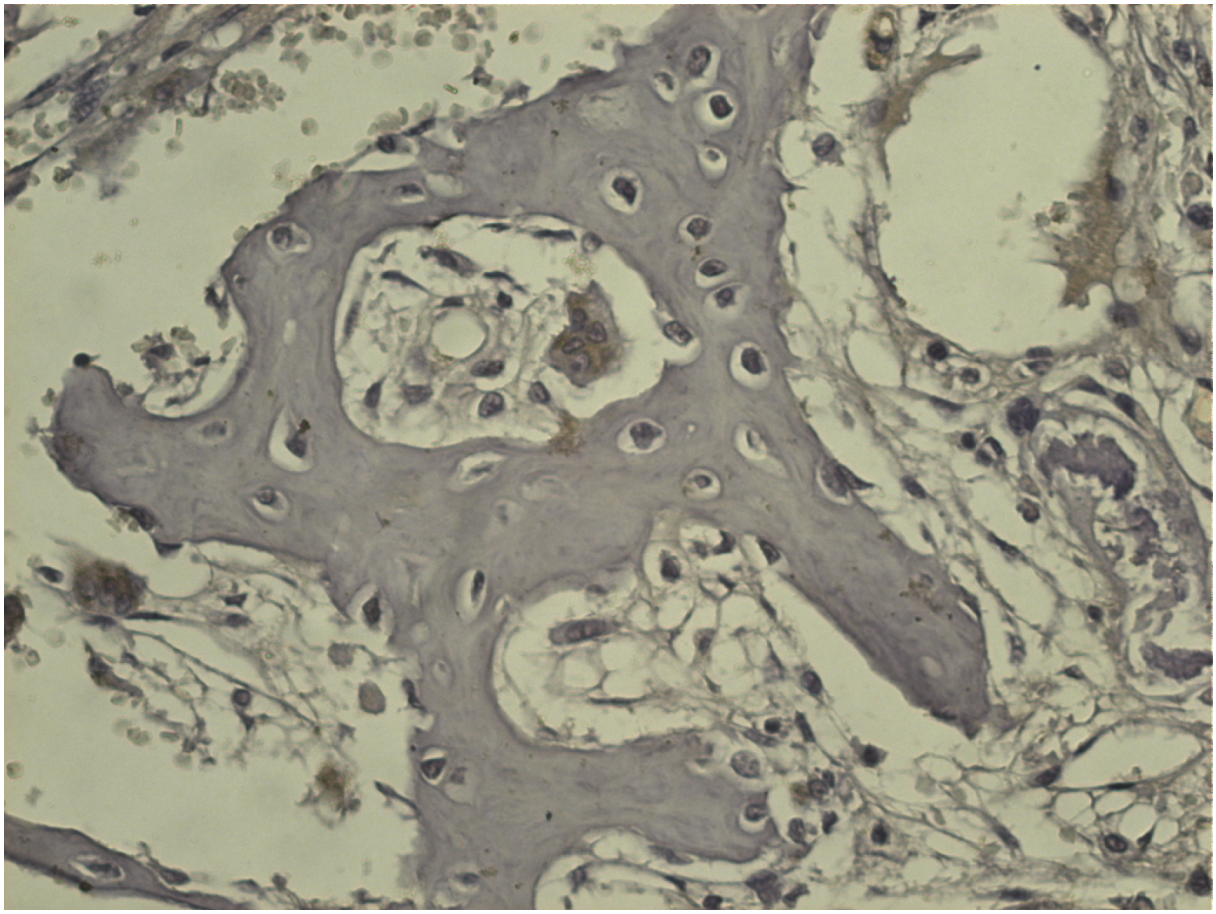

Figura 11. 400x. TRAP. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 2 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação de leve a moderada (Score 1/2) para a enzima em questão demonstrando uma menor ação osteoclástica.

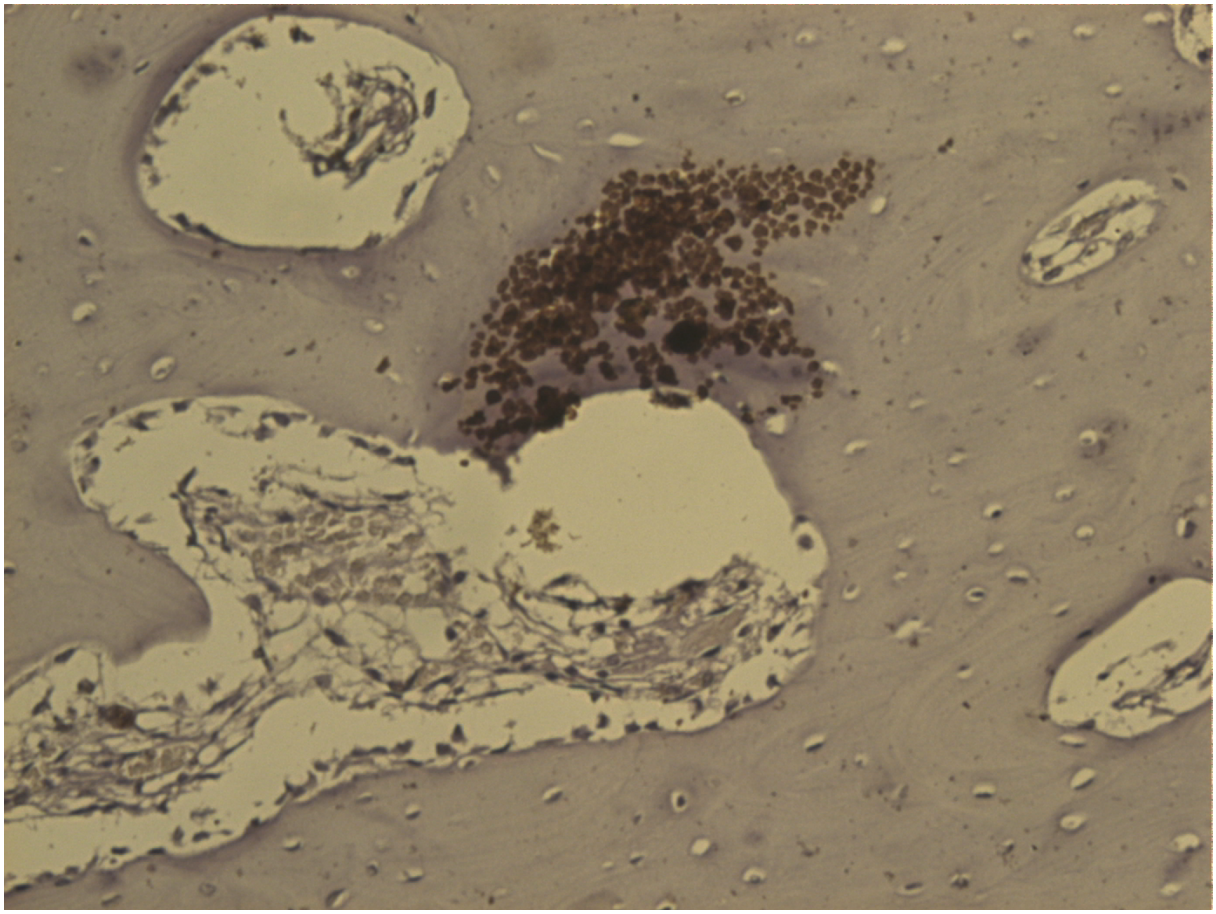

Figura 12. 400x. TRAP. Representa o Grupo Autógeno no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão demonstrando uma menor ação osteoclástica.

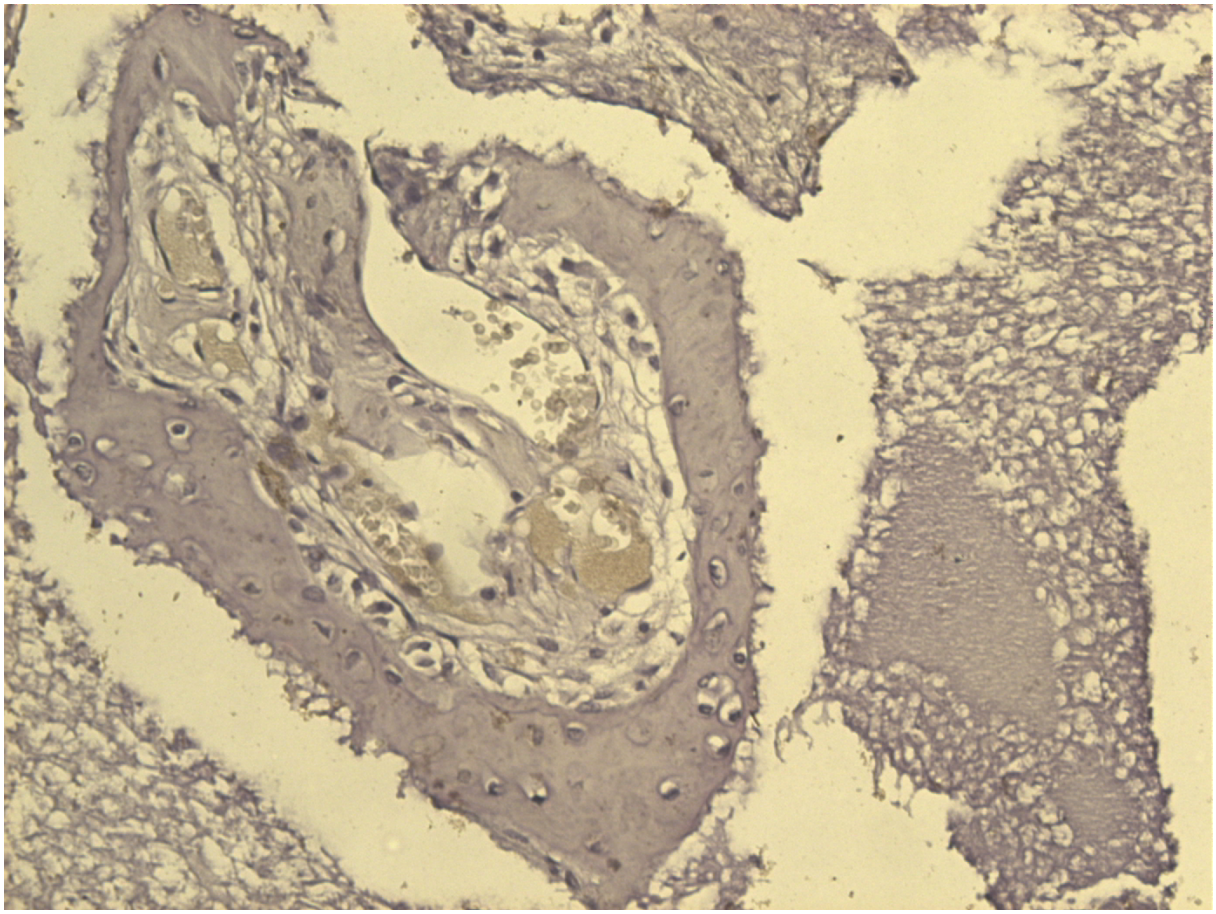

Figura 13. 250x. TRAP. Representa o Grupo Biomaterial no tempo de 8 semanas de eutanásia onde pode ser observado uma marcação leve (Score 1) para a enzima em questão demonstrando uma ação osteoclástica.

Anexo - D

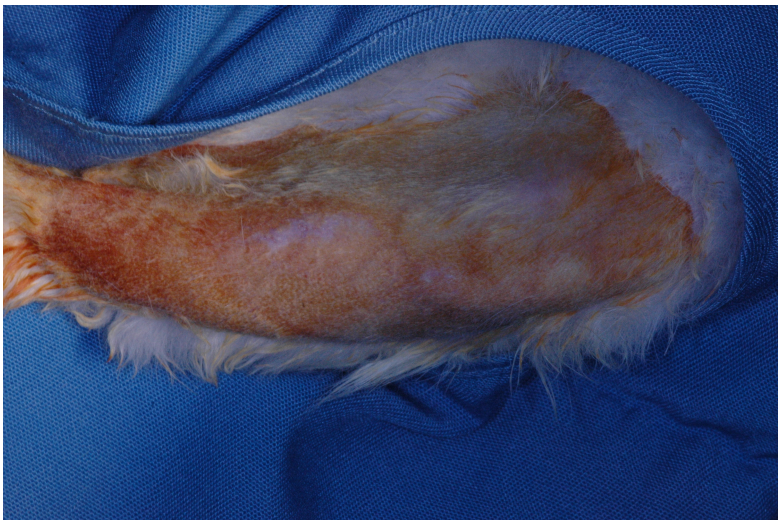

Figura 14. Tíbia tricotomizada, antissepsia realizada.

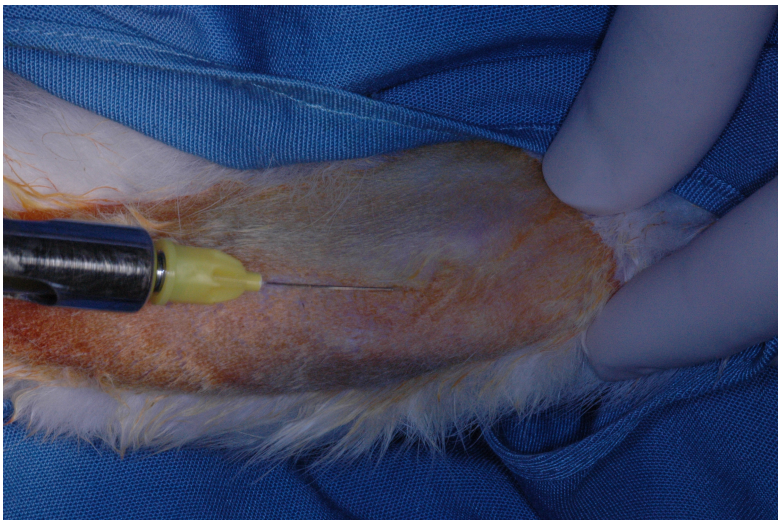

Figura 15. Tíbia tricotomizada sendo anestesiada para vasoconstrição local.

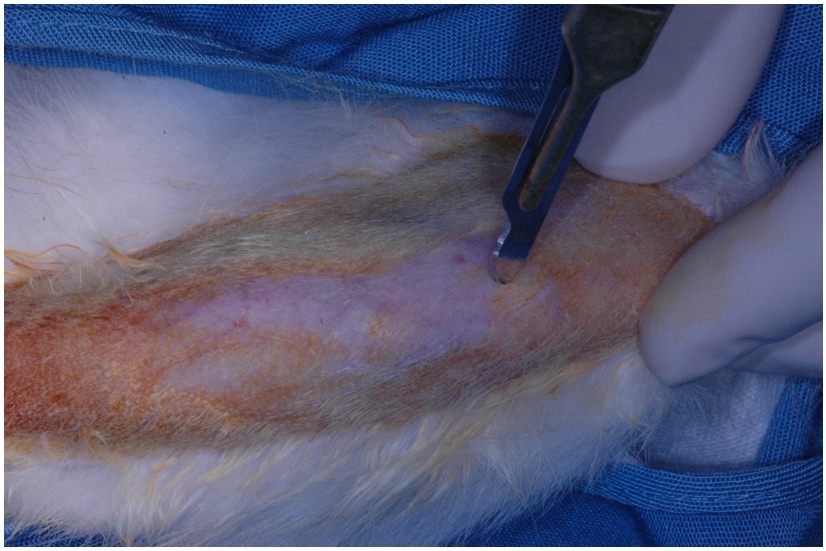

Figura 16. Tíbia sendo incisada por planos.

Figura 17. Tíbia sendo incisada por planos.

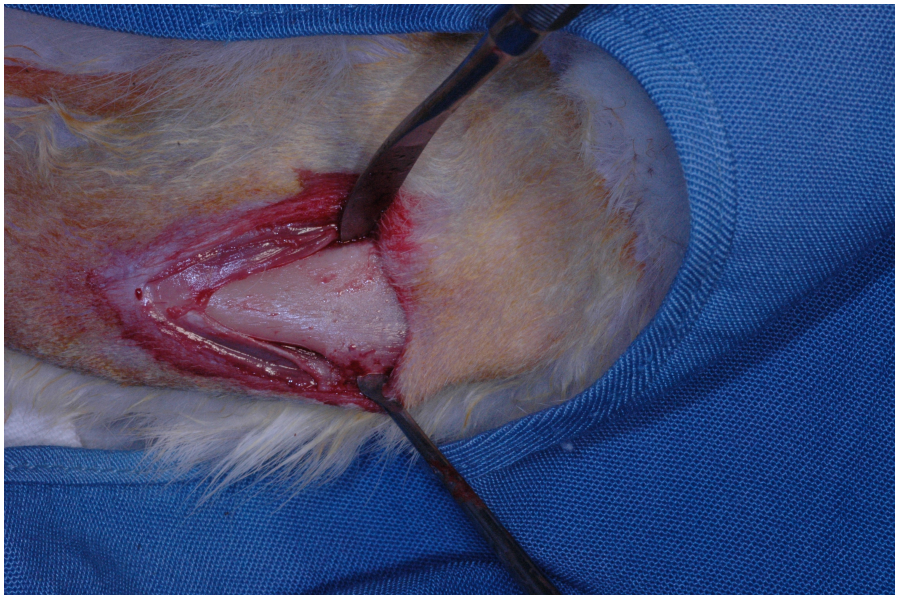

Figura 18. Tíbia exposta para retirada de enxerto autógeno com broca trefina de 8mm.

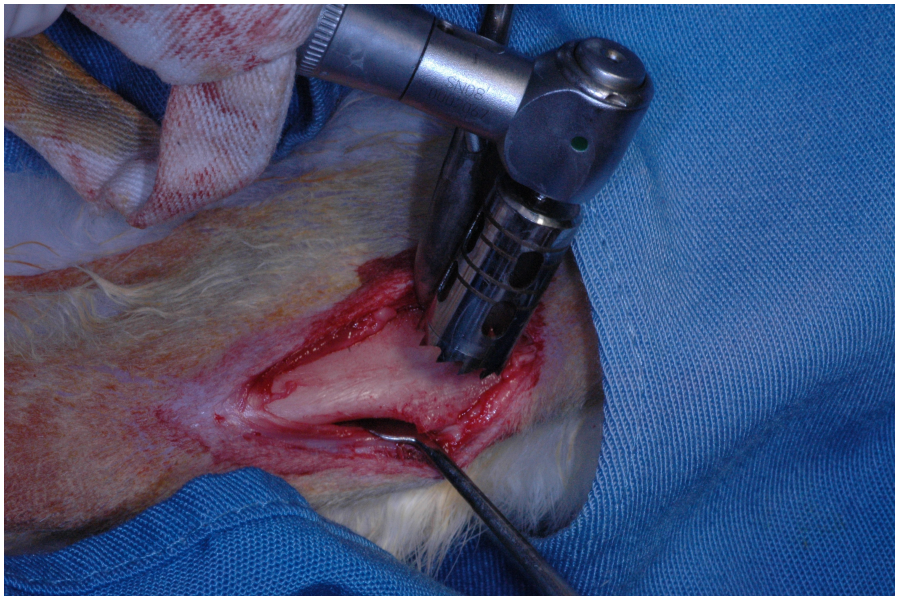

Figura 19. Tíbia exposta para retirada de enxerto autógeno com broca trefina de 8mm.

Figura 20. Defeito criado para retirada do bloco de enxerto autógeno.

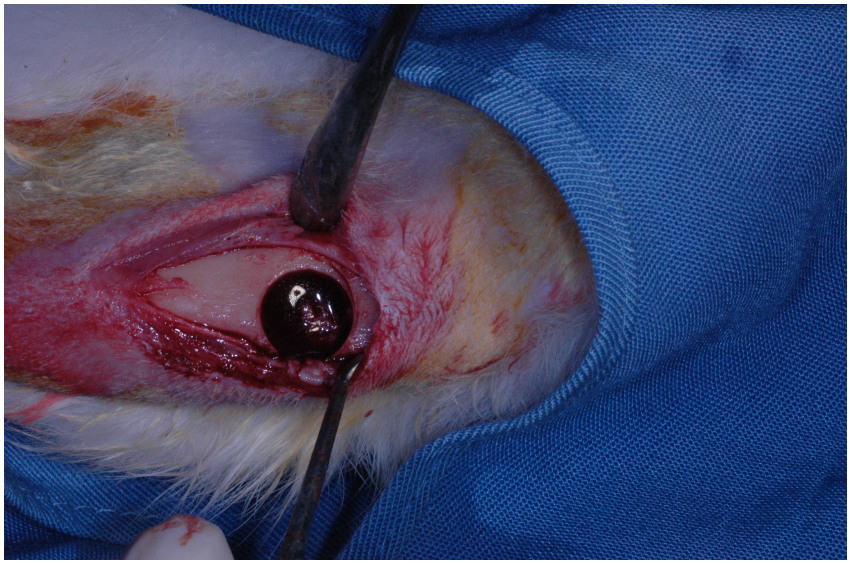

Figura 21. Defeito criado e enxerto autógeno retirado para implantação no leito receptor.

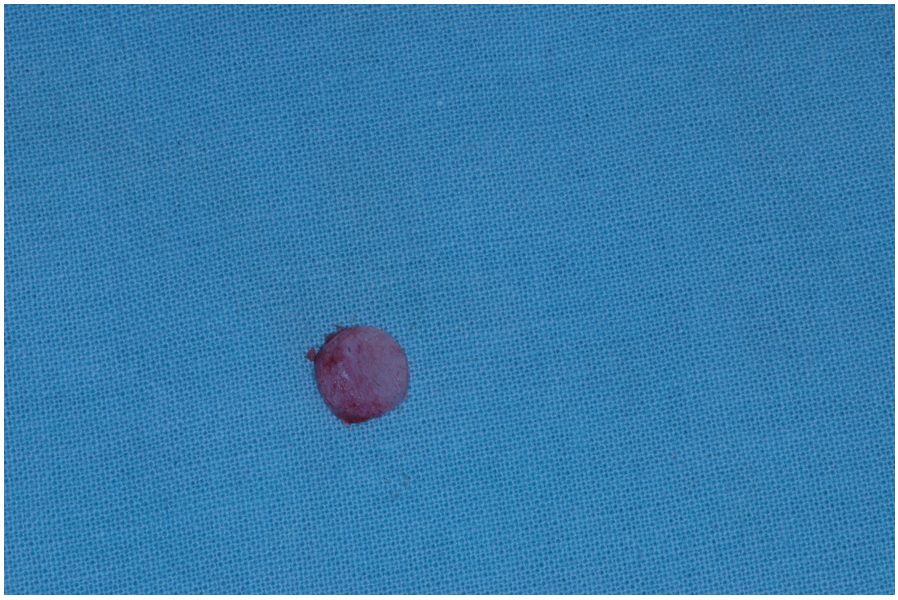

Figura 22. Bloco de enxerto autógeno.

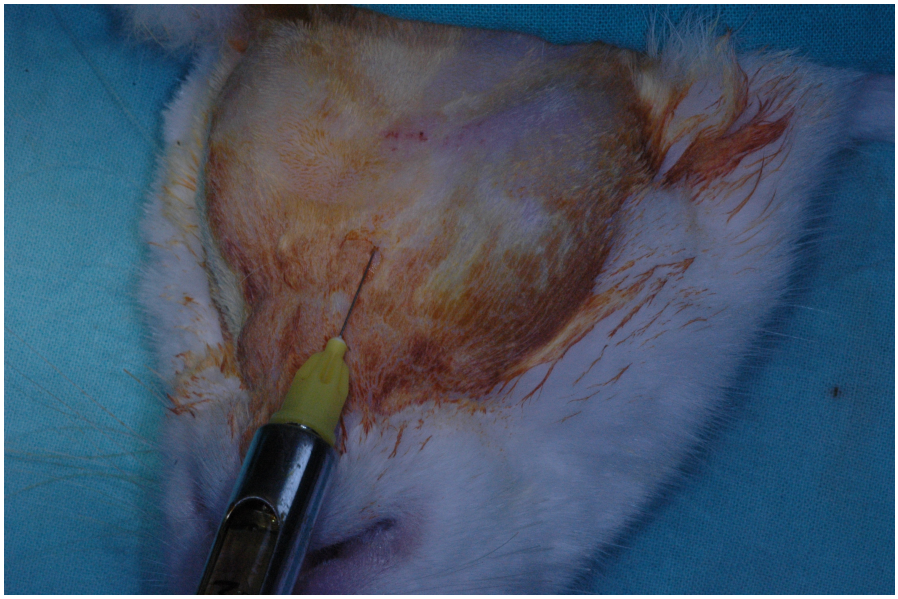

Figura 23. Mandíbula sendo anestesiada para acesso ao leito receptor.

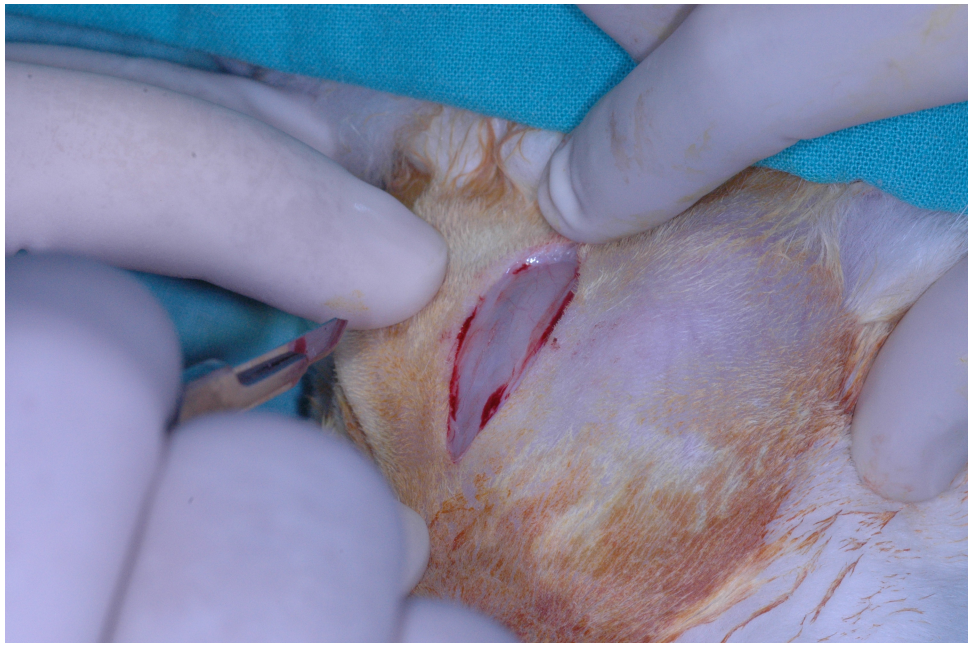

Figura 24. Incisão feita por planos.

Figura 25. Dissecção para acessar o leito receptor.

Figura 26. Dissecção realizada sobre a margem mandibular onde será fixado o bloco de enxerto autógeno. Ramo mandibular esquerdo.

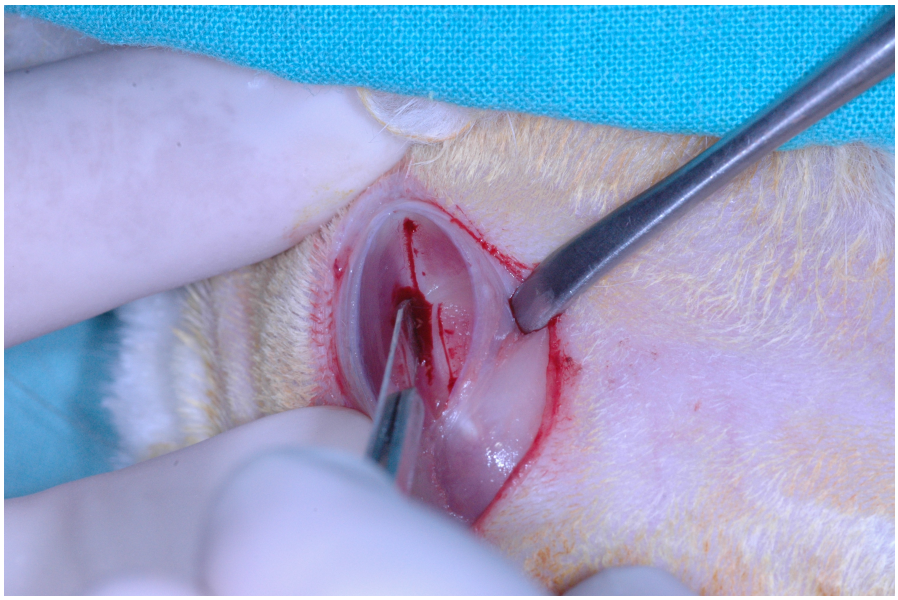

Figura 27. Incisão realizada sobre a margem mandibular onde será fixado o bloco de enxerto autógeno. Ramo mandibular esquerdo.

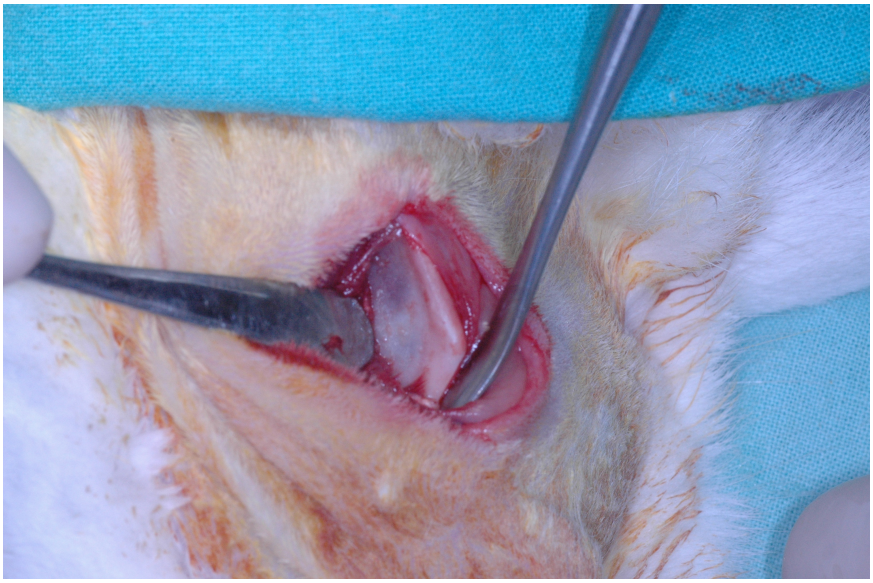

Figura 28. Mandíbula esquerda exposta para recebimento do bloco de enxerto autógeno.

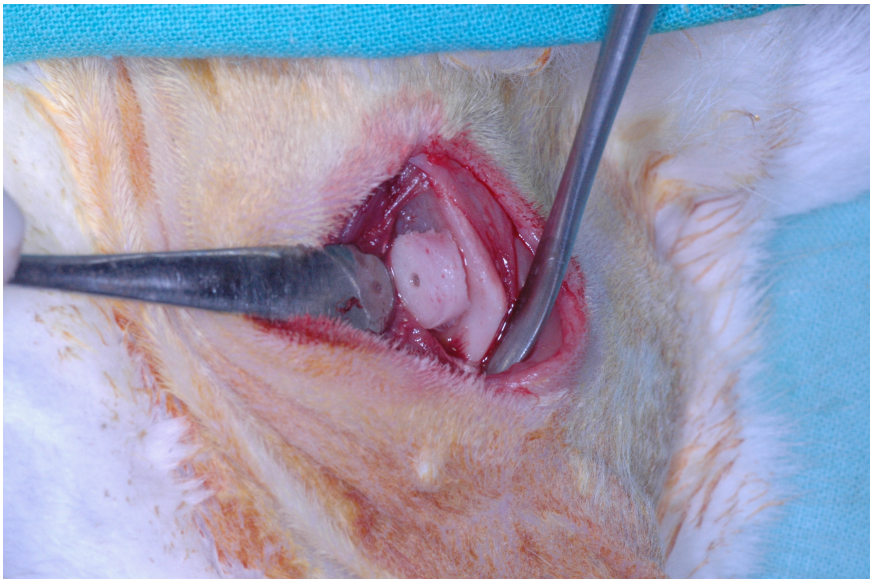

Figura 29. Bloco de enxerto autógeno posto em posição.

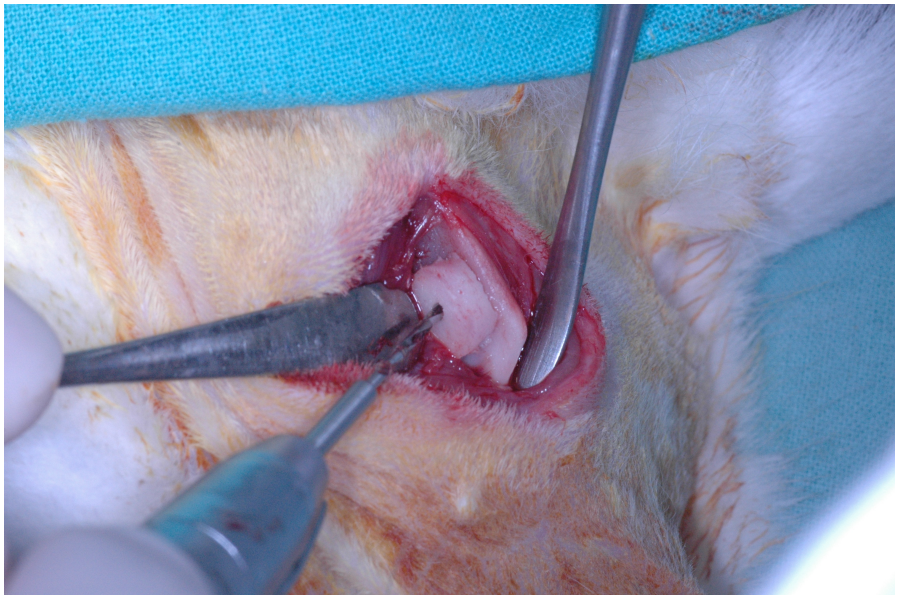

Figura 30. Bloco de enxerto autógeno sendo fresado em posição no leito receptor.

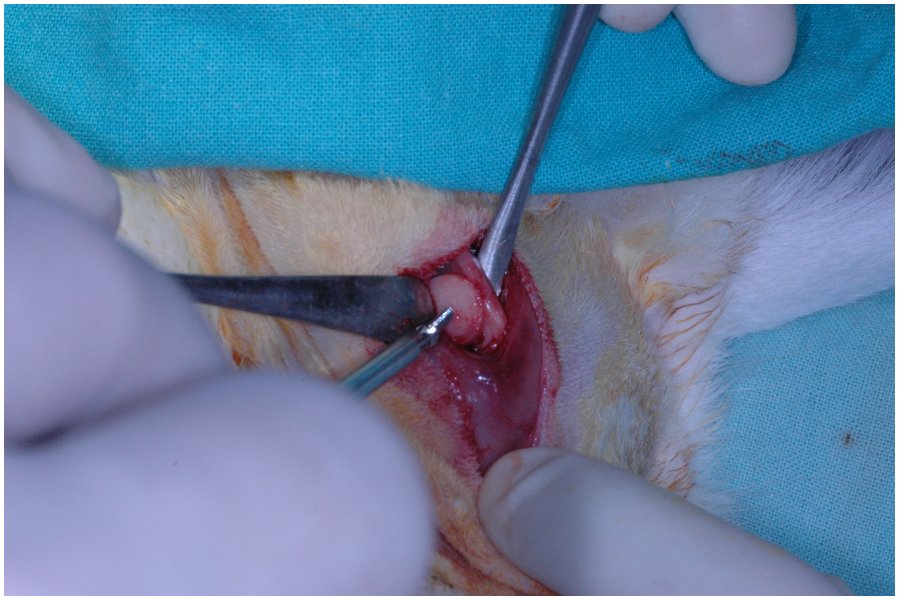

Figura 31. Bloco de enxerto autógeno sendo parafusado junto ao leito receptor.

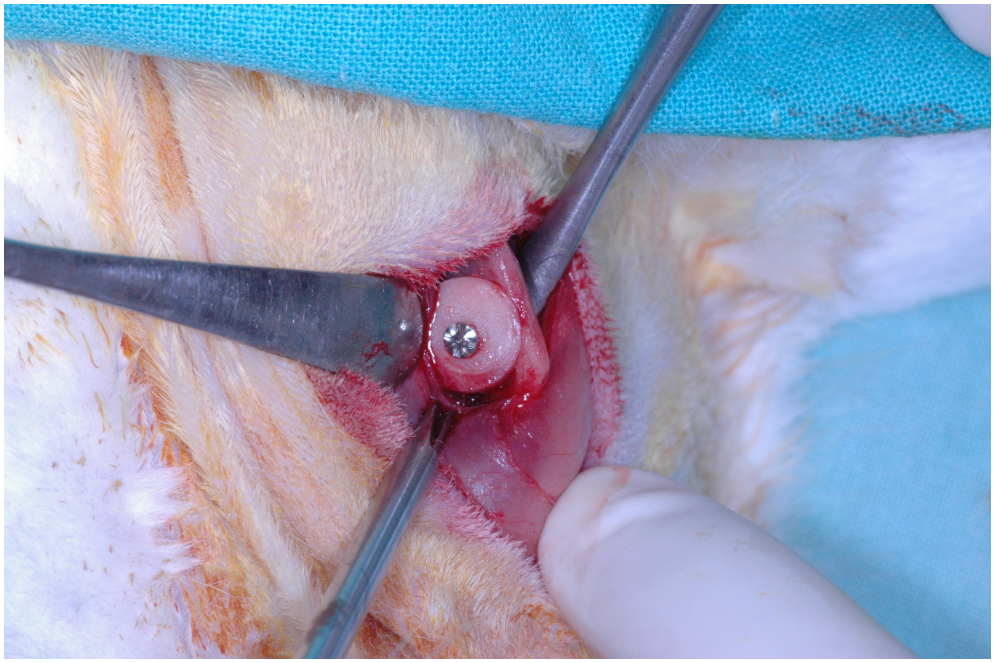

Figura 32. Bloco de enxerto autógeno parafusado em posição no leito receptor.

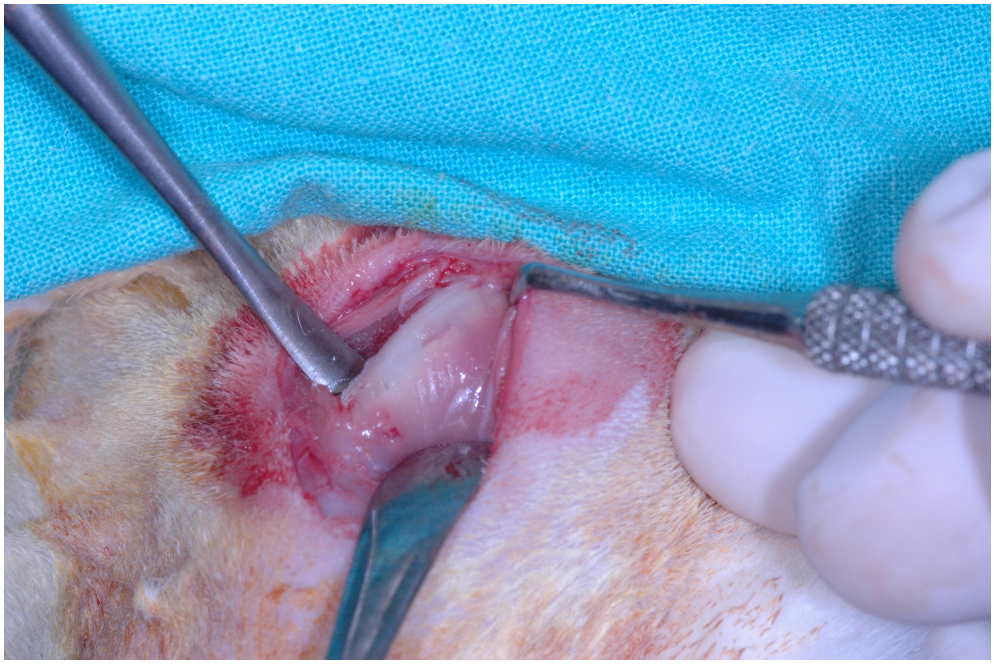

Figura 33. Exposição do ramo mandibular direito para recebimento do bloco bifásico.

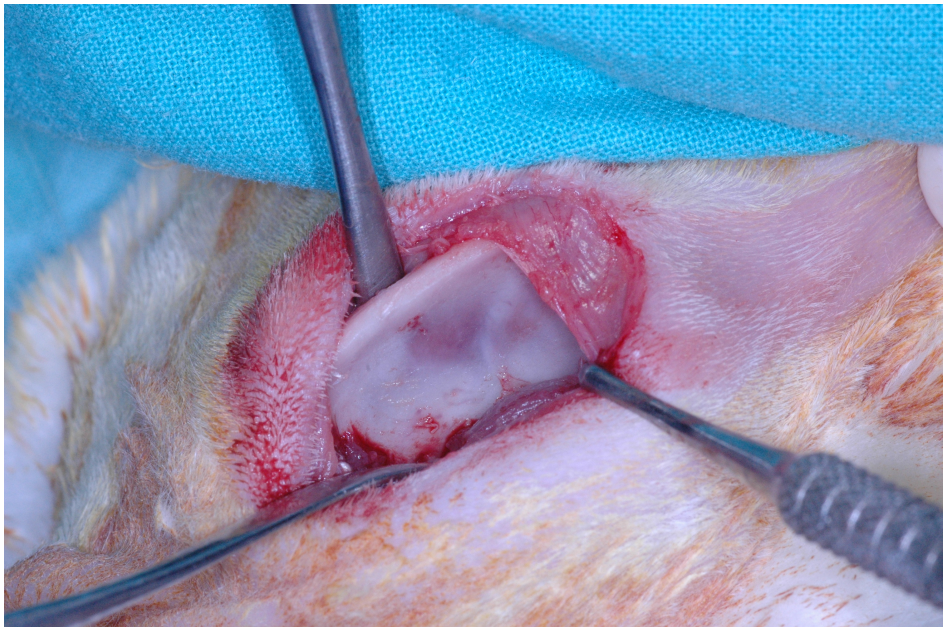

Figura 34. Mandíbula direita exposta.

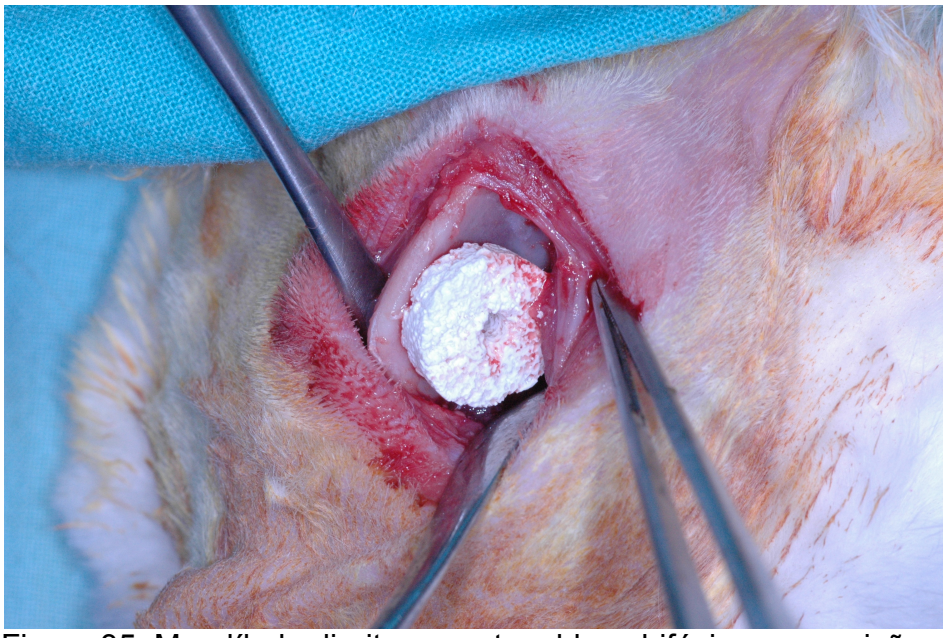

Figura 35. Mandíbula direita exposta e bloco bifásico em posição.

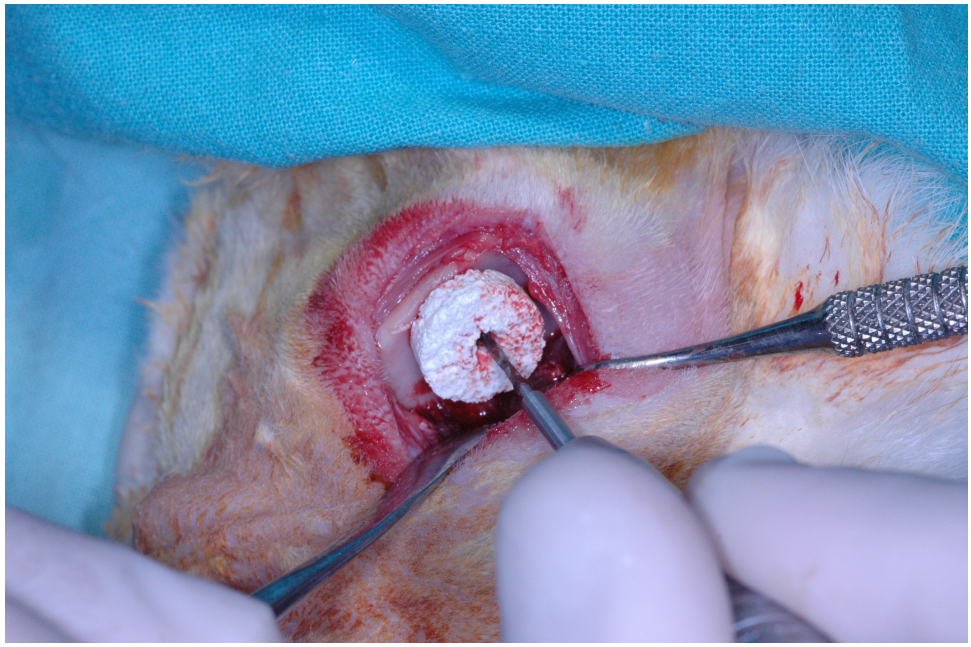

Figura 36. Bloco bifásico sendo fresado em posição no leito receptor.

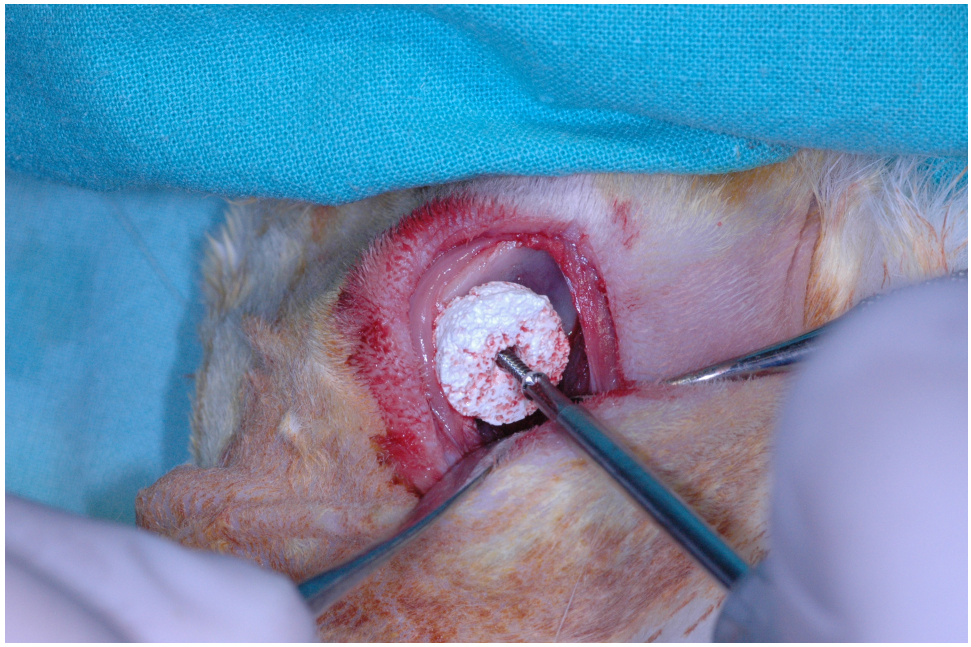

Figura 37. Bloco bifásico sendo parafusado no leito receptor.

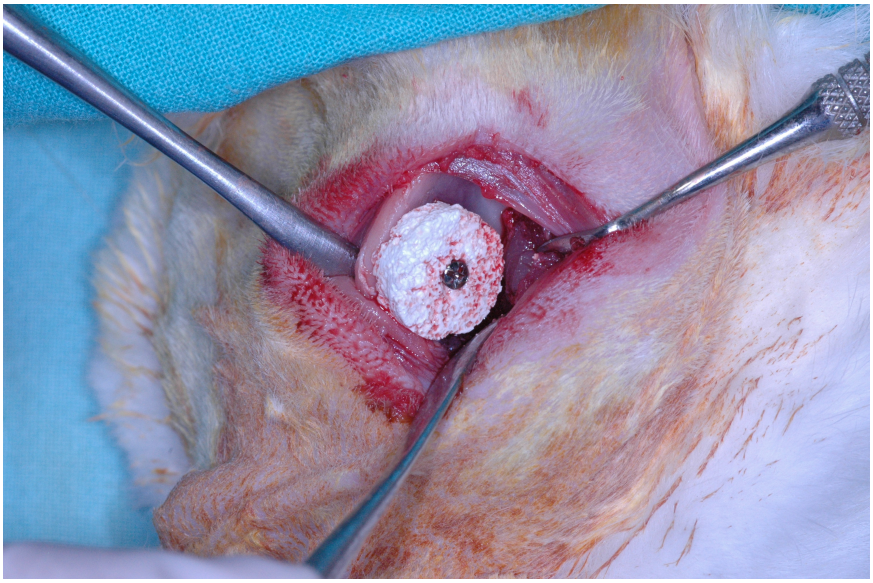

Figura 38. Bloco bifásico parafusado.

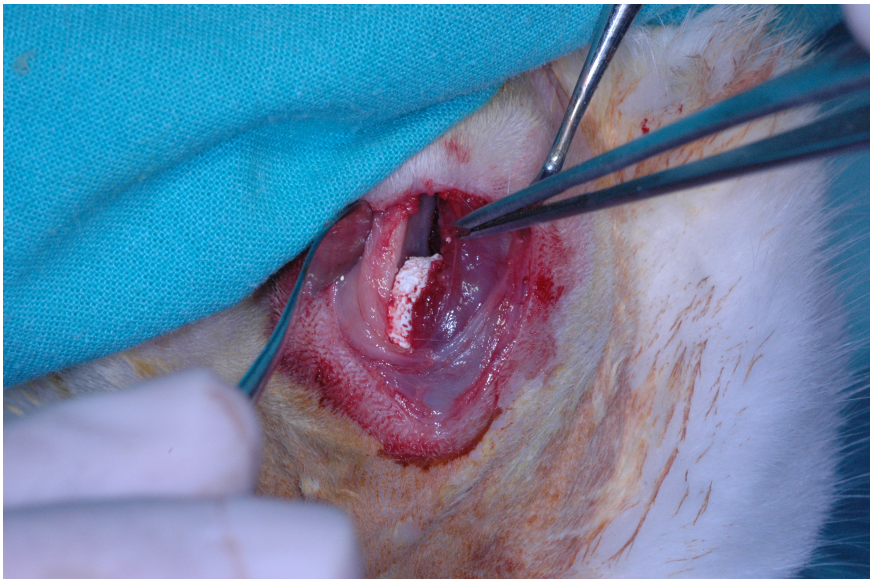

Figura 39. Bloco bifásico parafusado e região sendo suturada por planos.

Anexo - E

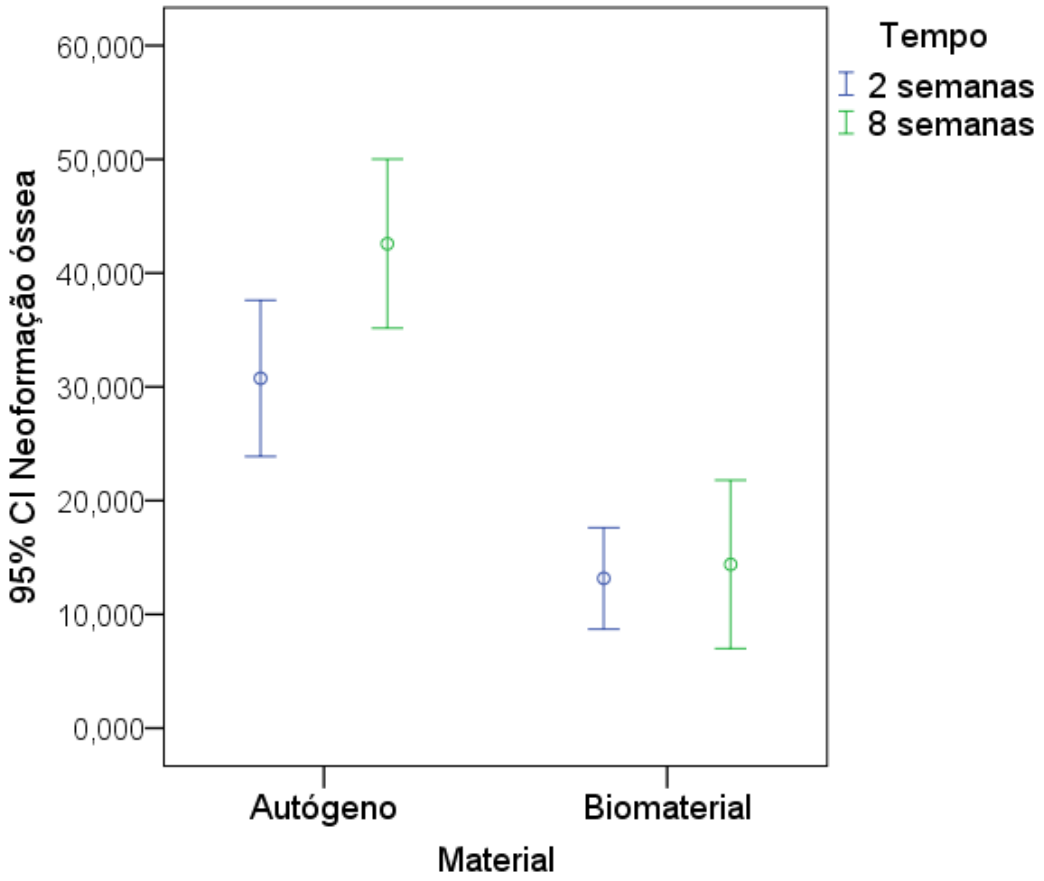

Figura 1. Comparação da neoformação óssea em função dos tempos e materiais.

Tabela 1. Comparação da neoformação óssea (%) entre os materiais para cada um dos dois tempos.

Tempo	Material	Média dos Ranks	Mediana	Média	Desvio padrão	p
2 semanas	Autógeno	10,33	31,66	**30,74**	6,53	**0,004**
	Biomaterial	4,14	13,83	**13,16**	4,81	
8 semanas	Autógeno	9,50	41,96	**42,58**	7,08	**0,004**
	Biomaterial	3,50	12,09	**14,39**	7,05	

Tabela 2. Comparação da neoformação entre os tempos para cada um dos dois materiais.

Material	Tempo	Média dos Ranks	Mediana	Média	Desvio padrão	p
Autógeno	2 semanas	3,92	31,66	**30,74**	6,53	**0,009**
	8 semanas	9,08	41,96	**42,58**	7,08	
Biomaterial	2 semanas	6,86	13,83	**13,16**	4,81	0,945
	8 semanas	7,17	12,09	**14,39**	7,05	

Tabela 3. Comparação das manifestações entre cada proteína para cada tempo.

Proteína	Tempo	Média dos Ranks	Mediana	Média	Desvio padrão	p
OC	2 semanas	14,50	**2,00**	1,77	0,61	0,12
	8 semanas	19,83	**2,00**	2,21	0,59	
TRAP	2 semanas	25,43	**1,50**	1,50	0,51	**0,01**
	8 semanas	16,21	**1,00**	1,13	0,35	

Tabela 4. Comparação das manifestações entre cada proteína para cada material.

Proteína	Material	Média dos Ranks	Mediana	Média	Desvio padrão	p
OC	Aut	24,00	**2,00**	2,08	0,51	**0,03**
	Bio	16,67	**2,00**	1,90	0,75	
TRAP	Aut	23,70	**1,00**	1,40	0,50	0,29
	Bio	19,93	**1,00**	1,25	0,44	

Tabela 5. Comparação da manifestação entre os materiais, em função do tempo e da proteína.

Proteína	Tempo	Material	Média dos Ranks	Mediana	Média	Desvio padrão	p
OC	2 semanas	Aut	13,14	**2,00**	1,91	0,51	0,09
		Bio	9,08	**1,50**	1,60	0,69	
	8 semanas	Aut	12,50	**2,00**	2,27	0,46	0,14
		Bio	7,93	**2,00**	2,16	0,71	
TRAP	2 semanas	Aut	12,50	**2,00**	1,60	0,51	0,40
		Bio	10,50	**1,00**	1,41	0,51	
	8 semanas	Aut	11,87	**1,00**	1,20	0,42	0,44
		Bio	9,17	**1,00**	1,08	0,28	