

ANDREA ASHCAR CURY

**RESPOSTAS TECIDUAIS NO TRANSPLANTE HOMÓGENO
DE MEDULA ÓSSEA. ESTUDO HISTOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba – UNESP”, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia

Araçatuba - SP

2007

ANDREA ASHCAR CURY

**RESPOSTAS TECIDUAIS NO TRANSPLANTE HOMÓGENO
DE MEDULA ÓSSEA. ESTUDO HISTOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba – UNESP”, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba - SP

2007

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- C982a **Cury, Andrea Ashcar**
Respostas teciduais no transplante de medula óssea: estudo histológico e imunoistoquímico em ratos / Andrea Ashcar Cury. - Araçatuba: [s.n.], 2007
62 f.: il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2007
Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior
1. Implante dentário 2. Enxerto ósseo 3. Medula óssea 4. Steam Cell 5. Imunoistoquímica 6. Fluorescência

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

ANDREA ASHCAR CURY

Nascimento: 07/08/1968 São Paulo/SP

Filiação: Renald Cury

Lelia Ashcar Cury

1986 - 1989 Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia da Universidade Camilo Castelo Branco -
São Paulo/SP

1989 - 1991 Curso de Pós Graduação com Residência Hospitalar em Cirurgia e
Traumatologia Buco Maxilo Facial pela Universidade Camilo Castelo
Branco em associação com o Hospital Universitário da Faculdade de
Medicina ABC – Santo André – SP

1995-1997 Curso de Pós Graduação – Especialização em Implantodontia pela
Universidade Metodista de Ensino Superior – São Bernardo do
Campo/SP

2000-2002 Curso de Pós Graduação – Mestrado em Odontologia – Área de
Concentração: Implantodontia – Universidade Camilo Castelo
Branco e São Leopoldo Mandic Campinas/SP

2001-2002 Curso de Pós Graduação – Especialização em Biologia Celular e
Histologia Molecular – Faculdade de Medicina da UNIFESP.

Dedicatória

Aos meus pais, Lelia e Renald, que me guiaram pelo caminho do ensinamento do amor, da dedicação e da sabedoria. Pelo apoio infindável e incansável no longo caminho trilhado durante toda a minha vida acadêmica, estimulando a dedicação ao estudo, ao trabalho e a vida. Pelos sacrifícios para que essa minha longa jornada pudesse existir. Pela humildade, pelos conselhos e pelo exemplo de honestidade. É com muita satisfação e orgulho, que dedico a vocês toda minha vida profissional.

Às minhas irmãs, Christina e Fabiana, com as quais compartilhei toda uma vida de amor, respeito, gratidão e alegrias. Obrigada por todos os momentos que tive a bênção de repartir com vocês. A você Fabiana, que tenho o orgulho de ter estimulado a trilhar comigo o amor à nossa profissão.

Aos meus queridos sobrinhos, Maria Eduarda e João Pedro que trouxeram à nossa família infinitos momentos de felicidade, e nos ensinam, a todo momento, a arte de aprender o renascer de uma nova vida.

Ao meu querido marido Randolph, por todo o amor, apoio, incentivo e compreensão por esse caminho longo o qual esteve sempre ao meu lado, compreendendo o afastamento e a distância. E aos meus queridos enteados Eric e Amanda, pela grata satisfação e bênção de ter aprendido com vocês uma nova forma de amor.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR

Profissional dedicado à ciência e à didática. Agradeço a orientação, o tempo empregado nesse estudo, a confiança, a amizade e o incentivo à pesquisa.

A Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO

Seu amor e dedicação à profissão me incentivaram nessa árdua jornada. Agradeço a orientação e incentivo de maneira tão próxima e sempre presente. É com grande alegria que lhe dedico os meus maiores sentimentos de amizade, admiração, respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. PAULO SÉRGIO PERRI DE CARVALHO

Profissional brilhante, cuja carreira de ensino e pesquisa iluminam os olhos de todo aquele envolvido em nossa especialidade. Agradeço o apoio nos meus primeiros passos no curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. OSWALDO BERGAMASCHI

Agradeço ao amigo e profissional dedicado, cuja carreira é um exemplo de dedicação e amor à profissão.

Epígrafe

*Os domínios dos mistérios
nos prometem as mais belas experiências.*

Albert Einstein

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, UNESP, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. PAULO ROBERTO BOTACIN, pelas condições oferecidas para realização da pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP: ANA CLÁUDIA, BERNARDETE MARIA, GILMAR, GLAUCO JOSÉ, MARIA DIRCE e CLEIDE, pelas infindáveis demonstrações de carinho, solidariedade e incentivo que me mantiveram com forças para terminar essa longa jornada.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, MARINA, VALÉRIA e DIOGO, que com toda disposição e carinho me guiaram pelos caminhos burocráticos.

Aos amigos que fiz tão longe de casa e que, com toda a certeza, estarão sempre presentes, quando a vida me fizer reviver esses anos em que pude desfrutar, por vezes, infelizmente, tão pouco suas companhias.

Em especial, agradeço aos colegas, Doutorando LEANDRO CARVALHO CARDOSO e Doutorando FRANCISLEY ÁVILA DE SOUZA, pela colaboração em todas as fases desse trabalho, não mediram esforços para que esse estudo fosse realizado.

À minha equipe de trabalho, cujo suporte tornou-se indispensável para meu afastamento durante toda a pós-graduação: DR. MAURICIO REBELLO MOREIRA QUERIDO, DRA. FABIANA ASHCAR CURY, DRA. ANDREA MASELLI, LUCIANA HITOMI NAKAGAMI, agradeço a dedicação e a amizade. Submergimos em traduções e discussões, em busca de respostas às inúmeras dúvidas que surgiram. Agradeço à equipe dedicada, sempre presente, incentivadora em todos os nossos projetos e pela colaboração no levantamento bibliográfico, e a todos os FUNCIONÁRIOS DA CLÍNICA CURY.

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, próximo ou distante, colaboraram para que esse trabalho existisse.

Agradeço à DEUS, pela VIDA. Devo a ELE a felicidade de ter em meu caminho todas as pessoas a quem dedico e agradeço pela execução desse trabalho. Que ELE nos dê a sua bênção e proteção, hoje e sempre. Amém.

Resumo

O presente estudo teve por finalidade analisar as respostas teciduais do tecido subcutâneo na presença de transplante homogêneo de células de medula óssea, por meio dos estudos histológico e imunoistoquímico das proteínas Cbfa1/Runx2 e osteocalcina. A metodologia utilizada nesse estudo envolve processamento em tecido descalcificado e neste caso, possibilitando cortes com menor espessura, para análise das características morfológicas das células presentes no tecido formado ao redor do enxerto e mesmo a resposta inflamatória do tecido subcutâneo ao material enxertado. Como complementação realizou-se o processamento em tecidos calcificados, após a injeção de fluorocromos, a calceína aos 10 dias e a alizarina aos 20 dias possibilitando a análise do processo de deposição de cálcio ao redor do material enxertado no tecido subcutâneo. Com a análise histológica, verificou-se que o enxerto de medula óssea isoladamente foi incorporado ao tecido subcutâneo, sendo que no período de 20 dias são observadas algumas estruturas semelhantes a tecido ósseo, pois apresentam-se morfológicamente, como tecido calcificado. Com o objetivo de caracterizar o tecido medular implantado no tecido conjuntivo subcutâneo, foi observada imunomarcção positiva contra Cbfa1/Runx2 e contra osteocalcina. Os resultados sugerem que a presença da medula óssea junto ao osso cortical, quando transplantada em seres de mesma espécie, em tecido subcutâneo, favoreceu a osteogênese pelo processo de osteoindução.

Palavras-chave: Implante dentário; Enxerto ósseo; Medula óssea; Imunoistoquímica; Fluorocromos.

Abstract

The purpose of this study was to analyze the cellular response to the subcutaneous tissue in a presence of autologous bone marrow cells transplantation, through the histological and immunohistochemical study of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin proteins. The methodology uses the decalcified tissue processing, and in this case, provides thinnest slices cuts for the morphological analyses and inflammatory responses of the cells around the graft in the subcutaneous tissue. As an extra study, was evaluated the calcified tissues after the fluorochromes injection, calcein in the tenth day and alizarin in the twentieth day, given the possibility to analyze the calcium deposition process around the graft in the subcutaneous tissue. Through the histological analyses it was possible to verify that the bone marrow was well accepted by the connective tissue, at the twentieth day it was possible to see some structures similar to bone, because it was morphologically similar to calcified tissue. With the objective to characterize the bone marrow implanted in the conjunctive subcutaneous tissue, positive results against Cbfa1/Runx2 and osteocalcin was observed. The results suggest that the presence of the bone marrow next to the cortical bone, when grafted in beings of same species, in subcutaneous tissue, it favored osteogenesis for the osteoinduction process.

Key-words: Dental implants, Bone graft, Bone marrow, Immunohistochemistry, Fluorochromes

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
A. Cirurgia Experimental.....	16
B. Processamento Laboratorial.....	19
C. Injeção de Fluorocromos.....	20
3. RESULTADOS.....	22
Análise Histológica.....	23
Análise Imunoistoquímica.....	26
Análise por Fluorocromos.....	27
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	34
7. ANEXOS.....	39
Anexo A - Normas da Revista <i>The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants</i> , selecionada para a publicação do Artigo.....	40
Anexo B - Ilustrações do procedimento cirúrgico.....	43
Anexo C – Ilustrações da Análise Histológica.....	51
Anexo D – Ilustrações da Análise Imunoistoquímica.....	55
Anexo E - Ilustrações da Análise por fluorocromos.....	57

1. INTRODUÇÃO

Enxertos ósseos têm sido utilizados como rotina nos últimos cem anos, para o tratamento de fraturas e no reparo de defeitos do esqueleto. Existem diferentes tipos de materiais disponíveis para as reconstruções de defeitos ósseos. Esses materiais são classificados segundo alguns fatores: status vascular, imunocompatibilidade entre o doador e o receptor, propriedades mecânicas do material, incluindo tamanho, forma e tipo, e as técnicas utilizadas para sua preservação. De acordo com a imunocompatibilidade os materiais podem ser autógenos ou alógenos. O fenômeno que garante o sucesso do transplante é a incorporação efetiva desse material. Esse processo de incorporação é a união do leito receptor com o material transplantado resultando em células viáveis e novo osso.¹

O termo incorporação descreve a reparação do transplante ósseo, de acordo com sua área de origem. O processo de incorporação é uma função do leito receptor e depende do íntimo contato com o tecido doado, da seqüência de tempo e do equilíbrio de processos independentes.

Enxertos ósseos autógenos esponjosos são considerados os mais efetivos por apresentarem três elementos indispensáveis para a regeneração óssea; osseoindução, osseocondução e a presença de células osteogênicas.

As variáveis da incorporação são: (a) proliferação de células osteoprogenitoras (células mesenquimais), (b) diferenciação dessas células em osteoblastos, (c) osseoindução, (d) osseocondução, (e) propriedades biomecânicas do enxerto. A incorporação também é dependente do metabolismo fisiológico do esqueleto e da idade do indivíduo. O processo de

incorporação dos enxertos ósseos foi muito bem descrito histologicamente e representa uma seqüência previsível de eventos que refletem uma parceria entre os fatores derivados do enxerto e do leito receptor.¹

Enxertos ósseos autógenos corticais, apresentam esses três elementos de forma mais limitada, porém ainda é muito utilizado na reconstrução de grandes defeitos. Os enxertos autógenos estão associados a algumas contra indicações e complicações, que levam a necessidade de avaliar novas alternativas. Nenhum material que substitui os enxertos autógenos possui isoladamente os três elementos indispensáveis para a incorporação. Os enxertos compostos são geralmente utilizados para somar as propriedades individuais de cada material e com isso maximizar o potencial de reparação óssea.²

Desde que o uso de aspirado de medula óssea tem mostrado conter células osteoprogenitoras, muitos estudos o tem utilizado, associado a outros materiais no intuito de promover a osteogênese.³

A medula óssea pode estimular a formação de osso. Mais ainda, sua capacidade osteogênica pode ser transferida não somente aos enxertos livre de medula e aos enxertos ósseos autógenos, mas também aos vários tipos de enxertos de bancos. Um enxerto composto de osso e medula é considerado mais eficiente que um enxerto de um dos dois isoladamente.⁴

A medula óssea se localiza nos ossos esponjosos: esterno, ossos ilíacos e costelas. Em conjunto, forma um órgão de grande porte, maior que o fígado, com peso aproximado de 1.500g. No período pré-natal e ao nascer, há

medula óssea formadora de células sanguíneas em quase todos os ossos. A medula óssea tem uma estrutura anatômica muito especial que permite a proliferação das células pluripotentes e, ao mesmo tempo a diferenciação destas. Uma célula mãe única, denominada célula pluripotente ou totipotente ou *stem cell*, também denominada célula-tronco ou célula CD34, que pode ser estimulada a diferenciação osteoblástica, encontra-se na medula óssea.⁵

A habilidade da medula óssea em formar osso, foi sugerida inicialmente por Goujon, no início de 1869. Inúmeros estudos em animais têm mostrado que a medula óssea autóloga contém células precursoras osteogênicas que contribuem na produção de osso. Muitos pesquisadores têm utilizado clinicamente medula óssea autóloga para aumentar a resposta osteogênica nos enxertos alógenos, na indução óssea ou como agente condutor ósseo, como as proteínas morfogênicas.⁶⁻²⁵

Com a possibilidade de estender a utilização da medula óssea como indutora de formação óssea em áreas severamente atrofiadas do complexo maxilo mandibular, minimizando procedimentos extensos de reconstrução para pacientes que necessitem receber implantes osseointegrados para sua reabilitação protética, a utilização das células-tronco na reabilitação de órgãos comprometidos, vem aumentando o interesse científico em sua utilização. Havendo necessidade de mais estudos *in vivo* para avaliar a resposta celular desse material.

Como o intuito desse estudo era avaliar a formação óssea, isso significa constatar a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos.²⁶

Os osteoblastos, são células de origem mesenquimal, e para a confirmação de sua presença, foi utilizado um fator de transcrição específico o Cbfa1/Runx2, que é o mais precoce e específico marcador de osteogênese e uma proteína da matriz a osteocalcina. O Cbfa1 (core-binding factor α 1)/Runx2 (runt-related transcription factor 2) é um gen que direciona o estroma de células mesenquimais a se tornarem osteoblastos, é indispensável na formação óssea. É um fator de transcrição expresso muito cedo nas células mesenquimais pluripotentes, antes de se expressar os fenótipos para osteoblastos.²⁷⁻²⁹

O presente estudo tem por finalidade a análise das respostas teciduais do tecido subcutâneo na presença de transplante homogêneo de células de medula óssea, por meio de estudo histológico e imunoistoquímico em ratos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Previamente à sua realização, a metodologia empregada no projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba – UNESP. Neste trabalho foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos com peso corporal variando entre 250 e 300 gramas e idade aproximada de 60 dias. Os animais foram obtidos e mantidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e alimentados durante o período do experimento com ração sólida triturada (Mogiana Alimentos S/A) e água “ad libitum”.

A. Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de oito horas e pré-anestesiados, por via intramuscular com Cloridrato de Xilazina (Anasedan AgriBrands Ltda, Paulínea, SP, Brasil.) em dosagem de 0,03ml para cada 100g de peso corporal, para promover um relaxamento muscular. Na sequência foi utilizado Cloridrato de Ketamina (Dopalen AgriBrands Ltda. , Paulínea, SP, Brasil) em dosagem de 0,07ml para cada 100g de peso corporal, para a obtenção do efeito anestésico (Figuras 1 e 2).

Do total de 40 ratos, um grupo de 10 foi separado, para que fossem utilizados como doadores na obtenção do material medular e do osso cortical triturado, colhido das tíbias, denominado Grupo Doador (GD). Os animais desse grupo submeteram-se à tricotomia e anti-sepsia do campo operatório (tíbias

direita e esquerda) com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante[®], Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil), (Figura 3), e na sequência foi realizada a cirurgia para a coleta do material a ser transplantado.

Os animais doadores receberam uma incisão linear em ambas as tíbias e, após descolamento total do periósteo as tíbias, foram expostas e retiradas na íntegra (Figura 4). As tíbias receberam osteotomia longitudinal, com bisturi número 3, montado com lâmina número 15 (Feather[®], Feather Safety, Japão) para acesso da porção medular (Figuras 5 e 6). O material foi colhido e separado em uma cuba cirúrgica (Figuras 7 e 8). Após a coleta do material medular, todo o osso cortical foi triturado em fragmentos, utilizando-se um triturador de osso (Figuras 12 e 13) e armazenado em uma segunda cuba cirúrgica. Uma parte do material colhido de medula óssea foi agregado a uma parte do material cortical triturado (Figura 15) e acondicionado em uma terceira cuba cirúrgica. Como resultado do material coletado dos 10 animais doadores, tivemos três grupos de enxertos:

Grupo A - medula óssea

Grupo B - osso cortical triturado

Grupo C - osso cortical triturado associado com medula óssea

Após esse procedimento, o grupo de animais doadores foi imediatamente sacrificado, utilizando-se sobredose de agente anestésico.

Os animais experimentais receberam o mesmo protocolo de anestesia descrito anteriormente e foram divididos em três grupos de 10 animais, de acordo com o tipo de material a ser enxertado no tecido subcutâneo.

Grupo I - receptores de medula óssea homogênea

Grupo II - receptores de osso cortical homogêneo triturado

Grupo III - receptores de medula óssea e osso cortical triturado homogêneos

A técnica cirúrgica empregada em todos os animais dos três grupos foi a mesma. Os animais submeteram-se à tricotomia e anti-sepsia do campo operatório com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante®, Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil), receberam uma incisão linear de cerca de 2 cm em região dorsal com bisturi número 3, montado com lâmina número 15 (Feather®, Feather Safety, Japan) . Após um descolamento por divulsão (Figura 9) o material de enxerto destinado a cada grupo, foi levado em posição. Grupo A inserido em tecido subcutâneo dos animais do Grupo I (Figura 10); Grupo B inserido em tecido subcutâneo dos animais do Grupo II (Figura 14) e Grupo C em animais do Grupo III (Figura 16). Não houve mistura de materiais de enxerto entre os doadores, portanto, cada animal receptor recebeu enxerto de apenas um animal doador. Foi realizada sutura com fio de nylon 5-0 (Mononylon®, Ethicon® Johnson & Johnson®, São José dos Campos/SP, Brasil), com ponto único para a demarcação das áreas enxertadas (Figura 11)

e sutura da ferida cirúrgica após aproximação das bordas. Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam dose única de 20.000 U.I. de penicilina G benzatina (Fontoura Wyeth S.A. Indústrias Farmacêuticas, São Bernardo do Campo/SP, Brasil) via intramuscular.

B. Processamento Laboratorial

A análise histológica foi realizada nos três grupos experimentais deste trabalho, nos períodos de 10 e 20 dias após a cirurgia de transplante do material.

Os animais foram sacrificados por meio de sobredose de anestésico e as peças removidas foram fixadas em Formalina Tamponada a 10% (Reagentes Analíticos[®], Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva/SP, Brasil). Após o período de fixação por 48 horas, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA a 20% (Reagentes Analíticos[®], Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva/SP, Brasil), e passaram pelas diversas etapas laboratoriais de rotina para parafina, ou seja, desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Na seqüência, foram obtidos cortes com 5µm de espessura, obtidos em micrótomo e montados em lâminas. Realizou-se, então, a coloração dos cortes histológicos pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE Merck & Co., Inc.), para posterior análise em microscópio óptico.

Parte das lâminas obtidas após o corte em micrótomo foi reservada para realização de reações imunoistoquímicas contra as proteínas Cbfa1/Runx2 e osteocalcina. Após o preparo do tecido, com a realização dos bloqueios de reações inespecíficas, foram utilizados como anticorpos primários o α -PEBP2 α , anticorpo policlonal, produzido em cabras (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

CA USA) e o α -Osteocalcin, anticorpo policlonal, também produzido em cabras (Santa Cruz Biotechnology). Como anticorpo secundário, foi utilizado o anticorpo biotinilado α cabra, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford IL, USA). O sinal foi amplificado pelo kit Streptavidina-Biotina (Dako North American, Inc. Carpinteria, CA USA) e o cromógeno da reação foi a Diaminobenzidina (Dako North American, Inc. Carpinteria, CA USA) .

Ao término das reações, as lâminas receberam contra-coloração pela Hematoxilina de Harris (HE Merck & Co., Inc.) para análise ao microscópio óptico.

C. Injeção de Fluorocromos

Com o objetivo de se avaliar o processo de mineralização pela deposição de cálcio, dois animais do Grupo II e dois animais do Grupo III foram submetidos a injeções intramusculares dos fluorocromos. Ao décimo dia foi injetada nos quatro animais, via intramuscular, a calceína (Calcein[®], Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e, aos 20 dias a alizarina (Alizarin Red S[®], Sigma Chemical St. Louis, MO, USA).

Decorridos 25 dias da cirurgia experimental, quinto dia da injeção de alizarina, e décimo quinto dia da injeção de calceína, os quatro animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico. Após a remoção das peças, essas foram fixadas em Formalina Tamponada a 10% (Reagentes Analíticos[®], Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva/SP, Brasil) e, após 48 horas de fixação, foram lavadas em água corrente por 24 horas.

O processamento das peças obtidas consistiu na desidratação por seqüência crescente de álcoois, imersão em acetona e dois banhos de metil metacrilato. A inclusão das peças foi realizada em tubos de ensaio utilizando o metil metacrilato (Classico[®], Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo/SP, Brasil) com a adição de um catalisador peróxido de benzoíla a 1% (Riedel[®] - De Haën AG, Seelze – Hannover, Germany), possibilitando o corte da peça e o seu desgaste manual em lixas até a obtenção de cortes na espessura de 100µm, que foram montados em lâminas (Leica[®] DMLB, Heerbrugg, Switzerland) para posterior análise em microscópio de epifluorescência utilizando filtros específicos para o comprimento de onda de cada fluorocromo.

Para o fluorocromo Calceína, utilizou-se Filter Cube I.3, Excitação Azul, Filtro de excitação (Band Pass Filter) BP 495 green, Espelho Dicromático 510 e Filtro de Supressão (Long Pass Filter) LP 520 green. Para o fluorocromo Alizarina, utilizou-se Filter Cube N2.1, Excitação Verde, Filtro de excitação (Band Pass Filter) BP 539-574 red, Espelho Dicromático 580, Filtro de Supressão (Long Pass Filter) LP 602 red.

Para a aquisição de imagens utilizou-se uma câmara digital (Leica[®] DC300 microsystem ltd, Heerbrugg, Switzerland) acoplada a um microscópio de fluorescência e conectada ao computador pelo programa Leica[®] DC300 onboard. Para a padronização das imagens capturou-se as imagens com aumentos de 63x e 160x.

3. RESULTADOS

Análise Histológica

10 dias

Grupo I – Medula

Aos 10 dias o tecido medular transplantado no espaço subcutâneo apresenta-se bem preservado. São observadas células com aspecto de linfócitos, características do tecido medular que se encontra bastante vascularizado, possibilitando a sua nutrição e consequentemente a boa preservação observada.

Ao redor do tecido medular, o tecido conjuntivo subcutâneo apresenta poucas células inflamatórias (Figura 17).

Grupo II - Osso Triturado

Aos 10 dias, o osso triturado apresenta-se preservado no tecido subcutâneo. Nas partículas do tecido ósseo são observados osteócitos, presentes no interior de suas lacunas e o tecido conjuntivo subcutâneo apresenta-se em íntimo contato com o material transplantado.

Algumas áreas ao redor das partículas de tecido ósseo apresentam-se irregulares, caracterizando áreas de reabsorção óssea. Em alguns espécimes, são observados osteoclastos em atividade.

Diferente do grupo medula, quase não são observados vasos sanguíneos próximos às partículas de tecido ósseo implantadas (Figura 18).

Grupo III - Osso triturado + medula

São observados alguns fragmentos de tecido ósseo no espaço subcutâneo, com a presença de osteócitos em suas lacunas. Entretanto, um aspecto observado em todos os espécimes analisados, é a presença do tecido ósseo em atividade metabólica, uma vez que em várias áreas do tecido conjuntivo subcutâneo, são observadas várias trabéculas ósseas delgadas, com grande quantidade de tecido conjuntivo ao seu redor. O tecido ósseo na forma de trabéculas ósseas apresenta-se totalmente incorporado ao tecido conjuntivo subcutâneo (Figura 19).

20 dias

Grupo I - Medula

No período de 20 dias, são observadas células com aspecto de linfócitos, característicos da medula óssea implantada. O tecido conjuntivo subcutâneo apresenta-se em íntimo contato com o tecido medular. Nos espécimes analisados, foi observada a presença de uma matriz calcificada no interior do tecido medular transplantado. Esta matriz calcificada apresenta-se com morfologia semelhante ao tecido ósseo e apresenta-se envolta por células semelhantes a osteoblastos em atividade de síntese de matriz óssea (Figura 20).

Grupo II - Osso triturado

As partículas de osso triturado apresentam-se com bordas irregulares, caracterizando áreas de reabsorção óssea, observadas em maior intensidade do que no período anterior. Em alguns espécimes, são observados osteoclastos em atividade. O tecido conjuntivo subcutâneo apresenta-se em contato com as partículas de osso triturado implantadas (Figura 21).

Grupo III - Osso triturado + medula

Neste período, não são observados remanescentes das partículas de tecido ósseo como no período anterior. Em várias áreas são observadas formações cartilaginosas, características do processo de ossificação endocondral. Em várias áreas do tecido conjuntivo subcutâneo é observado tecido cartilaginoso em atividade metabólica, e em alguns pontos é observado tecido ósseo neoformado, em decorrência do processo de ossificação. Vale destacar que o osso triturado foi obtido da tíbia dos ratos doadores e, portanto, caracteriza-se pela formação a partir do processo de ossificação endocondral. Como no período anterior, o tecido calcificado observado, seja cartilagem ou osso neoformado, apresenta-se totalmente incorporado ao tecido conjuntivo subcutâneo (Figuras 22 e 23).

Análise Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para determinar a presença do fator de transcrição Cbfa1/Runx2 e da proteína osteocalcina no tecido ósseo em atividade quando foi realizado o enxerto do osso triturado associado à medula óssea.

A análise da imunomarcção para Cbfa1/Runx2 mostrou a presença do fator de transcrição no tecido conjuntivo localizado ao redor das trabéculas ósseas, observadas aos 10 dias. Vale destacar que esse fator de transcrição identifica pré osteoblastos e, portanto, consiste num marcador de extrema importância para caracterizar o processo de diferenciação osteoblástica (Figura 24).

A análise da imunomarcção contra osteocalcina mostrou a presença desta proteína nas trabéculas ósseas no período de 10 dias, num padrão de marcação diferente do observado contra Cbfa1/Runx2. Vale destacar que a osteocalcina sinaliza a presença de osteoblastos maduros, bem como osteócitos e, portanto, se expressa no tecido após a ocorrência do processo de mineralização (Figura 25).

Com o objetivo de caracterizar o tecido medular implantado no tecido conjuntivo subcutâneo, foi observada imunomarcção positiva contra Cbfa1/Runx2, mostrando que no “pool” de células coletadas da medula óssea, há presença de células que apresentam o fator de transcrição que sinaliza positivamente para a diferenciação osteoblástica (Figura 26). Entretanto, quando foram realizadas reações imunoistoquímicas com o objetivo de identificar a presença da proteína osteocalcina, não foram observadas células marcadas positivamente.

Análise por Fluorocromos

Essa metodologia envolve o processamento em tecidos calcificados, possibilitando a análise do processo de deposição de cálcio ao redor do material implantado no tecido subcutâneo.

A análise do tecido calcificado ao microscópio de epifluorescência com os filtros específicos para cada fluorocromo, possibilitou a visualização do cálcio precipitado individualmente nos períodos experimentais deste trabalho. Vale destacar que os fluorocromos apresentam colorações diferentes; no caso, a calceína verde aos 10 dias e a alizarina vermelha aos 20 dias.

Os resultados mostram que tanto o enxerto de osso triturado (animais do Grupo II), bem como o enxerto composto de osso triturado e medula óssea (animais do Grupo III), no tecido subcutâneo permitiu que houvesse precipitação de minerais ao redor das partículas ósseas. Como é possível ser visualizado por meio das faixas verdes, representando o período de 10 dias (Figuras 27-30) e faixas vermelhas, representando o período de 20 dias (Figuras 28-31).

A sobreposição das imagens permite a visualização da quantidade total de cálcio precipitada sobre as partículas de osso, mostrando que estas atuaram como um “arcabouço” permitindo que o processo de mineralização ocorresse numa área ectópica, no caso o tecido conjuntivo subcutâneo (Figuras 29-32).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram utilizadas três metodologias para a análise da resposta medular quando transplantada em tecido subcutâneo.

Com a análise histológica, verificou-se que o enxerto de medula óssea isoladamente foi incorporado ao tecido subcutâneo, sendo que no período de 20 dias são observadas algumas estruturas semelhantes a tecido ósseo, pois apresentam-se morfologicamente, como tecido calcificado.

Considerando-se que as células progenitoras para osteoblasto são encontradas em muitos tecidos como; periósteo e tecido conectivo peri trabecular, no entanto, a maior e mais abundante fonte é a medula óssea. Como já foi comprovado que a medula óssea sozinha ou em combinação com outros materiais é um enxerto ósseo efetivo, podemos acreditar que o achado confere com vários estudos em animais de pequeno e médio porte.³⁰

Constatamos que o enxerto de osso triturado foi incorporado ao tecido subcutâneo, apresentando um processo de reabsorção visível aos 10 dias e numa etapa mais evoluída aos 20 dias.

Os enxertos ósseos corticais garantem uma estrutura de suporte imediato ao enxerto, eles se tornam mais fracos, comparados com os vascularizados.³¹ Por volta do décimo dia após o transplante, os enxertos corticais apresentam uma quantidade considerável de células gigantes e osteoclastos. Isso ocorre após a diminuição das características inflamatórias iniciais dando início a atividade osteoclástica. Essa atividade é ainda mais marcante por volta do vigésimo dia.¹

Os osteoclastos são células multinucleadas que freqüentemente estão instalados em lacuna de reabsorção da superfície óssea. Esta célula, por meio da liberação de enzimas lisossomiais e substâncias ácidas (ex. ácido láctico), promove a queda do potencial hidrogeniônico (pH). Com a baixa do pH os cristais de hidroxiapatita óssea são dissolvidos e o remanescente orgânico eliminado por ação fagocística do osteoclasto. O binômio neoformação óssea/reabsorção é controlado pela relação osteoblasto/osteoclasto. O componente mineral dos tecidos duros consiste de depósitos de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita de cálcio e trifosfato de cálcio amorfo.³²

A avaliação do enxerto de osso triturado, associado à medula óssea, mostra que houve uma aceleração no processo de incorporação do osso particulado ao tecido subcutâneo, mostrando a presença de trabéculas ósseas delgadas com osteoblastos em atividade ao seu redor e no período de 20 dias é possível visualizar áreas características de processos de ossificação endocondral, com áreas de tecido cartilaginoso em atividade.

Inúmeros estudos de transplante de medula óssea em animais de pequeno porte e estudos de medula óssea aspirada em cachorros mostraram que a medula é um enxerto ósseo eficaz e que por si só ou associada a outros materiais pode formar osso.³³⁻³⁶

O osso cortical apresenta resistência inicial superior ao esponjoso, porém a longo prazo, essa resistência se equipara e apesar da grande resistência inicial, tem baixa atividade osteocondutora e osteoindutora.³⁷ A medula óssea com suas propriedades osteogênica e osteoindutora, promovem a aceleração no processo de incorporação do transplante de osso cortical triturado.

Na análise imunoistoquímica, as imunomarcações contra Cbfa1/Runx2 e osteocalcina mostram que no grupo de osso triturado e medula, há presença de pré-osteoblastos no tecido conjuntivo ao redor das trabéculas ósseas delgadas. A osteocalcina apresenta marcações positivas nas trabéculas ósseas e também nos osteócitos aprisionados no interior das trabéculas ósseas.

O Cbfa1/Runx2 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação de osteoblastos.³⁸ Houve marcação positiva para o Cbfa1/Runx2 no grupo onde houve a mistura de medula associada ao enxerto triturado. Já a osteocalcina consegue confirmar a presença de células osteoblásticas.

Foi observada imunomarkação positiva contra Cbfa1/Runx2 no tecido medular transplantado isoladamente no tecido conjuntivo subcutâneo.

Com a análise por injeção de fluorocromos nos períodos de 10 e 20 dias mostrou que, tanto no grupo osso triturado, quanto no grupo osso triturado + medula, houve a precipitação de cálcio ao redor das partículas de osso. Portanto, em ambos os casos observou-se que o material enxertado atuou como arcabouço permitindo a deposição de cálcio ao redor das partículas ósseas implantadas no tecido subcutâneo.

Essa técnica foi realizada para visualizar a precipitação de cálcio quando colocou-se somente o osso e osso + medula. A precipitação ocorreu ao redor do osso triturado implantado e as cores diferentes refletem o período em que houve a precipitação.

5. CONCLUSÃO

Dentro dos limites experimentais estabelecidos pela metodologia desse estudo, os resultados sugerem que a presença da medula óssea junto ao osso cortical, quando transplantada em seres de mesma espécie, em tecido subcutâneo, favoreceu a osteogênese pelo processo de osteoindução.

6. REFERÊNCIAS

1. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthopedic Clinics of North America* 1987; 18(2):187-96.
 2. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster R. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *Journal of the American Academy of Orthopedic Surgeons*. 1995; 3(1):1-8.
 3. Paley D, Young C, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1986; 208:300-12.
 4. Jun HP, Hollmann K, Wilfert KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of kiel bone containing fresh autologous marrow. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1972; 54B(4):735-43.
 5. Aires MM. *Fisiologia*. 2ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Capítulo 14. Eritrócitos. Therezinha Ferreira Lorenzi & Therezinha Verrastro; p.107-24.
 6. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1989; 71A(5):7684-91.
 7. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1991 N(266):259-70.
 8. Connolly J, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *Journal of Orthopaedic Trauma* 1989; 3(4): 276-82.
 9. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1990;(256):280-5.
 10. Cummine J, Nade S. Osteogenesis after bone and bone-marrow transplantation. *Acta Orthop scand*. 1977; 48:15-24.
 11. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *Journal of Orthopaedic Research* 2001;19:117-25.
-

-
12. Sharma S, Garg NK, Veliath AJ, Subramanian S, Srivastava KK. Percutaneous bone-marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1992; 63(2):166-9.
 13. Mitsuyoshi I, Ishi H, Sato J, Seto K. Histological evaluation of autogenous iliac particulate cancellous bone and marrow graft to alveolar clefts – A preliminary report of five young adult cases. *Cleft Palate Craniofac J* 2000; 37 (1): 55-60.
 14. Seitz WH, Foimson A, Leb RB. Autogenous bone marrow and allograft replacement of bone defects in the hand and upper extremities. *Journal of Orthopaedic Trauma* 1992; 6(1):36-42.
 15. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2002;(405):14-23.
 16. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The Role of a Composite, Demineralized Bone Marrow in the Treatment of Osseous Defects. *Orthopedics* 1995; 18(12):1153-8.
 17. Majors AK, Boehm C, Nitto H, Midura R, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *Journal of Orthopaedic Research* 1997;15(4):546-57.
 18. Nade S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. *Acta.orthop. scand.* 1977;48:572-9.
 19. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini NN, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2005(435) pags. 62-8.
 20. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clinica Orthopaedics and Related Research.* 1989; (240):270-80.
 21. Foldes J, Naparstek E, Statter M, Menczel J, Bab I. Osteogenic response to marrow aspiration: increased serum osteocalcin and alkaline phosphatase in human bone marrow donors. *Journal of Bone and Mineral Research* 1989; 4(4): 643-6.
 22. Burwell GR. Studies in the transplantation of bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 1964;46B(1):110-40.
-

23. Giardino R, Nicoli AN, Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rocca M, Martini L. A resorbable biomaterial shaped as a tubular chamber and containing stem cells: a pilot study on artificial bone regeneration.: *Int J Artif Organs* 2000 23(5) pags. 331-7 [(iah) MEDLINE_1993-2005 pmid: 10872852]
 24. Wittbjer J, Rohlin M, Thorngren KG. Osteogenic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1983; 173: 229-38.
 25. Takagi K, Urist M. The role of bone marrow in bone morphogenic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1982; (171):224-31.
 26. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Bone remodeling and repair*. 2000; 289(1):1501-4.
 27. Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: A multifunctional regulator of bone formation. *Current pharmaceutical design*. 2003;9(32): 2677-85.
 28. Perinpanayagam H, Martin T, Mithal V, Dahman M, Marzec N, Lampasso J, Dziak R. Alveolar bone osteoblast differentiation and Rnx2/Cbfa1 expression. *Archives of Oral Biology*. 2006;51:406-15.
 29. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89:747-54.
 30. Muschler GF, Boehm C, Easley KB. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1997; 79-A(11):1699-709.
 31. Finkermeier CG, Current concepts review bone-grafting and gone-graft Substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2002; 84-A(3): 454-64.
 32. Bhaskar SN. *Histologia e Embriologia Oral de Orban*. 8ª ed. São Paulo. Livraria Editora Artes Médicas, 1978.
 33. Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of bone graft. *Clin. Orthp.*, 1985; 200:125-41.
-

34. Lane JM, Muschler GF, Werntz J, Nottebaert M, Gebhart M, Piergentili C. et al. The use of composite bone graft materials in a segmental femoral defect model in the rat. *J. Orthop. Trauma*, 1988; 2: 57-58
 35. Nade S, Burwell RG. Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. *J. Bone and Joint Surg.* 1977; 59-B(2):189-96.
 36. Pfeiffer CA. Development of bone from transplanted marrow in mice. *Anat. Rec.* 1948. 102: 225-40.
 37. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: Efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3(1): 1-7.
 38. Kanatani, N et al. Cbfb regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *J. Development Biology* 296 (2006) : 48-61
-

7. ANEXOS



Anexo A

Normas da Revista The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, selecionada para a publicação do artigo

Author Guidelines

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

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

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

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

Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

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

MANUSCRIPT PREPARATION

The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See www.icmje.org.

Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.

Abstract/key words. Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.

Introduction. Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.

Materials and Methods. Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results. Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.

Discussion. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.

Conclusions. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.

Acknowledgments. Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.

Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

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

The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.

Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

Avoid using abstracts as references.

Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

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

Book reference style:

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

ILLUSTRATIONS AND TABLES

All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.

Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.

All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.

Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.

Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.

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

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

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

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

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

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

MANDATORY SUBMISSION FORM

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

PERMISSIONS AND WAIVERS

Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.

Waivers must be obtained for photographs showing persons. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.

Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

REPRINTS

If reprints are desired, they may be ordered from the publisher. Authors receive a discount of 40% on quantities of 100 or 200 reprints.

Anexo B – Ilustrações do procedimento cirúrgico



Figura 1 – Medicações anestésicas.



Figura 2 – Anestesia por via intramuscular.

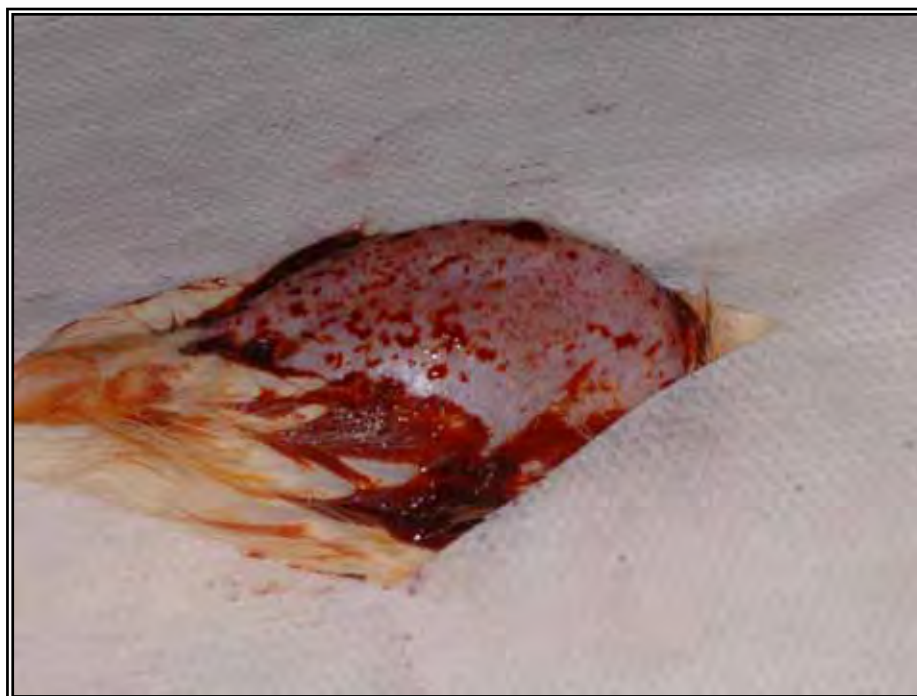


Figura 3 – Aposição do campo estéril



Figura 4 – Movimento de deslocamento para remoção da tíbia



Figura 5 – Incisão sobre a tíbia



Figura 6 – Exposição da medula óssea.



Figura 7 – Coleta da medula óssea.



Figura 8 – Medula óssea.



Figura 9 – Divulsão do tecido subcutâneo com pinça hemostática.

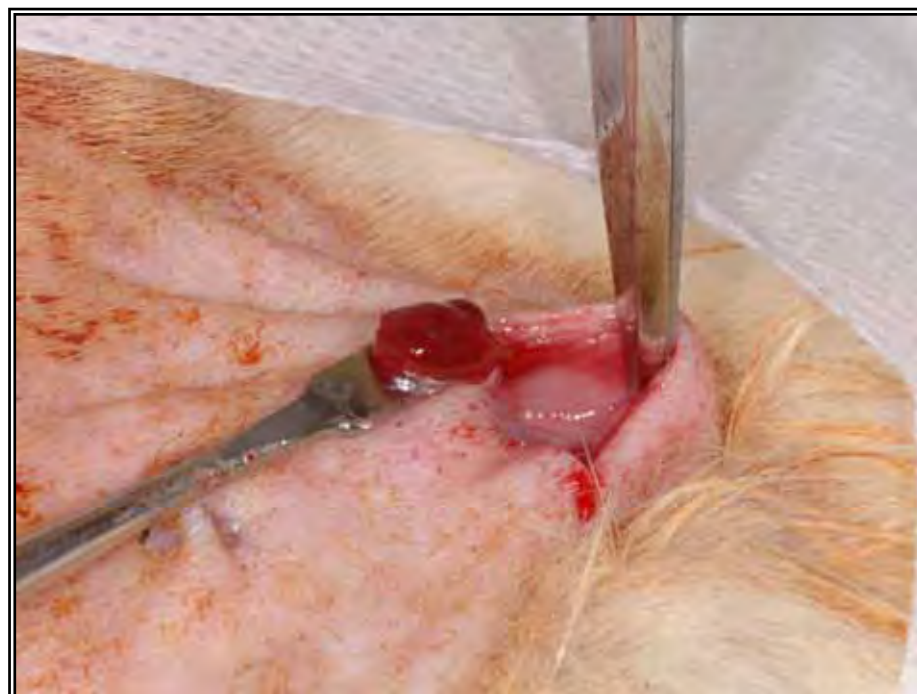


Figura 10 – Grupo I, colocação do tecido medular no região subcutânea.



Figura 11 – Sutura com Nylon 5.0, para localização da área receptora com o tecido medular.



Figura 12 – Triturador ósseo usado para triturar o osso cortical, utilizado nos Grupos II e III.



Figura 13 – Osso cortical triturado.



Figura 14 – Osso cortical triturado sendo colocado no tecido subcutâneo, grupo II.

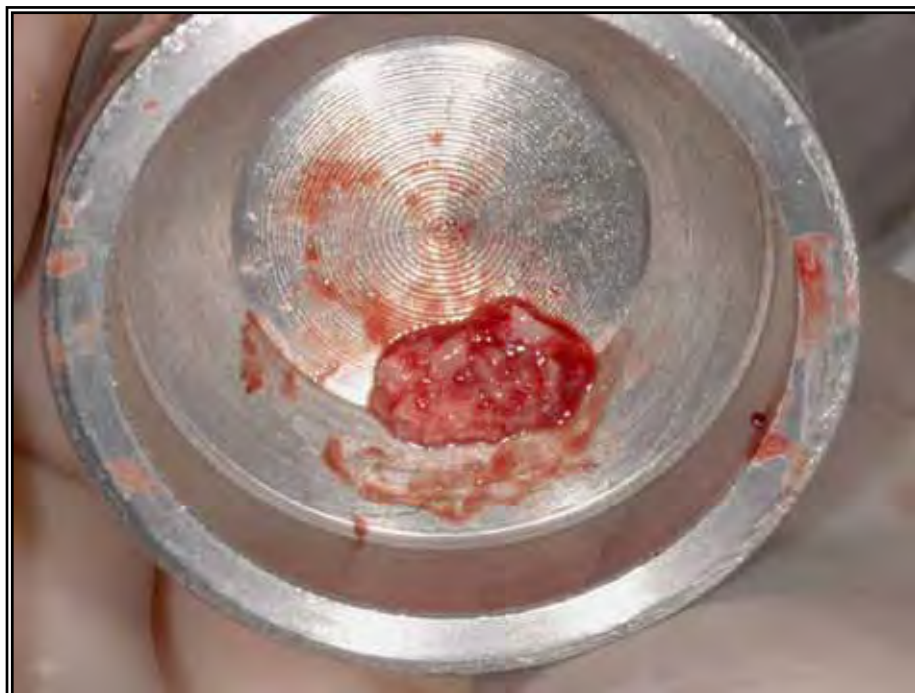


Figura 15 – Aglutinação do osso cortical triturado e da medula óssea.



Figura 16 – Colocação da mistura óssea no subcutâneo dos ratos do grupo III.

Anexo C – Ilustrações da Análise Histológica

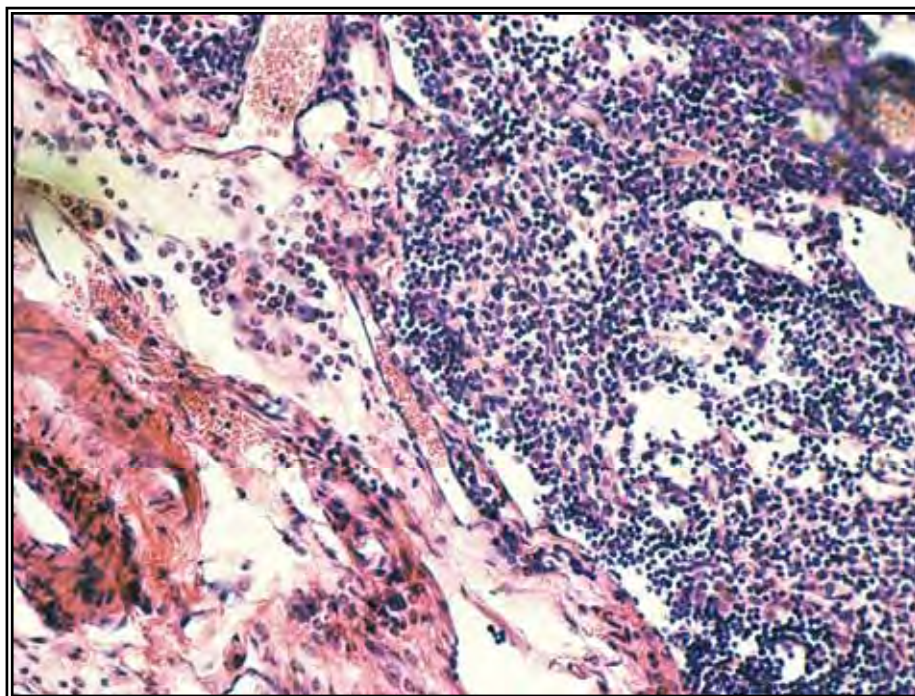


Figura 17 - Medula 10 dias (160X).

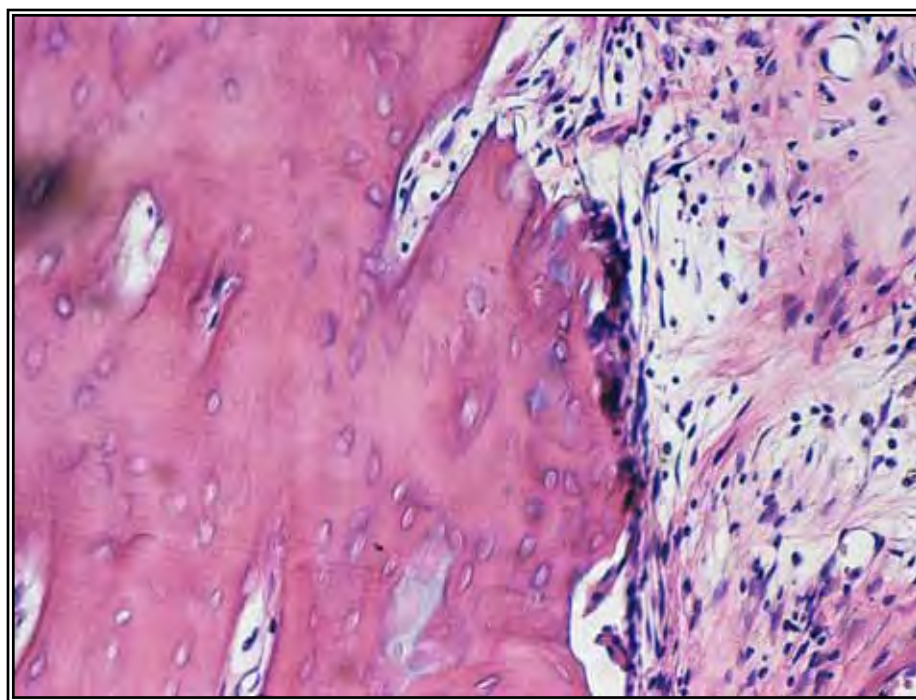


Figura 18 – Osso 10 dias (160 X).

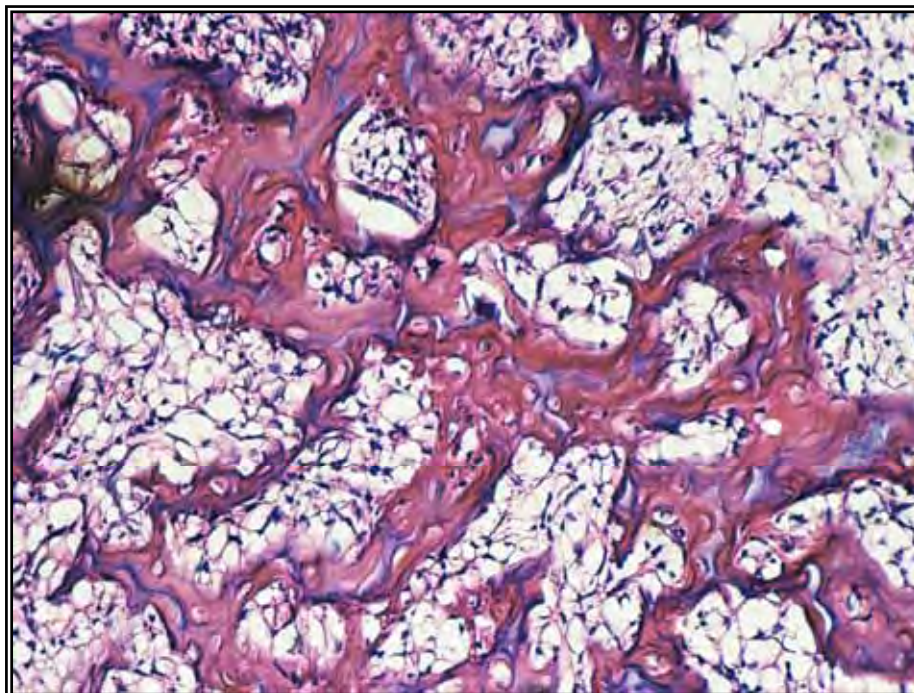


Figura 19 – Osso e Medula 10 dias (160X).

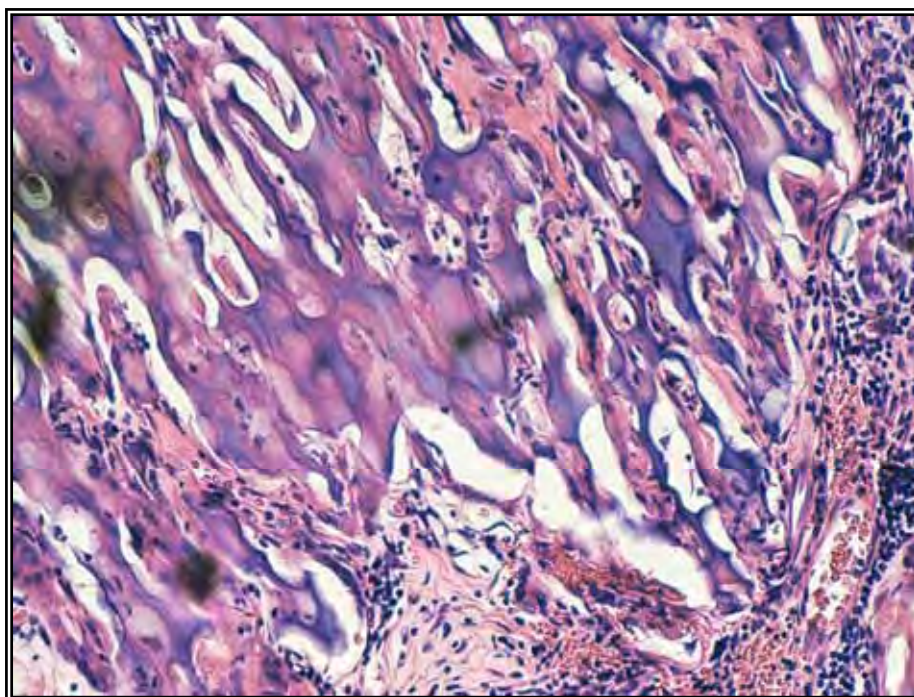


Figura 20 – Medula 20 dias (160X).

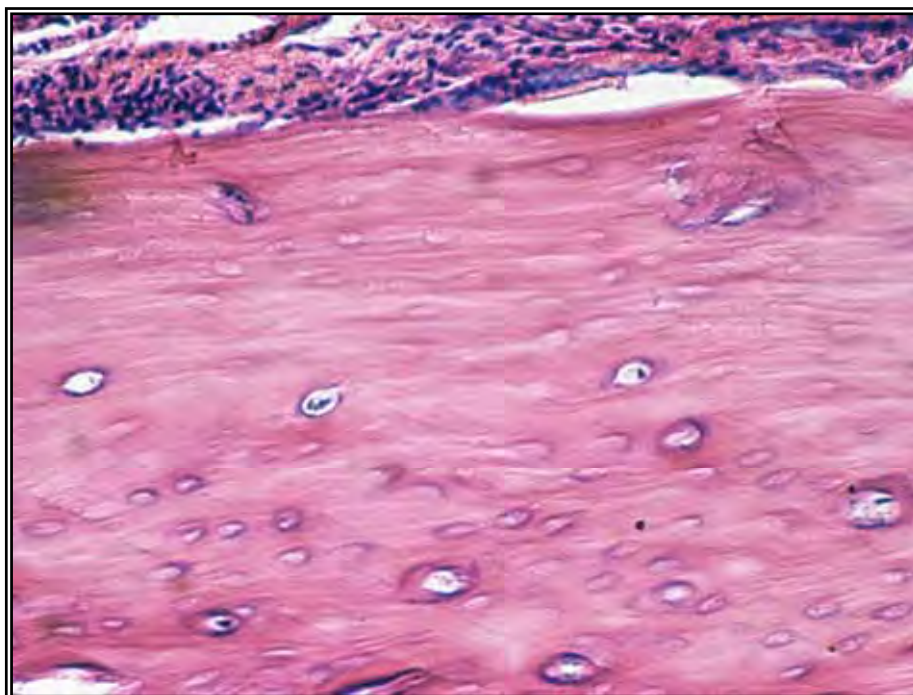


Figura 21 – Osso 20 dias (160X).

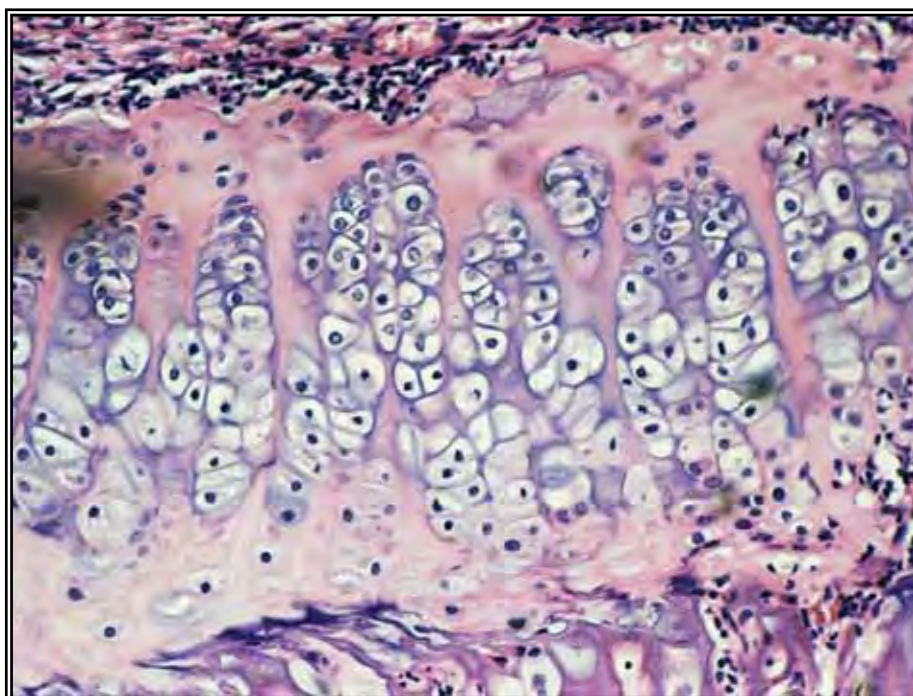


Figura 22 – Osso e Medula 20 dias (160X).

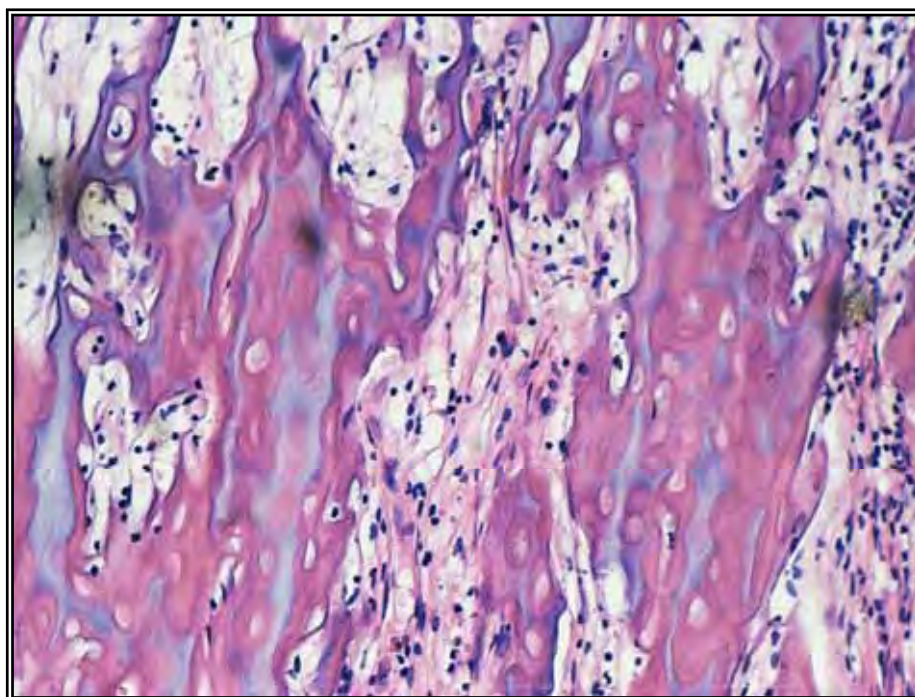


Figura 23 – Osso e Medula 20 dias (160X).

Anexo D – Ilustrações da Análise Imunoistoquímica

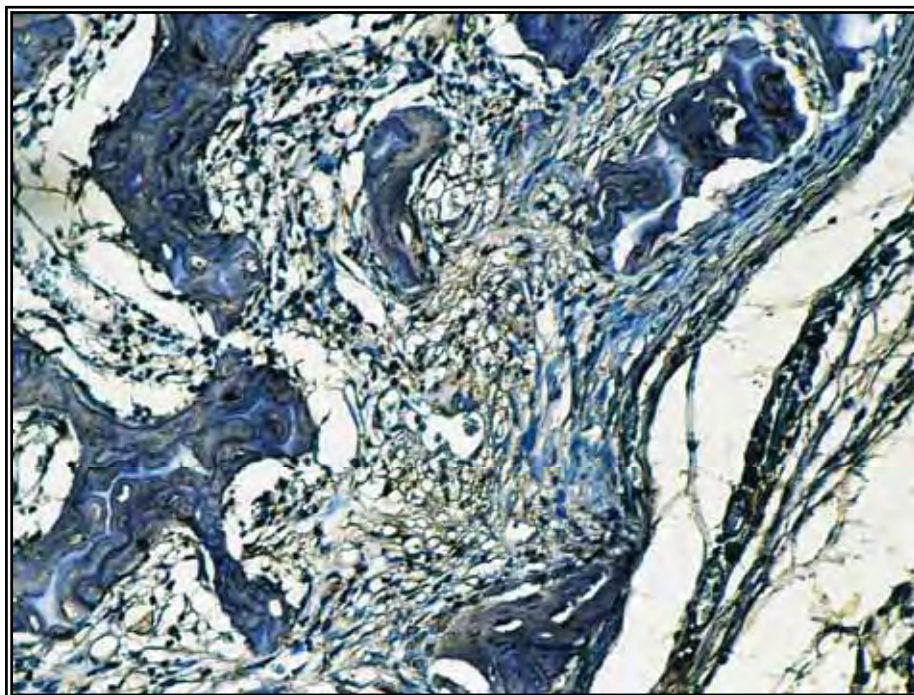


Figura 24 – Osso e Medula 10 dias Cbfa1 (160X)

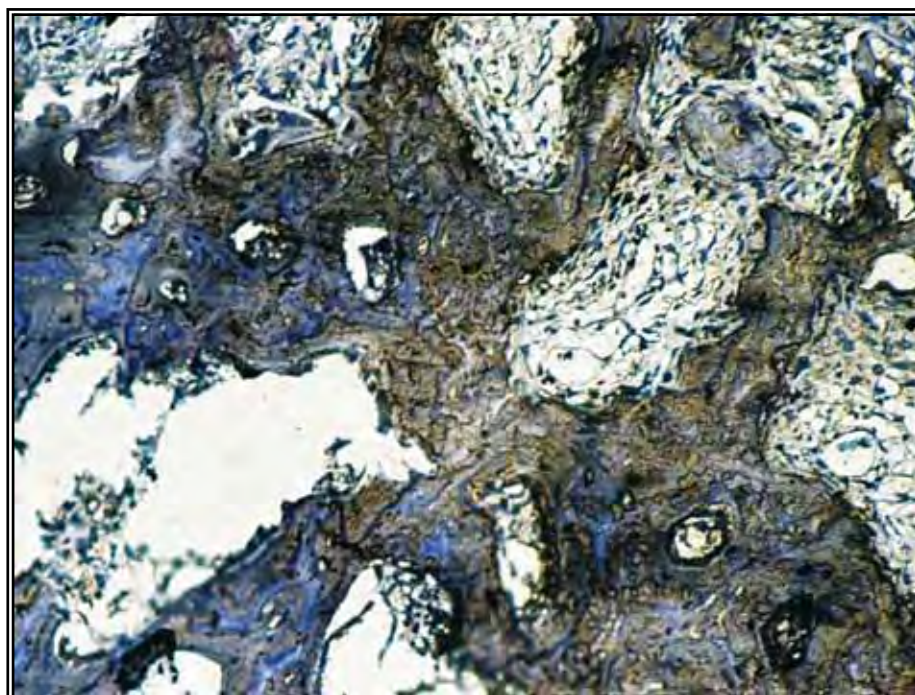


Figura 25 – Osso e Medula 10 dias Osteocalcina (160X).

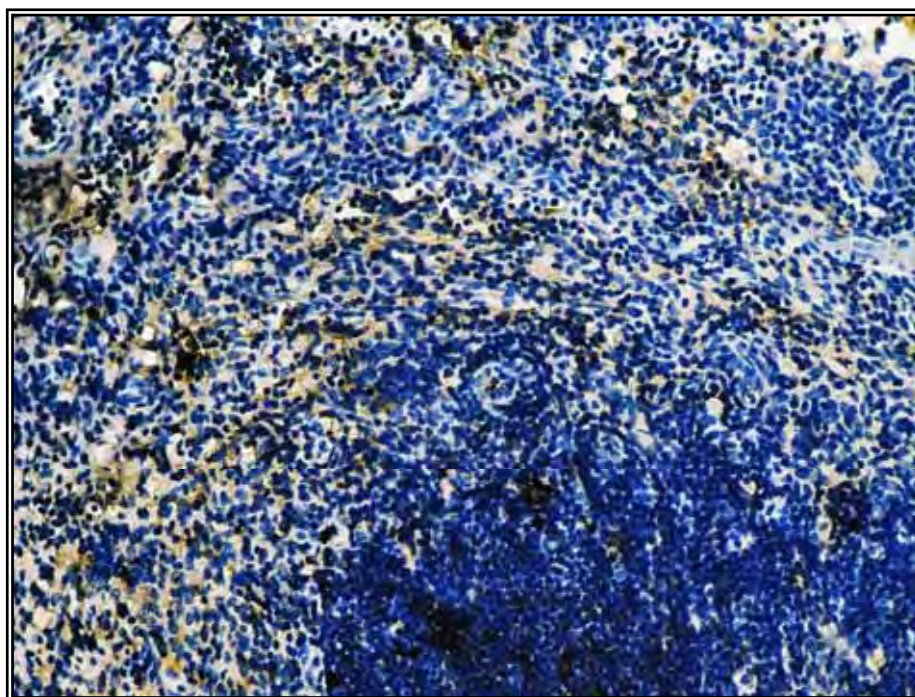


Figura 26 – Medula 20 dias Cbfa1 (160X).

Anexo E – Ilustrações da Análise por Fluorocromos



Figura 27 – R1 – Grupo II Alizarina (25X)

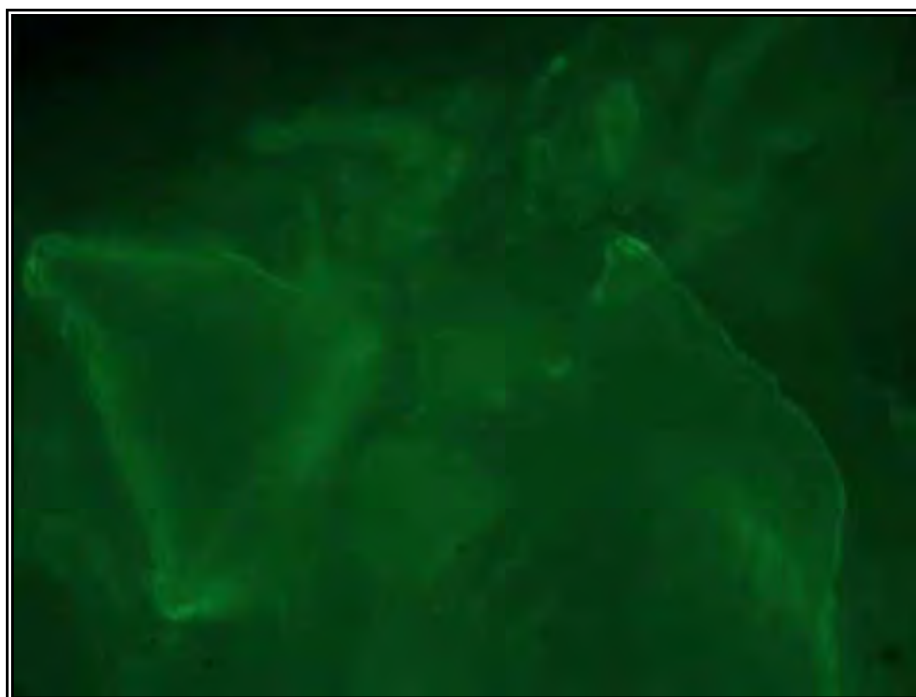


Figura 28 – R1– Grupo II Calceína (25X).

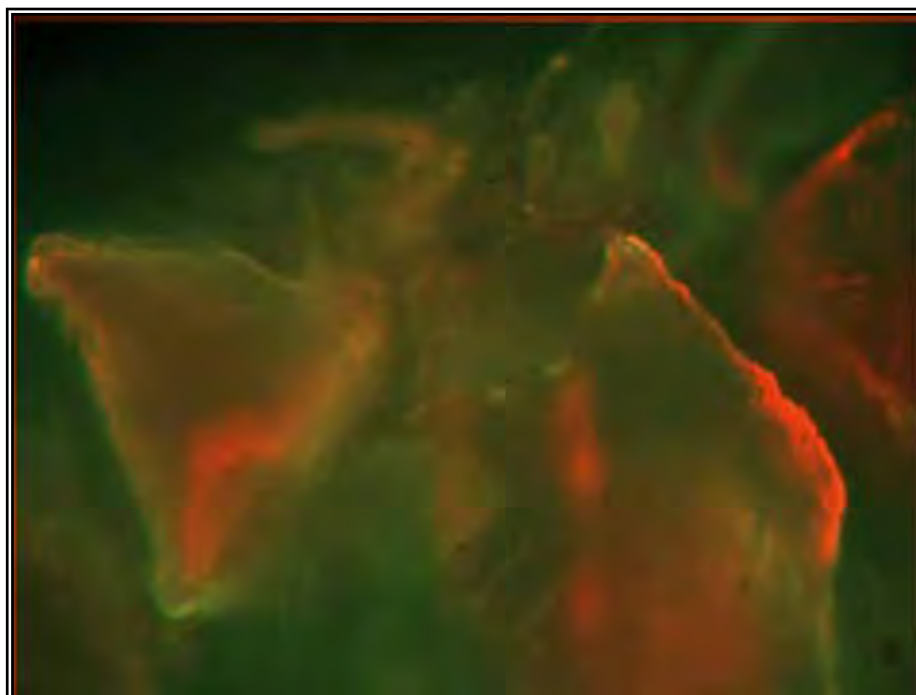


Figura 29 – R1 – Grupo II Sobreposição (25X).

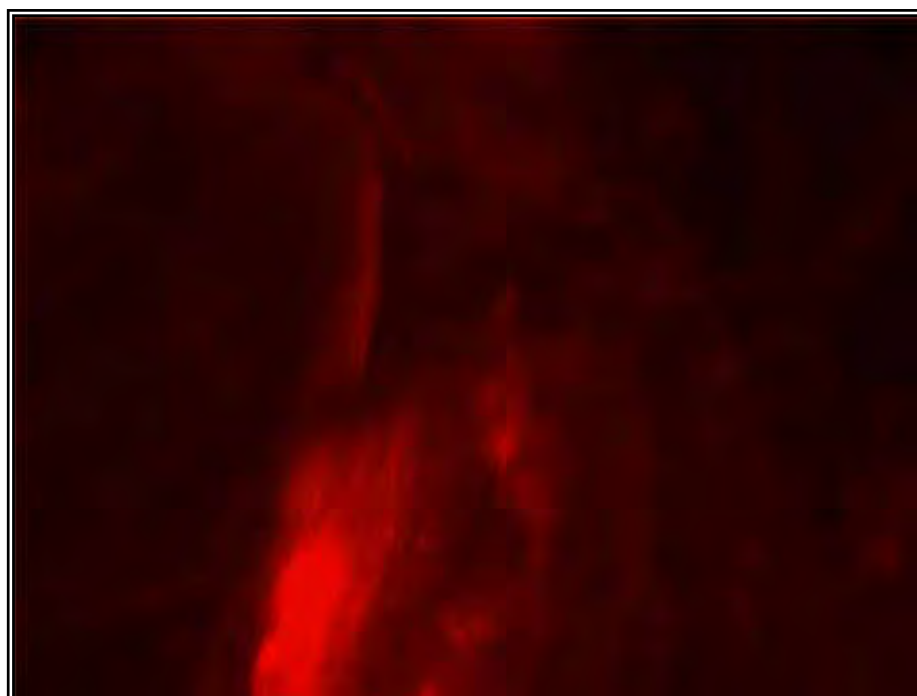


Figura 30 – R2– Grupo III Alizarina (25X).

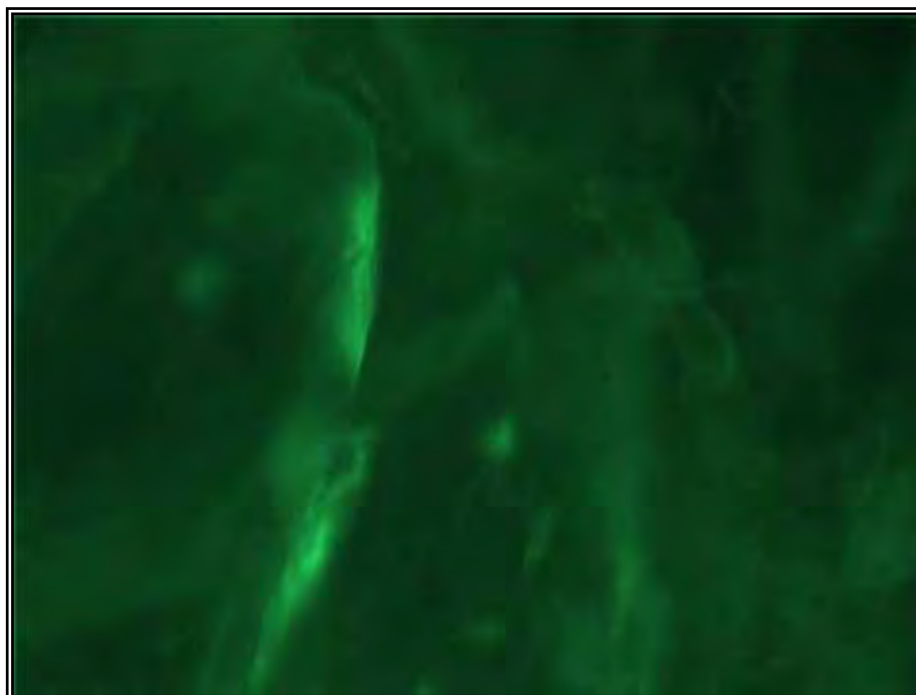


Figura 31 – R2– Grupo III Calceína (25X).

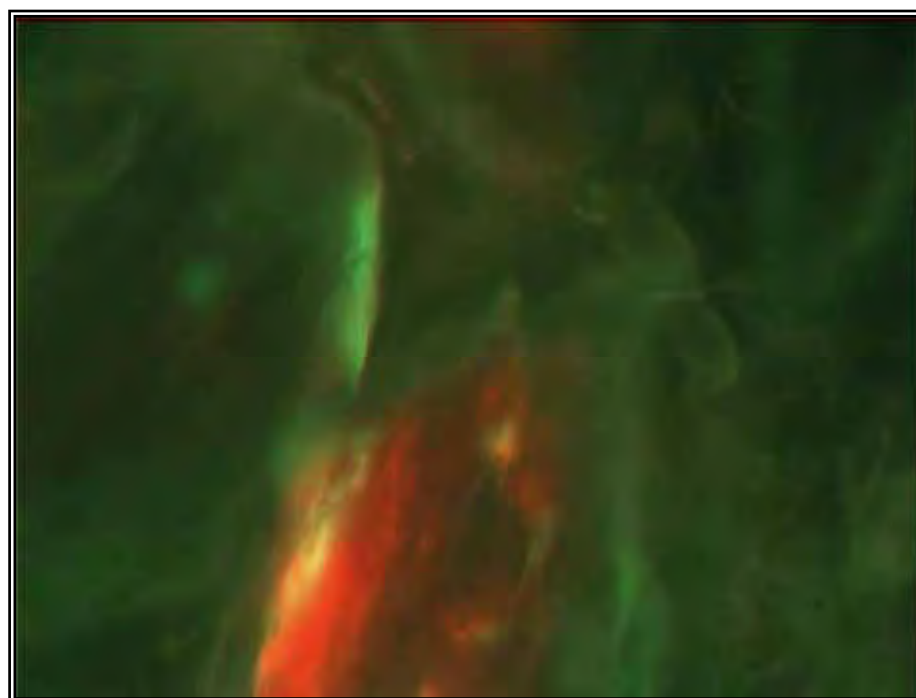


Figura 32 – R2– Grupo III Sobreposição (25X).