

Laís Sara Egas Muniz Barreto Valle

**REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS CRÍTICOS DE
CALVÁRIA DE RATOS PREENCHIDOS COM BIO-
OSS[®], GENOX INORGÂNICO[®] E GENOX
INORGÂNICO 700: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA E HISTOLÓGICA**

Araçatuba

2019

Laís Sara Egas Muniz Barreto Valle

**REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS CRÍTICOS DE
CALVÁRIA DE RATOS PREENCHIDOS COM BIO-
OSS[®], GENOX INORGÂNICO[®] E GENOX
INORGÂNICO 700: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA E HISTOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do
Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de
concentração em Implantodontia).

Orientadora: Professora Associada Dra. Daniela Ponzoni

Araçatuba

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V181r Valle, Laís Sara Egas Muniz Barreto.
Reparo ósseo em defeitos críticos de calvária de ratos preenchidos com Bio-Oss®, Genox Inorgânico® e Genox Inorgânico 700 : análise histomorfométrica e histológica / Laís Sara Egas Muniz Barreto Valle. – Araçatuba, 2019
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Daniela Ponzoni

1. Materiais biocompatíveis 2. Modelos animais 3. Regeneração óssea I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedicatória

A minha força e o meu sorriso vem de um Deus que opera milagres! Eu vivo, respiro e transpiro amor e luz por causa de um Deus que é meu melhor amigo! Eu escolhi encarar a vida com positividade porque eu posso sentir o cuidado, e o amor mais verdadeiro desse mesmo Deus a cada segundo! Esse Pai misericordioso que até permitiu provações acontecerem, mas nunca deixou nenhum mal me tocar, muito pelo contrário, o bom Pai transformou e continuará transformando tudo de ruim em vitórias e bênçãos!

Por ser uma menina preciosa aos olhos do Pai, o próprio Deus me presenteou com um time imbatível de bons amigos espirituais, com os quais eu posso contar com a intercessão e o amparo.

Santo Antônio, meu amigo e fiel protetor; São José da providência; Santa Terezinha do Menino Jesus que enche a minha vida com a alegria das cores e o perfume das suas rosas; São Rafael Arcanjo aquele que é a própria cura de Deus e aproveita uma única oportunidade para transformar a vida de todos os envolvidos e da tão doce Mãe Maria, a

quem eu fui entregue logo quando nasci, ela sempre me carrega debaixo do seu manto e me põe no colo com todo amor para enxugar minhas lágrimas.

Esse mesmo Deus tão sábio desenhou toda minha vida e permitiu que eu aprendesse a bondade, a honestidade e o caráter no meu núcleo familiar e foi lá também que me fez desenvolver todos os dons necessários para o bem viver.

Joadson Egas, meu irmão, meu Dindo, minha referência de afeto, de bondade e inteligência. Foi ele quem cuidava de mim quando eu ficava doente, quem me ensinou a andar de bicicleta, a ler e a escrever. Assim como foi o primeiro a me oferecer jornais, livros de filosofia e ciências sociais e, dessa sempre me incentivou a desenvolver o pensamento crítico e posicionamento político.

Já minha mãe, Edelzúita Egas, me fez extremamente independente, pró-ativa, dedicada em tudo que faço, ágil, determinada, gentil e simpática com todos independente de classe sócio-econômica.

Tanto minha mãe como meu irmão, me ensinaram a ler as pessoas nas entrelinhas, a compreender importância da

língua corporal e, sobretudo, me mostraram que eu posso me afastar a qualquer momento de qualquer pessoa que vá contra meus valores, meus princípios ou me maltrate.

Por tudo isso e por tanto, eu só posso dedicar esses dois anos exclusivos de estudos a Deus, aos meus amigos espirituais, à minha mãe e ao meu irmão.

Muito obrigada por me fazerem chegar até aqui! O título é nosso!

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Todo dia eu agradeço

Tanta gente que conheço

E num mundo tão avesso

Essa gente não tem preço.

Pois são demais são pura luz

São Chicos, Terezinhas de Jesus

Tem Tua paz no coração

A caridade e a confirmação

E se a carne é prisão

O Teu amor liberta

Não será preso não

Quem tem a alma aberta

(Tanta Gente - Nizan Guanaes, Grupo de Oração pela Arte

(OPA)

*Meu coração transborda de alegria por ter conhecido
pessoas tão especiais ao longo desses 31 anos de existência! Por
isso, eu comecei os meus agradecimentos louvando a Deus por
ter colocado cada um de vocês no meu caminho, e “Tanta*

gente” é a música que resume perfeitamente todo meu sentimento de gratidão. Tenho sorte de conviver e poder contar com a ajuda de pessoas tão lindas e generosas durante esses dois anos de mestrado.

Mais do que a oportunidade do título, Araçatuba significa para mim mudança de vida, crescimento e amadurecimento pessoal e uma oportunidade incrível de autoconhecimento.

Cada “não” escutado me aproximou de profissionais excelentes, referências em suas áreas de atuação. Fato que só confirma a minha teoria de que os profissionais de excelência são generosos e muito seguros de si. Gratidão a cada porta fechada!

Minha sincera gratidão e meu eterno carinho:

Aos professores:

Desde os professores das primeiras letras, que me ensinaram a contar, ler e escrever a todos os professores responsáveis pela minha formação escolar, universitária e pós-universitária: gratidão! Em especial agradeço aos que mantenho contato atualmente:

Marcos André Matos, cirurgião buco-maxilo-facial e coordenador do meu curso de especialização. Muito obrigada por confiar em mim e sempre me incentivar! O carinho é mútuo e eu admiro muito a forma que o senhor conduz os casos, cuida dos pacientes de maneira integral, gentil, atenciosa e humana (do pré ao pós-operatório), mas não deixa de ser um empresário ágil também.

A vida nos apresentou em 2006 quando eu estava no primeiro semestre da graduação, acompanhando minha tia numa consulta, e ali o senhor me ensinou: “A gente não opera raio-x! (nem qualquer outro exame de imagem)”. Eu nunca me esqueci e foi por isso que anos depois eu escolhi me especializar com o senhor e não me arrependi!

O senhor nem sabe, mas desde 2006 até hoje eu emprego a sua premissa em todos os meus atendimentos, tanto na clínica geral como na implantodontia. Muito obrigada por me ensinar a enxergar o indivíduo muito além da película! O senhor me inspira!

Wirley Gonçalves Assunção, então coordenador de área, quem mesmo sem me conhecer, me aceitou durante a

entrevista de seleção e sempre torceu pela minha bolsa (sem isso eu não estaria aqui).

Idelmo Rangel Filho, que desde o primeiro dia me acolheu com um sorriso farto e olhar atento. A simpatia é mútua e apesar do pouco contato o senhor sempre foi o meu anjo bom aqui.

Roberta Okamoto, não houve um dia que a senhora não tenha me recebido com um sorriso farto, tamanha fofura e ouvidos e olhos bem atentos! Eu fico muito feliz que a Plataforma Sucupira tenha nos aproximado e, principalmente, pela senhora ter me recomendado com tanta confiança ao professor André Briso na época.

André Luís Fraga Briso, então coordenador do programa de pós-graduação. Foi por causa de uma ajuda despretensiosa no cadastro da Plataforma Sucupira, que eu pude conhecer o coração tão generoso e divertido do senhor. Eterna gratidão pelos ensinamentos, pelo carinho, atenção e cuidado comigo sempre. Estarei sempre à disposição para o que o senhor precisar!

Mariza Akemi Matsumoto, mais conhecida como “mãe Mariza”. É dona de um coração grandão, atento, sincero e

muito sábio! Desde o início do curso sempre estive disposta a me ajudar! Nunca me esquecerei de quando meu processo do comitê de ética foi negado e, a senhora foi a única entre todos os presentes que prontamente largou seu cafezinho, pôs os óculos e disse: “vem comigo, Laís!”, depois sentamos em frente ao seu computador, a senhora ditou tudo o que eu deveria escrever e mandou eu procurar o parecerista responsável. Além disso, permitiu que eu participasse de uma aula especial sobre histologia do tecido ósseo preparada para os seus orientados; liberou o meu acesso às aulas de histologia da graduação; tirou todas as minhas dúvidas durante a licença maternidade da minha orientadora; também me ensinou a quantificar as células para a dissertação e num momento mais conturbado se prontificou a fazer a análise histológica descritiva antes mesmo que eu pedisse.

Eu fiquei muito feliz quando minha orientadora sugeriu a senhora como banca, porque não poderia ser outra pessoa!!! Muito obrigada por sempre me ouvir e por ser tão lúcida! Obrigada por deixar as portas sempre abertas para mim e por ter sempre um lanchinho na sala da senhora! Gratidão por me fazer acreditar que o ambiente acadêmico pode ser

sím cooperativo de maneira desinteressada! A senhora é um ser humano especial e todos ao seu redor sabem disso! Sorte de quem tem o prazer dessa convivência! Parabéns por ser tanto amor e luz!

Celso Koogi Sonoda, sempre risonho, racional, aberto e muito simples! Nós podemos conversar sobre a vida, plantas, alimentação, dentes ou ciência com a mesma leveza. O professor é uma das pessoas mais inteligentes que conheço e sempre que saio da sua sala tenho a sensação que preciso estudar mais e mais. Obrigada por me fazer pensar a ciência de uma maneira simples e objetiva! Muito obrigada pela confiança mútua! Muito obrigada por me incentivar e estimular a minha curiosidade sempre! O senhor me ensinou que eu posso confiar nas pessoas e que elas vão gostar de mim só pelo meu jeito de ser. Obrigada por me fazer não desistir da docência! E muito obrigada por me adotar (sem eu pedir) durante a licença maternidade da minha orientadora! O senhor é incrível! Gratidão eterna!

Eu gosto sempre de reforçar que se não fossem o prof. Celso e a profa. Mariza, eu estaria perdida durante a licença

maternidade da minha orientadora. Muito obrigada por sempre tão prestativos e por me acolherem!

Daniela Átíli Brandíni, poucos conhecem o tamanho desse coração e eu faço questão de deixar registrado aqui. Quando eu estava muito doente e afastada do curso, recebi uma mensagem dela dizendo: “saiba que você não está sozinha, conte comigo sempre!” e antes disso o nosso contato não passava de “bom dia, boa tarde e oi” pelos corredores do prédio 5. Desde então, ela me levou para lugares de tratamento, por diversas vezes me olhou e disse: “hoje você não está bem” e lá vinha o melhor abraço do mundo. Como se não bastasse, aos 45 do segundo tempo me ensinou a fazer a estatística do meu trabalho e começamos às 13h30 na faculdade e terminamos às 21h30 na casa dela, no outro dia leu a análise descritiva para ver se estava de acordo com a estatística e claro, se disponibilizou para o que eu mais precisasse. Muito obrigada pelos cafés, por abrir as portas da sua casa para mim e pelo seu ombro amigo!

André Luís Fabrís, gratidão por aceitar o convite para participar da minha banca examinadora com tanta prontidão e simpatia sem mesmo me conhecer. Não é a toa

que o senhor é tão querido entre todos os alunos da pós-graduação. Agradeço de coração a sua atenção e disponibilidade!

Daniela Ponzoni, minha orientadora! Por último, mas não menos importante, a senhora que é uma pessoa reservada, mas tem o coração do tamanho do mundo também. Dona de uma personalidade muito parceira e protetora, sempre se preocupou para que eu não me expusesse e me ensinou, sobretudo, que não é nada saudável fazer várias coisas ao mesmo tempo. Eu também jamais me esquecerei de quando mandou entregar os remédios em minha casa (e nunca me cobrou por eles), procurou por neurologistas que pudessem me atender gratuitamente e naquele período mais agudo que ainda não sabíamos do que se tratava, mandava mensagens diariamente para saber como eu estava. A senhora foi muito compreensiva durante o período que a doença me manteve totalmente afastada e incapaz. Muito obrigada pela compreensão e parceria extrema! Obrigada por todos os ensinamentos teóricos e clínicos: eu adoro lhe ver operando! Muito obrigada pela super paciência para me ensinar a escrever e sobre questões de ciência - eu cheguei

aquí sem nunca ter escrito um artigo e sem nunca ter trabalhado com animais (só com a vontade de aprender). Obrigada por ser prática, objetiva e racional e, assim, direcionar as melhores soluções. Eu sei que posso confiar na senhora! Gratidão por me ensinar a focar! Gratidão pelo seu coração tão humano!

Eu sou bastante grata por todos os mestres que passaram na minha vida, mas de modo muito singular os professores Celso Sonoda, Mariza Matsumoto, Daniela Brandini e Daniela Ponzoni me inspiram por serem verdadeiros EDUCADORES no sentido mais amplo da palavra! O caráter, a honradez e ética profissionais de vocês são admiráveis! Assim como a simplicidade e humildade para com qualquer pessoa são características que também chamam a atenção. Além de ser fascinante o prazer com que vocês quatro tem de ensinar e ajudar a todos os alunos sejam seus orientados ou não! Sou fã de vocês 4 e se um dia eu for um pouquinho do que vocês são estarei muito satisfeita! Contem comigo sempre!

Aos funcionários:

Desde os auxiliares de manutenção e limpeza, diretor, ao reitor, eu agradeço a todos que trabalham para o bom funcionamento desta instituição, em especial:

Sr. Arnaldo, que sempre teve prazer em me ensinar a cuidar da melhor maneira dos meus animais e me fazia companhia durante as trocas de maravalha. Mesmo sem nenhuma obrigação colocava água e ração para os meus ratos quando julgava necessário e nos dias que não nos encontrávamos no biotério dizia: “Ô minha filha, você não veio! Está tudo bem?”

Sr. Márcio, o porteiro mais legal! Desde o início me deu várias dicas sobre a cidade e como ele mesmo diz se preocupa comigo da mesma maneira que se preocupa com a filha dele.

Paulo Henrique Costa, técnico do microtomógrafo, que aprendeu junto comigo a trabalhar com calotas de ratos e sempre foi extremamente interessado e prestativo. E até quando não consegui analisar um grupo, ele tentou me ajudar remotamente e solucionar o problema do arquivo corrompido.

Paulo Gratão, Renato Gomes, Marco Ianner, muito obrigada pela carteirinha de sócia do 5. Vocês são incríveis e

me ensinam a importância de um ambiente de trabalho amistoso e leve!

***Renato**, você é um ótimo secretário! Muito obrigada pelos cafezinhos, por conferir todos os documentos que eu imprimia na sua sala e por me ensinar a redigir ofícios e por me deixar sempre fazer telefonemas da sua sala também!*

***Marco**, obrigada pela disponibilidade e extrema preocupação com os pacientes, pelas nossas conversas sobre espiritualidade e por me ensinar tanto!*

***Paulo**, em especial, você me adotou como irmã caçula! Além todas as técnicas laboratoriais, me ensinou a cortar minhas peças e as colorações de HE e Tricômio de Mansson com toda paciência do mundo. Mais do que isso, sempre teve o ombro amigo junto com a Cristina, sua esposa e quando fiquei doente me deu um kimono de presente, me levou para o jiu-jitsu e conseguiu um desconto para que eu pudesse fazer as aulas. Sem falar que compartilhou a senha do Netflix comigo desde o início do mestrado. Muito obrigada pelo carinho de sempre!*

***Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lílian Mada**, as meninas da secretaria, sempre foram muito gentis e*

atenciosas comigo. Muito obrigada por todas as vezes que vocês fizeram questão de me avisar pessoalmente sobre os períodos e obrigações. Graças ao carinho de vocês eu posso defender no prazo!

A todos os profissionais que cuidaram ou cuidam da minha saúde:

Dr. Ricardo Wahys, Enfermeira Yara Bianchini, às psicólogas Flávia Santiago e Bruna Côrrea vocês reforçam todas as teorias das políticas públicas de saúde, exemplificam tão bem a importância do vínculo entre profissional-paciente e do cuidado com o todo. Muito obrigada por me acolherem e cuidarem de mim com tanto carinho!

Dr. Ricardo, me ensina a cada consulta a importância do exame clínico-anamnésico. E eu que achava que era uma ótima dentista porque sempre tratei todos os meus pacientes da mesma maneira independente de ser SUS, particular ou convênio, descobri que não sou nada e ainda tenho muito a aprender com ele. Dr. Ricardo, quando eu crescer quero ser igual ao senhor e passar com o meu paciente dentro do consultório o tempo que for preciso.

Enfa. Yara, é esse docinho de côco sempre solícita, carinhosa e preocupada que me deu o número do seu telefone particular para casos de urgência ou se eu simplesmente precisasse conversar. Ainda bem que eu nunca precisei telefonar para a senhora, mas meu coração se enche de alegria e conforto em saber posso contar com a senhora! Muito obrigada por tudo!

Psí. Flávia, muito obrigada por me acolher na urgência e me atender durante as suas férias com tanto carinho! Não é à toa que você é tão famosa entre os seus colegas e na cidade, você é merecedora de todo sucesso!

Psí. Bruna, apesar de termos iniciado o tratamento esse ano, em pouco tempo de convivência já consigo ver bons resultados. Você chegou num período crítico e graças ao seu trabalho estou evoluindo bem!

À estagiária de pós-doc:

Cláudia Bigetti, mesmo sem me conhecer sempre foi muito solícita em me ajudar com a microtomografia. Me deu apostilas sobre as análises em calota, me avisou quando estava escaneando suas peças aqui na FOA para que eu

pudesse acompanhá-la e aprender. No primeiro dia que fui escanear minhas peças ela passou a manhã inteira lá de Bauru por telefone ajustando as configurações e o flat-field comigo e com o Paulo, o técnico, que estava recém contratado na época e nunca tinha trabalhado com calota. Sempre que o Paulo entrava em contato para tirar dúvidas sobre o meu scaneamento, ela sempre parava o que estava fazendo para nos ajudar sem nenhum interesse.

A Cláudia, ficou tão chateada quanto eu, quando tivemos que descartar a micro-ct da dissertação por conta de um grupo que não conseguíamos fazer a leitura de jeito nenhum e não havia tempo hábil para reoperar os três animais. Com isso, ela me ensinou a reconstruir as peças logo em depois do scaneamento (e antes de desmineralizá-las).

A Cláudia é uma das pessoas mais inteligentes e generosas que conheço, ensinou a micro-ct a todos os pós-graduandos da cirurgia antes mesmo de eu chegar no mestrado, criou um programa que oferece as reconstruções tridimensionais coloridas e muito mais didáticas e partilhou esse arquivo com todos. Ela poderia simplesmente usar essa

ferramenta sozinha, mas como toda profissional excelente no que faz, é segura de si e adora compartilhar o conhecimento.

Aos doutorandos:

Cleídiel Aparecido Lemos, que me adotou como M1 e sempre tirou minhas dúvidas mais bobas, até olhou algumas apresentações minhas antes dos eventos, me ensinou a ler diversos gráficos e suas indicações, mas também chamava minha atenção quando necessário (sempre porque queria o meu bem e o melhor). Muito obrigada por tudo! Você é sem dúvida o melhor aluno de toda pós-graduação, o que mais pública, é um protesista sensacional e disposto a ouvir os colegas e um ser humano extremamente solidário. É incrível perceber (apesar da nossa pouca convivência) como você é capaz de parar, escutar e ajudar qualquer pessoa que lhe solicite. Parabéns por esse coração!

Sandro Bittencourt Bassi, apesar de ser da prótese já me auxiliou em cirurgia, me ajudou com meu EGQ, me ensinou a utilizar o programa Epi-info, montou o prontuário dentro desse programa e sempre que surgia alguma dúvida estava

*sempre disposto a me ajudar ainda que também não soubesse.
Muito obrigada por quebrar a cabeça junto comigo!*

*Nathália Januário, tão querida e solícita, essa
peridontista me salvou quando o micrótomo do prédio 5
quebrou e eu precisei usar o da periodontia. Depois de meses
tentando acesso, na mesma hora que entrei em contato com
ela as portas se abriram e ela parou o que estava fazendo
para me ensinar a operar um micrótomo semi-automático.
Nathí, muito obrigada!*

Aos colegas:

*Letícia Cerrí Mazza, esse ser humano de alma tão nobre
que deixa de fazer por ela para fazer pelo outro ainda que
não o conheça. A Mazza morena é minha colega de turma e
garantiu a minha diversão no primeiro ano de mestrado.
Mais do que isso, ela me apresentou às melhores pessoas de
Araçatuba: o Edsão e a Marininha. Muito obrigada por
dividir seus melhores amigos comigo!*

*Ana Carolina Hernandes, Ana Flávia Piqueira, Bruna
Junger, Caroline Chepernat e Isabela Ervolino, que chegaram
na pós ano passado com toda animação e alegria. Em
especial a Isabela Ervolino que é uma menina naturalmente*

preocupada e atenciosa com todos e é muito bonito observar como ela faz isso de maneira tão genuína e desinteressada! A Isa em particular teve uma participação singular nessas últimas semanas em que eu tive uma recaída e ela literalmente segurou a minha mão, guardou sua dor no bolso, me levou para a missa, para passear e me disse: “vamos juntas!”.

Tenho muita sorte de ter vocês na minha vida!

Jaqueline Hassumi e Cássio Messias Beija-flor, tão queridos e sempre pude contar com eles em todas as cirurgias dos meus ratos. A Jaque com toda paciência me ensinou a anestésiar os animais e me encorajou a remover as calotas.

O Cássio passou 1 mês indo trocar a maravalha comigo até eu perder totalmente o medo dos ratos e em uma das cirurgias ficamos sozinhos operando até 23 horas.

Muito obrigada pela parceria! Contem sempre comigo!

Aos amigos que a FOA me deu:

Leonardo de Freitas Silva e Luíza Monzoli Covre não é a toa que vocês são baianos!

O Leo foi o meu único amigo aqui no primeiro ano e sempre se fez muito presente mesmo à distância. Desde o início ele foi muito preocupado com a minha produção e sempre me passou os seus melhores trabalhos para apresentar. Sem nem me conhecer me deu a sua dissertação para levar no meu primeiro SPBQO e sem eu pedir me passou todo o seu material de inglês para eu estudar para os exames de proeficiência (isso é a coisa mais baiana que existe). Ele sempre teve muita paciência para tirar todas as minhas dúvidas mais bobas relacionadas artigos e revistas, até pagou a tradução de um artigo para mim. Graças a ele eu tinha um artigo publicado para a qualificação e foi por causa dele também que as pessoas começaram a me tratar com dignidade e passaram a me dar “bom dia”. Obrigada por existir, por ter esse coração tão nobre, ser esse ser humano tão bondoso e atencioso com todos e por ser extremamente dedicado em tudo que faz! Você me inspira!

Já a Lu é a pessoa mais parceira e companheira que eu conheço! Linda por dentro e por fora, com quem eu posso contar na saúde ou na doença, na tristeza ou na alegria, dançando funk nas festas ou passando o dia no pronto

socorro. O nosso santo bateu de cara e eu ganhei um anjo! Nunca vou me esquecer do momento em que avisei que ia ficar de observação no PS e ela disse: “eu não vou deixar você caindo sozinha aí nessas cadeiras!”, chegou super rápido lá, cheia de frutas para eu lanchar, conversou com o segurança e deu um jeitinho de me fazer companhia (já que não era permitido acompanhante). Entre tantos momentos que partilhamos, vão ficar para a história as noites e dias que nós perdemos fazendo estatística manual no meu caderno para o meu EGQ e como se não bastasse ela também me ajudou a entender os dados estatísticos de verdade da dissertação. Lulu vai ganhar um troféu de ditado de tabelas e dados!

Muito obrigada por existir, por ser pau para toda obra e por ter esse sorrisoão lindo do tamanho do seu coração grandão demais! Você é puro amor e luz!

O que seria de mim sem vocês dois aqui? Vocês são muito importantes para mim e eu os quero para sempre na minha vida!

À minha família Araçatubense:

Família Cavinatti, que me acolhe em todas as festas, me põe no colo e reclamam muito quando eu não aviso que estou doente ou precisando de ajuda! Maríninha, muito obrigada por ter me emprestado sua mãe, seu pai, suas irmãs e suas cachorrinhas! Vocês são um exemplo de família e de amor para mim!

Sempre vou me lembrar quando em maio/junho de 2018, a Luísi Cavinatti foi caminhar na Pompeu comigo mesmo sem a menor vontade só para me fazer companhia porque eu estava começando a ficar doente e muito mal, mas ainda não tínhamos um diagnóstico.

*De brinde eu conheci os Casonato que fazem a maior festa todo Natal e Reveillon e desde o meu primeiro final de ano aqui em Araçatuba me recebem com tanto carinho na chácara deles. Entre eles tem **Edson Casonato** (Edsão) que eu não canso de dizer que é a melhor pessoa de Araçatuba! Sensato, calmo, extremamente atencioso, atento e dono de um coração do tamanho do céu. Edsão é tão incrível que me disse: “vamos fazer um cafezinho na sua defesa, eu dou um bolo e pego as coisas de minha mãe emprestadas. Na véspera a*

gente vai arrumar aí na sua casa, porque no dia a gente vai trabalhar.” Eu nem preciso falar que foi tudo iniciativa desse coração tão generoso. Eu ainda fico boba com esses carinhos de Deus! Muito obrigada, Edson, por me lembrar que as alegrias da vida estão nesses pequenos milagres!

Aos meus amigos de sempre e para sempre:

Bernardo Gil Brasileiro Ferreira e Priscila Carneiro Oliveira, vocês estão sempre presente ainda que tão distantes. Eu consigo sentir o amor de vocês daqui!

Eu e Bê nos amamos, vibramos um pelo outro e nos apoiamos desde os tempos de Salesiano. Sempre estamos de camarote torcendo um pelo outro, nós entendemos a nossa sinceridade mútua. Você se preocupa e me ampara em todos os sentidos, eu nem tenho como agradecer sua ajuda financeira quando eu tive o acidente automobilístico aqui no primeiro ano e assim que você soube você me mandou dinheiro sem eu pedir. Ainda brigou comigo quando lhe paguei porque sabia que eu estava vivendo só com a bolsa, mesmo sendo seu ano sabático, você não estava trabalhando na época e eu sabia que essa grande ajuda vinha das reservas

que você havia planejado para seu sabático. Gratidão por ser meu irmão tão presente mesmo do outro lado do mundo. Muito obrigada por me incentivar a ter ousadia, coragem e determinação para construir a vida que eu quero! Você me enche de orgulho e me inspira tanto, meu amigo! Amo você!

Pri, você é o presente que a UNIRB me deu! Deus sabia que precisávamos nos conhecer mesmo que fosse pertinho de eu me mudar. Foi um prazer ser sua preceptora, aprendi muita periodontia com você, você também foi minha chefe em seu consultório e bem no dia que comecei lá saiu o resultado do mestrado aqui. Isso não abalou a nossa relação, muito pelo contrário esse dinheirinho a mais foi muito importante nos meus primeiros meses aqui. Muito obrigada por partilhar sua senha da JOMI comigo, por me incluir em todos os seus projetos pessoais e profissionais, por partilharmos sonhos e podermos dividir opiniões e dúvidas. Obrigada por todas as vezes que você disse: “venha passar uns dias em Salvador, eu pago sua passagem!”. Desculpa por eu nunca ter aceitado. Muito obrigada por ser tão simples, disponível, solidária e tão presente na minha vida! Obrigada principalmente por me

deixar participar da sua vida tão de pertinho também! Você é linda demais! Que sorte a minha!

À minha família loira:

Minha irmã de coração Tássia Bahia que me deu de presente minha tia-mãe Cássia Bahia.

Tia linda, o tanto que a senhora se preocupou e cuidou de mim enquanto eu estava doente aqui foi gostoso demais. Muito obrigada por falar comigo todos os dias e por me fazer sentir seu amor e carinho tão de pertinho como se esses mais de 2 mil quilômetros não existissem!

Tassinha é minha loira, é pura luz, amor, simpatia e alegria por onde passa, ela encanta a todos com seu jeitinho meigo. Foram tantos carnavais, cursos, aniversários, celebrações e choros que a nossa irmandade só se fortaleceu quando você se mudou de país. Nossa amizade é a mais linda e leve que existe, o nosso vínculo é tão forte que sentimos quando a outra não está bem. Você é quem me ajuda a racionalizar os fatos e foi quem me disse: "vou pagar seu médico aí, você precisa de um especialista!". Muito obrigada por permitir que eu participe bem de pertinho da sua vida!

*Obrigada por todos os ensinamentos e por crescermos juntas!
A alegria de uma é a alegria da outra e foi você que me
ensinou e me mostrou o verdadeiro sentido do amor! Você é o
melhor presente que o Salesiano me deu!*

À agência de fomento:

*Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível
Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado ao
longo desses dois anos. Sem tal auxílio, eu nem viria à
Araçatuba!*

*É com o coração cheio de gratidão e os olhos cheios de
lágrimas que acabo de escrever esses agradecimentos. Só
agora eu percebi que eu não peço nada de nada e o bom
Deus me manda tudo!*

Gratidão a Deus e ao universo por toda sincronicidade!

Epígrafe

Epígrafe

*Eu piso forte neste chão de amor,
Às vezes caio, mas eu me levanto.
Com tua força, dentro em mim senhor,
Eu nunca páro, eu não calo, eu não canso.
Sou cantador, eu sou pastor de estrelas,
Tanjo rebanho nos raios da lua,
Não me acostumo com os homens da cidade,
Que sabem eles o que é felicidade?
Que sabem eles da terra molhada?
Que sabem eles do entardecer?
Que sabem eles da paz que vem com a alvorada,
Do orvalho da madrugada?
Não conhecem bem querer.
E pra aprender, tem que chorar
E pra aprender, tem que sofrer
E pra aprender, a gente luta, a gente apanha
A vida ensina as manhas, pra gente se defender.*

Terra Molhada - Maria Célia Monteiro e Nizan Guanaes

Grupo De Oração Pela Arte (OPA)

Resumo e Abstract

Valle LSEMB. Reparo ósseo em defeitos críticos de calvária de ratos preenchidos com Bio-Oss[®], GenOx Inorgânico[®] e GenOx Inorgânico 700: análise histomorfométrica e histológica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Resumo

Objetivo: Avaliar por meio da análise histomorfométrica e histológica o potencial osteocondutor dos biomateriais Bio-Oss[®] (Geistlich, Suécia), GenOx Inorgânico[®] (Baumer S.A, São Paulo, Brasil) e GenOx Inorgânico 700 (Baumer S.A, São Paulo, Brasil) no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos.

Métodos: Foram utilizados 48 ratos divididos em quatro grupos de acordo com o material de preenchimento. Grupo controle (GC) com o defeito preenchido somente com coágulo sanguíneo (n=12), GBO preenchido com Bio-Oss[®] (n=12), G300 preenchido com GenOx Inorgânico[®] (n=12) e o G700 com GenOx Inorgânico 700 (n=12). Na calvária de cada animal foi utilizada uma broca trefina de 5 mm de diâmetro interno para confecção de defeito central com 6 mm de diâmetro e a após a inserção dos biomateriais correspondentes. Sobre todos os defeitos foi sobreposta a membrana bovina Gen Derm[®]. Posteriormente, submetidos à eutanásia aos 30 dias e 60 dias pós-cirúrgicos. Após 30 e 60 dias, tais defeitos foram encaminhados para análise histológica e análise histométrica para avaliação das seguintes variáveis: neoformação óssea, presença de biomaterial, leucócitos mononucleares e polimorfonucleares e outros tecidos encontrados (de granulação e medular). **Resultados:** O grupo mais representativo para neoformação óssea foi GC. Aos 30 dias apresentou maior média de tecido ósseo maduro (75,8). Aos 60 dias não houve diferença estatística entre os grupos GC (64,9), GBO (32,9), G300 (45,3) e G700 (26,6). O GBO apresentou maior quantidade de biomaterial após 30 dias (115,9) e 60 dias (118,5). **Conclusão:** Todos os biomateriais bovinos testados mostraram-se biocompatíveis e osteocondutores. Entre os biomateriais observados, o G300 promoveu melhor reparo ósseo.

Palavras-chaves: Materiais biocompatíveis, Modelos animais, Regeneração óssea.

Valle LSEMB. Bone repair in critical calvarial defects of rats filled with Bio-Oss[®], Inorganic GenOx[®] and Inorganic GenOx 700: histomorphometric and histologic analysis [dissertation]. Araçatuba: Faculty of Dentistry, State University of São Paulo; 2019.

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate the osteoconductive potential of Bio-Oss[®] (Geistlich, Sweden), GenOx Inorganic[®] (Baumer SA, São Paulo, Brazil) and GenOx Inorganic 700 (Baumer SA, São Paulo, Brazil) in the bone repair of critical defects in rat calvaria. **Methods:** 48 rats were divided into four groups, submitted to euthanasia at 30 days and 60 postoperative days: the control group (CG) with the defect filled only with blood clot (n = 12), GBO filled with Bio-Oss[®] (n = 12), G300 filled with GenOx Inorganic[®] (n = 12) and G700 with GenOx Inorganic 700 (n = 12). In the calvaria of each animal a 5mm trephine drill was used to make a central defect with 6 mm diameter and after the insertion of the corresponding biomaterials. Gen Derm[®] membrane was superimposed over all defects. Subsequently, these cavities were sent to histological and histometric analysis to evaluate the following variables: bone neoformation, presence of biomaterial, mononuclear and polymorphonuclear leukocytes and other tissues found (granulation and medullary). **Results:** The most representative group for bone neoformation was GC. At 30 days presented a higher mean of mature bone tissue (75.8). At 60 days there was no statistical difference between the GC (64.9), GBO (32.9), G300 (45.3) and G700 (26.6) groups. GBO had a higher amount of biomaterial after 30 days (115.9) and 60 days (118.5). **Conclusion:** All bovine biomaterials tested showed to be biocompatible and osteoconductive, Among the biomaterials observed, the G300 promoted better bone repair.

Key words: Biomaterials, Animal models, Bone regeneration.

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema sobre a divisão dos animais para cirurgia, biomateriais utilizados e análises.....	49
Figura 2: Tricotomia em região frontal da calvária do rato.....	50
Figura 3: Incisão triangular no sentido occipito-frontal.....	51
Figura 4: Fresagem com broca trefina 5 mm de diâmetro interno para confecção de defeito cirúrgico de 6 mm de diâmetro.....	51
Figura 5: Preenchimento do defeito crítico com coágulo sanguíneo.....	51
Figura 6: Grânulos do biomaterial inseridos no defeito crítico.....	52
Figura 7: Membrana reabsorvível sobre o defeito ósseo.....	52
Figura 8: Sutura simples.....	52
Figura 9: Grupo GC – a, b, c) 30 dias. Nota-se formação de trabéculas ósseas ora maduras curtas e arredondadas (*) em defeito recoberto por membrana óssea (#), ora neoformadas (**), em meio a tecido conjuntivo fibroso (Tc). d, e, f) 60 dias. Observam-se eventuais trabéculas ósseas em remodelação (*), circundadas por tecido conjuntivo fibroso (Tc) e em meio a fragmentos da membrana (setas) (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).....	56
Figura 10: Grupo G300 – a, b, c) 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo (Tc), apresentando tecido ósseo em remodelação justaposto à sua superfície (*) e recoberto por membrana óssea	

(#). Nota-se atividade osteogênica no interior da porosidade do material (setas). d, e, f) 60 dias. Tecido ósseo lamelar (*) em contato direto com as partículas do biomaterial (##), bem como áreas com neoformação óssea (**). Observam-se CGMs (setas) associadas ao biomaterial. (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).....57

Figura 11: Grupo G700 – a, b, c) 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo frouxo (Tc), associadas às CGMs (setas) e leucócitos MNs, recoberto por membrana óssea (*). d, e, f) 60 dias. Notam-se ora finas trabéculas maduras (*) em contato direto com as partículas do biomaterial (##), ora tecido conjuntivo infiltrado por CGMs e leucócitos MNs (setas). (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).....57

Figura 12: Grupo GBO – a, b, c) 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo (Tc), associadas a CGMs (setas) e leucócitos MNs, com discreta neoformação óssea (**) recoberto por membrana óssea (*). d, e, f) 60 dias. Persistência de tecido conjuntivo (Tc) circundando as partículas do biomaterial (##), associadas às CGMs (setas) (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).....58

Gráfico 1: Planimetria de ponto em relação aos biomateriais utilizados.....59

Gráfico 2: Planimetria de ponto em relação ao tecido ósseo neoformado.....60

Gráfico 3: Planimetria de ponto em relação quantidade de leucócitos mononucleares.....60

Gráfico 4: Planimetria de ponto em relação quantidade de células gigantes multinucleadas.....61

Gráfico 5: Planimetria de ponto em relação quantidade de outros tecidos encontrados (tecido medular e tecido de granulação).....62

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca: cálcio (elemento químico presente na tabela periódica e nutriente presente na ração dos animais)

P: Potássio (elemento químico presente na tabela periódica e nutriente presente na ração dos animais)

GC: Grupo controle - coágulo (defeitos preenchidos somente com coágulo sanguíneo)

GBO: Grupo Bio-Oss (defeitos preenchidos com Bio-Oss[®])

G300: Grupo 300 (defeitos preenchidos com GenOx Inorgânico[®])

G700: Grupo700 (defeitos preenchidos com GenOx Inorgânico 700)

CGMs: Células gigantes multinucleadas

MNs: Leucócitos mononucleares (células inflamatórias)

PMNs: Leucócitos polimorfomononucleares (células inflamatórias)

g: Gramas (unidade de medida)

mL: Mililitro (unidade de volume)

Kg: Quilograma

mL/kg: Mililitro/quilograma (concentração anestésica)

µm: Micrômetros (unidade de medida)

cm: Centímetros (unidade de medida linear)

mm: Milímetros (unidade de medida linear)

HE: Hematoxilina e eosina (corantes histológicos)

PVPI: Polivinilpovidona

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	45
2.	Materiais e métodos.....	49
3.	Resultados.....	54
4.	Discussão.....	62
5.	Conclusão.....	65
6.	Referências bibliográficas.....	66
7.	Anexos.....	70
	Anexo 01 - Normas da revista a ser publicada.....	71
	Anexo 02 - Aprovação do CEUA.....	83
	Anexo 03 - Tabela dos resultados da análise estatística.....	85

**REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS
PREENCHIDOS COM BIO-OSS[®], GENOX INORGÂNICO[®] E GENOX
INORGÂNICO 700: ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E HISTOLÓGICA.**

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Acta Histochemica. Entretanto, em se tratando da dissertação e para melhor entendimento dos resultados, foram inseridas diversas imagens, as quais serão reduzidas no momento do envio do artigo para publicação (Anexo 1).*

1. INTRODUÇÃO

Densidade e disponibilidade óssea são fatores essenciais para reabilitação com implantes osseointegráveis em pacientes mutilados orais ^{1,2}. A partir do momento em que o dente é perdido inicia-se o processo de reabsorção dos ossos maxilares e mandibular atingindo progressivamente diferentes graus, por isso sabe-se que quanto maior a perda óssea maior a necessidade de reposição desse tecido de suporte, daí vem à necessidade de enxertia óssea capaz de oferecer tratamento adequado com previsibilidade da prótese em função ^{3,4}. Dentre as opções de reposição óssea, o enxerto autógeno é o único com propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras simultaneamente, por isso é chamado padrão ouro da enxertia ⁵⁻⁷.

A tendência atual é desenvolver e utilizar biomateriais que acelerem ou, ao menos, permitam o reparo normal e completo do defeito ósseo, diminuindo a taxa de insucesso pós-operatória ^{8,9}. Com isso, a engenharia tecidual possui o principal objetivo de criar um biomaterial no mínimo osteocondutor e que esteja a contento para o reparo ósseo, semelhantemente ou até superior aos enxertos ósseos ¹⁰.

Dos biomateriais sintéticos, destaca-se a hidroxiapatita natural xenógena de origem bovina, extraídos da porção inorgânica de ossos dos animais sem riscos de infecção cruzada, pois o seu processo de tratamento elimina qualquer risco de resposta imunogênica ¹¹.

O osso inorgânico pode ser usado sozinho ou combinado com barreiras de membranas em lesões isoladas, como defeitos periodontais, deiscências e fenestrações ao redor de implantes e em pequenas osteotomias de seio maxilar ¹¹⁻¹⁶. Dos biomateriais provenientes de osso bovino inorgânico, o Bio-Oss[®] (Geistlich, Suécia) é o mais conceituado no mercado, por isso é considerado padrão ouro quando comparado aos outros biomateriais. O Bio-Oss[®] é capaz de oferecer previsibilidade do tratamento e é composto por uma matriz óssea mineral obtida após completa extração dos componentes

orgânicos do osso bovino medular¹⁷⁻¹⁹. Outros produtos similares provenientes do mercado nacional são o Bonefill[®] (Bionnovation, Bauru, São Paulo, Brasil)²⁰ e os da linha Genios de enxertos ósseos: Gen Mix[®], GenOx Orgânico[®], GenOx Inorgânico[®], Gen Phos[®], OrthoGen[®] e Pratix[®] (Baumer S.A., São Paulo, Brasil)²¹. Estes materiais vêm sendo alvo de pesquisas, com o intuito de observar sua biocompatibilidade, características físico-químicas e potenciais osteocondutor²²⁻²⁴.

Em relação aos biomateriais de matriz inorgânica desmineralizada porosa liofilizada extraída do osso cortical bovina, a indústria nacional oferece o GenOx Inorgânico[®] que deve ser aplicado em procedimentos de implantodontia, bucomaxilofacial e em cirurgias ósseas em geral, tais como: preenchimento de alvéolos; defeitos intraósseos; preenchimento de *GAP's* (espaço entre osso alveolar e o parafuso de titânio) após instalação de implantes imediatos; tratamentos cirúrgicos peri-implantares; lesões ósseas periodontais. O GenOx Inorgânico[®] é um material natural, reabsorvível que apresenta porosidade semelhante ao tecido ósseo natural que leva em média 4 a 6 meses para reparação. Além disso, apresenta como vantagens, dentro de sua adequada aplicação, permitir a instalação do implante em períodos mais curtos²¹.

Com a promessa de ser mais uma alternativa ao osso alógeno e autógeno a Baumer criou dentro da linha Genios, mesma linha do GenOx Inorgânico[®], o produto GenOx Inorgânico 700, ainda em fase de teste, apresenta estrutura e composição química comparáveis ao osso humano, composta por uma porção mineral de hidroxiapatita formada a partir de um processo de sinterização que é um processo natural em que um conjunto de partículas em contato mútuo, sob ação da temperatura, transforma-se em um corpo íntegro e de maior resistência mecânica, podendo, inclusive, tornar-se totalmente denso¹¹.

O estudo da sinterização é feito pela observação das mudanças que ocorrem com o corpo sinterizante (que deve ser sempre poroso) durante o processo e pela

tentativa de associar estas mudanças às condições de sinterização, ao material sinterizado e às características dele. Sendo assim, pode-se alterar as propriedades mecânicas, elétricas e magnéticas além da estrutura do biomaterial (dimensões, densidade e aspecto estrutural). A mudança das dimensões do corpo sinterizante em decorrência da sinterização está ligada ao processo de diminuição da área superficial do sistema, embora esta mudança não seja necessária para se diminuir esta energia. Diminuir a área superficial das partículas implica em diminuir a área da interface material – vapor (espaço vazio). Isto é feito trocando-se esta interface pela interface material–material. A fase vapor corresponde justamente aos poros no interior do corpo sinterizante. Eliminar a interface material–vapor pode implicar em eliminar os poros. Se isto ocorre, o corpo fica mais denso. Dentre todos os tipos de processos de sinterização, o empregado pela Baumer para criação do GenOx Inorgânico 700 foi o chamado de sinterização de *supersolidus*, ocorre quando a composição do pó préligado é tal que está em um intervalo de uma reação que dá origem a uma fase líquida. Quando a temperatura da amostra excede aquela da formação do líquido, este é formado no interior de cada partícula. Dentro de cada partícula coexistem, portanto, sólido e líquido. As quantidades relativas destas fases dependem da temperatura e da composição da liga. A fase líquida forma camadas separando partículas. Isto opera como lubrificante, facilitando o deslizamento das partículas, conseqüentemente a fragmentação mencionada. Após ter sido formado e fragmentado as partículas originais, o líquido extravasa e preenche a porosidade ²⁵.

A sinterização ocorre espontaneamente na natureza, por exemplo, com a neve e o gelo das geleiras, ou mesmo entre cubos de gelo dentro do isopor, bem como no processo de solidificação das rochas sedimentares, em que temperatura e pressão atuam simultaneamente ²⁵.

No caso do biomaterial GenOx Inorgânico 700, a sinterização permite que suas partículas se mantenham porosas por dentro, assemelhando-se assim ao osso humano.

O GenOx Inorgânico 700 difere do seu concorrente de marca, o GenOx Inorgânico® apenas na temperatura utilizada durante o processo de sinterização. O GenOx Inorgânico 700 foi submetido ao processamento físico-químico comprovadamente eficaz quanto a agentes infecciosos, apresenta estrutura porosa e firme capaz de facilitar a deposição de células osteogênicas e formação de osso novo por osteocondução. Também pode ser lapidado e adaptado ao leito receptor de maneira fácil aliado a estes fatores: sua natureza trabeculada intacta e sem resíduos, permite rápida vascularização sanguínea. Dessa maneira, o GenOx Inorgânico 700 tem indicação em cirurgias ósseas em geral, implantodontia, cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, levantamento de seio maxilar, defeitos intraósseos e tratamentos cirúrgicos peri-implantares, lesões ósseas periodontais e cirurgias parodontológicas como também em recobrimento de espiras expostas²¹.

Este estudo apresenta como hipótese alternativa que material em fase de teste chamado de GenOx Inorgânico 700 seja superior ao seu antecessor da mesma empresa e já no mercado por alguns anos o GenOx Inorgânico® dando espaço ao trabeculado ósseo neoformado de maior qualidade.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente em calvárias de ratos por nível histomorfométrico e histológico, o potencial de reparo dos substitutos ósseos GenOx Inorgânico® e GenOx Inorgânico 700. A fim de oferecer opções de materiais nacionais a custos mais acessíveis quando comparados aos materiais importados, baseado no interesse profissional de que no momento da instalação do implante e durante sua sobrevida.

2. Materiais e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso em Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob processo número 835/2018 (Anexo 2).

2.1 Delineamento do Experimento

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em quatro grupos (n=12), submetidos à eutanásia em dois momentos do experimento, aos 30 dias e aos 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP. Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (6 mm de diâmetro), como discriminado a seguir e esquematizado na Figura 1:

- Grupo Coágulo (GC) – n=12: O defeito ósseo foi preenchido somente com coágulo
- Grupo Bio-Oss® (GBO) – n=12: O defeito ósseo foi preenchido com Bio-Oss®
- Grupo GenOx 300 (G300) – n=12: O defeito ósseo foi preenchido com Genox Inorgânico®
- Grupo Genox 700 (G700) – n=12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com osso Genox Inorgânico 700.

Em todos os grupos foi utilizada membrana reabsorvível Gen Derm® recobrindo o defeito.

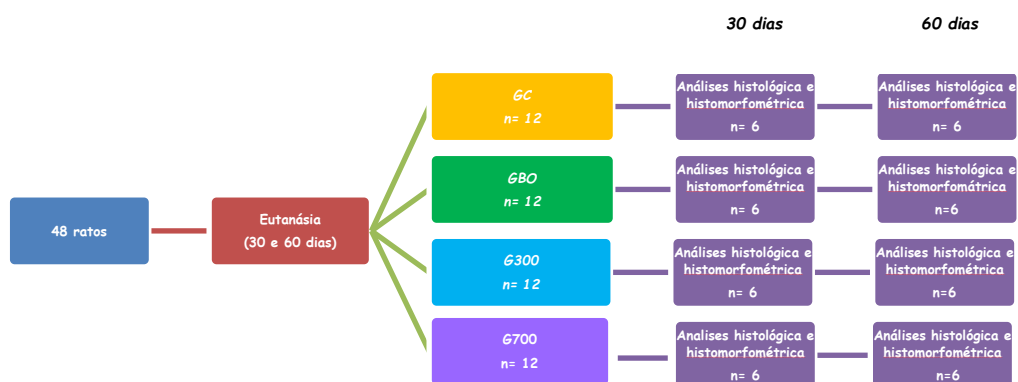


Figura 1: Esquema sobre a divisão dos animais para cirurgia, biomateriais utilizados e análises.

2.2 Protocolo para cirurgia experimental

Os animais permaneceram em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à anestesia por meio da administração via intramuscular, com cloridrato de ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), sob a dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária craniana (Figura 2), antissepsia com polivinilpovidona tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos cirúrgicos estéreis.



Figura 2 - Tricotomia em região frontal da calvária do rato.

Foi realizada incisão triangular (Figura 3) no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2cm, com lâmina de bisturi nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 5mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico de 6,0mm de diâmetro²⁶, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura 4).



Figura 3- Incisão triangular no sentido occipito-frontal.



Figura 4 - Fresagem com broca trefina 5mm de diâmetro interno para confecção do defeito cirúrgico de 6mm de diâmetro.

Em GC (n= 12) os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo (Figura 5), em GBO os defeitos foram preenchidos com Bio-Oss[®] (n= 12), no G300 os defeitos foram preenchidos com GenOx Inorgânico[®] (n= 12) e G700 com GenOx Inorgânico 700 (n= 12) (Figura 6). Posteriormente foram instaladas membranas de cortical óssea bovina reabsorvíveis de dimensões 30 mm x 30 mm sobre os defeitos preenchidos (Figura 7) com recortadas em quadrados (Gen Derm[®], Baumer, São Paulo, Brasil).



Figura 5- Preenchimento do defeito crítico com coágulo sanguíneo.



Figura 6 - Grânulos de biomaterial inseridos no defeito crítico.



Figura 7- Membrana reabsorvível sobre o defeito ósseo.

Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados a pontos interrompidos (Figura 8) com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) em plano único.



Figura 8 - Sutura simples.

Para pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 mL de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge

Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e Dipirona Sódica 50-600mg/kg SC/IV/IP a cada 12 horas (Analgésico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Os animais foram eutanasiados nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico.

2.3 Processamento Histológico

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 05 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e cortadas em micrótomo cortes de 5µm de espessura e posteriormente montadas em lâminas. As lâminas foram coradas com HE.

2.4 Forma de análise dos resultados

2.4.1 Análise histomorfométrica

Após a coloração das lâminas em HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando uma lupa (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um *software* analisador de imagens digitalizadas ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas. A análise quantitativa dos defeitos foi realizada em todos os cortes corados com HE. Foram capturados e registrados seis campos em objetiva de 40x abrangendo duas áreas periféricas e um central do defeito, a fim de se proceder a morfometria das células utilizando software ImageJ (Schneider *et. al*, 2012).

Na aba Plugins foi utilizada a ferramenta Grid para a confecção de um retículo contendo 221 cruces. Com a ferramenta Cell counter foram contabilizadas somente as células que coincidiam com a intersecção das cruces, denominados de pontos. A soma dos 6 campos resultaram no total de tecido ósseo neoformado, biomaterial, leucócitos mononucleares (MN), células gigantes multinucleadas (CGMs) e outros (tecido medular e tecido de granulação) de cada animal.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism 7 XML Project (Graphpad software, San Diego, CA, EUA), seguindo um padrão de trabalhos prévios (18, 25, 26). A análise comparativa dos biomateriais foi realizada utilizando o teste estatístico de normalidade Kruskal-Wallis e para as interações que mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), o pós teste Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1 Análise morfológica microscópica

GC – Aos *30 dias* o defeito ósseo mostra-se quase que totalmente preenchido por trabéculas de tecido ósseo pequenas e com superfícies arredondadas, ora maduro, ora em remodelação em meio a tecido conjuntivo frouxo vascularizado, com eventuais leucócitos MNs. No período de *60 dias*, notam-se trabéculas de tecido ósseo maduro, de aspecto lamelar, em processo de remodelação. O tecido conjuntivo apresenta-se mais colagenizado, com eventuais leucócitos mononucleares (figura 9).

GBO – Aos *30 dias* observa-se defeito ósseo preenchido por evidentes partículas de biomaterial em meio a tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado, moderadamente infiltrado por leucócitos MNs. Em contato com as partículas, pode-se observar a presença de feixes de fibras colágenas paralelas entre si, onde nota-se a presença de CGMs tipo corpo estranho finas e alongadas. Eventualmente, tem-se presença de tecido ósseo

maduro em remodelação em contato direto com o biomaterial. Sobrejacente à área do defeito, observam-se fragmentos da membrana de barreira óssea sendo substituída por tecido ósseo neoformado. *Aos 60 dias* notou-se que a formação óssea observada aos 30 dias se manteve, havendo predomínio de tecido conjuntivo permeando as partículas do biomaterial, as quais mantiveram dimensão e morfologia semelhantes ao período anterior. O tecido conjuntivo mostrou-se mais maduro, com menor presença de vasos sanguíneos e ainda com eventuais leucócitos mononucleares. A reação tipo corpo estranho se manteve neste período, pela presença das CGMs finas e regulares localizadas sobre as partículas do biomaterial. Em um dos espécimes foi possível observar uma barreira óssea formada sobre o defeito. No entanto, a mesma se deu às custas da membrana posicionada no defeito e não às custas do biomaterial (figura 10).

G300 – No período de *30 dias* observa-se recobrimento da área de defeito por membrana óssea de barreira em processo de degradação. Subjacente, preenchendo o defeito tem-se grandes partículas do biomaterial em meio a tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório mononuclear. Em contato com o biomaterial observa-se, ora fibras colágenas paralelas entre si com CGMs do tipo corpo estranho finas e alongadas, ora tecido ósseo em maturação. Chama a atenção presença de poros nas partículas do biomaterial, possibilitando a formação óssea em seu interior. *Aos 60 dias*, nota-se presença de tecido ósseo maduro com espaços medulares regulares preenchidos por tecido hematopoiético. O tecido ósseo apresenta-se em remodelação circundando as partículas do material, bem como em meio a elas devido à presença dos poros. A membrana de barreira mostra-se em degradação, sendo substituída por tecido ósseo neoformado (figura 11).

G700 – *Aos 30 dias* tem-se defeito ósseo preenchido por partículas porosas do biomaterial à semelhança de matriz óssea mineralizada, em meio a tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e moderadamente infiltrado por leucócitos MNs. Circundando as partículas nota-se arranjo de fibras colágenas paralelas às suas

superfícies, com presença de CGMs finas e alongadas. Em meio aos seus poros, pode-se observar discreta atividade osteogênica. Eventualmente observa-se tecido ósseo em contato direto com o biomaterial. Nota-se a presença de membrana de barreira óssea recobrindo o defeito. No período de *60 dias*, observam-se partículas permeadas por tecido conjuntivo frouxo com moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Em contato com o biomaterial tem-se, em sua maioria, fibras colágenas com CGMs. Eventualmente, nota-se formação de tecido ósseo maduro direto sobre a superfície das partículas. Observa-se degradação da membrana de barreira suprajacente ao defeito (figura 12).

Abaixo seguem as pranchas com imagens histológicas realizadas com coloração de HE do processo de reparo ósseo em todos os grupos evidenciando a formação óssea e o tempo (figuras 9, 10, 11, 12):

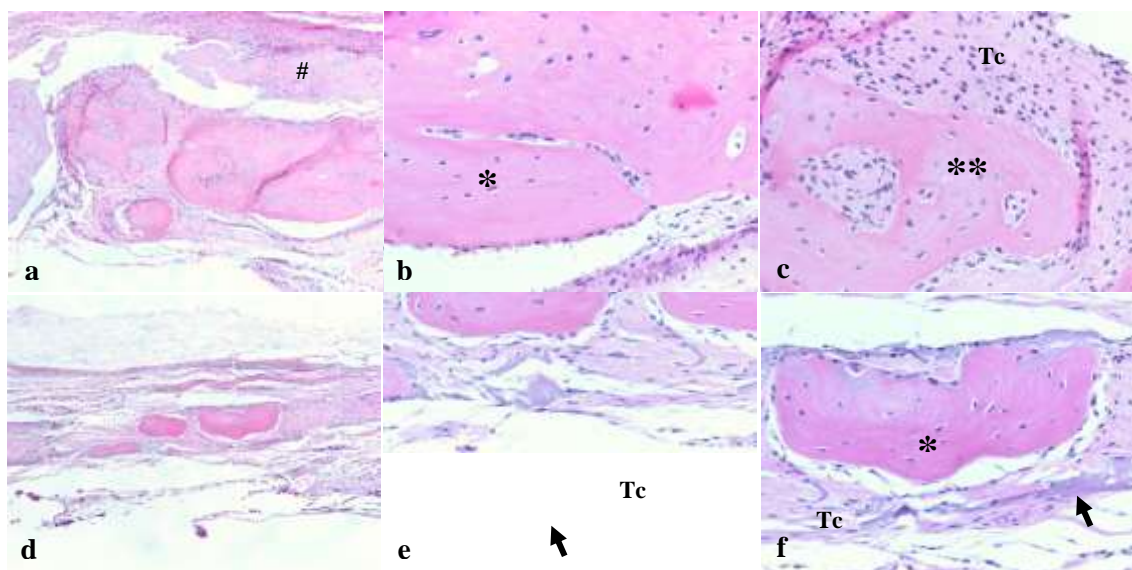


Figura 9 – GC – a, b, c) 30 dias. Nota-se formação de trabéculas ósseas ora maduras curtas e arredondadas (*) em defeito recoberto por membrana óssea (#), ora neoformadas (**) em meio a tecido conjuntivo fibroso (Tc). d, e, f) 60 dias. Observam-se eventuais trabéculas ósseas em remodelação (*), circundadas por tecido conjuntivo fibroso (Tc) e em meio a fragmentos da membrana (setas) (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).

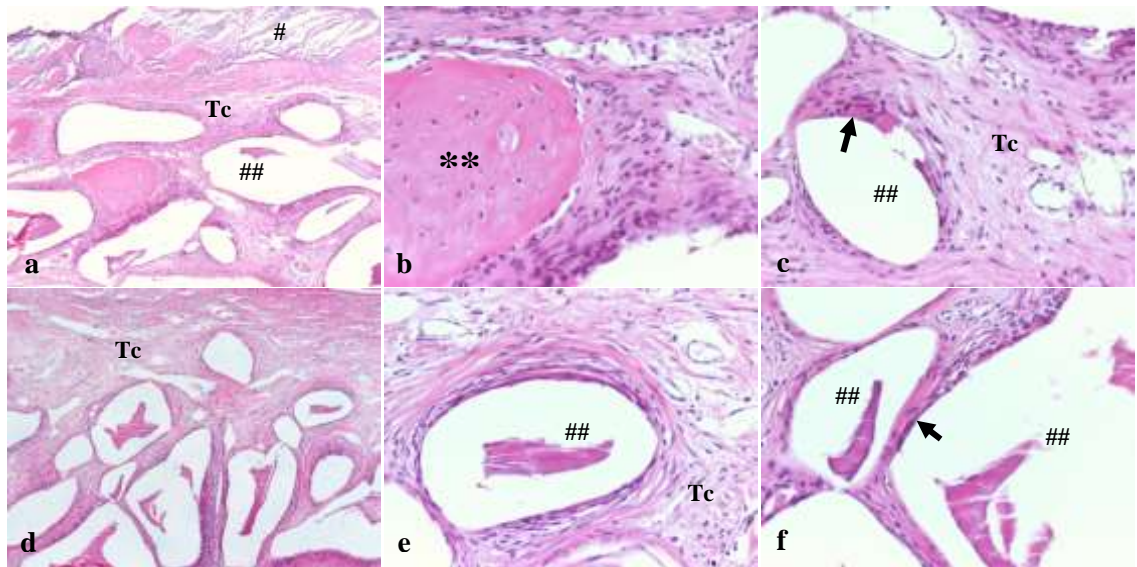


Figura 10 – GBO – a, b, c) 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo (Tc), associadas a CGMs (setas) e MNs com discreta neoformação óssea (**) recoberto por membrana óssea (#). d, e, f) 60 dias. Persistência de tecido conjuntivo (Tc) circundando as partículas do biomaterial (##), associadas às CGMs (setas) (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).

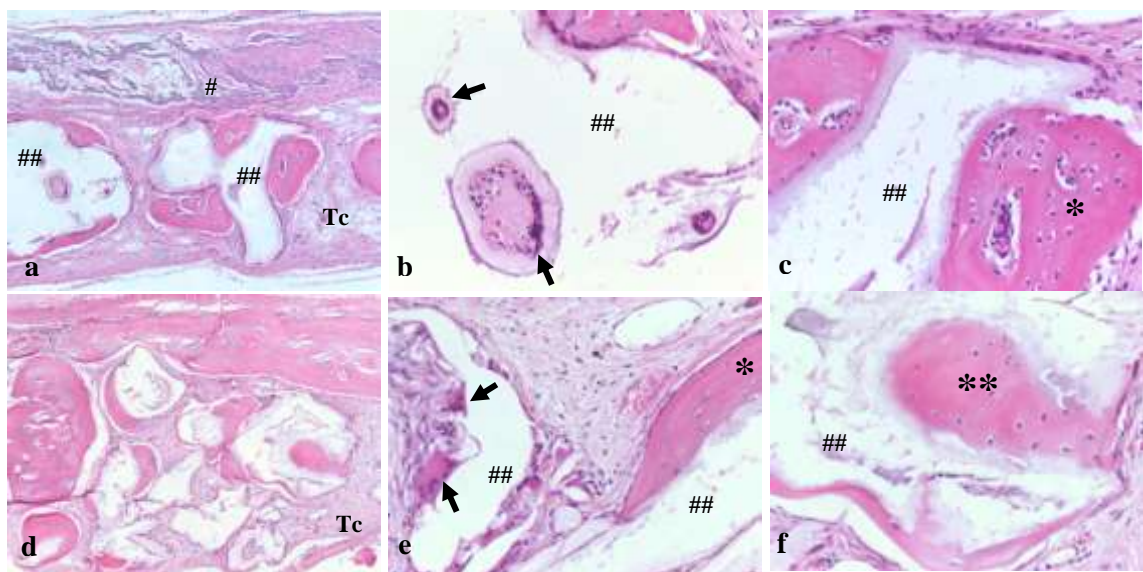


Figura 11 – G300 – a, b, c) 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo (Tc), apresentando tecido ósseo em remodelação justaposto à sua superfície (*) e recoberto por membrana óssea (#). Nota-se atividade osteogênica no interior da porosidade do material (setas). d, e, f) 60 dias. Tecido ósseo lamelar (*) em contato direto com as partículas do biomaterial (##), bem como áreas com neoformação óssea (**). Observam-se CGMs (setas) associadas ao biomaterial. (HE; a, d – aumento original 10x; b, c, e, f – aumento original 40x).

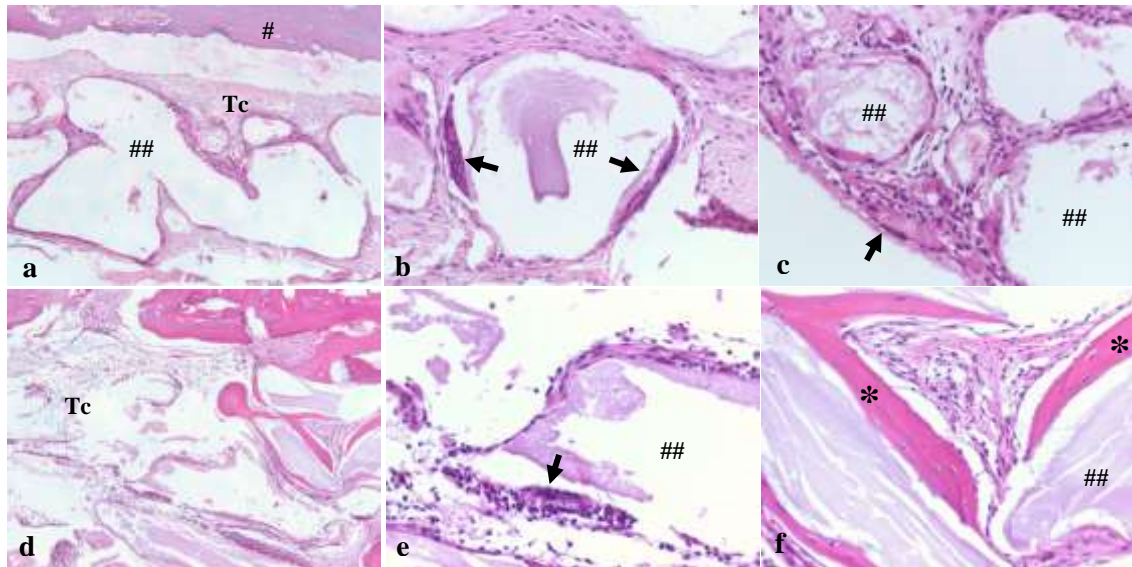


Figura 12 – G700 – *a, b, c* 30 dias. Defeito preenchido por partículas do biomaterial (##) em meio a tecido conjuntivo frouxo (Tc), associadas a CGMs (setas) e MNs, recoberto por membrana óssea (*). *d, e, f* 60 dias. Notam-se ora finas trabéculas maduras (*) em contato direto com as partículas do biomaterial (##), ora tecido conjuntivo infiltrado por CGMs e MNs (setas). (HE; *a, d* – aumento original 10x; *b, c, e, f* – aumento original 40x).

3.2 Análise estatística

Os resultados obtidos através dos testes estatísticos estão distribuídos na tabela 1 em anexo (Anexo 3).

Foram realizadas duas análises, sendo a primeira entre os diferentes grupos nos períodos de 30 e 60 dias (inter-grupos) e a segunda avaliou os mesmos grupos em períodos diferentes (intra-grupos). Os dados estatísticos encontrados não apresentam padrão de normalidade e todos serão apresentados a seguir sob a forma de média e desvio padrão (DP) em relação ao número de pontos quantificados por retículo.

Em relação à presença de biomaterial, GBO apresentou mais partículas ao final dos 30 e 60 dias [115,9 (16,1) e 118,5 (12,1)], respectivamente, quando comparados a G300 e G700 [58,3 (24,3) e 69,1 (13,3); 89,7 (26,5) e 114,1 (12,6)] nessa ordem para os mesmos períodos, não havendo diferença estatística na comparação intra os grupos nos mesmos tempos. Entretanto, quando se comparou inter-grupos notou-se que GBO demonstra diferença estatística de G300 e obviamente de GC que não tem biomaterial. Como ilustrado no gráfico 1 a seguir:

Planimetria de ponto: Biomaterial - 30 e 60 dias

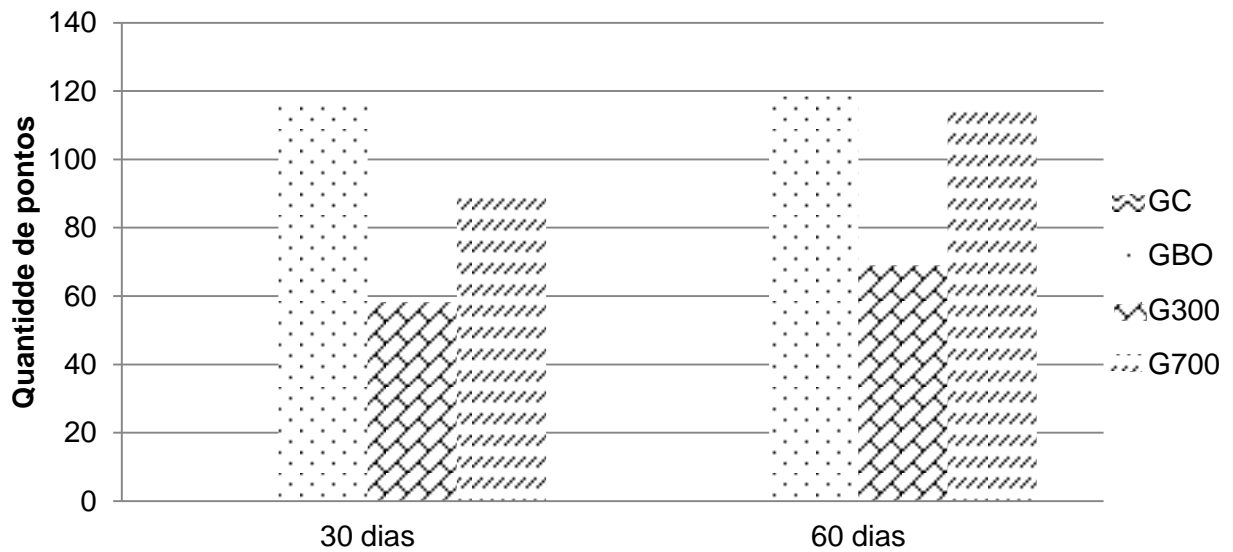


Gráfico 1: Planimetria de ponto em relação aos biomateriais utilizados.

Entretanto em relação à formação de tecido ósseo, observou-se no GC maior quantidade de trabéculas seguido por G300, G700 e GBO tanto aos 30 como aos 60 dias. Sendo que a diferença estatística foi notada entre os grupos GBO quando comparado os períodos de 30 de 60 dias desse mesmo grupo ($p=0,008$)* e na comparação entre diferentes grupos e períodos (intra-grupos) a diferença estatística se deu apenas aos 30 dias entre GC e GBO. De acordo com a disposição no gráfico 2 a seguir:

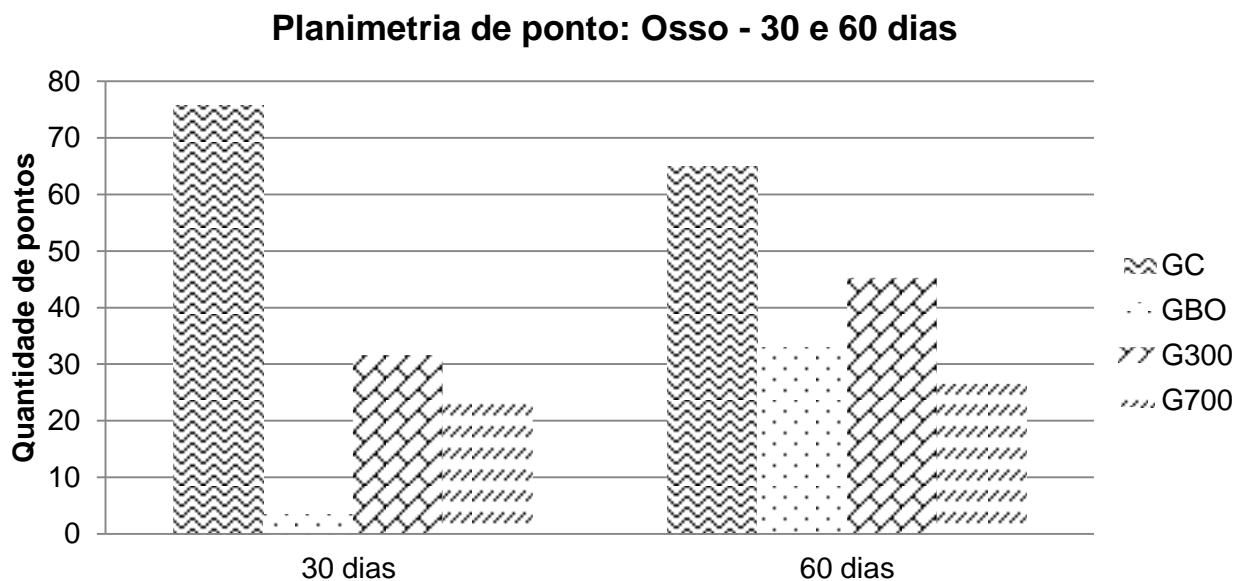


Gráfico 2: Planimetria de ponto em relação ao tecido ósseo neoformado.

Já em relação à frequência de MNs tem-se que G700 foi o grupo mais representativo ao final dos 30 e 60 dias, sem diferenças estatísticas em nenhuma das análises. Ilustrado a seguir no gráfico 3:

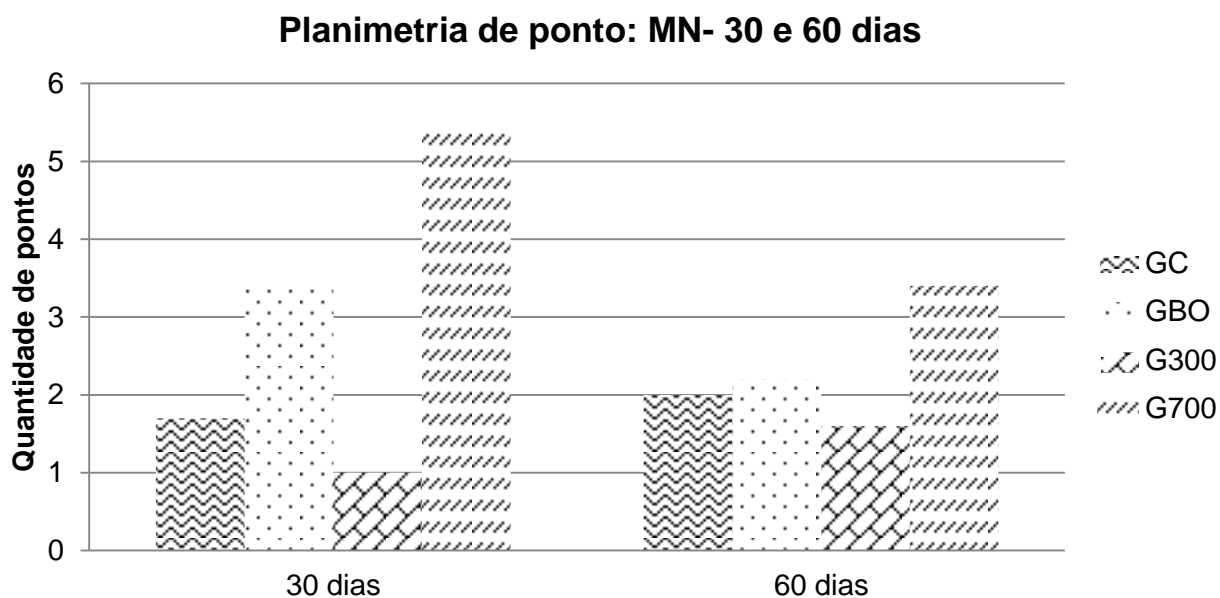


Gráfico 3: Planimetria de ponto em relação quantidade de leucócitos mononucleares.

Quando avaliada a presença de GGMs obteve-se: 6,8 (1,6) e 4,6 (1,6); 5,3 (2,6) e 3,4 (2,2); 5,2 (1,8) e 7,8 (0,9) nessa ordem para GBO, G300 e G700 aos 30 e 60 dias, com diferenças estatísticas para o G700 nos diferentes períodos avaliados ($p= 0,02$) e GC diferente estatisticamente de GBO aos 30 dias. Conforme o gráfico 4 abaixo:

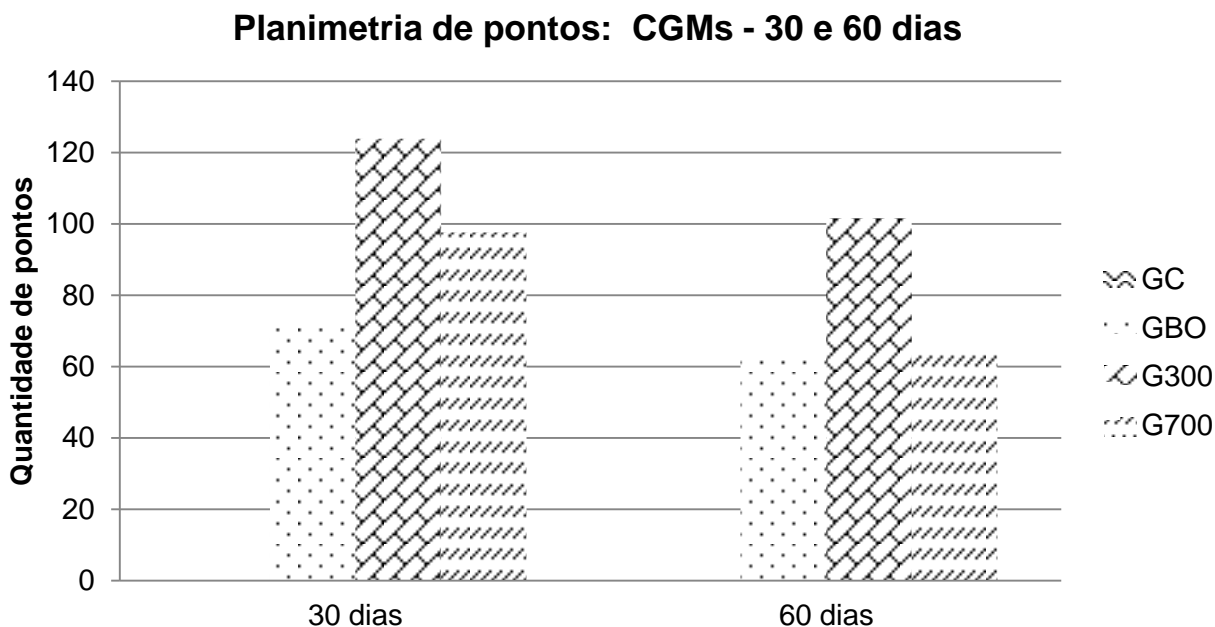


Gráfico 4: Planimetria de ponto em relação quantidade de células gigantes multinucleadas.

No tocante à ocorrência de outros tecidos, seja medular ou de granulação, observou-se que em aspectos gerais GC foi o mais representativo em relação aos dois períodos analisados. De forma que a variável outros apresenta-se na seguinte ordem para GC, GBO, G300 e G700 aos 30 e 60 dias: 137,2 (59,1) e 151,2 (296); 70,9 (13,6) e 63 (28,9); 123,9 (20,8) e 101,6 (15,9); 97,6 (29,8) e 65,1 (21,5). Com distinção estatística apenas na comparação intra-grupos aos 60 dias entre GBO e G700. De acordo com o gráfico 5 abaixo:

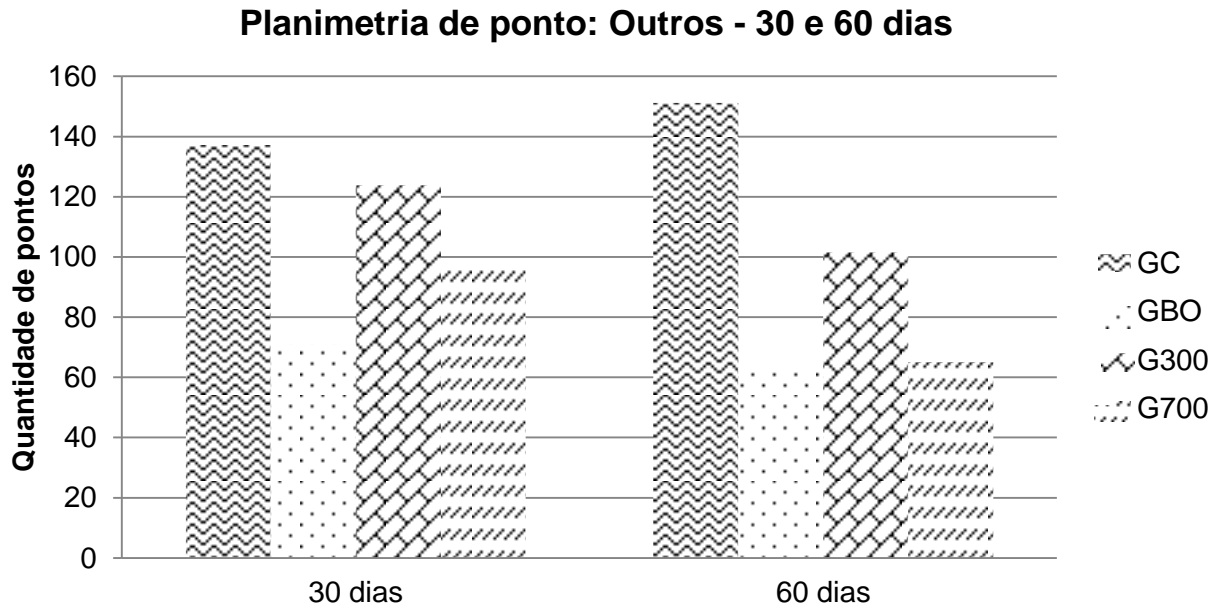


Gráfico 5: Planimetria de ponto em relação quantidade de outros tecidos encontrados (tecido medular e tecido de granulação).

5. Discussão

A calvária de ratos é um dos modelos experimentais mais utilizados para avaliar reparo ósseo. O termo defeito crítico foi definido por Schmitz & Hollinger em 1986²⁷ como o menor tamanho de ferida cirúrgica intra-óssea que não cicatrizará espontaneamente durante a vida do animal. No entanto, a maioria dos estudos pré-clínicos possuem períodos de análises limites, por isso, Goisan *et.al* (2000)²⁸, afirmaram que o defeito de tamanho crítico em pesquisas com animais é aquele que não cicatrizará durante a duração do estudo²⁸. Em relação às dimensões do defeito, não foram encontradas diferenças estatísticas para formação óssea no centro do defeito, quando comparadas feridas de 5 e 6 mm às de 9 mm nos períodos de 1 a 3 meses de acompanhamento. De modo que há evidências suficientes que mostram que defeitos de 5 mm de diâmetro em calvária de ratos podem ser considerados defeitos críticos²⁹.

O grupo controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo, apresentou histologicamente uma maior quantidade de pontos com tecido ósseo maduro e também

um tecido conjuntivo mais colagenizado tanto no período inicial como no final da análise, com diferença estatística apenas entre GC e GBO aos 30 dias ($p=0,0010$). Esse último grupo apresentou 3,4 e 32,9 com 30 e 60 dias, respectivamente, havendo diferença estatística em GBO à medida que se aumenta o período de análise $p=0,008$. Informações que vão de encontro ao estudo de Kim *et.al*, 2016³⁰ que realizaram dois defeitos de 8mm em cada calvária de rato e obtiveram nova taxa de formação óssea de 30,50% e 28,53%; 50,21% e 54,12% em seus grupos controle e Bio-oss[®], com 4 e 8 semanas nessa ordem. Enquanto que a análise histomorfométrica de Parque *et.al*, 2009³¹ exibiu novas taxas de remodelação óssea de 3,9% e 6,4% nos grupos não preenchidos com biomaterial enquanto que os grupos tratados com Bio-oss[®] apresentaram 6,4% e 8,2% sempre na ordem de 6 semanas e 12 semanas de análise.

De maneira tal que a hipótese alternativa foi refutada, pois ao contrário do que se imaginava, G300 apresentou maior quantidade de tecido ósseo em remodelação do que G700, biomaterial em fase de teste. O G300 demonstrou quantidade média de osso neoformado em 30 dias de 23,9 e em 60 dias de 26,6 sem diferença estatística entre eles. Vale ressaltar que também não houve diferença estatística entre GC, G300 e/ou G700 em nenhuma das análises comparativas. Neste modelo, o grupo G300 ainda chamou a atenção para a formação óssea dentro dos poros das suas partículas aos 30 dias. Entre todos os materiais analisados, o G300 foi o grupo que apresentou essa característica. Fatos que levam a crer que o osso formado por G300 parece apresentar maior quantidade em relação a G700.

Não há como estudar substitutos ósseos sem citar as membranas biológicas recomendadas para todos os procedimentos de enxertia óssea. Dentre as várias opções dentro dos mercados nacional e internacional há a GenDerm[®] (Baumer S.A., São Paulo, Brasil) membrana reabsorvível de cortical óssea bovina a qual possui amplo estudo clínico que demonstra a eficácia e segurança na utilização. A GenDerm[®] é uma barreira biológica natural osteoprotetora que recobre enxertos com substitutos ósseos. Possui

aspecto homogêneo e transparente após hidratação, apresenta fácil manipulação, é flexível e permite ajuste após hidratação com soro fisiológico e por se tratar de uma membrana reabsorvível evita nova etapa cirúrgica para remoção ³². Além disso, sua permeabilidade seletiva permite a troca de nutrientes e impede a invaginação de células não osteogênicas para dentro do enxerto, atuando como barreira protetora contra o tecido mole e, ao mesmo tempo, permite estabilização do leito cirúrgico favorecendo assim à remodelação óssea ^{12,32,33}. Por esses motivos foi utilizada membrana com todos os grupos para que o tecido mole não interferisse na formação óssea das cavidades.

O presente estudo também avaliou a presença de atividade inflamatória por meio de algumas células: CGMs, MNs e PMNs, embora não tenha sido notada a ocorrência de nenhum PMNs nos animais envolvidos.

As CGMs também conhecidas como células de Langhans ou células de corpo estranho são caracterizadas pela presença de vários núcleos arranjados ao redor da periferia celular e formadas por macrófagos (células fagocitárias). As CGMs estão presentes em infiltrações histiocitárias e principalmente nos processos inflamatórios granulomatosos ³³, e, neste caso são responsáveis pela reabsorção dos biomateriais. Tanto que como já era de se esperar o GC não apresentou um número representativo das CGMs aos 30 e 60 dias. Aos 60 dias, o grupo G700 apresentou maior número de CGMs havendo diferença estatística em relação aos 30 dias ($p=0,02$) para análise intra-grupo. Já em relação à análise inter-grupos em períodos diferentes, houve diferenças estatísticas apenas entre GC e GBO aos 30 dias ($p=0,0438$) e entre GC e G700 aos 60 dias ($p=0,0015$).

Já as outras células inflamatórias avaliadas foram os leucócitos, também conhecidos como glóbulos brancos e classificados em MNs e PMNs. São células presentes no sangue e produzidas na medula óssea e no tecido linfático, responsáveis pela defesa do organismo contra agentes infecciosos (vírus, bactérias e substâncias

alergênicas). Esse processo ocorre, porque os leucócitos possuem a capacidade de produzir anticorpos e através de suas propriedades de motilidade, quimiotaxia, ação bactericida e digestão, os neutrófilos têm como principal função a fagocitose de corpos estranhos e bactérias, além de participar dos processos inflamatórios ³³.

Os MNs são linfócitos e possuem núcleo esférico, gerados na medula óssea, localizam-se principalmente nos órgãos linfóides e nos monócitos entre os leucócitos os MNs são os que apresentam maior tamanho (podem chegar a 20 μ m) ³¹. Em relação à presença dessas células neste os MN foram mais representativos no G700 5,4 e 3,4 com 30 e 60 dias nessa ordem, com diferença significativa apenas entre G300 e G700 ($p=0,0094$) aos 30 dias.

Quando comparadas os MNs e CGMs juntas pode-se afirmar que G700 foi o que apresentou maior atividade inflamatória geral em relação aos outros grupos. Na análise descritiva foi o grupo que apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo e em alguns animais pôde-se observar a completa substituição do biomaterial por tecido conjuntivo.

Diante das limitações desse trabalho, serão necessários mais estudos com o GenOx 700 para que ele possa ser indicado na prática clínica.

6. Conclusão

Todos os biomateriais bovinos testados mostraram-se biocompatíveis e osteocondutores. Entre os biomateriais observados, o G300 promoveu melhor reparo ósseo.

7. Referências bibliográficas

1. RAVALD N, DAHLGREN S, TEIWIK A, GRONDAHL K. **Long-term evaluation of Astra Tech and Branemark implants in patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years.** Clin Oral Implants Res. 2012 Jul 4. PubMed PMID: 22762251. Epub 2012/07/06. Eng.
2. PENARROCHA-OLTRA D, DEMARCHI CL, MAESTRE-FERRIN L, PENARROCHA-DIAGO M. **Comparison of immediate and delayed implants in the maxillary molar region: a retrospective study of 123 implants.** Int J Oral Maxillofac Implants. 2012 May-Jun;27(3):604-10. PubMed PMID: 22616054. Epub 2012/05/23. eng.
3. DINOPOULOS H, DIMITRIOU R, GIANNOUDIS PV. **Bone graft substitutes: What are the options?** Surgeon: 2017 Royal College of Surgeons of Edinburgh (Scottish charity number SC005317) and Royal College of Surgeons in Ireland. Published by Elsevier Ltd; 2012.
4. KOLK A, HANDSCHEL J, DRESCHER W, ROTHAMEL D, KLOSS F, BLESSMANN M, ET AL. **Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials.** J Craniomaxillofac Surg: 2018 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd; 2012.
5. PIKE RL, BOYNE PJ. **Composite autogenous marrow and surface-decalcified implants in mandibular defects.** J Oral Surg. 1973 Dec;31(12):905-12. PubMed PMID: 4584256. Epub 1973/12/01. eng.
6. SOLTAN M, SMILER DG, GAILANI F. **A new "platinum" standard for bone grafting: autogenous stem cells.** Implant Dent. 14. United States2005. p. 322-5.
7. SMILER D, SOLTAN M, LEE JW. **A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells.** Implant Dent. 16. United States2007. p. 42-53.
8. LE HEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine.** Monographs in oral science., v. 15, 1991. 201p.

9. URIST MR. **Bone: formation by autoinduction.** 1965. Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb(395):4-10. PubMed PMID: 11937861. Epub 2002/04/09. eng.
10. MISCH CM. **Bone augmentation of the atrophic posterior mandible for dental implants using rhBMP-2 and titanium mesh: clinical technique and early results.** Int J Periodontics Restorative Dent. 2011 Nov-Dec;31(6):581-9. PubMed PMID: 22140660. Epub 2011/12/06. eng.
11. OLIVEIRA, R. C. **Efeito da temperatura de desproteínização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos.** FOB, v. 7, n.3/4, p.85-93, jul-dez., 1999
12. URIST MR. **Bone: formation by autoinduction.** 1965. Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb(395):4-10. PubMed PMID: 11937861. Epub 2002/04/09. eng.
13. HAAS, R. **Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep.** Clin. Oral Implants Res., v.9, p. 107-16, 1986.
14. LEMONS, J. **Biomaterials, biocompatibility and peri-implant considerations.** Dent. Clin. North Am., v. 30, p.3-23, 1986.
15. RODRIGUEZ, A. **Maxillary sinus augmentation with deproteinad bovine bone and platelet-rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants.** J. Oral Maxillofac. Surg., v.61, n.2, p.157-63, 2003.
16. TADJOEDIN, E.S. **Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases.** J. Clin. Periodontol., v.30, n.3, p.261-270, 2003.
17. BERGLUNDH, T., LINDHE, J. **Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog.** Clin. Oral Implants. Res., v.8, n.2, p.117-24, 1997.
18. LINDHE, T.B. **Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®: an experimental study in dog.** Clin Oral Implant Res., v.8, n.2, p.117-24, 1997.

19. ZITZMANN, N.U., et al. **Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss®: a histologic study in humans.** Int. J. Periodont. Rest. Dent., v.21, n.3, p.289-95, 2001.
20. TREVISAN, W.J, RODRIGUES, M.R, SCREMIN E.I. **Utilização de biomateriais previamente à colocação de implantes.** In: PAIVA, J.S, ALMEIDA, R. V. Implantodontia a alteração clínica baseada em evidências científicas. São Paulo: Artes Médicas, 2005, p.12-15.
21. BAUMER (Brasil). **Genius Linha de Enxertos Ósseos:** catálogo. São Paulo, 2017. 24 p.
22. HERCULANI, P. P. et al. **Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado.** Rev. Bras. Implant., v.7, n.2, p.7-14, 2000.
23. CARVALHO, Paulo Sérgio Perri de. **Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso desmineralizado ou por osso composto com sem proteína morfogenética do osso (BMP).** Revista Odontológica de Araçatuba, v. 27, p. 34-40, 2006.
24. TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. BCI Rev.Bras. Cir. Implantolol. v. 3, p.30-9, 1996.
25. Acesso em 14 de fevereiro de 2019, às 15h30min: www.aulas.e-agps.info/sinterizacao/SINTERIZACAO.pdf
26. LUVIZUTO ER, TANGL S, ZANONI G, OKAMOTO T, SONODA CK, GRUBER R. **The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects.** *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3855-61. PubMed PMID: 21376389. Epub 2011/03/08. eng
27. SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. **The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.** *Clinical Orthopaedics Related Research*. 1986 205: 299–308.
28. GOSAIN, A.K., SONG, L., Yu, P., MEHRARA, B.J., Maeda, C.Y., GOLD, L.I. & LONGAKER, M.T. **Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of**

critical size and the expression of TGF-beta isoforms. Plastic and Reconstructive Surgery. 2000 106: 360–371.

29. VAJGEL A, MARDAS N, FARIAS BC, PETRIE A, CIMOES R, VAJGEL ND. **A systematic review on the critical size defect model.** Clin. Oral Impl. Res. 25, 2014 / 879–893.

30. KIM R, KIM J, MOON S. **Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect.** Maxillofac Plast Reconstr Surg . 2016 dez; 38 (1): 26.

31. PARQUE JW, JANG JH, BAE SR, UM CH, SUH JY . **Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect.** *Implantes orais da Clin Res.* 2009 apr; 20 (4): 372-8.

32. GUO J, MENG Z, CHEN G, XIE D, CHEN Y, WANG H, et al. **Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds.** Tissue Eng Part A. 2012 Jun;18(11-12):1239-52. PubMed PMID: 22320360. Epub 2012/02/11. Eng

33. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica:** texto e atlas. 12.ed.

Anexos

Anexo 1



ACTA HISTOCHEMICA

A Journal of Structural Biochemistry, Cell and Tissue Imaging

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0065-1281

DESCRIPTION

Acta histochemica, a journal of **structural biochemistry of cells and tissues**, publishes original research articles, short communications, reviews, letters to the editor, meeting reports and abstracts of meetings. The aim of the journal is to provide a forum for the cytochemical and histochemical research community in the life sciences, including cell biology, biotechnology, neurobiology, immunobiology, pathology, pharmacology, botany, zoology and environmental and toxicological research. The journal focuses on new developments in **cytochemistry and histochemistry and their applications**. Manuscripts reporting on studies of living cells and tissues are particularly welcome. Understanding the complexity of cells and tissues, i.e. their **biocomplexity** and **biodiversity**, is a major goal of the journal and reports on this topic are especially encouraged. Original research articles, short communications and reviews that report on new developments in cytochemistry and histochemistry are welcomed, especially when molecular biology is combined with the use of **advanced microscopical techniques including image analysis and cytometry**. Letters to the editor should comment or interpret previously published articles in the journal to trigger scientific discussions. Meeting reports are considered to be very important publications in the journal because they are excellent opportunities to present state-of-the-art overviews of fields in research where the developments are fast and hard to follow. Authors of meeting reports should consult the editors before writing a report. The editorial policy of the editors and the editorial board is rapid publication. Once a manuscript is received by one of the editors, an editorial decision about acceptance, revision or rejection will be taken within a month. It is the aim of the publishers to have a manuscript published within three months after the manuscript has been accepted.

AUDIENCE

Histochemists, histologists, anatomists, cell biologists, biochemists, pathologists, physiologists, pharmacologists, microbiologists, immunologists, specialists in animal experimentation

IMPACT FACTOR

2017: 1.652 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Biochemistry & Biophysics Citation Index
Biological Abstracts
BIOSIS
CAB Abstracts
Chemical Abstracts
Current Advances in Ecological and Environmental Sciences
Current Contents/Life Sciences
Dairy Science Abstracts
Current Awareness in Biological Sciences
EMBASE
Excerpta Medica
Fisheries Review
Helminthological Abstracts
MEDLINE®
Index to Dental Literature
Index to Scientific Reviews
Index Veterinarius
INIS Atomindex
Referativnyi Zhurnal VINTI-RAN (Russian Academy of Sciences)
Reference Update
Research Alert
Science Citation Index
Scopus
SciSearch
Veterinary Bulletin

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Pasquale Chieco, Università di Bologna, Bologna, Italy

Editor

Steven B. Oppenheimer, California State University, Northridge, California, USA

Editorial Board

Serap Arbak, Istanbul, Turkey
Barbara Bilinska, Kraków, Poland
Susan Brooks, Oxford, UK
Nigel A. Calcutt, La Jolla, California, USA
Edward J. Carroll, Jr., Northridge, California, USA
Marta Cascante, Barcelona, Spain
Rudolph J. Castellani, Jr., Baltimore, Maryland, USA
Raymond Coleman, Bat-Galim, Haifa, Israel
Jesus Espada, Madrid, Spain
Jorge M.O. Fernandes, Bodø, Norway
Michael G. Jonz, Ottawa, Ontario, Canada
Malgorzata Kotula-Balak, Krakow, Poland
Heyo K. Kroemer, Göttingen, Germany
Eugenia Rita Lauriano, Messina, Italy
Stan Metzenberg, Northridge, California, USA
Christopher R. Murphy, Sydney, South Australia, Australia
Giuseppe Musumeci, Catania, Italy
Maria Teresa Perra, Cagliari, Italy
Rita Rezzani, Brescia, Italy
Udo Schumacher, Hamburg, Germany
Eleonora Sgambati, Pesche (IS), Italy
Yongli Shan, Dallas, Texas, USA
Mary-Patricia Stein, Northridge, California, USA
Juan C. Stockert, Madrid, Spain
Geert J.L.H. van Leenders, Rotterdam, Netherlands
Ron van Noorden, Amsterdam Zuidoost, Netherlands

Marilena Vered, Tel-Aviv, Israel
David Yew, Hong Kong, China
Giacomo Zaccone, Messina, Italy

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Acta Histochemica, a journal of structural biochemistry of cells and tissues, publishes original research articles, short communications, reviews, letters to the editor, and meeting reports. The aim of the journal is to provide a forum for the cytochemical and histochemical research community in the life sciences, including cell biology, biotechnology, neurobiology, immunobiology, pathology, pharmacology, botany, zoology and environmental and toxicological research.

Contact details for submission

Contact details for submission

For technical questions, please use our help site at: <http://epsupport.elsevier.com/>. Here you will be able to learn more about the online submission and editorial system via interactive tutorials, explore a range of problem solutions via our knowledgebase, and find answers to frequently asked questions. You will also find our support contact details should you need any assistance from one of our customer service representatives.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the

[Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such

a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 1800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Full Online Submission

For technical questions, please use our help site at: <http://epsupport.elsevier.com/>. Here you will be able to learn more about the online submission and editorial system via interactive tutorials, explore a range of problem solutions via our knowledgebase, and find answers to frequently asked questions. You will also find our support contact details should you need any assistance from one of our customer service representatives.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/acthis>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

For supported file types in Evise, please visit our [Support site for Evise](#). Note: The list will be expanded as more file types are supported.

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-histochemica>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

Anexo 2

Anexo 3

Tabela 1 : Distribuição dos valores médios e desvio padrão e análise estatística dos eventos histomorfométricos intra e inter grupos (Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, p<0,05)

Variáveis	Período (dias)	Grupos							
		GC	GBO	G300	G700	Média (DP)	Valor de P	Média (DP)	Valor de P
Biomaterial	30	0 (0)	115,9 (16,1)	58,3(24,3)	89,7 (26,5)				
		A	B	AB	B				
	60	0 (0)	ns	118,5 (12,1)	ns	69,1 (13,3)	ns	114,1 (12,6)	ns
		A	B	AB	B				
	30	75,8 (58,4)	3,4 (1,1)	31,6 (20,1)	23,9 (4,9)				
		A	B	AB	AB				
Ossos	60	64,9 (30,6)	ns	32,9 (21,1)	0,008	45,3 (15,2)	ns	26,6 (15,1)	ns
		A	B	AB	AB				
	30	1,7 (1,5)	3,4 (1,1)	1,0 (0,7)	5,4 (2,2)				
		A	A	A	A				

Tabela 1 : Distribuição dos valores médios e desvio padrão e análise estatística dos eventos histomorfométricos intra e inter grupos (Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, p<0,05)

	A	A	A	A	B				
MN	60	2,0 (1,3)	ns	2,2 (1,1)	ns	1,6 (1,1)	ns	3,4 (1,3)	ns
		A		A		A		A	
CGM	30	2,7 (2,1)		6,8 (1,6)		5,3 (2,6)		5,2 (1,8)	
		A		B		AB		AB	
	60	1,2 (0,75)	ns	4,6 (1,6)	ns	3,4 (2,2)	ns	7,8 (0,9)	0,02
		A		AB		AB		B	
Outros	30	137,2 (59,1)		70,9 (13,6)		123,9 (20,8)		97,6 (29,8)	
		A		A		A		A	
	60	151,2 (29,6)	ns	63 (28,9)	ns	101,6 (15,9)	ns	65,1 (21,5)	ns
		A		B		AB		B	

As variáveis foram quantificadas por meio de histomorfometria por pontos do retículo.

Letras maiúsculas diferentes denotam p<0,05 para avaliação dos períodos 30 e 60 dias (sentido vertical).

As comparações no sentido horizontal, entre os grupos no mesmo período mostram as diferenças estatísticas por meio do valor de P (p<0,05) e ns quando p>0,05.