

Thaís da Silveira Rodrigues

**Resposta tecidual ao enxerto
xenógeno inorgânico de osso bovino.
Avaliação histomorfológica e
histomorfométrica.**

Thaís da Silveira Rodrigues

**Resposta tecidual ao enxerto xenógeno
inorgânico de osso bovino. Avaliação
histomorfológica e histomorfométrica.**

*Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do “Câmpus de
Araçatuba – UNESP”, para obtenção
do grau de DOUTOR EM
ODONTOLOGIA (Área de
Concentração: Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).*

*Orientador: Wilson Roberto Poi.
Co-orientador: Idelmo Rangel Garcia Júnior.*

**Araçatuba – SP
2009**

Catálogo na Publicação (CIP)
Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

R696r	Rodrigues, Thaís da Silveira Resposta tecidual ao enxerto xenógeno de osso bovino : avaliação histomorfológica e histomorfométrica / Thaís da Silveira Rodrigues. - Araçatuba : [s.n.], 2009 58 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009 Orientador: Wilson Roberto Poi Coorientador: Idelmo Rangel Garcia Júnior 1. Transplante heterólogo 2. Materiais biocompatíveis 3. Osso e ossos Black D7 CDD 617.64
-------	---

Dedicatória

À minha dedicada mãe Maria Luzia da Silveira Rodrigues,

Gostaria de compartilhar toda minha alegria e satisfação na conclusão de mais uma etapa! Sem dúvida você é a principal responsável por essa conquista, pois foi através do seu exemplo de mãe, mulher e profissional que me mostrou a importância da busca dos meus ideais, baseado sempre em bons princípios. Amo muito você!

Aos meus queridos irmãos Lara e Alexksander,

Mais uma vez agradeço por estarem ao meu lado, acreditando sempre nos meus sonhos e me apoiando para que eles se concretizassem. Obrigada pelo incentivo e participação indireta durante toda jornada. Amo vocês!

Ao meu companheiro Leandro Canassa Abrão Gomes e família,

Obrigada pela presença constante e pelo carinho no fim dessa jornada! Isto fez com que tudo se tornasse mais suave. Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

A Deus, por me conceder a alegria de viver! MUITO OBRIGADA!

Ao meu orientador Prof. Wilson Roberto Poi,

Não tenho palavras.....Concluímos mais um trabalho! Agradeço profundamente por ter me acolhido como sua orientada durante todos esses anos, respeitando sempre minhas escolhas apesar de todas as dificuldades. Obrigada pela paciência, pela presença real e pela maneira de conduzir as diversas situações. Essa conquista também é sua!

Ao meu co-orientador Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior,

Chegamos ao fim de mais uma etapa! Só tenho a agradecer.....Por todos o momentos de aprendizado diante do seu grande conhecimento, pelo exemplo de liderança e dedicação ao trabalho e pelo companheirismo durante toda a jornada. Obrigada pela oportunidade de vivenciar tantas experiências!

Ao Prof. Oswaldo Magro Filho, agradeço o acolhimento nesta instituição, os ensinamentos e oportunidades, a convivência e amizade valiosas. Sua presença foi muito importante!

Ao meu grande amigo José Luiz Rodrigues Leles,

*Companheiro de todas as horas.....Grande exemplo de amigo e profissional.
Alavanca que me impulsionou a prosseguir! Obrigada por ter me permitido participar da equipe e pela gentileza em contribuir com esse trabalho!*

*Aos colegas de pós-graduação, **Abrahão, Albanir, Marcos, Jéssica, Francisley e Paulo Almeida**, muito obrigado pelos preciosos auxílios para concretizar essa pesquisa. A equipe foi fundamental!*

*Aos meus amigos de coração....**Flávia, Camila e Xande, Melaine, Patrícia, Carla, Helen, Carine e Raul, Fabiana, Angélica e Taciana**, que longe ou perto sempre me apoiaram na busca por meus ideais. Adoro vocês!*

*Ao meu amigo **Robson Garcia (Robinho)**, pelo incentivo e amizade durante todos esses anos. Muito obrigado!*

*Aos Profs. **Wirley Assunção e Cláudio Maçon**, pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados durante a convivência profissional. Obrigada por poder contar com vocês!*

*A equipe de consultório, **Breno de Paula Ascenço Soares, Cláudia Kristina Camêlo de Menezes, Fausto Cortês Issac**, pela oportunidade e companheirismo desde o início do trabalho em Goiânia....Obrigada por terem acreditado em mim!*

A equipe de trabalho UNIP, Alberto F. da Silva Júnior, José Luiz Rodrigues Leles, Robson Rodrigues Garcia e Rubens Jorge Silveira, minha gratidão pela chance de trabalhar nesta equipe. Sinto-me lisonjeada por isso!

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

A todos os colegas de pós-graduação, André Dotto Sottovia, Eleonor Álvaro Garbin Júnior, Liliane Sheidegger da Silva Zaneti, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho, Leandro de Carvalho Cardoso, Walter Betoni Júnior, Camila Benez Ricieri, Jéssica Lemos Gulinelli, Francisley Ávila Souza, Thallita Pereira Queiroz, Albanir Gabriel Borrasca, Flávia Priscila Pereira, Marcos Heidy Guskuma, Abrahão e Rodolfo pela amizade e companheirismo durante nossa caminhada.

Aos Professores da Disciplina de Cirurgia, Tetuo Okamoto, Michel Saad Neto, Alessandra Aranega, Cristiane Ruiz e Roberta Okamoto, pela torcida, incentivo e colaboração em outros trabalhos de pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, pela contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

A Seção de pós-graduação da FOA-UNESP, pela prestatividade e eficiência nas suas funções, sempre nos auxiliando com boa vontade.

À equipe da Biblioteca da FOA-UNESP, pela competência e auxílio na elaboração deste trabalho.

A Capes – Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização da pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

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

Henfil

Sumário

Lista de figuras.....	11
Lista de tabelas.....	13
Resumo.....	15
Abstract	17
Introdução	19
Proposição	22
Material e Método	24
Resultado.....	28
Discussão	31
Conclusão.....	38
Referências.....	40
Figuras e legendas	46
Anexo 1	51
Anexo 2	52
Anexo 3	56
Anexo 4.....	57

Lista de Figuras

- Figura 1** Grupo I – Osso neoformado (TON) junto aos espaços medulares (MO). Subcutâneo. 180 dias. HE. 200X. 46
- Figura 2** Grupo I – Osso bovino (OB) exibindo tecido ósseo neoformado (TON) em alguns espaços medulares e em sua periferia. Diferenciação celular por estímulo osteoindutor (setas). Subcutâneo. 180 dias. HE. 200X. 46
- Figura 3** Grupo II – Osso bovino (OB) exibindo a interface de contato (linha) e espaços medulares preenchidos por medula óssea ativa e osso neoformado (setas). Tíbia. 180 dias. HE.125X. 47
- Figura 4** Grupo II – Osso bovino (OB) implantado em íntimo contato com leito ósseo (LOT). Espaços medulares (MO) revascularizados com osso neoformado (setas). Interface leito receptor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X. 47
- Figura 5** Grupo II – Processo de osseointegração do osso bovino (OB) sendo substituído por tecido neoformado (TON). Presença de espaços medulares (MO) celularizados e em atividade (setas). Ausência de osteócitos (*) no osso bovino e presença dessas células no tecido neoformado(+). Tíbia. 180 dias. HE.125X. 48
- Figura 6** Grupo II – Osso bovino (OB) junto ao leito ósseo (LOT) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado (TON*) e espaços medulares preenchidos por medula ativa (MO) e revascularização dos canais de nutrição (setas). Linha de interface leito receptor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X. 48

Figura 7	Grupo II – Osso bovino (OB) junto ao leito ósseo (LOT) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado (TON*) e espaços medulares preenchidos por medula ativa (MO) e revascularização dos canais de nutrição (setas). Linha de interface leito recetor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X.	49
Figura 8	Grupo II – Osso bovino (OB) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado(*) no interior dos espaços medulares e canais de nutrição (setas). Medula óssea (MO) em atividade. Tíbia. 180 dias. HE.125X.	49
Figura 9	Coelho <i>Nova Zelândia</i> .	57
Figura 10	Bloco ósseo.	57
Figura 11	Incisão no pavilhão auricular.	57
Figura 12	Divulsão.	57
Figura 13	Inserção do enxerto ósseo	57
Figura 14	Sutura.	57
Figura 15	Anestesia infiltrativa local.	58
Figura 16	Incisão.	58
Figura 17	Exposição da tíbia.	58
Figura 18	Preparo do leito receptor	58
Figura 19	Fixação do enxerto ósseo.	58
Figura 20	Sutura	58

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média dos índices da formação óssea no interior do implante ósseo e na interface leito receptor/enxerto ósseo.	56
-----------------	--	----



Resumo

RODRIGUES, TS. **Resposta tecidual ao enxerto xenógeno inorgânico de osso bovino. Avaliação histomorfológica e histomorfométrica.** Araçatuba, 2009. 58p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

Resumo:

Proposição: Avaliar a resposta tecidual ao enxerto xenógeno inorgânico de osso bovino, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica. **Material e método:** O enxerto foi obtido da costela de boi resfriada após 8 horas de sacrifício do animal e processado da seguinte maneira: imersão por 60 minutos em água oxigenada a temperatura ambiente, com trocas a cada 15 minutos; imersão em água oxigenada aquecida, a uma temperatura de 100°C, por 30 segundos e resfriamento imediato com água destilada a uma temperatura variando de 6° a 8°C; enxague em água destilada corrente por 6 horas; imersão em álcool 70°, 90° e 100°, respectivamente, sendo 15 minutos em cada álcool; esterilização em autoclave. Em seguida, 10 coelhos brancos (*Nova Zelândia*) foram utilizados, originando dois grupos: Grupo I – enxerto inserido no pavilhão auricular e Grupo II – enxerto inserido e fixado em tíbia. Decorridos 180 dias, foi realizado sacrifício dos animais por injeção excessiva de anestésico. **Resultados:** No Grupo I, o enxerto apresentou-se em íntimo contato com tecido subcutâneo. No Grupo II, o enxerto apresentou-se em justaposição com o leito ósseo receptor. E nos dois grupos havia espaços medulares preenchidos por medula óssea ativa e osso neoformado, além da ausência de osteócitos no osso bovino e presença destas células no osso neoformado, próximo aos espaços medulares. **Conclusão:** Em razão dos resultados obtidos o enxerto xenógeno inorgânico de osso bovino demonstrou biocompatibilidade, capacidade osteocondutora e discreta perda de volume, preenchendo requisitos importantes do material ideal para reconstrução óssea.

Palavras-chave: Xenoenxerto, Materiais biocompatíveis, Osso.



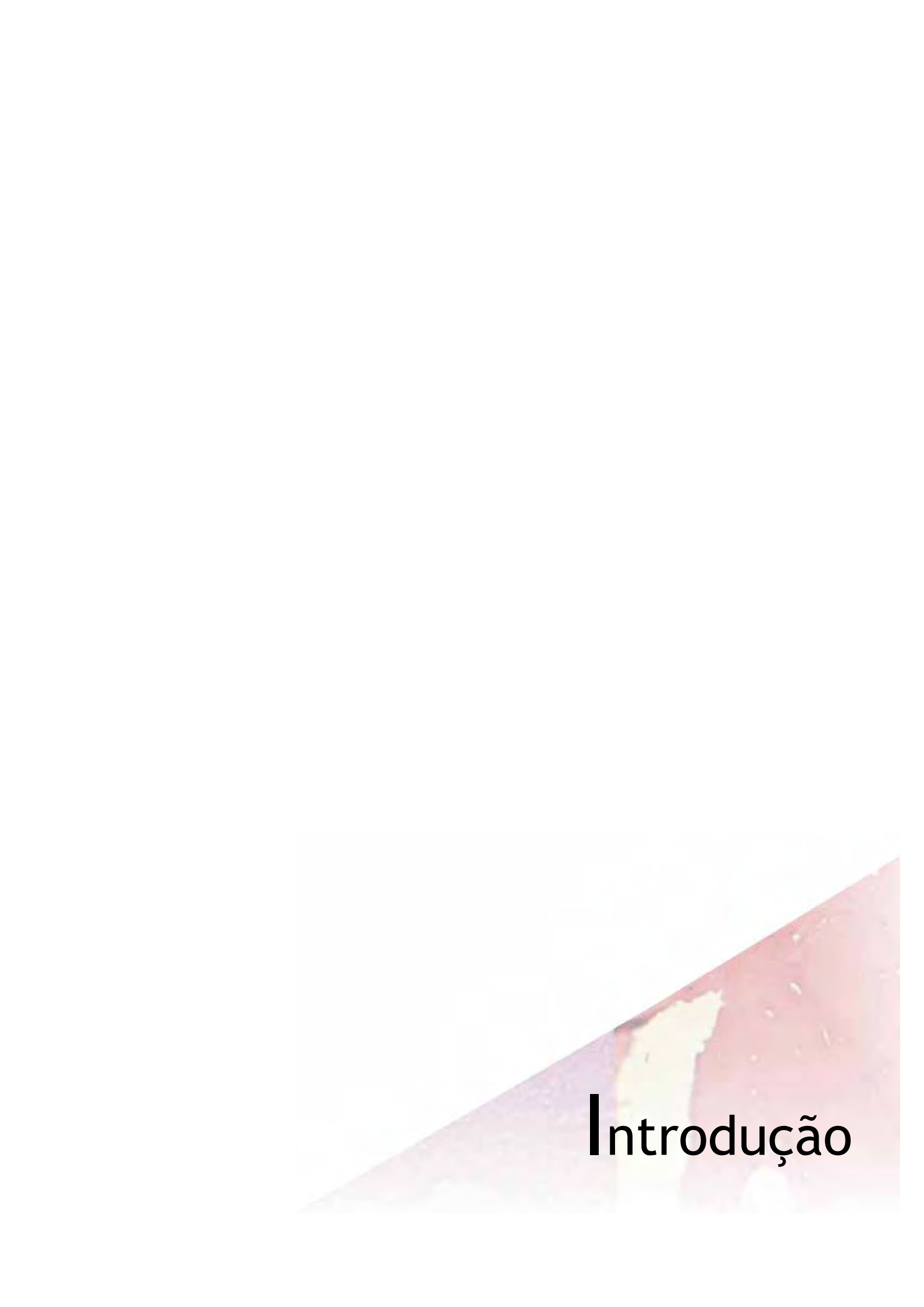
Abstract

RODRIGUES, TS. **Tissue response to inorganic bovine bone xenograft. Histomorphological and histomorphometrical evaluation.** Araçatuba, 2009. 58p. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

Abstract:

Objective: To evaluate tissue response to inorganic bovine bone xenograft by histomorphological and histomorphometrical analyses. **Material and methods:** The bone grafts was obtained from cooled bovine rib 8 hours after slaughtering and were processed as follows: 60-minute immersion in hydrogen peroxide at room temperature, with changes at 15-minute intervals; 30-second immersion in hydrogen peroxide at 100°C; immediate cooling with distilled water at temperatures ranging from 6° to 8°C; rinsing in running distilled water for 6 hours; immersion in alcohol grades of 70°, 90° and 100°GL (15-minute in each solution); autoclaving. Thereafter, 10 white New Zealand rabbits were distributed into two groups: Group I – graft inserted in the ear pavilion and Group II – graft inserted and fixed in the tibia. After 180 days, the animals were sacrificed by anesthetic overdose. **Results:** In Group I, the graft was in intimate contact with the subcutaneous tissue, while in Group II the graft was juxtaposed to the recipient site. Both groups presented medullar spaces filled with active bone marrow and newly formed bone. In addition, osteocytes were absent in the bovine bone graft and present in the newly formed bone, close to the medullar spaces. **Conclusion:** From the obtained results, the inorganic bovine bone xenograft showed biocompatibility.

Key Words: Xenograft, biocompatible materials, bone.



Introdução

Introdução

A evolução da Implantodontia trouxe consigo a necessidade da utilização de técnicas de reconstrução dos rebordos maxilares, visando a reestruturação do tecido ósseo em altura e espessura ¹.

A reconstrução óssea, sob aspecto fisiológico, é realizada pela combinação de três processos: osteogênese, osteocondução e osteoindução ^{2,3}. Dessa forma, dentre os tipos de materiais utilizados nos enxertos, o autógeno é o mais compatível e o que mostra melhor resultado. Suas propriedades biológicas desencadeiam uma série de eventos que culminam na sua revascularização, incorporação e remodelação, o que permite a reabilitação com implantes osseointegráveis de forma mais previsível ⁴.

Entretanto, a cirurgia de remoção de fragmentos ósseos para os enxertos autógenos é seguida de alguma morbidade nos sítios doadores, que podem desencadear em hematomas, edemas, infecções, lesões vaso-nervosas, além do aumento do tempo cirúrgico ⁵.

Diante disso, outras opções de enxertos tem sido mencionadas como alternativa para substituir o enxerto ósseo autógeno, como o osso alógeno, osso xenógeno e os materiais aloplásticos ⁶, o que conseqüentemente minimiza o grau de morbidade. No entanto, estes materiais não apresentam as propriedades osteogênicas dos enxertos autógenos.

Dentre os materiais xenógenos, os de origem bovina merecem destaque, pois estão disponíveis em grandes quantidades e sugerem segurança em relação à indução de resposta imune e transmissibilidade de doenças quando o processamento laboratorial é

adequado ³. Assim, o enxerto xenógeno de osso bovino, tem sido pesquisado no intuito de identificar as propriedades específicas desse material ⁷.

Atualmente, o grande desafio na área médico-odontológica é encontrar o carreador ideal para fatores de crescimento ou de indução, como as proteínas morfogenéticas ósseas, que seja compatível e osteocondutor e que possa ser utilizado para melhorar a regeneração óssea no local do tratamento ³.

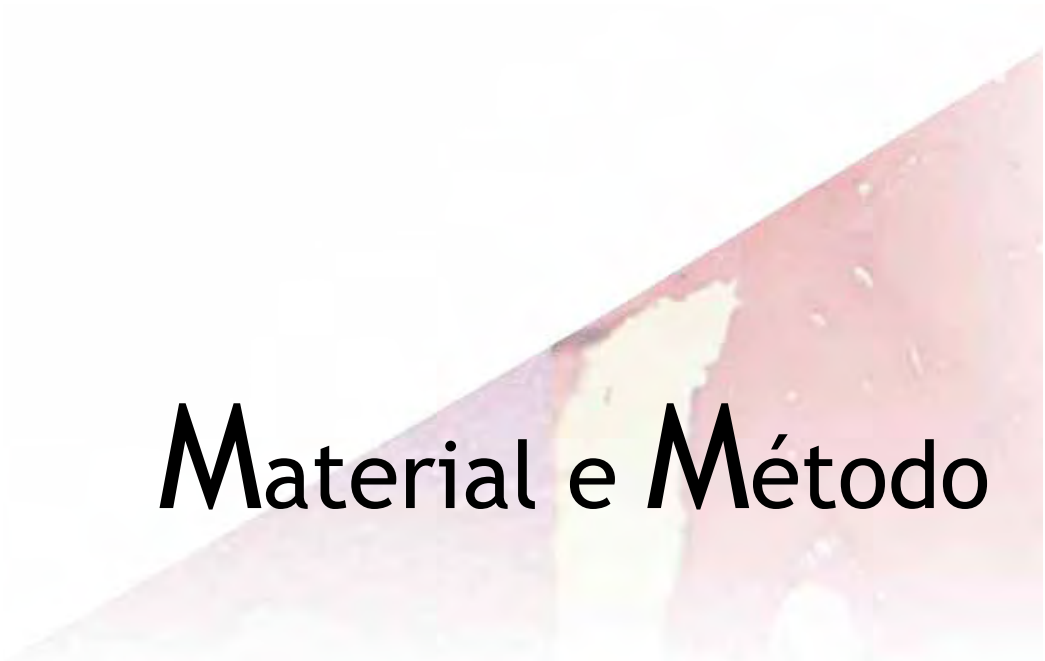
Assim, este trabalho de pesquisa se justifica devido à relevância clínica do assunto abordado e a necessidade de maiores esclarecimentos sobre a biocompatibilidade do material.



Proposição

Proposição

Este trabalho tem o propósito de avaliar a resposta tecidual ao enxerto xenógeno inorgânico de osso bovino, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica.



Material e Método

Material e Método

1. Processamento do enxerto xenógeno inorgânico bovino:

O osso foi obtido da costela de boi resfriada após 8 horas do sacrifício do animal. O processamento dos pequenos blocos ósseos foi feito de acordo com o seguinte protocolo: (1) Imersão por 60 minutos em água oxigenada a temperatura ambiente, com trocas a cada 15 minutos; (2) Imersão em água oxigenada aquecida, a uma temperatura de 100°C, por 30 segundos e resfriamento imediato com água destilada a uma temperatura variando de 6° a 8°C; (3) Enxague em água destilada corrente por 6 horas; (4) Imersão em álcool 70°, 90° e 100°, respectivamente, sendo 15 minutos em cada álcool; (5) Esterilização em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

2. Fase experimental:

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Araçatuba, foram utilizados 10 coelhos brancos (*Nova Zelândia*) machos, adultos, pesando aproximadamente entre 3 a 4 Kg.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho - Primor, São Paulo, SP, Brasil) e água a vontade, em condições climatizadas e água canalizada, no biotério do Câmpus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Os coelhos foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina (Vetaset - Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, São Paulo, Brasil), mediante injeção intramuscular, na dosagem de 50mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente.

Após tricotomia na região de orelha e tibia do lado direito dos animais foi realizada antissepsia das áreas cirúrgicas com iodo tópico (Gessy Lever Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foi feita incisão de 1 cm no pavilhão auricular na face externa de cada coelho e o tecido foi divulsionado com uma tesoura romba até a profundidade de 15 mm. Na face externa da perna direita de cada animal, após anestesia local, foi realizado também incisão medindo 2 cm, seguido do descolamento dos tecidos para exposição óssea.

A partir daí, dois grupos experimentais foram constituídos: Grupo I – enxerto xenógeno bovino inserido em região auricular e Grupo II – enxerto xenógeno bovino inserido e fixado em tibia.

Os blocos ósseos com formato retangular, medindo 1 cm X 0,5cm X, 0,2cm, previamente preparados, foram inseridos no pavilhão auricular nos espaços criados pelas divulsões.

Na tibia os ossos foram inseridos e fixados após decorticação, realizada com broca diamantada número 6 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) montada em peça reta cirúrgica (Kavo, Joinville, SC, Brasil), sob constante irrigação com solução fisiológica 0,9%, estéril (JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil) e perfuração do leito receptor com broca esférica carbide número 2 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), com parafusos de titânio de 1.6 mm de diâmetro por 8 mm de comprimento (SIN, São Paulo, SP, Brasil). Após implantação, as bordas das feridas foram unidas por planos com fio de nylon 5-0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil).

No pós-operatório, os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico 0,1 ml/Kg (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica

1 mg/Kg/dia (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses.

Decorridos 180 dias, o sacrifício dos 10 coelhos foi realizado por injeção excessiva de anestésico.

Os implantes inseridos em região auricular foram removidos em blocos com adesão de tecido conjuntivo, enquanto os implantes fixados em tíbia foram removidos sem tecidos aderidos. As peças obtidas foram encaminhadas ao laboratório para fixação, descalcificação e inclusão em parafina para possibilitar os cortes semi-seriados. Os cortes obtidos com uma espessura de seis micrometros foram corados pela hematoxilina e eosina (H.E.) para análise histomorfológica e histomorfométrica.

Para a análise dos cortes histológicos, foi utilizado um microscópio óptico binocular JENAMED 2 (Carl-Zeiss), com objetivas de aumento 40X, 125X, 200X e 400X, considerando o interior do enxerto ósseo, a interface leito receptor-enxerto ósseo e o tecido neoformado.

Para análise quantitativa foi utilizada a Grade de Merz para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica, e para isto basta considerar o número de pontos que se superpõem à estrutura analisada. Foram selecionadas 10 lâminas, uma de cada animal, e cem pontos em cada corte histológico da tíbia, referentes ao interior do enxerto ósseo e a interface leito receptor/enxerto ósseo foram considerados. Após contagem dos pontos foi calculada a média e o desvio padrão para avaliar a quantidade de tecido neoformado.



Resultado

Resultado

Análise qualitativa

Os resultados obtidos serão descritos de acordo com as regiões em que foram inseridos os blocos de osso – pavilhão auricular e tíbia dos coelhos.

Grupo I – enxerto xenógeno bovino inserido em pavilhão auricular – O enxerto encontra-se em íntimo contato com tecido subcutâneo. Ausência de infiltrado inflamatório tardio. Presença de espaços medulares celularizados. Ausência de osteócitos no osso bovino e presença destas células no osso neoformado, próximo aos espaços medulares (Figuras 1 e 2).

Grupo II – enxerto xenógeno bovino inserido e fixado em tíbia – O enxerto encontra-se em justaposição com o leito ósseo receptor. Ausência de infiltrado inflamatório tardio. Espaços medulares preenchidos por medula óssea ativa e osso neoformado. Revascularização dos canais de nutrição do sistema de Harvers. Ausência de osteócitos no osso bovino e presença destas células no osso neoformado, próximo aos espaços medulares (Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Análise quantitativa

Na análise quantitativa foi observada, no interior do enxerto ósseo, uma menor quantidade de espaços medulares ($15,2 \pm 5,6$) quando comparado à interface leito receptor/enxerto ósseo ($27,2 \pm 6,8$). Em contrapartida, a quantidade de osso neoformado no interior do enxerto ósseo ($33,4 \pm 6,8$) foi maior quando comparado à interface leito

receptor/enxerto ósseo ($22,2 \pm 7,4$). No total foi encontrada uma formação de tecido neoformado de $98,0 \pm 27,5$.



Discussão

Discussão

O material ideal para enxerto ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não induzir resposta imunológica e estar disponível em quantidades suficientes. Deve ser ainda, capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo, ao mesmo tempo, gradualmente absorvível, fornecendo um suporte condutivo para formação de um novo osso. Adicionalmente, o material deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para o interior do defeito ⁸.

Com o objetivo de assegurar a biocompatibilidade desses enxertos, em termos de biossegurança, vários protocolos de tratamentos são desenvolvidos ^{9,10}. Métodos de esterilização e processamento incluem: exposição ao óxido de etileno, irradiação gama e liofilização, que tem efeitos deletérios nas propriedades biomecânicas do osso cortical e medular ¹¹⁻¹⁹. Entre os diversos métodos, o processo com BioCleanse® tem se destacado ^{10,20}.

O BioCleanse® utiliza baixa temperatura e sistema de esterilização que sucessivamente expõe o osso a uma variedade de soluções químicas, incluindo isopropanol e peróxido de hidrogênio. O processo promove penetração completa no interior da matriz do tecido, remoção de contaminantes, bem como sangue, medula óssea e outros materiais endógenos, por meio de um processo extenso de diluição ^{20,21}. Além disso, dois detergentes são utilizados para inativar vírus ^{22,23}. O processo conta também com variação de pressão e alternância dos ciclos de vácuo. Ao final, os tecidos são liofilizados e, após trituração, são estocados a - 20°C.

Portanto, o processamento utilizado neste estudo tem os mesmos objetivos do método BioCleanse®. A utilização da água oxigenada e álcool no enxerto se justificam

pela atuação desinfetante dessas substâncias, ou seja, capacidade de eliminar microrganismos patogênicos. Além disso, a água oxigenada tem ação fibrinolítica e desengordurante, o que é fundamental no processo de eliminação de todo o sangue contido no enxerto e de sua porção lipídica do osso medular. O álcool, por sua vez, desidrata o enxerto, fato que é importante para o seu armazenamento.

A autoclavagem, técnica empregada no tratamento para esterilização do tecido neste trabalho, é um processo que utiliza 127°C de temperatura durante 15 minutos. Embora este método remova a maior parte da imunogenicidade, segundo DEL CARLO (1999)²⁴ provavelmente a autoclavagem, com o propósito de esterilização leva à coagulação sangüínea e desnaturação das proteínas nos canais de Harvers e desnaturação do colágeno ósseo. Então, enquanto a coagulação impede a revascularização, a desnaturação da matriz impede o processo normal de reparo, sendo preciso reconhecer que é desvantajoso aos enxertos fervidos ou autoclavados não conservarem a osteoindução.

Além disso, a consolidação óssea é lenta quando comparada com os outros métodos de conservação²⁵. Estes aspectos não foram evidenciados tão fortemente neste estudo. A estrutura do complexo de trabéculas ósseas se manteve e o osso neoformado conseguiu preenchê-los.

Contudo, os métodos podem ser discutíveis do ponto de vista da efetividade e comprometimento das atividades biológicas do tecido²⁶. Existe a possibilidade de falhas no processamento, qualquer que seja o método utilizado, e essas falhas podem alterar a resposta biológica.

A metodologia empregada, no tocante à utilização do pavilhão auricular e da tibia do coelho como regiões receptoras dos enxertos, foi baseada no fato de que as duas permitem avaliar a biocompatibilidade do material. Nesse modelo experimental é

possível, guardadas as proporções de resistência do animal e cronologia do processo de reparo ósseo, simular situações que poderiam ocorrer em seres humanos ²⁷.

A cartilagem da orelha do coelho é um excelente modelo e há relatos com resultados muito próximos àqueles para cartilagem auricular humana ²⁷⁻²⁹. Assim, neste estudo, pensou-se em utilizar o pavilhão auricular para, inicialmente, avaliar a biocompatibilidade do material em tecido conjuntivo subcutâneo. Por outro lado, existia a hipótese de que o osso bovino utilizado pudesse estimular a deposição óssea em razão da presença de cartilagem. Esse fato foi observado no Grupo I com presença de espaços medulares celularizados, ausência de osteócitos no osso bovino e presença destas células no osso neoformado.

A tíbia do coelho, por sua vez, é um osso que apresenta cortical fina envolvendo espaço medular extenso, representando uma situação clínica em que não há quantidade e qualidade óssea favorável para a reabilitação com implantes osseointegrados convencionais ³⁰.

A origem embriológica dos tecidos ósseos enxertados pode explicar a sua rápida revascularização e a sua menor reabsorção ³¹. Em razão disso, algumas áreas doadoras foram estudadas ³²⁻³⁶. Dessa forma, o osso bovino que apresenta propriedades mecânicas similares ao osso humano e menor limitação dimensional ³⁷, propiciou a realização da pesquisa.

O enxerto de osso autógeno é o mais eficaz, devendo ser consideradas as limitações como: disponibilidade óssea, aumento do tempo cirúrgico, morbidez e dor ao paciente ³⁸. Os enxertos xenógenos, por sua vez, podem transmitir doenças e favorecer fraturas e infecções.

Os enxertos ósseos ideais deveriam apresentar as seguintes características: osteointegração, osteocondução, osteoindução e osteogênese e serem biodegradáveis. Todas essas características são encontradas nos enxertos autógenos³⁹.

Durante todo o período pós-operatório não houve sintomatologia apresentada pelos animais que permitisse diagnosticar qualquer reação ao osso bovino estudado, fato favorável ao cumprimento do requisito mínimo de biocompatibilidade.

Dessa forma, destacam-se neste trabalho aspectos microscópicos relevantes no grupo I, ou seja, ausência de infiltrado inflamatório tardio e a presença constante de tecido ósseo neoformado junto ao xenoenxerto, principalmente, invadindo seus canais nutrientes e espaços medulares. Em alguns espécimes, é sugerida a sua substituição por tecido ósseo novo.

Em relação ao preparo cirúrgico do leito receptor, este foi realizado no intuito de aproximar a medula óssea da área receptora, fonte de vasos sanguíneos e células osteogênicas, e o leito receptor. Esta manobra facilita a revascularização e a transformação celular, que produz novo osso e consolida o enxerto⁴⁰.

Em enxertos autógenos, de acordo com os achados na literatura, há extensa perda de vitalidade, demonstrada pelas lacunas vazias de osteócitos^{40,41}. Os autores relatam a grande perda da vitalidade celular, verificada no bloco de enxerto, mesmo com cobertura de periósteo, mantendo-se vivas apenas as células da periferia, que exercem função osteogênica. Ainda, de acordo com os mesmos autores^{40,41}, a formação óssea é conduzida por células sobreviventes do enxerto e pela habilidade da matriz óssea em induzir diferenciação de células osteoprogenitoras na área receptora.

Esse mesmo fenômeno não ocorre com enxertos xenógenos, nos quais somente a cortical se revasculariza e participa na formação óssea. Isso ocorre porque esses enxertos recebem tratamento específico em função do risco de transmissão de doenças

^{42,43}. Apesar disso, os resultados encontrados neste estudo mostram-se muito semelhantes àqueles observados com o uso de enxertos autógenos, quando se considera o infiltrado inflamatório e a reparação óssea.

A perda da celularidade do enxerto bovino, neste estudo, se deu pelo processo de obtenção, havendo perda dos osteócitos e células da medula óssea. Este fato não inviabilizou o xenoenxerto, uma vez que sua matriz óssea mineralizada e, provavelmente, parte orgânica se mantiveram íntegras, possibilitando um processo de incorporação adequado com osteocondução em todo seu volume.

Portanto, pelo fato de apresentarem inúmeros osteoblastos e perda da carga medular, os ossos preparados podem ter indicação clínica em inúmeras situações, uma vez que os enxertos não dependem de células vivas para se regenerar e sim da matriz óssea, do arcabouço mineral e da presença das proteínas morfogenéticas, responsáveis pelos processos de osteoindução e osteocondução.

Observando o quadro de proliferação de osso neoformado junto ao xenoenxerto é possível esperar que ocorra um processo de substituição desse enxerto, mesmo que lento quando é comparado com o autoenxerto, mas de forma positiva se espera que a função morfofisiológica da área enxertada seja desenvolvida, aspecto imprescindível na implantodontia.

O material implantado e fixado em tíbia desempenhou sua capacidade osteocondutora, comprovada histológica e estatisticamente pela neoformação óssea no grupo II, sendo maior no interior do implante quando comparado à interface leito receptor-enxerto ósseo. Uma hipótese para justificar esse fato é que a nutrição do enxerto ocorre, principalmente, através dos espaços medulares presentes na interface.

Ressalta-se ainda que, neste trabalho, o grupo II não apresentou áreas necróticas, características de ausência de vascularização e processo de osteoclasia inflamatória

crônica ou aguda, caracterizando um processo patológico de osteomielite, situação muito comum nos homoenxertos congelados que mostram povoamento celular de qualidade inflamatória crônica e com risco de reações imunogênicas ⁴⁴.

Houve um aspecto celular importante junto ao osso estudado, que foi a formação de medula óssea no seu interior, demonstrando a qualidade de processo de biocompatibilidade induzida pela sua presença, apresentando células viáveis e remodelação estabelecida.



Conclusão

Conclusão

Em razão dos resultados obtidos o enxerto xenógeno inorgânico de osso bovino demonstrou biocompatibilidade, capacidade osteocondutora e discreta perda de volume, preenchendo requisitos importantes do material ideal para reconstrução óssea, não sendo conclusiva a capacidade osteoindutora.



Referências

Referências

1. Segundo TK. Avaliação dos enxertos ósseos e homólogos utilizados em Implantodontia. RGO 2000; 48: 217-22.
2. Manso, MC. Reconstrução óssea em implantodontia: apresentação de um protocolo de condutas. Rev Bras Implant 2002; 8: 7-12.
3. Zambuzzi, WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. Braz Dent J; 17(4): 274-8, 2006.
4. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. J Foot Ankle Surg 1996; 35: 413-17.
5. Garcia RJ, Feofiloff ET. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos, protocolo do Banco de Ossos da Escola Paulista de Medicina. Rev Bras Ortop 1996; 3: 895-903.
6. Young C, Sandsted P, Skogund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants 1999; 14: 72-6.
7. Garofalo GS. Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. Minerva Stomatol 2007; 56: 373-92.
8. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. Br J Oral Maxillofac Surg. 1995; 33: 312-8.
9. Kim YK, Yun PY, Kim SG, Kim BS, Ong JL. Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107:21-8.

10. Supronowicz P, Zhukauskas R, York-Ely A, Wicomb W, Thula T, Fleming L, Cobb RR. Immunologic analyses of bovine bone treated with a novel tissue sterilization process. *Xenotransplantation*. 2008; 15: 398-406.
11. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop* 1996; 324: 6–74.
12. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop* 1993; 290: 279–84.
13. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC. Biomechanical properties of bone allografts. *Clin Orthop* 1983; 174: 54–7.
14. Cornu O, Banse X, Docquier PL, Luyckx S, Delloye C. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *J Orthop Res* 2000; 18: 426–31.
15. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, et al. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3: 1–8.
16. Akkus O, Rimnac CM. Fracture resistance of gamma sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res* 2001; 19: 927–34.
17. Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997; 15: 111–7.
18. Anderson MJ, Keyak JH, Skinner HB. Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation. *J Bone Joint Surg [Am]* 1992; 74: 747–52.
19. Moreau MF, Gallois Y, Basle MF, Chappard D. Gamma irradiation of human

- bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2000; 21: 369–76.
20. Mroz TE, Lin EL, Summit MC, Bianchi JR, Keesling JE Jr, Roberts M, Vangsness CT Jr, Wang JC. Biomechanical analysis of allograft bone treated with a novel tissue sterilization process. *Spine J.* 2006; 6: 34-9.
 21. Schimizzi A, Wedemeyer M, Odell T, Thomas W, Mahar AT, Pedowitz R. Effects of a novel sterilization process on soft tissue mechanical properties for anterior cruciate ligament allografts. *Am J Sports Med* 2007; 35: 612–616.
 22. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992; 79: 826–831.
 23. Howett MK, Neely EB, Christensen ND et al. A broad-spectrum microbicide with virucidal activity against sexually transmitted viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 314–321.
 24. Del Carlo RJ et al. Aloenxertos ósseos caninos diferentemente preservados. *Revista Brasileira Ciência Veterinária.* 1999; 6: 121-6.
 25. Stevenson S. Enxertos ósseos. In: Slatter, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais.* (2 Ed). São Paulo: Manole, 1998: 2006-16.
 26. Bienek C, Mackay L, Scott G, Jones A, Lomas R, Kearney JN, Galea G. Development of a bacteriophage model system to investigate virus inactivation methods used in the treatment of bone allografts. *Cell Tissue Bank.* 2007; 8: 115-24. Epub 2006 Oct 24.
 27. Massengill PL, Goco PE, Norlund LL, Muir-Padilla J. Enzymatic recontouring of auricular cartilage in a rabbit model. *Arch Facial Plast Surg* 2005; 7: 104-10.

28. Ozgenel GY. The influence of human amniotic fluid on the potential of rabbit ear perichondrial flaps to form cartilage tissue. *Br J Plast Surg* 2002; 55: 246-50.
29. Ozgenel GY, Filiz G, Ozcan M. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *Br J Plast Surg* 2004; 57: 423-8.
30. Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 1246-53.
31. Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. *Minerva Stomatol* 2004; 53: 191-206.
32. Gutta R, Waite PD. Outcomes of calvarial bone grafting for alveolar ridge reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24: 131-6.
33. Acocella A, Sacco R, Niardi P, Agostini T. Early implant placement in bilateral sinus floor augmentation using iliac bone block grafts in severe maxillary atrophy: a clinical, histological, and radiographic case report. *J Oral Implantol* 2009; 35: 37-44.
34. Barone A, Covani U. Maxillary alveolar ridge reconstruction with nonvascularized autogenous block bone: clinical results. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 2039-46.
35. Coradazzi LF, Garcia IR Jr, Manfrin TM. Evaluation of autogenous bone grafts, particulate or collected during osteotomy with implant burs: histologic and histomorphometric analysis in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; 22: 201-7.

36. Clayman L. Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: review of the literature and presentation of 8 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 674-82.
37. Haddock, S.M., Yeh, O.C., Mummaneni, P.V., Rosenberg, W.S. and Keaveny, T.M. Similarity in the Fatigue Behavior of Trabecular Bone Across Site and Species. *J Biomech* 2004; 37: 181–7.
38. Moore W. R., Graves S. E., Bain G. I. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J Surg* 2001; 71: 354–361.
39. Yoneda M, Terai H., Imai Y., Okada T., Nozaki K, Inoue H., Miyamoto S.,Takaoka K. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable boneinducing implant. *Biomaterials* 2005; 26: 5145–52.
40. Mowlem R. Bone grafting. *British Journal of Plastic Surg* 1963; 8: 293-304.
41. Burchardt H, Enneking WF. Transplantation of bone. *Surg Clin North Am* 1978; 58: 403-27.
42. Von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluation implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 343-54.
43. Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1999; 70: 526-35.
44. Katz J, Mukherjee N, Cobb RR, Bursac P, York A. Incorporation and Immunogenicity of Cleaned Bovine Bone in a Sheep Model. *J Biomater Appl.* 2008 Nov 5. [Epub ahead of print].



Figuras e Legendas



Figura 1 – Grupo I – Osso neoformado (TON) junto aos espaços medulares (MO). Subcutâneo. 180 dias. HE. 200X.

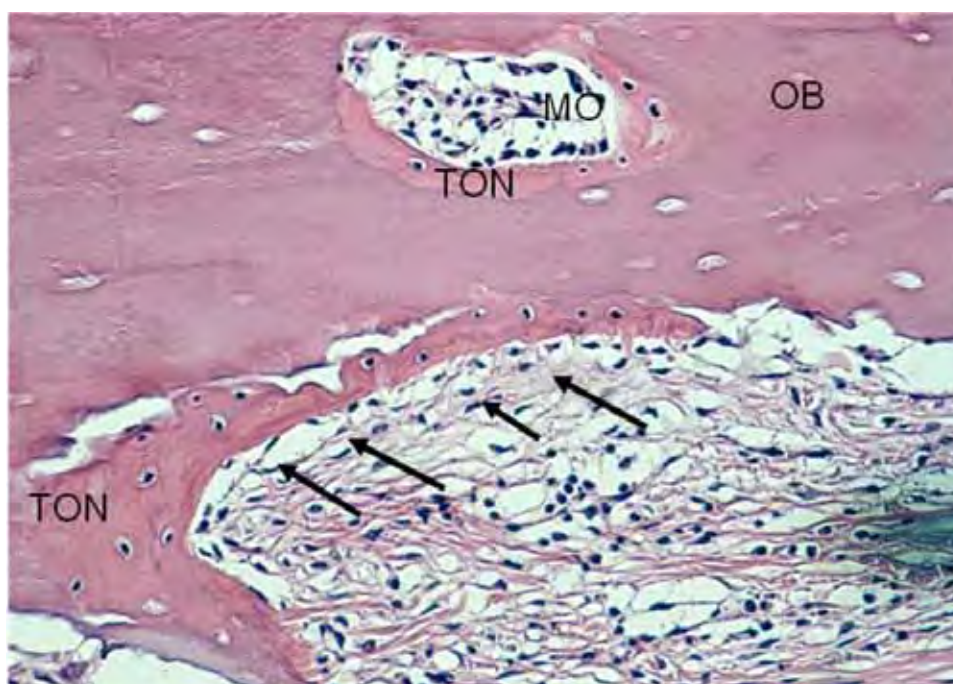


Figura 2 – Grupo I – Osso bovino (OB) exibindo tecido ósseo neoformado (TON) em alguns espaços medulares e em sua periferia. Diferenciação celular por estímulo osteoindutor (setas). Subcutâneo. 180 dias. HE. 200X.

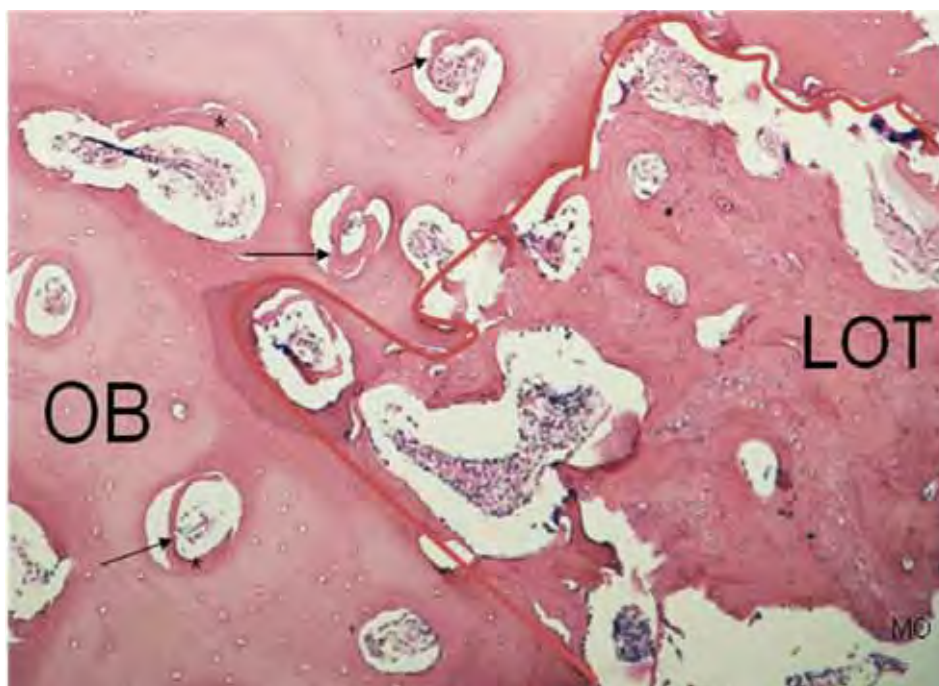


Figura 3 – Grupo II – Osso bovino (OB) exibindo a interface de contato (linha) e espaços medulares preenchidos por medula óssea ativa e osso neoformado (setas). Tíbia. 180 dias. HE.125X.

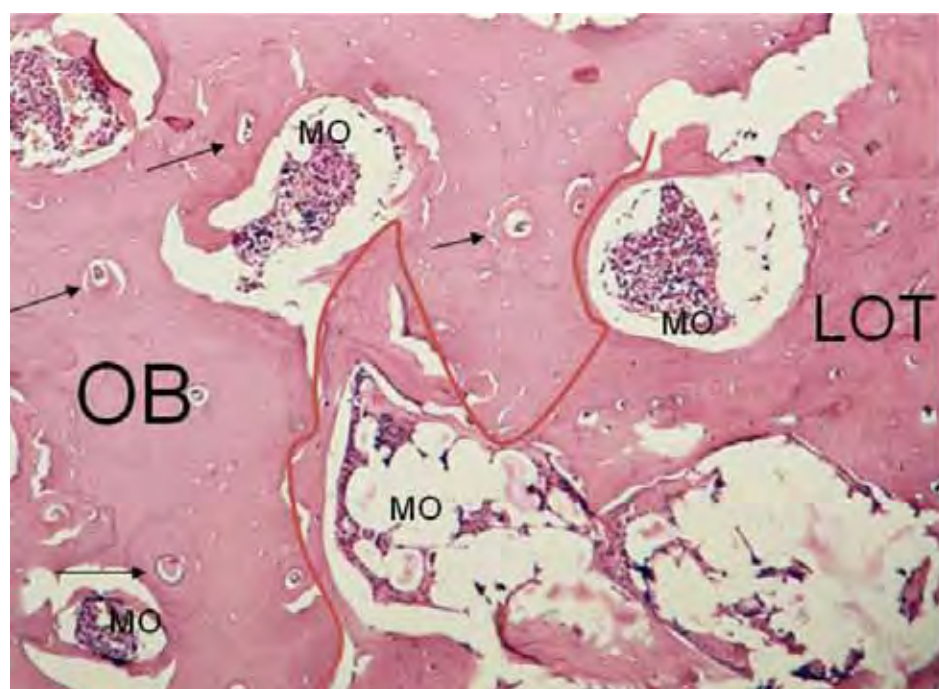


Figura 4 – Grupo II – Osso bovino (OB) implantado em íntimo contato com leito ósseo (LOT). Espaços medulares (MO) revascularizados com osso neoformado (setas). Interface leito receptor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X.

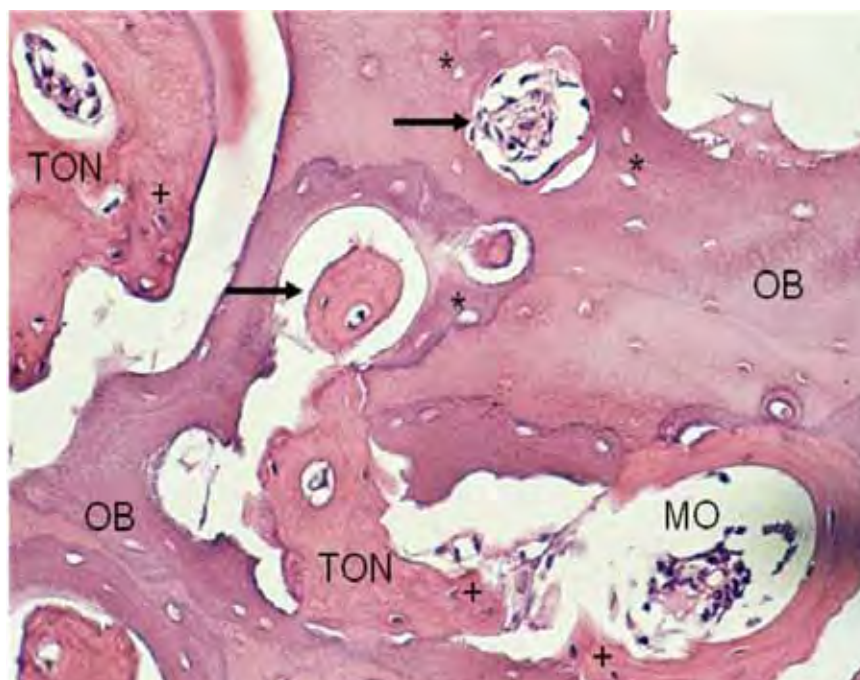


Figura 5 – Grupo II – Processo de incorporação do osso bovino (OB) sendo substituído por tecido neoformado (TON). Presença de espaços medulares (MO) celularizados e em atividade (setas). Ausência de osteócitos (*) no osso bovino e presença dessas células no tecido neoformado(+). Tíbia. 180 dias. HE.125X.

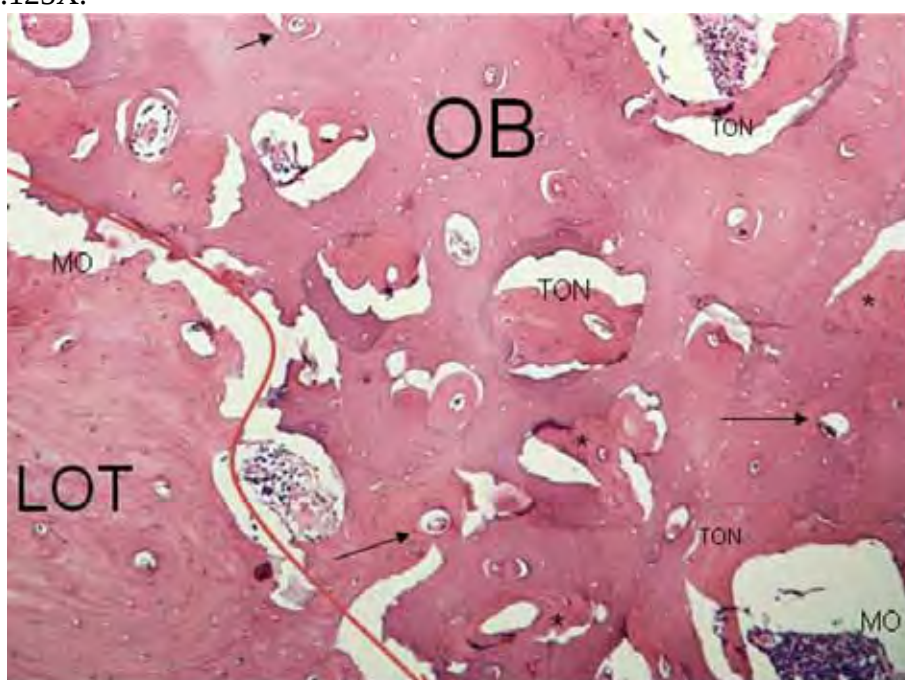


Figura 6 – Grupo II – Osso bovino (OB) junto ao leito ósseo (LOT) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado (TON*) e espaços medulares preenchidos por medula ativa (MO) e revascularização dos canais de nutrição (setas). Linha de interface leito recetor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X.

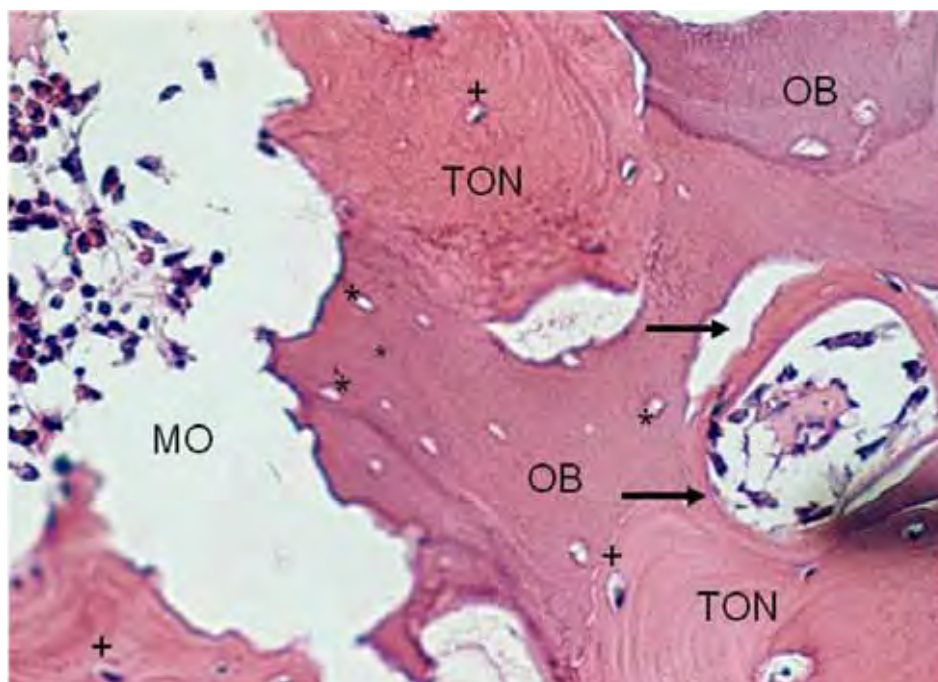


Figura 7 – Grupo II – Osso bovino (OB) junto ao leito ósseo (LOT) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado (TON*) e espaços medulares preenchidos por medula ativa (MO) e revascularização dos canais de nutrição (setas). Linha de interface leito recetor-enxerto ósseo. Tíbia. 180 dias. HE.125X.

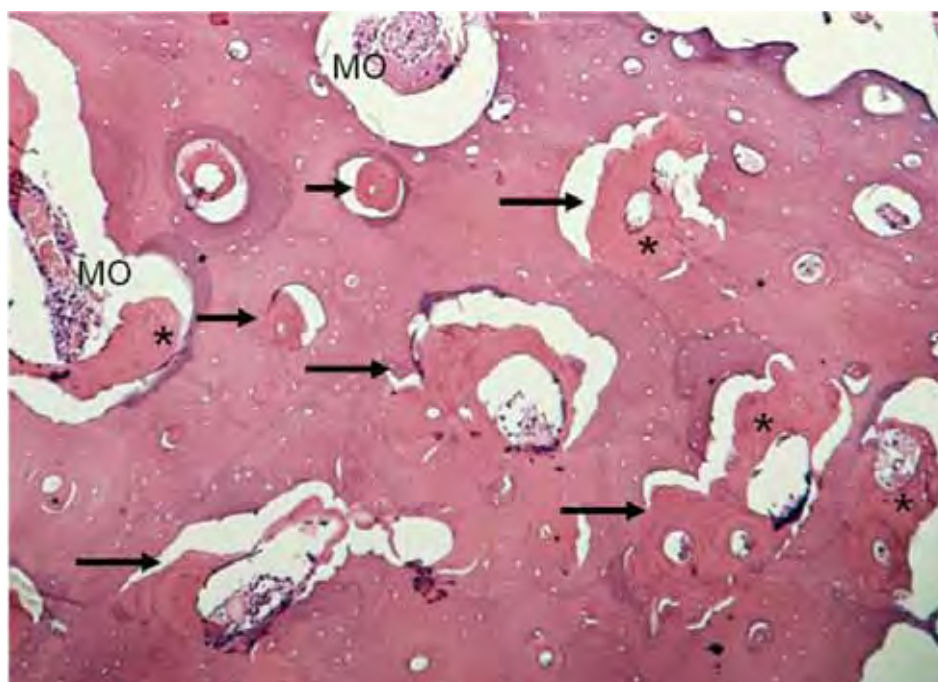
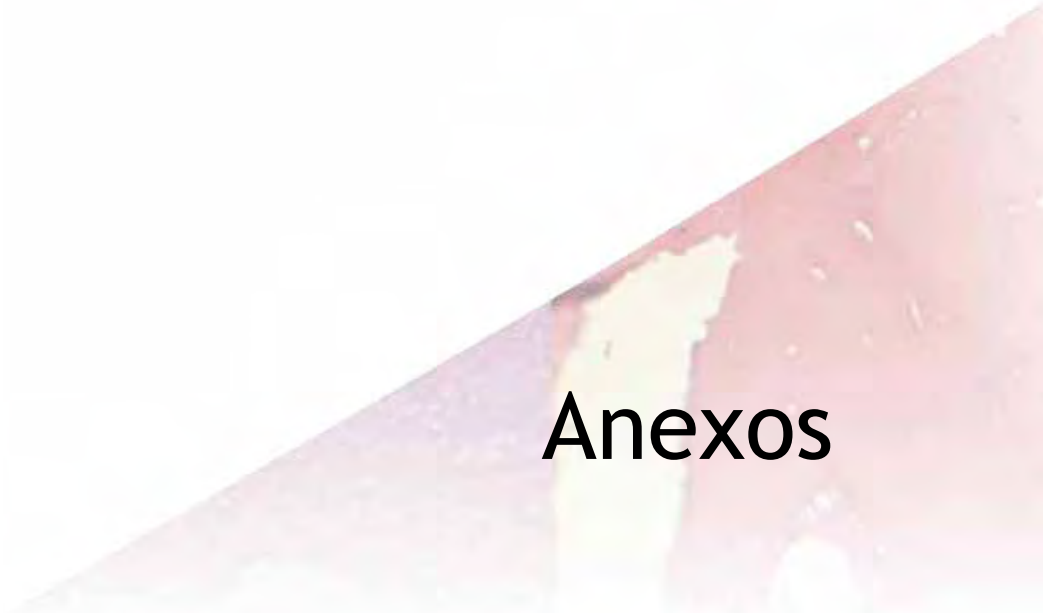


Figura 8 – Grupo II – Osso bovino (OB) exibindo áreas de substituição por tecido ósseo neoformado(*) no interior dos espaços medulares e canais de nutrição (setas). Medula óssea (MO) em atividade. Tíbia. 180 dias. HE.125X.



Anexos

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TECIDUAL DE ENXERTOS HETERÓGENOS ANORGÂNICOS DE OSSO BOVINO E SUÍNO. ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO E HISTOMORFOMÉTRICO EM COELHOS" sob responsabilidade de PROF DR WILSON ROBERTO POI e PROF DR IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR e colaboração de THAÍS DA SILVEIRA RODRIGUES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 30 de maio de 2008, de acordo com o protocolo no. 2008-003435.

Araçatuba, 28 de julho de 2008.

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

Anexo 2

Normas da revista selecionada para publicação do artigo:

“International Journal of Oral & Maxillofacial Implants”

Author Guidelines

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

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

Acceptable material.

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

Number of authors.

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

Review/editing of manuscripts.

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

Adherence to guidelines.

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

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See www.icmje.org.
- Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

- Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- Abstract/key words. Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.
- Introduction. Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
- Materials and Methods. Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- Results. Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- Discussion. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- Conclusions. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.
- Acknowledgments. Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

REFERENCES

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

Journal reference style:

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

Book reference style:

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

ILLUSTRATIONS AND TABLES

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

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

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

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

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-

printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

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

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

MANDATORY SUBMISSION FORM

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

PERMISSIONS AND WAIVERS

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

Anexo 3

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos dados encontrados nos Grupos I e II.

Animais	Interior do enxerto ósseo			Interface leito receptor/enxerto ósseo			Total de tecido neoformado		
	Medula	Osso neoformado	Total	Medula	Osso neoformado	Total	Medula	Osso neoformado	Total
1	18	29	47	16	34	50	34	63	97
2	11	37	48	28	24	52	39	61	100
3	7	33	40	32	24	56	39	57	96
4	15	28	43	36	26	62	51	54	105
5	6	42	48	34	22	56	40	64	104
6	20	35	55	26	10	36	46	45	91
7	18	26	44	24	26	50	42	52	94
8	21	24	45	30	16	46	51	40	91
9	14	39	53	30	28	58	44	67	111
10	22	41	63	16	12	28	38	53	91
Média	15,2±5,6	33,4±6,8	48,6±6,74	27,2±6,8	22,2±7,4	49,4±10,4	42,4±5,6	55,6±8,5	98,0±27,5

Anexo 4

Ilustrações da fase experimental – Grupo I – Pavilhão auricular.



Figura 9 – Coelho *Nova Zelândia*.



Figura 10 – Bloco ósseo.

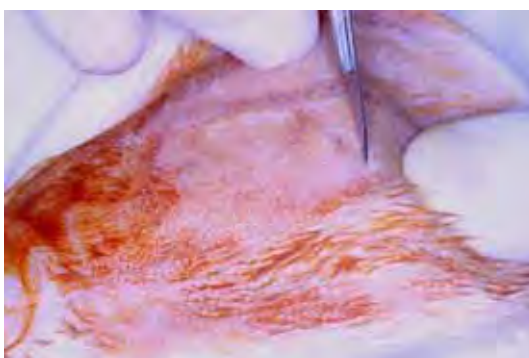


Figura 11 – Incisão no pavilhão auricular.

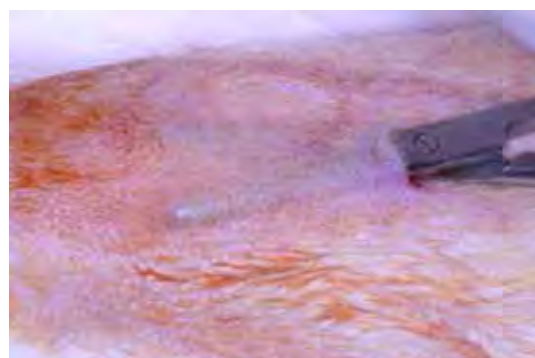


Figura 12 – Divulsão.



Figura 13 – Inserção do enxerto ósseo



Figura 14 – Sutura.

Ilustrações da fase experimental – Grupo II – Tíbia.



Figura 15 – Anestesia infiltrativa local.



Figura 16 – Incisão.



Figura 17 – Exposição da tíbia.



Figura 18 – Preparo do leito receptor.



Figura 19 – Fixação do enxerto ósseo.



Figura 20 - Sutura.