

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

***Processo de cicatrização óssea em defeitos
cirúrgicos de tamanho crítico tratados com
partículas do novo vidro bioativo associadas ou
não à barreira de sulfato de cálcio. Estudo
histológico e histométrico em calvárias de rato.***

ARAÇATUBA -SP

2008

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

***Processo de cicatrização óssea em defeitos
cirúrgicos de tamanho crítico tratados com
partículas do novo vidro bioativo associadas ou
não à barreira de sulfato de cálcio. Estudo
histológico e histométrico em calvárias de rato.***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP,
para a obtenção do Título de DOUTOR EM
ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA -SP

2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F985p Furlaneto, Flávia Aparecida Chaves
Processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico tratados com partículas do novo vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio: estudo histológico e histométrico em calvárias de rato / Flávia Aparecida Chaves Furlaneto. – Araçatuba : [s.n.], 2008
73f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008
Orientador: Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata

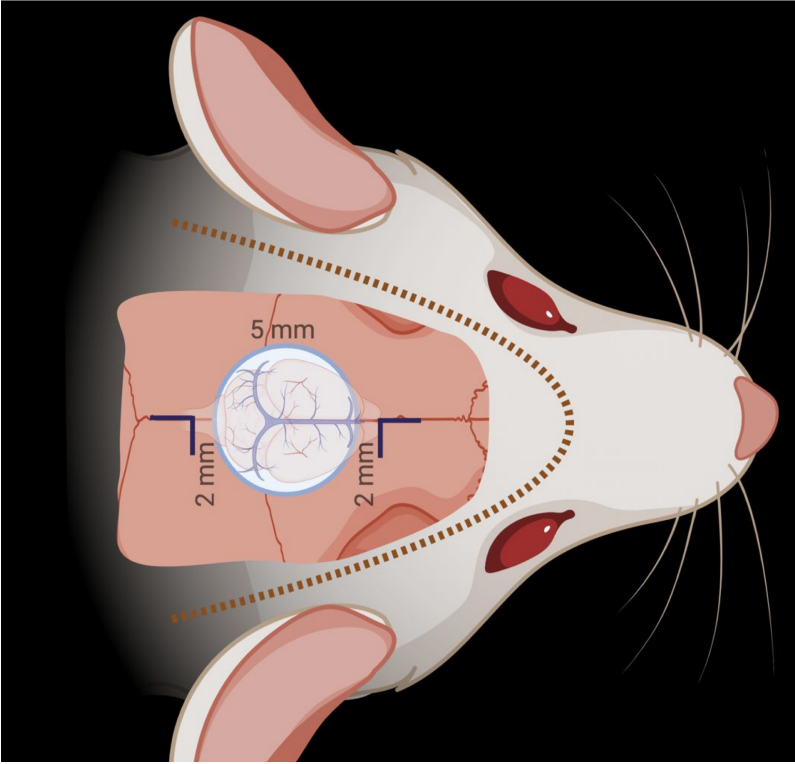
1. Regeneração óssea 2. Substitutos ósseos 3. Vidro 4. Sulfato de cálcio

Black D6
CDD 617.632

ERRATA

FURLANETO, F. A. C. ***Processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico tratados com partículas do novo vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio: estudo histológico e histométrico em calvárias de rato***. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2008.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
34	1	<i>Figura 1 - Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária</i>	<i>Figura 1 – Representação de um defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e das duas marcações de referência criados na calvária (Created in BioRender. Messora, M. 2024, https://BioRender.com/x86v848)</i>
60	1	<i>Fig. 1 - Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária.</i>	<i>Figura 1 – Representação de um defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e das duas marcações de referência criados na calvária (Created in BioRender. Messora, M. 2024, https://BioRender.com/x86v848).</i>
60	1	Substituir a imagem presente na tese (Figura 1) pela imagem a seguir.	



Dados Curriculares

Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

Nascimento: 10.02.1978 – Londrina/PR

Filiação: Luiz Antonio Furlaneto
Tereza Chaves Furlaneto

1996-1999: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

2000-2001: Curso de Especialização em Periodontia
Associação Brasileira de Odontologia – Seção MS (ABO/MS)

2003-2004: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área
de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

2005-2007: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

A Deus:

A Ti...

A minha vida, meus talentos, minha missão, minhas escolhas...

Porque de Ti vieram e a Ti devem retornar...

Que a Sua vontade prevaleça em cada um dos meus dias!

“Quando entre nós estás, tudo em torno se transforma

Mesmo se o inverno vem, resplandece sempre o sol

Tudo parece ouro, a névoa se dilui

E, como no Tabor, tudo se transfigura

Quando entre nós estás, tudo é sabedoria

Transfigura-nos em Ti, novos todos nos sentimos!”

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvar

diante da divindade.”

(Voltaire)

A meus pais, **Luiz e Tereza:**

Muito obrigada por me amarem tanto, me compreenderem, me esperarem...

Por terem sempre confiado em mim, incondicionalmente...

Pela liberdade que me deram para que eu fizesse as minhas próprias escolhas...

Por terem permitido que eu amadurecesse, com a responsabilidade que me ensinaram, de maneira tão tranqüila...

Por terem sempre assistido a minha trajetória, mesmo que distantes, de maneira que pudessem me apoiar, me levantar e me estimular a seguir em frente, caso fosse preciso...

Por terem acreditado nos meus sonhos comigo! Ainda que tivessem de abdicar dos seus sonhos em vista dos meus...

Muito obrigada pelo exemplo de amor, serenidade, resignação, humildade, honestidade, fé, otimismo e esperança...

Por terem me ensinado os verdadeiros valores de nossas vidas... Que privilégio e orgulho ter vocês como meus pais!

A vocês, minha admiração, respeito e gratidão infinitos... **Amo vocês!**

“Depois de algum tempo, você aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha”.

(William Shakespeare)

Ao meu irmão **Emerson**, minha cunhada **Luciana** e minha afilhada
Mariana:

Guinga e Lú,

Muito obrigada pela paciência, pela espera, pela compreensão...

Por terem feito por mim o que eu não pude fazer nos últimos anos...

Pelo exemplo de simplicidade, resignação e determinação...

Vocês foram de importância inestimável na minha formação como
pessoa e como profissional!

Muito obrigada por terem me confiado a Mariana, presente maior de
Deus nas nossas vidas!

Mariana,

Há menos de um ano você chegou às nossas vidas... E como já as
transformou!

Quanto amor temos por você... Para nós, você é motivo de alegria, fé e
esperança de que tudo é possível quando Deus está no comando de
nossos caminhos!

Amo vocês!

*A*o meu namorado **Michel**:

Difícil descrever em palavras tudo o que vivenciamos nos últimos 4 anos...

Tivemos grandes idéias, lutamos por elas, descobrimos que nada era tão simples e fácil assim...

Acompanhamos o amadurecimento um do outro, partilhando nossas vidas e experiências pessoais e profissionais dia após dia...

Identificamo-nos um com o outro, descobrimos nossas diferenças, enxergamos no outro suas mais valiosas qualidades e seus mais difíceis desafios...

De melhores amigos a namorados... Sem saber, vivemos cada etapa de um relacionamento tão peculiar e valioso!

Como é bom partilharmos juntos as nossas vidas!

Muito obrigada pelo seu amor, companheirismo, respeito... Por cuidar tanto de mim! Pela ajuda incansável nas pesquisas, projetos, aulas, me estimulando tanto na minha vida acadêmica! Você foi muito importante para que esta etapa fosse vencida!

“Nothing you confess could make me love you less...

I’ll stand by you...”

(The Pretenders)

Agradecimentos Especiais

A

minha orientadora Profa. Dra. **Maria José Hitomi Nagata**

Expressar em um breve texto o que a senhora trouxe à minha vida não é uma tarefa fácil...

Claro divisor de águas, sabiamente guiou-me para que eu pudesse escolher os melhores caminhos na minha vida pessoal e profissional...

Não existem palavras suficientes para agradecer a confiança sempre em mim depositada!

Muito obrigada por me conduzir à realização de um grande sonho, uma das melhores experiências da minha vida!

Pelo exemplo de dignidade, integridade, seriedade e competência profissional... Pela oportunidade de conviver e aprender tanto com a senhora... Tenho um orgulho imenso de ter sido orientada por uma educadora, pesquisadora e mulher com uma reunião de qualidades tão difícil de encontrar em um ser humano!

Obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelas partilhas de vida e de experiências tão engrandecedoras...

Jamais serei suficientemente grata por tudo o que fez por mim!

"O que o mestre é vale mais que os ensinamentos do mestre."

(Karl Menninger)

Ao querido Prof. Dr. **Antonio José Moretti**

Como ouvi falar desde o princípio, um verdadeiro anjo da guarda...

Sempre fazendo mais do que eu esperava, mais que o necessário para me ajudar...

Muito obrigada pelo carinho da acolhida e pela confiança em mim depositada... Pela compreensão, pela paciência, pelas conversas tão engrandecedoras, por tantos momentos agradáveis partilhados... Por me estimular tanto na vida acadêmica!

Serei eternamente grata pela oportunidade ímpar de aprimoramento profissional e pela experiência pessoal vivenciada!

Ao senhor, meu eterno respeito e admiração.

"Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes."

(Gilbert Keith Chesterton)

Agradecimentos

A MINHA SINCERA GRATIDÃO. . .

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**
Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas pessoas de seu Coordenador Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** e de todo corpo docente
Pela valiosa contribuição na minha formação.

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. **Valdir Gouveia Garcia**

Professor, o senhor possui qualidades extremamente raras em um ser humano... Sentimentos, valores e atitudes perante o próximo peculiares de pessoas realmente iluminadas... Com sua intensa energia positiva, contagiou cada um dos nossos encontros, clínicas, conversas... Preocupou-se conosco em todos os momentos e acima de qualquer coisa! Ajudou-nos a levantar, respirar fundo e recomeçar, sempre que necessário. Muito obrigada pelo seu exemplo de educador, pesquisador, profissional ético e batalhador incansável... Obrigada por todos os ensinamentos e pelo imenso prazer de conviver com o senhor!

“O homem livre é aquele que é capaz de ir até ao fim do seu pensamento.”

(Léon Blum)

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. **Alvaro Francisco Bosco**

Sempre me lembrarei, com orgulho, de seus sábios ensinamentos, na Periodontia clínica e na vida cotidiana... Muito obrigada pelo seu exemplo de ser humano

honesto, alegre, forte, corajoso, lutador... Sempre disposto a aprender mais e mais, espelho para nós, iniciantes na vida acadêmica...

Muito obrigada pela paciência, pela compreensão e pela confiança em nós depositada...

Obrigada por me ensinar a tornar as coisas mais simples!

“A sabedoria própria dos sábios consiste em uma extraordinária dose de bom senso.”

(Reitor W.R. Inge)

Ao Departamento de Periodontia da “The University of Texas Dental Branch at Houston – UTDB”, na pessoa de seu chefe Prof. Dr. **James Katancik**

Por ter me aceitado e acolhido tão carinhosamente, permitindo que eu vivesse a indescritível experiência científica e pessoal durante o estágio realizado nas dependências desta instituição.

Ao Professor da “The University of Texas Health Science Center Dental Branch” Dr. **Jerry E. Bouquot**

Por ter aceitado contribuir para o nosso estudo, mesmo com tantos compromissos...

Pela realização da análise histológica deste trabalho... Pela convivência tão agradável, pela conversas científicas tão enriquecedoras e pelo exemplo de competência e simplicidade! Obrigada por ter me acolhido tão bem!

Ao Professor da “The University of Texas Southwestern Medical Center” Dr. **Chul W. Ann**

Por ter aceitado colaborar em nossa pesquisa, realizando a análise estatística da mesma.

Ao Professor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Dr. **Wilson Roberto Poi**

Por toda a disponibilidade e carinho com que sempre me atendeu...

Por ter confiado em mim! Por todo o estímulo e encorajamento, essenciais para que eu seguisse adiante na busca dos meus sonhos!

Ao querido Professor Dr. **Stephen E. Fucini**

Pelo estímulo em sempre seguir adiante! Pela inestimável ajuda nas traduções e correções dos artigos científicos... Pelo empenho na aquisição de materiais para nossas pesquisas... Pelo intermédio que realizou para a obtenção do financiamento deste estudo!

Aos queridos **Gillian e Barry Rittman**

Pela ajuda inestimável na realização da análise histométrica deste trabalho e pela carinhosa acolhida!

Ao Professor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Dr. **Luiz Alberto Milanezi**

Pela amizade, confiança e exemplo de grande educador e ser humano... Pelo auxílio essencial na aquisição dos animais utilizados neste estudo!

Aos queridos Professores do Departamento de Periodontia da “The University of Texas Dental Branch at Houston – UTDB” **Andrew Moore, Gina Bonaventura, Gissela Anderson, Hiru Mathur, Lawrence Friedman, Lillian Lyons, Maria Fiocchi, Michael Korth, Omar Hakki, Pedro Trejo, Raoulf Hanna, Robin Weltman e Stephen Schorr**

Por tantos ensinamentos teóricos e clínicos na Periodontia... Pela acolhida tão carinhosa, oferecendo-me a valiosa oportunidade de participar de todas as atividades de suas disciplinas! Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim!

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Dr. Michel Saad Neto e Dr. Tetuo Okamoto

Pela amizade, encorajamento e prontidão em ajudar sempre.

À querida Professora do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e grande amiga Dra. Sônia Regina Panzarini Barioni

Um anjinho na minha vida... Nem sei como agradecer pelo seu carinho, pelos seus conselhos, pela partilha das nossas experiências iniciais de fé, pelo seu exemplo de mulher, mãe, cristã, educadora... Impossível conhecer-te e não adorar-te! Muito obrigada a você e a todos da sua família pela acolhida tão amorosa!

Aos Professores da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) Dra. Margareth Coutinho e Dr. Luiz Massaharu Yassumoto

Sem a força de vocês, certamente eu não estaria aqui. Obrigada pelo estímulo!

Aos meus queridos avós maternos, José (*in memoriam*) e Dolores

Pela preocupação, amor e carinho constantes, mesmo com a distância tão grande! Vocês são exemplos muito importantes de honestidade, simplicidade, alegria e resignação para mim! Amo vocês!

Aos meus queridos avós paternos, **Angelo e Assunta** (*in memoriam*)

Tenho certeza de que vocês olham e torcem por nós continuamente. Obrigada por tudo! Muito amor e saudades...

Ao Dr. **Mário** e a Sra. **Hermínia Nagata**

Pelo carinho e atenção com que me acolheram desde o princípio... Pela preocupação com meu bem-estar... Por serem a minha família em Araçatuba... Serei sempre a “filha espiritual” de vocês!

À **Tatiana**, minha querida companheira de curso e de casa

Tati, a empatia foi imediata, no dia da prova do Mestrado... Início de uma amizade que será eterna, independentemente do tempo e da distância, pois tenho certeza do respeito e da confiança que temos uma pela outra! Vou sentir muito sua falta, minha irmãzinha! Estarei sempre torcendo muito por você, o que na verdade nem precisaria, pois você já é um sucesso! Muito obrigada por todos os momentos vividos, por partilharmos nossas experiências, pelo companheirismo, pela praticidade que você trouxe às nossas tarefas e por tudo o que pude aprender com você!

“As pessoas podem duvidar do que você diz, mas acreditarão sempre no que você faz.”

(Ralph W. Emerson)

Aos meus amigos **Luis Augusto, Luiz Gustavo, Michyele, Natália de Campos e Natália Pola**

Como foi bom dividir idéias, dúvidas, risadas, vitórias, dificuldades, metodologias, viagens, congressos e os incansáveis dias de cirurgias com vocês! Tenho um carinho muito especial por cada um... Boa sorte e sucesso em suas carreiras acadêmicas!

“Nenhum de nós é bom o suficiente como todos nós juntos.”

Às minhas queridas amigas **Natália de Campos** e **Natália Pola**

Pela inestimável ajuda no processamento laboratorial deste trabalho.

À minha amiga **Paulina**

Pela amizade, companheirismo, partilhas de vida, de fé e de experiências tão engrandecedoras! Na Guatemala, nos EUA, em qualquer lugar, sempre terei você no meu coração... Te adoro muito!

Aos meus queridos amigos **Nancy** e **Thien**

Pela acolhida, pelo carinho, pelo exemplo de altruísmo, esperança, fé e resignação... Por tudo o que fizeram por mim, desde o início da nossa convivência... Tenho certeza de que nossa amizade não ficou apenas no período em que estávamos próximos fisicamente! Saudades...

Aos meus queridos amigos **Celine, Fabi, Brenda, Sayma, Sridhar, Jan, Louise, Ann, Magret, Lisa, Juliana, German, Sidney, Yusuf, Sid e Sree**

Pelo carinho com que me acolheram, por tudo o que aprendemos juntos, por terem me ajudado tanto... Pelos seminários, aulas, viagens e passeios tão proveitosos junto com vocês!

À minha querida amiga e irmãzinha mais nova **Larissa**

Pelos sorrisos e lágrimas... Por tudo o que aprendemos juntas...

Pelo ânimo, descontração e alegria que você sempre trouxe à nossa casa quando eu e a Tati mais precisávamos! Muito obrigada por partilharmos nossas vidas durante esses 3 anos!

Às minhas queridas “roomates” **Talita, Sarah, Maria del Carmem, Paulina, Vanessa, Karla, Andreja, Suheyla e Holly**

Pelo carinho, pela compreensão e pela troca de experiências culturais tão enriquecedoras!

Aos meus amigos do Mestrado e Doutorado em Periodontia **Alex, Ana Cristina, Célia, Danielle, Fernando, Juliano, Leandro, Luciana, Samara, Sérgio Ricardo, Thiago e Valmir**

Por tudo o que pude aprender com vocês... Pelas alegrias e desafios compartilhados!

Às minhas amigas de Pós-Graduação **Fernanda Brighenti e Livia Zina**

Pela partilha de um sonho em comum!

Aos meus amigos **Carla e Alex Bachega**

Por serem sempre presença de Deus na minha vida. Pelo incentivo e amor que, mesmo com a distância, fazem-se vivos nos meus dias.

Aos meus amigos **Cristiane e André Pagnoncelli**

Vocês foram essenciais para que eu pudesse continuar o meu caminho, tão incipiente, no estudo da Periodontia. Muito obrigada!

À minha querida amiga **Juliana Tsumura**

Pela amizade, pela agradável convivência, pela troca de experiências pessoais e profissionais e pela companhia nas viagens entre Campo Grande e Araçatuba!

Ao meu amigo **Rodrigo Leonardo** e sua família

Pela amizade, pelas preocupações de sempre... Por toda a ajuda com minhas mudanças!

À **Rute**

Por ter cuidado da nossa casa, das nossas coisas e tão carinhosamente de nós!

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP **Diogo, Marina e Valéria**

Por terem me recebido sempre tão bem, com sorriso nos lábios e um bom-humor contagiante, independentemente de qualquer contratempo... Pela eficiência e presteza de sempre, fundamentais ao prosseguimento dos nossos trabalhos.

Ao querido amigo e funcionário **Odair**

O que seria de nós sem a sua eficiência e sua prontidão em ajudar e servir sempre, mesmo nas situações mais difíceis? Sua bondade é eloqüente em seus olhos! Obrigada pelo seu exemplo!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP **Antônia, Bernadete, Claudiomiro, Cleide, Dirce, Gilmar e Paulo**

Pela convivência tão agradável e por terem me ensinado tanto.

Em especial à **Bernadete, Dirce e Gilmar**, pela contribuição na coloração das lâminas deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
Camilo, José Lúcio, João Batista e Romildo Bandeira

Pela disponibilidade em ajudar sempre... Por todas as alegrias e dificuldades compartilhadas.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP
Alexandra, Ana Claudia, Ana Paula, Claudia, Cláudio Maciel Júnior, Cláudio Matsumoto, Fernando, Helena, Isabel, Ivone, Izamar, Jessica, Luzia e Maria Cláudia
Pela eficiência, paciência e alegria com que sempre me atenderam.

À empresa "BIOMET 3i, Inc." (Palm Beach Gardens, FL, EUA), na pessoa do seu Diretor de Pesquisas Clínicas Dr. **James N. Kenealy**
Pelo financiamento total concedido para a realização deste trabalho.

A todos os alunos de graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela convivência tão agradável e enriquecedora!

A todos os pacientes, pela confiança depositada em cada atendimento.

Aos animais que, não tendo escolha, simplesmente dispõem-se.

Epígrafe

“**S**er feliz não é ter uma vida perfeita
Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância
Usar as perdas para refinar a paciência
Usar as falhas para esculpir a serenidade
Usar a dor para lapidar o prazer
Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência...”

(Augusto Cury)

Resumo

FURLANETO, F.A.C. **Processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico tratados com partículas do novo vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio:** estudo histológico e histométrico em calvárias de rato [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2008.

Este estudo avaliou, histologicamente e histometricamente, a influência das partículas esféricas do novo vidro bioativo (NVB), associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio (SC), na cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico (DTC) cirurgicamente criados em calvárias de rato. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi realizado na calvária de 60 ratos, divididos em três grupos: C (controle) - defeito preenchido apenas com coágulo sangüíneo; NVB - apenas NVB; e NVB/SC - NVB coberto por barreira de SC. Cada grupo foi subdividido para eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias (n=10). As quantidades de osso neoformado e de remanescentes dos materiais implantados foram calculadas como porcentagens da área total do defeito original e os dados foram analisados estatisticamente (Kruskal-Wallis, teste da soma dos postos de Wilcoxon, $p<0,05$). Nenhum defeito regenerou completamente com tecido ósseo. A espessura da área do defeito foi similar à da calvária original nos Grupos NVB e NVB/SC. O Grupo C apresentou um tecido conjuntivo fino na área central do defeito. Partículas de NVB foram observadas nos Grupos NVB e NVB/SC em ambos os períodos de análise. Após 4 semanas, o Grupo C apresentou neoformação óssea significativamente maior do que o Grupo NVB/SC. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre o Grupo NVB e o Grupo C ou o Grupo NVB/SC. Após 12 semanas, o Grupo C apresentou formação óssea significativamente maior do que os Grupos NVB e NVB/SC. A área de NVB remanescente foi significantemente maior no Grupo NVB/SC do que no Grupo NVB em 12 semanas. As partículas de NVB, associadas ou não à barreira de SC, mantiveram o volume e o contorno das áreas tratadas em DTC. A presença de partículas remanescentes de

NVB pode ter contribuído para a menor quantidade de osso neoformado observada nos Grupos NVB e NVB/SC em 12 semanas pós-operatórias.

Palavras-chave: regeneração óssea; substitutos ósseos; vidro; sulfato de cálcio.

Abstract

FURLANETO, F.A.C. **Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/ calcium sulfate:** a histologic and histometric study in rat calvaria [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2008.

This study analyzed histologically and histometrically the influence of new spherical bioactive glass (NBG) particles with or without a calcium sulfate (CS) barrier on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. A 5 mm diameter CSD was made in each calvarium of 60 rats. They were divided into three groups: C (control): defect filled with blood clot only; NBG: NBG only; and NBG/CS: NBG covered by a CS barrier. These groups were divided into subgroups and euthanized at 4 or 12 weeks (n=10). Amounts of new bone and remnants of implanted materials were calculated as percentages of the total area of the original defect. Data were statistically analyzed (Kruskal-Wallis, exact Wilcoxon rank sum tests, $p<0.05$). No defect completely regenerated with bone. The thickness throughout the defects in Groups NBG and NBG/CS was similar to the original calvarium, while Group C had a thin connective tissue in the center of the defect. NBG particles were observed in Groups NBG and NBG/CS at both periods of analysis. At 4 weeks, Group C had significantly more bone formation than Group NBG/CS. No significant differences were found between Group NBG and either Group C or Group NBG/CS. At 12 weeks, Group C had significantly more bone formation than Group NBG or NBG/CS. The area of remaining NBG was significantly greater for Group NBG/CS than for NBG at 12 weeks. NBG particles, used with or without a CS barrier, maintained the volume and contour of the area grafted in CSD. The presence of remaining NBG particles might have accounted for the smaller amount of newly formed bone observed in Groups NBG and NBG/CS at 12 weeks post-operative.

Key words: bone regeneration; bone substitutes; glass; calcium sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária	60
Figura 2 -	Grupo C (controle). 12 semanas. Defeito cirúrgico com tecido conjuntivo fibroso de espessura inferior à da calvária original (H.E., aumento original 20x)	60
Figura 3 -	Grupo NVB (novo vidro bioativo). 12 semanas. Partículas de NVB (setas) embebidas em osso neoformado (Tricrômico de Masson, aumento original 100x)	61
Figura 4 -	Grupo NVB (novo vidro bioativo). 12 semanas. Partícula de NVB apresentando fissuras e centros escavados com matriz osteóide (MO) (H.E., aumento original 200x)	61
Figura 5 -	Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 4 semanas. Osso neoformado (ON) no interior de uma partícula de NVB (H.E., aumento original 200x)	62
Figura 6 -	Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 12 semanas. Partículas de NVB circundadas por osso neoformado (ON) (H.E., aumento original 200x)	62
Figura 7 -	Grupo NVB (novo vidro bioativo). 4 semanas. Partículas de NVB e tecido conjuntivo circunjacente formam uma faixa com espessura similar à da calvária original (H.E., aumento original 20x)	63

Figura 8 - Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 4 semanas.

Partículas de NVB e tecido conjuntivo circunjacente formam uma faixa com espessura similar à da calvária original (Tricrômico de Masson, aumento original 20x)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) na área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias	64
Tabela 2 -	Porcentagem média da Área de Novo Vidro Bioativo (ANVB) na área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias	65

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	67
Anexo B -	Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontal Research”	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AON	=	Área de Osso Neoformado
ASC	=	Área de Sulfato de Cálcio
AT	=	Área Total
ANVB	=	Área de Novo Vidro Bioativo
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
DTC	=	Defeito(s) de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
Fig.	=	Figura
Figs.	=	Figuras
g	=	Grama
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
kg	=	Quilograma
Ltda.	=	Limitada
MO	=	Matriz Osteóide
mg	=	Miligrama
ml	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
mm ²	=	Milímetro quadrado
µm	=	Micrometro
NVB	=	Novo(s) Vidro(s) Bioativo(s)
ON	=	Osso Neoformado
PDEE	=	Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior
SC	=	Sulfato de Cálcio
VB	=	Vidro(s) Bioativo(s)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	=	Graus Celsius
%	=	Por cento
n	=	Tamanho da amostra
p	=	Probabilidade do valor do teste
x	=	Vezes
>	=	Maior
<	=	Menor
K_2HPO_4	=	Fosfato dipotássico

SUMÁRIO

Manuscrito para Publicação	41
Página de título	42
Resumo	43
Introdução	44
Material e métodos	46
Resultados	50
Discussão	52
Agradecimentos	56
Referências	56
Anexos	66



*Manuscrito para Publicação**

*Segundo as normas do periódico “Journal of Periodontal Research” – Anexo B

Processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico tratados com partículas do novo vidro bioativo associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio. Estudo histológico e histométrico em calvárias de rato.

Flávia A. C. Furlaneto, Cirurgiã-Dentista, Mestra¹

Maria J. H. Nagata, Cirurgiã-Dentista, Doutora¹

¹Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Brasil.

Título resumido (“Running title”): **Cicatrização óssea com novo vidro bioativo/sulfato de cálcio**

Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Rua José Bonifácio 1193

16015-050 - Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 3636 3239

Fax: +55 18 3636 3332

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Palavras-chave: regeneração óssea; substitutos ósseos; vidro bioativo 45S5; sulfato de cálcio

Resumo

Introdução e Objetivo: Este estudo avaliou, histologicamente e histometricamente, a influência das partículas esféricas do novo vidro bioativo (NVB), associadas ou não à barreira de sulfato de cálcio (SC), na cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico (DTC) cirurgicamente criados em calvárias de rato. **Métodos:** Um DTC de 5 mm de diâmetro foi realizado na calvária de 60 ratos, divididos em três grupos: C (controle) - defeito preenchido apenas com coágulo sangüíneo; NVB - apenas NVB; e NVB/SC - NVB coberto por barreira de SC. Cada grupo foi subdividido para eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias (n=10). As quantidades de osso neoformado e de remanescentes dos materiais implantados foram calculadas como porcentagens da área total do defeito original e os dados foram analisados estatisticamente (Kruskal-Wallis, teste da soma dos postos de Wilcoxon, $p<0,05$). **Resultados:** Nenhum defeito regenerou completamente com tecido ósseo. A espessura da área do defeito foi similar à da calvária original nos Grupos NVB e NVB/SC. O Grupo C apresentou um tecido conjuntivo fino na área central do defeito. Partículas de NVB foram observadas nos Grupos NVB e NVB/SC em ambos os períodos de análise. Após 4 semanas, o Grupo C apresentou neoformação óssea significativamente maior do que o Grupo NVB/SC. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre o Grupo NVB e o Grupo C ou o Grupo NVB/SC. Após 12 semanas, o Grupo C apresentou formação óssea significativamente maior do que os Grupos NVB e NVB/SC. A área de NVB remanescente foi significantemente maior no Grupo NVB/SC do que no Grupo NVB em 12 semanas. **Conclusão:** As partículas de NVB, associadas ou não à barreira de SC, mantiveram o volume e o contorno das áreas tratadas em DTC. A presença de partículas remanescentes de NVB pode ter contribuído para a menor quantidade de osso neoformado observada nos Grupos NVB e NVB/SC em 12 semanas pós-operatórias.

Introdução

Diversos tipos de enxertos e substitutos ósseos têm sido colocados no interior de defeitos ósseos a fim de facilitar e/ou promover a cicatrização (1). Dentre eles, destacam-se os materiais sintéticos ou aloplásticos pela disponibilidade ilimitada e por dispensarem o procedimento cirúrgico em um sítio doador (2,3).

Dentro do grupo dos materiais sintéticos usados como substitutos ósseos, o vidro bioativo (VB) particulado, que age formando uma união química com os tecidos circunjacentes (4,5), tem sido alvo de considerável investigação. Tem sido demonstrado que, além de serem altamente osteocondutivas (6-8), as partículas de VB possuem um efeito osteoestimulatório (3,6,7,8,9). Esta propriedade permite a formação de novo tecido ósseo dentro das partículas internamente escavadas, sem conexão com o osso pré-existente do sítio cirúrgico (6). As propriedades osteocondutiva e osteoestimulatória são decorrentes de uma série de reações que acontecem após a implantação e contato das partículas com os fluidos teciduais (6). Entretanto, períodos de cicatrização prolongados podem ser necessários para permitir a completa reabsorção das partículas e substituição das mesmas por tecido ósseo (10).

Diversas modificações têm sido realizadas com o propósito de acelerar as reações das partículas de VB (11,12). As formas granular e esférica do Biogran[®] (BIOMET 3i, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA) foram convertidas em hidroxiapatita *in vitro* (Biogran II[®]), por meio da imersão das mesmas em soluções de K_2HPO_4 , no estudo de Fang & Neidt (11). A forma esférica do Biogran II[®] pré-ativado, um novo vidro bioativo (NVB), exibiu diferenças no processo de crescimento dos cristais e nas micro-fissuras observadas na superfície externa das carapaças de hidroxiapatita. Acredita-se que, dos 11 estágios de reações que são necessários para a formação da ligação entre o Biogran[®] e os tecidos circunjacentes, os primeiros 5 estágios são obtidos *in vitro*, resultando em uma neoformação óssea mais rápida

ao redor do novo material (11). Quando as formas esférica e granular do Biogran II[®] foram usadas para preencher defeitos de tamanho crítico (DTC) ao redor de implantes em tíbias de coelho, o volume ósseo total, bem como o desenvolvimento de novo tecido ósseo dentro das partículas, foram maiores quando comparados a outros estudos em que o Biogran[®] foi utilizado. A dissolução da carapaça externa e o conseqüente crescimento de novo osso no interior dos centros escavados foram observados somente nas partículas esféricas (13). Atualmente, o Biogran II[®] é um novo produto disponível apenas para uso experimental.

O uso do VB com barreiras, como a de sulfato de cálcio (SC), também tem sido sugerido (14,15,16). Demonstrou-se que a combinação de partículas de VB com uma barreira de SC foi benéfica para preservar as dimensões do rebordo alveolar após exodontias (14). Melo *et al.* (16) realizaram um estudo histomorfométrico, em tíbias de ratos, para avaliar esta combinação de materiais. Defeitos ósseos cirurgicamente criados foram tratados com VB e a barreira de SC, usados isoladamente ou associados. Os defeitos do grupo controle, preenchidos somente com coágulo sanguíneo, apresentaram formação óssea significativamente maior que os defeitos dos grupos experimentais. Esses resultados foram atribuídos à natureza não crítica dos defeitos cirurgicamente criados. Assim, em um outro estudo histomorfométrico, Furlaneto *et al.* (17) criaram DTC em calvárias de rato para avaliar os mesmos materiais. Os autores concluíram que as partículas de VB, associadas ou não à barreira de SC, mantiveram o volume e o contorno da área enxertada. Contudo, esses materiais não levaram a diferenças significativas na formação óssea em relação ao grupo controle em 12 semanas pós-operatórias.

O propósito do presente estudo foi avaliar, histologicamente, a influência das partículas esféricas do novo vidro bioativo (NVB), associadas ou não à barreira de SC, na cicatrização óssea de DTC cirurgicamente criados em calvárias de ratos.

Material e métodos

Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) adultos machos, com 3 a 4 meses de idade e peso variando de 350 a 400 g (Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, UNESP). Os animais foram mantidos sob temperatura ambiente variando de 22 a 24°C, com ciclos de 12 horas de luz por dia. Eles foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: Grupo C (controle), Grupo NVB (implante de NVB; Biogran II[®], BIOMET 3i, Inc.) e Grupo NVB/SC (implante de NVB e barreira de SC; Calcigen[™] Oral, BIOMET 3i, Inc.).

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (70 mg/kg de peso corporal) associado à xilazina (6 mg/kg de peso corporal). Após tricotomia e anti-sepsia da área a ser operada, foi realizada uma incisão semilunar na região anterior da calvária e um retalho de espessura total foi elevado em direção posterior. A seguir, um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado no osso da calvária, envolvendo a sutura sagital. O defeito foi realizado usando uma broca trefina (BIOMET 3i, Inc.) acoplada a uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação contínua com solução salina estéril. Com auxílio de um guia cirúrgico previamente confeccionado e uma broca “carbide” tronco-cônica, uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram preenchidas com amálgama (18;

Fig. 1). Essas marcações foram úteis para permitir a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histométrica.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo NVB, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,1875 g de partículas esféricas de NVB (Biogran II[®]). No Grupo NVB/SC, ele foi preenchido com 0,1875 g de partículas esféricas de NVB (Biogran II[®]) e coberto por uma barreira de SC (Calcigen[™] Oral). O SC foi preparado seguindo a proporção recomendada pelo fabricante (0,09375 g de pó e 0,05 ml de agente catalisador).

Os tecidos moles foram então reposicionados e suturados, de modo a obter fechamento primário da ferida (Seda 4.0, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

Processamento tecidual

Cada grupo de animais foi subdividido em dois para realização de eutanásia em 4 ou 12 semanas pós-operatórias. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 16%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se o maior eixo de ambas as marcações de amálgama em formato de “L” como referências. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de cada marcação em “L”, de modo que cada espécime apresentou-se com 9 mm de extensão no sentido

longitudinal. Assim, foi possível identificar as margens do defeito cirúrgico original durante as análises histológica e histométrica (18). Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6 µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) ou Tricrômico de Masson para análise por microscopia óptica.

Análise histomorfométrica

Antes da análise, foram estabelecidos critérios para realizar uma avaliação mais objetiva dos infiltrados inflamatórios agudo (neutrófilos) e crônico (linfócitos, plasmócitos, histiócitos). Os infiltrados inflamatórios agudo e crônico foram graduados em uma escala de 1 a 4, sendo que o escore 1 representava uma quantidade mínima de células e o escore 4 representava uma quantidade muito grande de células. Caso nenhuma célula fosse observada, o escore 0 era utilizado. Após a análise de todos os espécimes, obteve-se um escore médio para cada grupo. Quatro cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, foram selecionados para as análises histológica e histométrica com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos dados usados na análise estatística. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, com aumento de 10x do original. As imagens digitalizadas foram salvas em um computador e transferidas para o “software” Image-Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, Maryland, EUA), que foi usado para a análise histomorfométrica.

Os seguintes critérios, baseados nos estudos de Furlaneto *et al.* (17) e Messoria *et al.* (18), foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação das superfícies

externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Essas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Considerando o comprimento total do espécime histológico, foram medidos 2 mm, a partir das extremidades direita e esquerda do mesmo, em direção ao centro do defeito, com o objetivo de localizar as margens do defeito cirúrgico original. A Área de Osso Neoformado (AON), bem como as áreas ocupadas pelos remanescentes dos materiais implantados, denominadas de Área de Novo Vidro Bioativo (ANVB) e Área de Sulfato de Cálcio (ASC), foram delineadas dentro dos limites da AT.

- 2) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON, a ANVB e a ASC também foram medidas em mm^2 e calculadas como porcentagens da AT.

Análise estatística

Os valores de AON de cada animal foram representados pela porcentagem média dos 4 cortes histológicos. A significância das diferenças entre os grupos em relação à AON foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste da soma dos postos de Wilcoxon, com correções de Bonferroni quando o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os valores de ANVB nos Grupos NVB e NVB/SC e os valores de ASC no Grupo NVB/SC, de cada animal, foram representados pela porcentagem média dos 4 cortes histológicos. O teste dos sinais de Wilcoxon foi usado para comparar os valores de ANVB entre 4 e 12 semanas no Grupo NVB e no Grupo NVB/SC ($p < 0,05$). Os valores de ASC no Grupo NVB/SC, nos períodos de 4 e 12 semanas, foram praticamente zero. Portanto, não foi realizada análise estatística para este parâmetro.

Resultados

Análise histológica qualitativa

Nenhum defeito cirúrgico regenerou completamente com tecido ósseo em nenhum dos grupos.

Grupo C (Controle): Em 4 e 12 semanas, observou-se neoformação óssea restrita às proximidades das margens originais do defeito cirúrgico. Todos os espécimes apresentaram osso neoformado circundado por matriz osteóide rica em osteoblastos. O nível de atividade osteoblástica diminuiu de 4 para 12 semanas. Em todos os espécimes, tanto em 4 como em 12 semanas pós-operatórias, a espessura do tecido conjuntivo que ocupava a parte central do defeito era menor que a do tecido ósseo original da calvária (Fig. 2). O tecido conjuntivo era bem vascularizado e rico em fibroblastos, com fibras colágenas orientadas. Em 12 semanas, o tecido conjuntivo fibroso era mais maduro do que o observado em 4 semanas. Não foram observadas células inflamatórias agudas. Os escores médios de 1,9 e 2,1 foram atribuídos ao infiltrado inflamatório crônico em 4 e em 12 semanas, respectivamente.

Grupo NVB e Grupo NVB/SC: Observou-se tecido ósseo neoformado, circundado por matriz osteóide, restrito às margens originais do defeito cirúrgico, em ambos os períodos de análise. No Grupo NVB, alguns espécimes apresentaram grande quantidade de partículas de NVB, enquanto outros apresentaram poucas partículas. Tanto no Grupo NVB, como no Grupo NVB/SC, os espécimes de 4 semanas apresentaram uma quantidade maior de partículas de NVB dentro do defeito do que os espécimes de 12 semanas. Em 12 semanas, as partículas de NVB eram menores do que em 4 semanas. A maioria dos espécimes apresentava partículas de NVB embebidas em osso neoformado nas áreas próximas às margens originais do defeito cirúrgico (Fig. 3). Na maior parte do defeito, as partículas de NVB estavam circundadas por tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas orientadas e elevado número de fibroblastos.

Em algumas áreas, principalmente nos espécimes de 4 semanas, o tecido conjuntivo circundante era frouxo e pouco organizado. A maioria das partículas de NVB apresentava fissuras, sendo que várias delas demonstravam invaginação de tecido conjuntivo em suas fissuras e centros escavados, em ambos os períodos de análise. Outras partículas apresentavam material amorfo em seus centros escavados. Na maioria dos espécimes dos Grupos NVB e NVB/SC, observou-se limitada formação óssea ou matriz osteóide rica em osteoblastos ao redor ou no interior das partículas de NVB (Figs. 4, 5 e 6). Em todos os espécimes, as partículas de NVB, juntamente com o tecido conjuntivo circunjacente, formavam uma faixa com espessura similar à do tecido ósseo original da calvária (Figs. 7 e 8), apesar de poucos espécimes do Grupo NVB terem apresentado áreas localizadas onde as partículas de NVB não estavam presentes. No Grupo NVB/SC, foram observados resíduos mínimos de SC em todos os espécimes em 4 semanas e na maioria dos espécimes em 12 semanas. Não foram observadas células inflamatórias agudas. No Grupo NVB, o infiltrado inflamatório crônico foi classificado com os escores médios de 3,4 e 2,6 em 4 e 12 semanas, respectivamente. No Grupo NVB/SC, este infiltrado foi classificado com os escores médios de 3,6 e 2,4 em 4 e 12 semanas, respectivamente.

Análises histométrica e estatística

As médias e os desvios-padrão de AON para cada grupo, bem como os resultados da comparação entre eles, em 4 e 12 semanas pós-operatórias, estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 mostra a reabsorção das partículas de NVB, de 4 para 12 semanas, nos Grupos NVB e NVB/SC.

Discussão

Este estudo avaliou a influência das partículas de NVB associadas ou não à barreira de SC na cicatrização de DTC em calvárias de rato.

O resultado de qualquer tipo de terapia regenerativa é fortemente dependente do espaço disponível sob o retalho mucoperiosteal (19). No presente estudo, observou-se um colapso do retalho no Grupo C, o que não ocorreu nos Grupos NVB e NVB/SC, provavelmente pelo uso de partículas de NVB, semelhante ao que foi observado por Furlaneto *et al.* (17) e Sculean *et al.* (20). Uma das vantagens do VB é a formação *in situ* de uma carapaça externa de cálcio e fosfato, que serve para manter o volume global da matriz partículas/osso (7). Esta é uma propriedade extremamente vantajosa para um material de aumento ósseo quando uma modificação previsível do defeito ou deficiência é desejada (7). Poucos espécimes do Grupo NVB apresentaram áreas localizadas onde as partículas de NVB estavam ausentes. Elas podem ter sido perdidas muito precocemente durante o processo de cicatrização. Entretanto, o volume e contorno globais das áreas enxertadas foram mantidos.

No presente estudo, foram observados matriz osteóide rica em osteoblastos e tecido conjuntivo fibroso circundando a maioria das partículas de NVB. Essas fibras colágenas podem indicar desenvolvimento de matriz para futura mineralização e formação óssea (21). De fato, limitada formação óssea foi observada circundando algumas partículas de NVB, confirmando suas propriedades osteocondutivas. Mineralização e formação óssea mais extensas poderiam ter sido observadas se o presente estudo tivesse incluído um período de cicatrização mais longo (22).

O efeito osteoestimulatório, descrito em outros estudos histológicos em humanos e em animais (3,6,7,8,9), também foi observado em algumas partículas na maioria dos espécimes do presente estudo, em ambos os períodos de análise. Essas partículas de NVB apresentaram

fissuras e centros escavados com matriz osteóide ou osso neoformado. A maioria das partículas de NVB, no entanto, apresentava fissuras e centros escavados com invasão de células, provavelmente células mesenquimais indiferenciadas, como observado em outros estudos realizados (7,10,23).

Foram observadas partículas de NVB nos Grupos NVB e NVB/SC em ambos os períodos analisados, demonstrando um lento processo de reabsorção, como foi observado com o Biogran[®] em estudos histológicos em humanos (3,10,23,24) e em animais (17,25,26). O Biogran[®] foi modificado para criar o Biogran II[®], em uma tentativa de acelerar suas reações *in vivo* (11). Contudo, isso não foi observado no modelo animal utilizado no presente estudo. Schepers *et al.* (27) demonstraram evidências de que a remodelação das partículas de VB é influenciada pela atividade remodeladora do osso circundante. De acordo com esses autores, as reações químicas das partículas acontecerão mais rapidamente em um local com alta atividade remodeladora do que em um local com atividade mais baixa, tal como a calvária usada no presente estudo (28). Próximo a uma superfície de implante dental, onde ocorre alta atividade remodeladora, a maioria das partículas foi reduzida em diâmetro e mostrou uma entrada aumentada ao lúmen interno. A certa distância, onde há limitada atividade remodeladora, as partículas eram maiores e menos reduzidas internamente (27).

Em 4 semanas pós-operatórias, o Grupo C apresentou formação óssea significativamente maior do que o Grupo NVB/SC. Não foram encontradas diferenças entre o Grupo NVB e o Grupo C ou entre o Grupo NVB e o Grupo NVB/SC (Tabela 1). De acordo com MacNeill *et al.* (29), materiais de enxerto que requerem longos períodos de tempo para completa reabsorção reduzem a quantidade total de osso neoformado devido a sua presença contínua. Dessa forma, a lenta reabsorção das partículas de NVB, também observada em estudos que avaliaram o Biogran[®] (16,17), provavelmente contribuiu para uma quantidade maior de osso

neoformado observado no Grupo C quando comparado ao Grupo NVB/SC. Por outro lado, Veis *et al.* (13) observaram que o volume ósseo total, bem como o desenvolvimento de novo osso no interior das partículas de Biogran II[®], foram maiores quando comparados a outros estudos nos quais o Biogran[®] foi usado. As diferenças entre os resultados do presente estudo e os de Veis *et al.* (13) podem ser explicadas, em parte, por vários fatores relacionados a características específicas dos diferentes modelos animais utilizados nos dois estudos. Além das diferenças em relação à localização dos sítios experimentais e às espécies animais usadas, a cicatrização aconteceu ao redor de implantes no estudo de Veis *et al.* (13), uma área com alta atividade remodeladora (27). Entretanto, deve-se considerar que a presença de um material de lenta reabsorção não necessariamente prejudica o resultado do tratamento. De acordo com o estudo de Norton & Wilson (3), apesar das partículas de VB terem sido lentamente substituídas por tecido ósseo, não houve impacto negativo no sucesso clínico de implantes dentais inseridos na massa de tecido/VB.

Em um estudo similar onde o Biogran[®] foi utilizado para tratar DTC em calvárias de rato, o grupo tratado com partículas de VB e barreira de SC recebeu menor quantidade de partículas do que o grupo tratado somente com as partículas de VB, devido ao espaço ocupado pela barreira (17). No presente estudo, a quantidade de partículas de NVB implantadas em cada defeito dos Grupos NVB e NVB/SC foi cuidadosamente padronizada. Contudo, o Grupo NVB/SC apresentou uma quantidade muito maior de partículas de NVB remanescentes do que o Grupo NVB, em ambos os períodos de análise, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa em 4 semanas pós-operatórias (Tabela 2). É possível que a barreira de SC tenha prevenido a perda de partículas de NVB no Grupo NVB/SC. A perda parcial de partículas de enxerto no pós-operatório é um evento adverso comum no tratamento de defeitos ósseos periodontais (30). Portanto, a presença de uma maior quantidade de um material lentamente reabsorvido no Grupo NVB/SC pode ajudar a explicar por que, embora

sem diferença estatisticamente significativa, a quantidade de osso neoformado neste grupo foi muito menor do que no Grupo NVB em 4 semanas pós-operatórias (Tabela 1).

Em 12 semanas, o Grupo C apresentou formação óssea significativamente maior do que os Grupos NVB e NVB/SC. Não foram encontradas diferenças entre os Grupos NVB e NVB/SC (Tabela 1). A diminuição nos valores percentuais da ANVB nos Grupos NVB e NVB/SC, de 4 para 12 semanas, indica uma clara tendência, embora a diferença tenha sido estatisticamente significativa somente no Grupo NVB/SC. Entretanto, remanescentes das partículas ainda estavam ocupando áreas consideráveis dos defeitos, tanto no Grupo NVB como no Grupo NVB/SC, em 12 semanas pós-operatórias (Tabela 2). Isso pode ajudar a explicar por que o Grupo C apresentou significativamente maior formação óssea do que os grupos tratados com partículas de NVB. Porém, embora tenha ocorrido maior formação óssea no Grupo C, o contorno das áreas enxertadas não foi mantido.

Um achado interessante no Grupo NVB foi a diminuição significativa na quantidade de osso neoformado observada neste grupo de 4 para 12 semanas pós-operatórias. Uma hipótese é que este fenômeno tenha ocorrido devido ao processo de remodelação óssea (31). É possível que, no período de 12 semanas pós-operatórias, a reabsorção tenha predominado no processo de remodelação.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que as partículas de NVB, associadas ou não à barreira de SC, mantiveram o volume e o contorno das áreas enxertadas em DTC. A barreira de SC pareceu prevenir a perda de partículas de NVB. A presença de partículas remanescentes de NVB pode ter contribuído para a menor quantidade de osso neoformado observada nos Grupos NVB e NVB/SC em 12 semanas pós-operatórias.

Agradecimentos

A BIOMET **3i**, Inc. (Palm Beach Gardens, FL, EUA), por ter patrocinado este estudo. Ao Prof. Dr. Jerry E. Bouquot da “The University of Texas Health Science Center Dental Branch”, Houston, TX, EUA e ao Prof. Dr. Chul W. Ann da “The University of Texas Southwestern Medical Center”, Dallas, TX, EUA, pela assessoria técnica prestada. À FUNDUNESP, pelo auxílio concedido (Processo 00933/07-DFP) à Profa. Dra. Maria J. H. Nagata para apresentar este trabalho no “93rd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology”. À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior (PDEE) (Processo 1090/06-2) à pós-graduanda Flávia A. C. Furlaneto.

Referências

1. Lang NP, Becker W, Karring T. Formação do osso alveolar. In: Lindhe J, ed. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999: 665-689.
2. Topazian RG, Hammer WB, Boucher LJ, Hulbert SF. Use of alloplastics for ridge augmentation. *J Oral Surg* 1971; **29**: 792-798.
3. Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; **17**: 249-257.
4. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 1971; **2**: 117-141.
5. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 1973; **7**: 25-42.

6. Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil* 1991; **18**: 439-452.
7. Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, Takahashi T. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; **13**: 672-676.
8. Froum S, Cho S, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol* 2002; **73**: 94-102.
9. Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil* 1997; **24**: 171-181.
10. Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Implants Res* 2001; **12**: 270-278.
11. Fang H, Neidt TM. *Development of pre-reacted Biogran[®]. Final technical report*. Palm Beach Gardens: 3i Implant Innovations Inc., 2000.
12. Radin S, Ducheyne P, Falaize S, Hammond A. *In vitro* transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells. *J Biomed Mater Res* 2000; **49**: 264-272.
13. Veis AA, Dabarakis NN, Parisi NA, Tsirlis AT, Karanikola TG, Printza DV. Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles. *Implant Dent* 2006; **15**: 386-394.
14. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; **90**: 581-586.

15. Sottosanti JS, Anson D. Using calcium sulfate as a graft enhancer and membrane barrier. *Dent Implantol Update* 2003; **14**: 1-8.
16. Melo LGN, Nagata MJH, Bosco AF, Ribeiro LLG, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Implants Res* 2005; **16**: 683-691.
17. Furlaneto FAC, Nagata MJH, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2007; **18**: 311-318.
18. Messoria MR, Nagata MJH, Mariano RC, Dornelles RCM, Bomfim SRM, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2007; **42**: 000–000. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x.
19. Wikesjö UME, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000 1999; **19**: 21-39.
20. Sculean A, Barbé G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Brex M. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol* 2002; **73**: 401-408.
21. Wheeler DL, Stokes KE, Park HM, Hollinger JO. Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius ostectomy model. *J Biomed Mater Res* 1997; **35**: 249-254.
22. Huygh A, Schepers EJG, Barbier L. Microchemical transformation of bioactive glass particles of narrow size range, a 0-24 months study. *J Mater Sci Mater Med* 2002; **13**: 315-320.
23. Tadjoeidin ES, De Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation:

histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. *Clin Oral Implants Res* 2002; **13**: 428-436.

24. Tadjoein ES, De Lange GL, Holzmann PJ, Kuiper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 2000; **11**: 334-344.

25. Cancian DCJ, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RAC, Marcantonio Júnior E. Use of BioGran and Calcitite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; **14**: 859-864.

26. Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard JR, Karring T. Deproteinized bovine bone (Bio-Oss[®]) and bioactive glass (Biogran[®]) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR): an experimental study in the rat. *J Clin Periodontol* 2003; **30**: 636-643.

27. Schepers E, Barbier L, Ducheyne P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; **13**: 655-665.

28. Prolo DJ, Pedrotti DW, Burres KP, Oklund S. Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop Relat Res* 1982; **168**: 230-242.

29. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. *In vivo* comparison of synthetic osseous graft materials: a preliminary study. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 239-245.

30. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; **8**: 227-265.

31. Adler CP. *Bone diseases*. Berlin: Springer-Verlag, 2000: 8-11, 116-121.

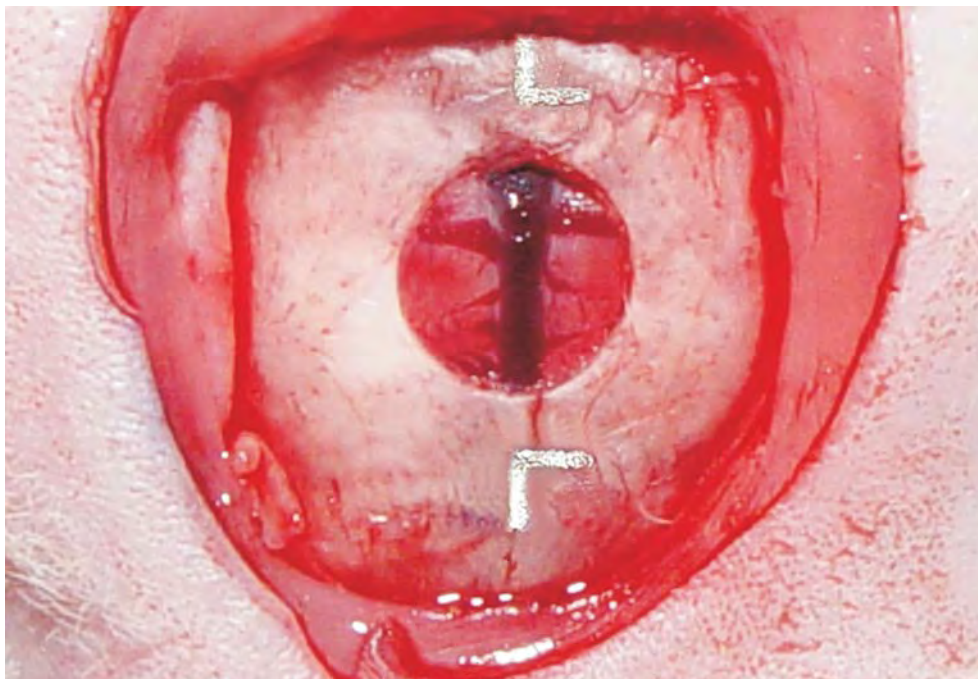


Fig. 1. Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as duas marcações de referência criados na calvária.

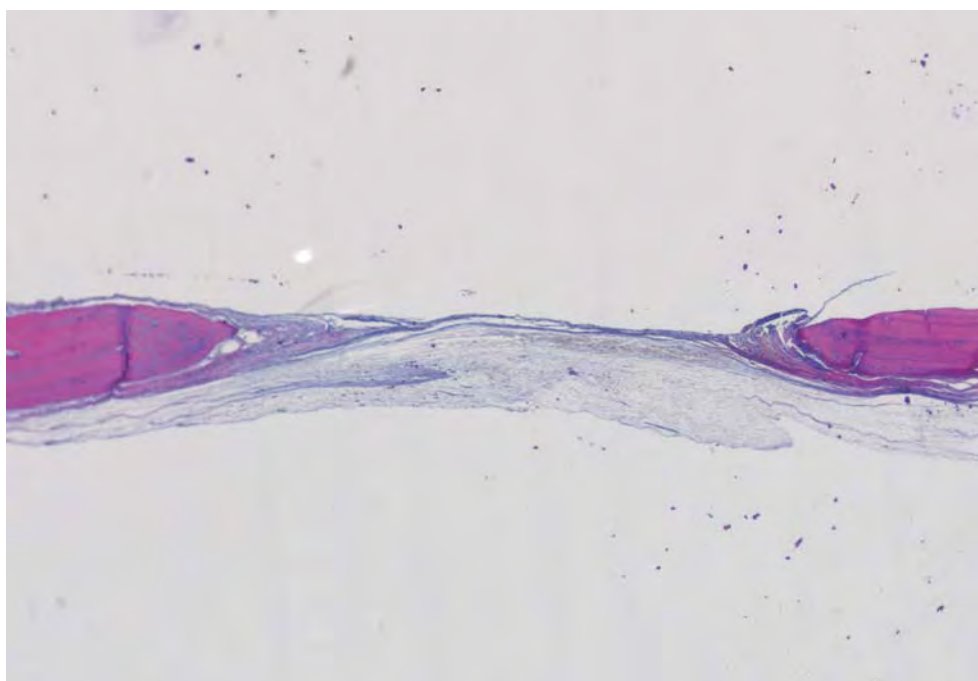


Fig. 2. Grupo C (controle). 12 semanas. Defeito cirúrgico com tecido conjuntivo fibroso de espessura inferior à da calvária original (H.E., aumento original 20x).



Fig. 3. Grupo NVB (novo vidro bioativo). 12 semanas. Partículas de NVB (setas) embebidas em osso neoformado (Tricrômico de Masson, aumento original 100x).

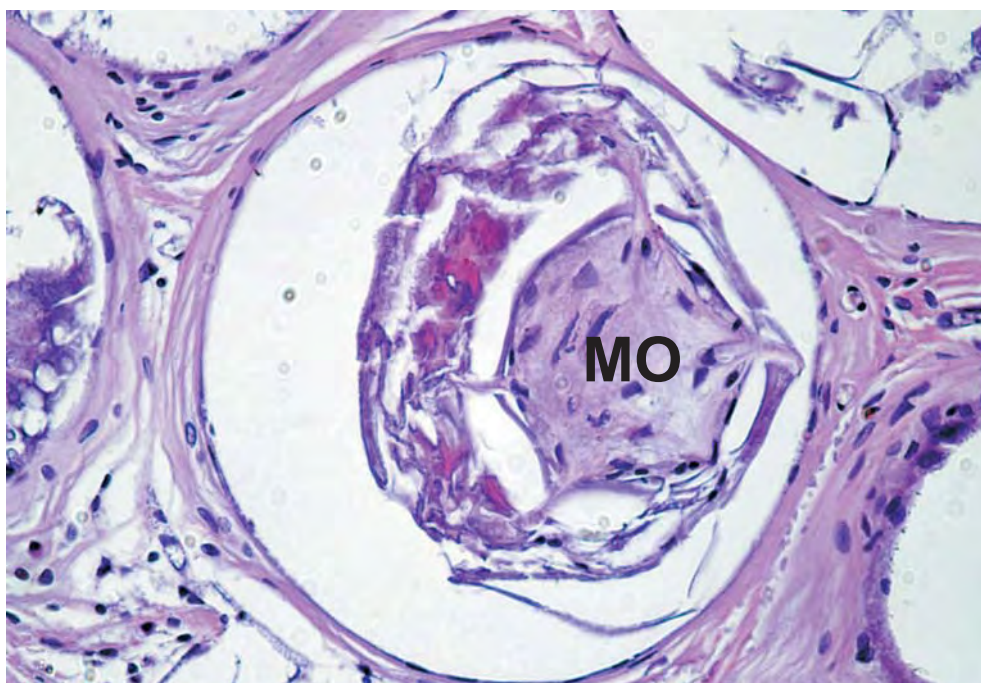


Fig. 4. Grupo NVB (novo vidro bioativo). 12 semanas. Partícula de NVB apresentando fissuras e centros escavados com matriz osteóide (MO) (H.E., aumento original 200x).

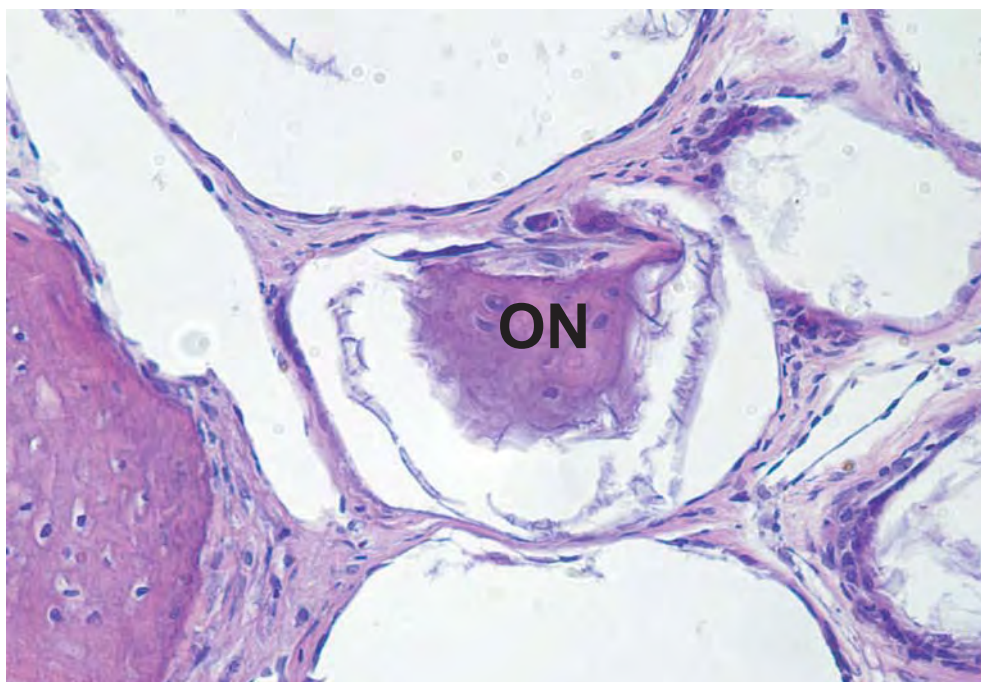


Fig. 5. Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 4 semanas. Osso neoformado (ON) no interior de uma partícula de NVB (H.E., aumento original 200x).

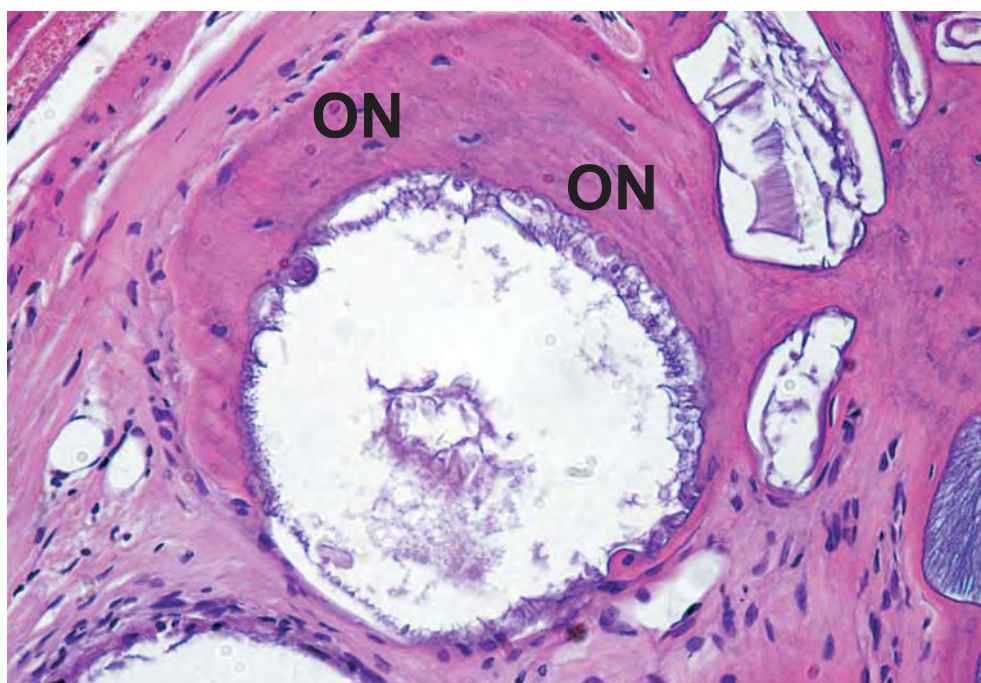


Fig. 6. Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 12 semanas. Partículas de NVB circundadas por osso neoformado (ON) (H.E., aumento original 200x).



Fig. 7. Grupo NVB (novo vidro bioativo). 4 semanas. Partículas de NVB e tecido conjuntivo circunjacente formam uma faixa com espessura similar à da calvária original (H.E., aumento original 20x)



Fig. 8. Grupo NVB/SC (novo vidro bioativo/sulfato de cálcio). 4 semanas. Partículas de NVB e tecido conjuntivo circunjacente formam uma faixa com espessura similar à da calvária original (Tricrômico de Masson, aumento original 20x).

TABELAS

Tabela 1. Porcentagem média da Área de Osso Neoformado (AON) na área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias

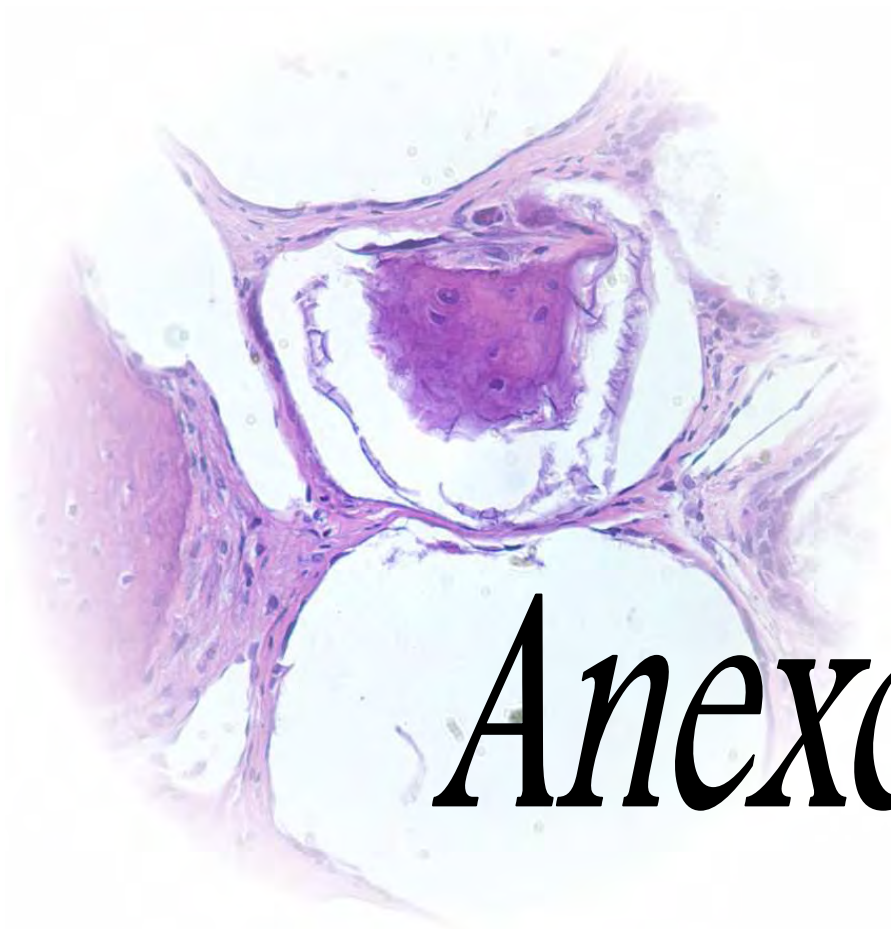
Grupo	n	Médias de AON (%) 4 semanas	Desvios-padrão 4 semanas	Médias de AON (%) 12 semanas	Desvios-padrão 12 semanas
C	10	16,95 ac	± 5,16	18,17 c	± 7,04
NVB	10	15,30 ab	± 6,41	7,75 d	± 4,83
NVB/SC	10	9,34 be	± 4,76	8,76 de	± 7,19

Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Porcentagem média da Área de Novo Vidro Bioativo (ANVB) na área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 4 e 12 semanas pós-operatórias

Grupo	n	Médias de ANVB (%) 4 semanas	Desvios-padrão 4 semanas	Médias de ANVB (%) 12 semanas	Desvios-padrão 12 semanas	p valor
NVB	10	38,65 ab	± 14,40	28,85 b	± 14,82	0,248
NVB/SC	10	53,15 a	± 9,53	46,22 c	± 12,09	0,043

Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).



Anexos

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM DEFETOS CIRÚRGICOS DE TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM PARTÍCULAS DO NOVO VIDRO BIOATIVO ASSOCIADAS OU NÃO À BARREIRA DE SULFATO DE CÁLCIO. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS" sob responsabilidade de MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA, FLÁVIA APARECIDA CHAVES FURLANETO E TATIANA MIRANDA DELIBERADOR está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEa em reunião de 19 maio de 2005, de acordo com o protocolo nº 65/05.

Araçatuba, 19 de maio de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Anexo B – Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Periodontal Research”

Journal of Periodontal Research

Edited by:

Isao Ishikawa and Jørgen Slots

Print ISSN: 0022-3484

Online ISSN: 1600-0765

Frequency: Bi-monthly

Current Volume: 42 / 2007

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2006: 6/49 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine)

Impact Factor: 2.472

Top Author Guidelines

Manuscripts should be submitted through the Journal of Periodontal Research - Manuscript Central electronic editorial office, which can be accessed through the following site URL:
<http://mc.manuscriptcentral.com/jre>

The corresponding author will need to create an account (top left hand corner) the first time he/she accesses the site. The author will be asked to provide a full postal address, email address, and telephone and fax numbers. *Journal of Periodontal Research* - Manuscript Central will then create a user name and password which should be retained for future access to the site. Once the author is logged into the system, the Main Menu will be displayed. Clicking on the Author Centre will bring up instructions for uploading the manuscript and associated files. The review process is entirely electronic-based.

Copyright - Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like **or reproduced photographically** without the **prior** written permission of the publisher.

Copyright: Copyright of all articles rests with Blackwell Publishing.

A completed Exclusive Licence Form (ELF), found at

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/copyright_JRE.pdf must be received by the Production Manager, Ms. Fiona McLeod, before any manuscript can be published. Authors must send the completed original ELF by regular mail upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the ELF at submission. Faxing or e-mailing the ELF does not meet requirements.

The ELF should be mailed to:

Blackwell Publishing

Att: Fiona McLeod

101 George Street

EH2 3ES

Edinburgh

UK

Manuscripts:

Electronic submission: Authors must submit their manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>, Author Center. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site.

Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received.

Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of GBP70 per page.

The article should be clearly divided as follows:

Title page - should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract - A separate abstract should *not exceed 250 words*. The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Introduction - Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods - Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results - Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion - Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Acknowledgements - Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

Short communication. Short communications, limited to one printed page, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a fulllength paper. Short communications need not follow the usual divisions.

References - References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in parentheses. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Examples:**(1) Standard journal article**

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; **48**: 42-49.
 Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; **125**: 2402-2405.

(2) Corporate author

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; **2**: 628-630.

(3) No author given

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; **283**: 628-635.

(4) Journal supplement

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; **92** (2 pt 2): 316- 324.
 Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; **54** (suppl 1): 26- 28.

(5) Journal paginated by issue

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; **16** (Sep): 24-29.

(6) Personal author(s)

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response* , 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) Editor, compiler, chairman as author

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing* 1972. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) Chapter in a book

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease* . Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

Illustrations - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Submit at least one original set of illustrations, identifying each with a label on the back which indicates the number, author's name, and the top. Alternatively, arrange micrographs into plates fitting the space appropriately. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

Tables - Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Scientific names. Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps* .for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, A must be attached when the term is first used.

Abbreviations and symbols The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use **no roman** numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term

for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Author material archive policy - Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Offprints - A PDF offprint will be supplied to the corresponding author. Additional offprints may be ordered on the form accompanying the proofs.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.