

Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

**Avaliação histológica, histométrica e
imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas
em calvárias de ratos preenchidas por proteínas
derivadas da matriz de esmalte**

Araçatuba – São Paulo

2017

Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis

**Avaliação histológica, histométrica e
imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas
em calvárias de ratos preenchidas por proteínas
derivadas da matriz de esmalte**

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

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior

Araçatuba – São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Reis, Erik Neiva Ribeiro de Carvalho.

R375a Avaliação histológica, histométrica e imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas em calvárias de ratos preenchidas por proteínas derivadas da matriz de esmalte / Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis. – Araçatuba, 2017.
60 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Junior

1. Materiais biocompatíveis 2. Substitutos ósseos 3. Ratos
I. T.

Black D7
CDD 617.6

DEDICATÓRIA



Dedicatória

Eu dedico esta conquista ao meu porto seguro: **a minha família.**

Ao meu pai (Aroldo de Carvalho Reis), meu amigo, meu primeiro professor e meu maior incentivador nessa caminhada. O senhor me educou não só academicamente, mas me ensinou os valores de uma vida digna e honesta. Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado a chance de ter um pai como o senhor! Sou seu fã e tenho muito orgulho de ser seu filho! Eu te amo e te amarei por toda a minha vida!

À minha mãe **(Rosiane de Neiva Ribeiro)**, por me amar de uma forma incondicional, sempre tentando proporcionar o meu melhor. Um exemplo de mãe, professora e mulher. Sem o seu apoio e amor, essa caminhada não teria sido possível ser concretizada. Muito obrigado! A saudade da senhora e do meu pai é enorme. Te amo minha mãe!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS



Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior. Por ter me aceitado como seu orientado. Seus ensinamentos teóricos e clínicos, aliados a sua serenidade e humildade, o tornam um grande cirurgião e, sobretudo, um grande líder! Deu-me um grande exemplo de como liderar uma equipe de trabalho. Muito obrigado por tudo!

A minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Paula fernazi Bassi, pela confiança, carinho, disponibilidade em ensinar e ajudar nos projetos desenvolvidos nesse período da pós-graduação. Sou muito grato à senhora! Um grande exemplo de professora!

Ao Professor Francisley Ávila Souza, pelos ensinamentos, sempre de bom humor, pela sua disponibilidade em ajudar não só a mim, como a todos os alunos da pós-graduação. Pela amizade e bons papos ao longo do decorrer do mestrado. Muito obrigado!

A Professora Dra. Daniela Ponzoni, por estar sempre incentivando e ajudando nas diversas pesquisas desenvolvidas em nosso departamento. Admiro muito a senhora pela sua competência e serenidade. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. Oswaldo Magro Filho, pelos ensinamentos principalmente na área de cirurgia ortognática. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. Leonardo Perez Faverani, pela amizade e por ter me incentivado a ingressar nesta pós-graduação. Você abriu as portas desta casa para mim e hoje tenho muito orgulho de fazer parte dela. Sou muito grato pelos seus

ensinamentos e por sua disponibilidade em ajudar sempre quando precisei. Muito obrigado! E conte sempre comigo.

À Professora Dra. Roberta Okamoto, por sua disponibilidade em ensinar e ajudar, principalmente nas análises laboratoriais. Sua ajuda é de extrema importância para o nosso departamento. Muito obrigado!

A minha noiva Bruna de Oliveira, Araçatuba me deu um presente e foi você! Obrigado por ser a minha parceira de todas as horas, pela paciência que a rotina da pós-graduação requer, por me incentivar e apoiar em todas as situações. Te amo!

Ao Leonardo de Freitas, um amigo que a pós-graduação me permitiu conhecer. Um grande parceiro de trabalho e um grande cirurgião! Torço pelo seu sucesso sempre! Você tem um futuro brilhante pela sua força de vontade e humildade! Muito obrigado por tudo!

Ao João Paulo Bonardi, pela amizade e parceria em diversos trabalhos. Conte sempre comigo!

Ao Ciro Duailibe pela amizade e companheirismo desde os tempos de residência em Bauru! Conte sempre comigo!

Aos amigos Valthierre Nunes, Gustavo Momesso e André Fabris pela amizade e por boas conversas sobre cirurgia e a vida!

Ao Pedro Henrique, pelos anos de amizade, desde a residência em Bauru, tornou-se um grande amigo ao longo desses anos. Obrigado por ter me incentivado a vir fazer parte deste programa de pós-graduação. Conte sempre comigo!

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de mestrado durante alguns meses do curso.

AGRADECIMENTOS



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de fazer parte do programa de pós-graduação desta instituição. Tenho muito orgulho de ser unespiano e ter a oportunidade de poder aprender e usufruir da estrutura física e dos docentes desta casa. Minha eterna gratidão e admiração!

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Prof. André Briso**, pela competência e maestria na condução da nossa pós-graduação.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, Valéria, Critiane e Lilian pela paciência no esclarecimento e resolução dos problemas burocráticos no decorrer destes dois anos de mestrado. Muito obrigado!

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade, paciência e compreensão nas etapas do mestrado. Pelo trabalho árduo e sempre ágil.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Paulo Gratão, Marcos e Renato). Muito obrigado pela disponibilidade e respeito.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Igor Puttini, Sabrina, Tarik, Juliana Zorzi, Willian Ricardo, Mônica, Helder, Rodrigo, Sormani, Jonhatan, Oliva, Fábio, Gabriel, Cristian). Aprendi muito

com cada um de vocês. Obrigado pelos momentos descontraídos e alegres na vida diária da pós-graduação.

Aos pacientes, pela confiança depositada a nós pós-graduandos, premitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas. Minha gratidão.



Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da Vinci)

Carvalho-Reis, E.N.R. Avaliação histológica, histométrica e imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas em calvárias de ratos preenchidas por proteínas derivadas da matriz de esmalte. [Dissertação] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de odontologia; 2017.

Resumo

As Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte (PDME) são uma mistura heterogênea de proteínas derivadas da amelogenina produzidas durante o desenvolvimento do dente que tem a capacidade de modular vias de diferenciação de células no ligamento periodontal em adulto, e seu efeito age sobre o gene de expressão osteogênico promovendo uma adesão celular. O objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo de defeitos padronizados em calvária de ratos albinos Wistar tratados com EMDOGAIN® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil), BONE CERAMIC® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil) e a combinação dos dois, em grupos experimentais de 30 e 60 dias, através de análises histométrica e imunoistoquímica. Para o período de 60 dias, foi observada tendência para maior neoformação óssea, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos EMD + BC vs Bio-Oss ($p= 0,036$) e autógeno vs Bio-Oss ($p= 0,001$) testes estatísticos ANOVA e Tukey. Dessa forma, apesar das limitações deste estudo pré-clínico em animais, foi possível observar boa propriedade biológica na associação do EMDOGAIN® com o BONE CERAMIC®. No entanto, mais estudos laboratoriais devem ser realizados para avaliar propriedades osteoindutoras destes materiais, bem como o comportamento destes biomateriais em humanos, através de estudos clínicos.

Palavras chaves: Materiais Biocompatíveis; Substitutos Ósseos; Ratos.

Carvalho-Reis, E.N.R. Histological, histometric and immunohistochemical evaluation of bone cavity repair in calvaries of rats filled with proteins derived from the enamel matrix. [Dissertation]. Araçatuba: São Paulo State University, School of Dentistry; 2017.

Abstract

Enamel Matrix Derived Proteins (PDME) are a heterogeneous mixture of amelogenin-derived proteins produced during tooth development that has the ability to modulate cell differentiation pathways in the adult periodontal ligament, and their effect on the gene of Osteogenic expression promoting cell adhesion. The objective of the present study was to evaluate the bone repair process of standardized calvarial defects of Wistar albino rats treated with EMDOGAIN® (STRAUMANN®, São Paulo, Brazil), BONE CERAMIC® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brazil) and the combination of the two, in experimental groups of 30 and 60 days, through histometric and immunohistochemical analyzes. For the 60-day period, there was a trend towards greater bone neoformation, with a statistically significant difference between the groups EMD + BC vs Bio-Oss ($p = 0.036$) and Autogene vs Bio-Oss ($p = 0.001$) ANOVA and Tukey. Thus, despite the limitations of this preclinical study in animals, it was possible to observe good biological properties in the association of EMDOGAIN® with BONE CERAMIC®. However, further laboratory studies should be performed to evaluate osteoinductive properties of these materials, as well as the behavior of these biomaterials in humans, through clinical studies.

Keywords: Biocompatible materials; Bone substitutes; Rats.

LISTAS E SUMÁRIO



Lista de Figuras

Figura 1. Lâminas histológicas imagem panorâmica grupo 30 dias. 46

Figura 2. Lâminas histológicas imagem panorâmica grupo 60 dias. 48

Figura 3. Lâminas imunoistoquímica grupos 30 e 60 dias. 50



Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantidade de marcação relacionada ao escore.	43
Tabela 2. Teste de Tukey comparando diferentes grupos de biomaterias no período de 30 dias.	43
Tabela 3. Teste de Turkey comparando diferentes grupos de biomaterias no período de 60 dias.	43
Tabela 4. Porcentagem da área de osso neoformado segundo os grupos e os tempos de eutanásia.	44
Tabela 5. Teste de dois fatores ANOVA comparando biomateriais, biomaterias versus períodos e períodos das análises.	45
Tabela 6. Escores das imunomarcações para Osteocalcina para os períodos de 30 e 60 dias.	45

Lista de Abreviaturas

Fosfato de cálcio bifásico homogêneo - FCBH

Hidroxiapatita - HA

Fosfato Tricálcico - TCP

Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte - PDME

Emdogain - EMD

BoneCeramic - BC

Osteocalcina - OC



Lista de Gráficos

Gráfico 1. Porcentagem de osso neoformado aos 30 dias e 60 dias.

42



Sumário

Avaliação histológica, histométrica e imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas em calvárias de ratos preenchidas por proteínas derivadas da matriz de esmalte

1. Introdução	22
2. Materiais e métodos	24
3. Resultados	27
4. Discussão	30
5. Referências	34
6. Anexo	52



Avaliação histológica, histométrica e imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas em calvárias de ratos preenchidas por proteínas derivadas da matriz de esmalte

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery*

1. Introdução

O tecido ósseo quando lesionado apresenta um alto potencial de reparação devido a suas características biológicas. No entanto, em algumas situações em que são provocados defeitos extensos e o tecido ósseo não consegue reparação, são necessárias técnicas cirúrgicas reconstrutivas, além da utilização de enxertos para restabelecimento da forma e função do osso. Estão descritos na literatura diversos materiais utilizados para reconstruções ósseas, esses materiais são classificados como autógenos, alógenos, xenógenos e os sintéticos, que podem ser utilizados de maneira isolada ou em associação entre eles¹.

Tradicionalmente o enxerto autógeno é o mais utilizado por apresentar biocompatibilidade, uma boa propriedade osteogênica e ostecondutora. Porém possuem algumas desvantagens na sua utilização como a necessidade de um sítio cirúrgico adicional provocando maior morbidade pós-operatória por parte do paciente, e uma pouca quantidade óssea disponível,^{2,3,4} além do seu alto potencial de reabsorção^{3,4}. Para suprir essas limitações muitos materiais vem sendo estudados dentre eles o osso bovino inorgânico (Bio-Oss, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) é considerado “padrão ouro” entre os enxertos xenógenos⁵, apresentando resultados similares ao osso autógeno^{6,7,8}.

Os defeitos resultantes das alterações mucogengivais e das sequelas periodontais são atualmente objeto de intensa pesquisa para utilização em cirurgia periodontal e buco-maxilo-facial⁹⁻¹². Desta forma, com intuito de suprir as limitações consequentes ao uso de enxerto autógeno e/ou de bancos de osso, os materiais

sintéticos como, por exemplo, o fosfato de cálcio bifásico homogêneo (Straumann Bone Ceramic), que é composto de 60% de hidroxiapatita (HA) e 40% de fosfato tricálcico (TCP), vem sendo utilizado com perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, seja no reforço de uma estrutura ou preenchimento de um defeito¹³⁻¹⁵.

Outro material sintético que vem sendo utilizado e pode se destacar entre estes materiais são as Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte (PDME)¹⁴. As PDME são uma mistura heterogênea de proteínas derivadas da amelogenina produzidas durante o desenvolvimento do dente e tem a capacidade de modular vias de diferenciação de células no ligamento periodontal em adulto, e seu efeito age sobre o gene de expressão osteogênica e promovem uma adesão celular¹⁴. A utilização em conjunto do Emdogain demonstram que esta combinação pode estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas incluindo a proteína morfogenética óssea 2, e o fator de crescimento beta 1, além de aumentar os níveis de marcadores dos osteoblastos(colágeno, fosfatase alcalina e a osteocalcina)¹⁵.

Deste modo, os dados clínicos e biológicos disponíveis parecem apoiar a combinação de PMDE e enxertos ósseos para o tratamento regenerativo de defeitos ósseos. É também antecipado que esta combinação pode mesmo produzir efeitos sinérgicos em que o material para enxerto pode atuar como um osteocondutor mantendo ao mesmo tempo o espaço do defeito, enquanto PMDE pode induzir a formação de cimento radicular, ligamento periodontal, e osso^{15,16}.

Este estudo tem como principal objetivo avaliar o processo de reparo ósseo de defeitos criados cirurgicamente em calvária de ratos preenchidos com EMDOGAIN® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil), BONE CERAMIC® (STRAUMANN®, São

Paulo, São Paulo, Brasil) e a combinação dos dois, por meio das análises histométrica e imunoistoquímica.

2. Materiais e métodos

Foram utilizados quarenta e oito ratos machos selecionados com um peso entre 250 e 300 g, da espécie *Rattus norvegicus*, da ordem Rodentia, linhagem Wistar. Os animais foram divididos em 04 grupos: grupo 1 Emdogain® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil), grupo 2 Boneceramic® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil) associado com Emdogain® (STRAUMANN®, São Paulo, São Paulo, Brasil), e membrana de colágeno Collacote em ambos os grupos. No grupo 3 foram utilizados o osso bovino inorgânico e membrana Collacote (Bio-Oss, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) e grupo 4, osso autógeno e membrana Collate. Os grupos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: dois grupos controles cada um com n = 06 e dois experimentais (n = 06), para cada tempo de 30 e 60 dias de eutanásia.

Procedimento cirúrgico

As cirurgias foram realizadas nas dependências da Faculdade de Odontologia UNESP de Araçatuba-SP. Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia por sedação foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 60 mg/Kg, e de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 8 mg/Kg. Foi realizada em complementação anestésica a infiltração local de solução de

Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na região da calota dos animais.

A seguir, foi realizada a tricotomia da calvária dos ratos e, em seguida, a antissepsia da região, com solução de gluconato de clorexidina a 2%. Na sequência, foi confeccionada a incisão na região sagital do crânio com bisturi montado com lâmina nº15, descolamento do periósteo com posterior confecção dos defeitos ósseos (críticos) no osso parietal direito, com trefina de 7 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil), sob irrigação constante com soro fisiológico. O defeito ósseo do grupo foi preenchido com os biomateriais. O retalho total foi reposicionado e suturado com fio Nylon 4-0 (Ethicon, Johnson&Johnson, São Paulo, Brasil).

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e Dipirona Sódica 1mg/kg intramuscular até o terceiro dia pós-operatório (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

A eutanásia dos animais foi realizada com Tiopental sódico 150mg/Kg + Lidocaína 10mg/ml, via intraperitoneal em dose letal aos 30 e 60 dias. As remoções das calvárias foram realizadas com uma incisão cutânea retangular e obtidas com uma serra oscilante de necropsia, quando foram imediatamente submersas, em solução de formol a 10% tamponada, utilizando recipientes apropriados por no máximo sete dias e a seguir preparadas para inclusão em parafina.

Análise Histométrica

Previamente a realização das análises histométricas e imunoistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente um indivíduo conhecia quais grupos pertenciam. Um único examinador calibrado realizou as análises desconhecendo o respectivo grupo da secção.

As imagens das lâminas foram obtidas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmara de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador com software analisador de imagens digitalizadas, Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG.

A avaliação histométrica foi realizada utilizando o software ImageJ 150e (National Institutes of Health, Maryland, USA), sempre com aumento original de 63x. O defeito ósseo foi determinado através da medição entre as margens das osteotomias e foi expresso como porcentagem total do defeito. A área de neoformação óssea foi calculada e expressa como uma porcentagem dentro da área total do defeito criado na calvária¹⁷. (Os valores obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de múltiplas comparações ANOVA 2 fatores e o teste Tukey post-hoc ($p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativa).

Análise Imunoistoquímica

Para esta análise foram utilizadas lâminas separadas durante o processamento de inclusão em parafina. O anticorpo primário utilizado foi contra Osteocalcina– OC

(OC, Goat anti-oc SC18319 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA) e como contra-coloração a hematoxilina de Harris. Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) bem como a expressão da proteína OC acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça).

Foi utilizada a análise qualitativa ordinal, através da atribuição de escores caracterizando a área de imunomarcação positiva para a proteína analisada. Os escores foram utilizados para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos (Pedrosa et al., 2009; Manrique et al., 2015). Os escores considerados foram leve, moderado e intenso, de acordo com a área marcada (Tabela 1).

3. Resultados

Análise Histológica

No grupo autógeno aos 30 dias foi observado que toda a extensão do defeito no aspecto horizontal apresentou neoformação de osso até o centro do defeito. À medida que a formação de osso se aproximou do fechamento na área central do defeito crítico, esta apresentou-se menor no sentido vertical em comparação com as margens do defeito. Aos 60 dias, independente do sentido da formação de tecido ósseo, o fechamento do defeito ocorreu em todos os sentidos (Figura 1 e Figura 2).

Na avaliação do grupo Bio-Oss 30 dias observou-se que as partículas do biomaterial preencheram grande parte do defeito ósseo (extensão horizontal e vertical), estando entremeadas por tecido conjuntivo e pequena quantidade de tecido ósseo neoformado. Aos 60 dias, notou-se grande quantidade das partículas do biomaterial preenchendo o defeito, entremeadas por tecido conjuntivo e alguns focos de neoformação de tecido ósseo no centro do defeito. Em toda a extensão do defeito, o preenchimento pelo biomaterial compreendeu todo o limite vertical (Figura 1 e Figura 2).

Para o grupo EMD 30 dias, as fotomicrografias mostraram neoformação de tecido ósseo em focos isolados no centro do defeito crítico, com uma fina camada de tecido conjuntivo bem organizado, sem a presença de infiltrado inflamatório. Já no grupo de 60 dias a osteogênese ficou mais concentrada nas margens do defeito ósseo, em função da atividade osteoblástica do osso remanescente. O defeito ósseo apresentou-se preenchido com tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão horizontal e vertical do defeito (Figura 1 e Figura 2).

A área entre os cotos osteotomizados do grupo Emd + BC 30 dias apresentou neste período grande quantidade de partículas do biomaterial remanescente preenchendo o defeito, entremeadas por tecido conjuntivo fibroso organizado, sem infiltrado inflamatório. A partir das margens do defeito e em alguns focos centrais, notou-se formação de tecido ósseo próximo às partículas do biomaterial. Na avaliação do grupo de 60 dias notou-se neoformação óssea proveniente das margens dos defeitos e em função da osteocondução dos substitutos ósseos aproximou-se da área central do defeito. Ainda restavam algumas áreas correspondentes às partículas de biomaterial, entremeadas por tecido ósseo neoformado e preenchimento em toda a extensão vertical do defeito por tecido conjuntivo fibroso organizado (Figura 1 e Figura 2).

Análise Histométrica

A figura 3 mostra a neoformação óssea de cada grupo estudado de acordo com o tempo pós-operatório. Para o período de 30 dias, todos os grupos apresentaram áreas de neoformação óssea, sendo observada maior área no grupo autógeno, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos ($p > 0,05$). Para o período de 60 dias, foi observada tendência para maior neoformação óssea em comparação ao período de 30 dias, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos EMD + BC vs Bio-Oss ($p = 0,036$) e autógeno vs Bio-Oss ($p = 0,001$). A porcentagem de neoformação óssea se mostrou estatisticamente significativa maior no grupo autógeno com relação aos demais ($p < 0,05$) (Tabela 2 e 3).

Análise imunoistoquímica

Foi possível observar imunomarcção moderada (2) do biomarcador osteocalcina para os grupos EMD, EMD+BC e Autógeno em 30 dias de reparo ósseo, enquanto que o grupo Bio-Oss no mesmo período experimental apresentou imunomarcção variando de leve à moderada (1/2). Já aos 60 dias de reparo ósseo foi possível notar aumento da imunomarcção de OC (3) para os grupos EMD e EMD+BC, compreendendo a região de matriz óssea extracelular, caracterizando o período de aposição óssea mineral. A imunomarcção de OC para o grupo autógeno variou de moderada e intensa (2/3), enquanto que o grupo bio-oss apresentou imunomarcção moderada de OC aos 60 dias de reparo ósseo (Tabela 6 e Figura 3).

4. Discussão

A calota craniana dos ratos é considerada similar à mandíbula humana, ambos se desenvolvem através da formação óssea intramembranosa e pode-se observar limitado potencial regenerativo¹⁹. O defeito crítico é definido como o menor tamanho de lesão intra-óssea em um osso em particular e em espécies de animal que não irá curar espontaneamente, durante o período de vida do animal²⁰. Neste presente estudo, foi realizado um defeito de 7 mm, estando de acordo com a literatura²⁰⁻²². Os grupos Autógeno e Bio-Oss foram utilizados por serem considerados “padrão-ouro” entre os biomateriais e enxertos xenógenos respectivamente^{23,24}.

De acordo com o trabalho de Donos et al.²⁵ em defeitos críticos de 5 mm em calotas de ratos, com o uso de EMD mais membrana de colágeno, notou-se osteogênese em todo o defeito ósseo. No centro do defeito, o novo osso apresentou-

se de forma cônica. Por outro lado, o presente trabalho evidenciou que não houve formação óssea em todo o defeito crítico em nenhum dos grupos (30 e 60 dias). No grupo de 30 dias houve áreas isoladas de neoformação de tecido ósseo no centro do defeito. No grupo de 60 dias ocorreu osteogênese mais concentrada nas margens do defeito ósseo, em função da atividade osteoblástica do osso remanescente. O trabalho de Donos et al. difere do presente trabalho em relação ao tempo de eutanásia dos animais, que foi de 120 dias. Além disso, poucos estudos *in vivo* avaliaram e elucidaram a capacidade do EMD para induzir a regeneração óssea nos defeitos ósseos críticos^{26,27}.

Em um trabalho realizado por Khoshzaban et al. com defeitos críticos de 6 mm em calotas de ratos preenchidos com Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), foi observado 25,26% de neoformação óssea no período de quatro semanas. Dois outros autores Park et al. e Mokbel et al., encontraram em suas pesquisas taxas de osso neoformado de $6,4\% \pm 4,3$ e 23,3% respectivamente, para defeitos de 8 mm em calvárias de ratos preenchidos por Bio-Oss, nos tempos de 6 e 8 semanas. Apesar da porcentagem de osso neoformado no Grupo Bio-Oss de 60 dias ser inferior ao de 30 dias, os resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para períodos experimentais de 4 e 8 semanas e não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de 30 e 60 dias. Além disso, a marcação da osteocalcina na análise imunoistoquímica sugere maior grau de mineralização do tecido ósseo neoformado no período de 60 dias em comparação ao de 30 dias no Grupo Bio-Oss.

Conforme o estudo de Potijanyakul et al. no qual foram realizados defeitos críticos de 5mm e usado EMD mais vidro bioativo Biogran (Orthovita, Implant Innovations, Palm Beach Gardens, Fla) ao final do período de 60 dias, observou-se uma

maior porcentagem de osso neoformado em relação ao grupo preenchido exclusivamente com EMD. O presente trabalho vai ao encontro dos resultados de Potijanyakul et al., no qual constatou-se uma maior neoformação óssea após 60 dias no grupo EMD + BC, em relação ao grupo EMD, no período de 60 dias. Após o período de 60 dias, pode-se perceber uma porcentagem de 43,24 % para o grupo EMD + BC de osso neoformado, enquanto o grupo somente com EMD, apresentou uma porcentagem de 39,19 %. A associação do EMD + BC, foi o grupo que mais se aproximou dos valores de neoformação óssea do grupo controle com osso autógeno.

A maior quantidade de osso neoformado no grupo EMD + BC, no presente estudo, em relação ao grupo EMD sozinho, corrobora com outros estudos em que o EMD associado a materiais de enxerto ósseo pode melhorar a neoformação óssea³²⁻³⁵. Outro estudo demonstrou que, embora o uso de EMD com uma membrana tenha obtido um resultado com aumento na formação óssea vertical, porém estatisticamente não significante, a adição do EMD aos materiais de enxerto ósseo não apresentou nenhum benefício adicional³¹. Em outros dois estudos clínicos, em humanos, os autores chegaram à conclusão que a associação EMD a enxertos ósseos, obtiveram melhores resultados para o tratamento de defeitos ósseos periodontais^{36,37}.

O osso é um tecido dinâmico que sofre remodelação, mesmo se o crescimento e a modelagem do esqueleto já tenham sido concluídos. O *turnover* dos ossos pode ser avaliado pela medição da quantidade de enzimas ou de matrizes proteicas produzidas por osteoblastos ou osteoclastos. Um marcador de formação óssea, a osteocalcina, é

uma proteína dependente de vitamina D e k, sendo a proteína não-colágena mais abundante e amplamente estudada do osso³⁸. No presente trabalho no grupo de 30 dias, houve uma marcação moderada de osteocalcina nos grupos EMD+BC, EMD e Autógeno. No grupo Bio-Oss houve uma marcação de leve a moderada. No grupo de 60 dias ocorreu uma marcação para osteocalcina intensa nos grupos EMD+BC, EMD e Autógeno. No grupo Bio-oss 60 dias ocorreu uma marcação de moderado a intenso. A osteocalcina é considerada um marcador para o fenótipo osteoblástico porque é expressa em células da linhagem osteoblástica in vivo e in vitro. Portanto, pode servir como um Índice de atividade osteoblástica durante a aposição óssea³⁹.

Alguns estudos in vitro demonstraram que o EMD estimula a proliferação e diferenciação de células ósseas⁴⁰⁻⁴³, afetando a formação óssea. Outra pesquisa relatou que a presença do EMD pode inibir o desenvolvimento mioblástico de células mesenquimais pluripotenciais cultivadas e aumentar a atividade da fosfatase alcalina⁴⁴. No estudo de Goda et al., constatou-se que a BMP-2 e o TGF- β no EMD podem ativar osteoblastos e aumentar a produção de collagenase (ex: metaloproteinase-1), que degrada as proteínas da matriz do tecido ósseo, resultando na facilitação da regeneração óssea.

Tendo em vista o grande desafio de ganhos ósseos verticais e horizontais, bem como em relação às propriedades biológicas dos enxertos xenógenos nas reconstruções maxilofaciais, o estudo de novos biomateriais e a associação destes, torna-se fundamental para a otimização do tratamento reabilitador em pacientes com deficiências ósseas, visando qualidade de osso neoformado e diminuição da morbidade cirúrgica. Dessa forma, apesar das limitações deste estudo pré-clínico em

animais, foi possível observar boa propriedade biológica na associação do Emdogain® com o Bone Cramic®. No entanto, mais estudos laboratoriais devem ser realizados para avaliar propriedades osteoindutoras destes materiais através da expressão de biomarcadores de células pré-osteoblásticas como o RUNX-2, bem como o comportamento destes biomateriais em humanos, através de estudos clínicos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor (REIS ENRC).

5. Referências

- 1- Matarasso M, Iorio-Siciliano V, Blasi A, Ramaglia L, Salvi GE, Sculean A. Enamel matrix derivative and bone grafts for periodontal regeneration of intrabony defects. A systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. 2015 Sep;19(7):1581-93.
- 2- Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. Clin Oral Implants Res 2001; 12: 495–502.
- 3- Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. Clin Oral Implants Res 2006;17:136–59.
- 4- McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. J Periodontol 2007;78: 881–7.

- 5- Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. J Maxillofac Oral Surg. Dec 2014;13(4):464-70.
 - 6- Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. Jan 2012;41(1):114-20.
 - 7- McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, Buck D, Hollinger JO, Lynch SE. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. Int J Oral Maxillofac Implants. May-1999 Jun;14(3):361-8.
 - 8- Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. Int J Oral Maxillofac Implants. 2003 Jan-Feb;18(1):53-8.
 - 9- Becker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F. Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. Clin Oral Implants Res. 2009 Jul;20(7):742-9.
 - 10- Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membranecompared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitutematerial. Clin Oral Implants Res. 2002 Dec;13(6):587-94.
-

- 11- Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Apr;16(2):210-9.
 - 12- Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997 Nov-Dec;12(6):844-52. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998 Jul-Aug;13(4):576.
 - 13- Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21: 696–710.
 - 14- Alkan EA, Parlar A, Yildirim B, Sengüven B. Histological comparison of healing following tooth extraction with ridge preservation using enamel matrix derivatives versus Bio-Oss Collagen: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Dec;42(12):1522-8.
 - 15- De Leonardis D, Paolantonio M. Enamel matrix derivative, alone or associated with a synthetic bone substitute, in the treatment of 1- to 2-wall periodontal defects. *J Periodontol.* 2013 Apr;84(4):444-55.
 - 16- Miron RJ, Wei L, Bosshardt DD, Buser D, Sculean A, Zhang Y. Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):471-8.
 - 17- Luvizuto ER, Queiroz TP, Margonar R, Panzarini SR, Hochuli-Vieira E, Okamoto
-

- T, Okamoto R. Osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate matrix, polylactic and polyglycolic acid gel, and calcium phosphate cement in bone defects. *J Craniofac Surg*. 2012 Sep;23(5):e430-3.
- 18- Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Nov;20(11):1254-64.
- 19- Yun JI, Wikesjö UM, Borke JL, Bisch FC, Lewis JE, Herold RW, Swiec GD, Wood JC, McPherson JC 3rd. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol*. 2010 May;37(5):419-26.
- 20- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Apr;(205):299-308.
- 21- Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)*. 1990;138(3):185-92.
- 22- Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Aug;25(8):879-93.
- 23- Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*. 1987 Apr;18(2):187-96.
- 24- Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone
-

Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. J Maxillofac Oral Surg. 2014 Dec;13(4):464-70.

25- Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrixproteins on the healing of critical-size defects. Clin Oral Implants Res. 2004 Feb;15(1):101-11.

26- Kawana F, Sawae Y, Sahara T, Tanaka S, Debari K, Shimizu M, Sasaki T. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. Anat Rec. 2001 Dec 1;264(4):438-46.

27- Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. J Periodontal Res. 2003 Jun;38(3):333-42.

28- Khoshzaban A, Mehrzad S, Tavakoli V, Keshel SH, Behrouzi GR, Bashtar M. The comparative effectiveness of demineralized bone matrix, beta-tricalcium phosphate, and bovine-derived anorganic bone matrix on inflammation and bone formation using a paired calvarial defect model in rats. Clin Cosmet Investig Dent. 2011 Sep 29;3:69-78.

29- Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. Oral Maxillofac Surg. 2008 Jul;12(2):73-8.

- 30- Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Apr;20(4):372-8.
- 31- Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, Leepong N, Kintarak S. Effects of enamel matrix derivative on bioactive glass in rat calvarium defects. *J Oral Implantol.* 2010;36(3):195-204.
- 32- Schneider D, Weber FE, Hämmerle CH, Feloutzis A, Jung RE. Bone regeneration using a synthetic matrix containing enamel matrix derivate. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Feb;22(2):214-22.
- 33- Trombelli L, Farina R. Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):117-35.
- 34- Tu YK, Woolston A, Faggion CM Jr. Do bone grafts or barrier membranes provide additional treatment effects for infrabony lesions treated with enamel matrix derivatives? A network meta-analysis of randomized-controlled trials. *J Clin Periodontol.* 2010 Jan;37(1):59-79.
- 35- Döri F, Arweiler N, Gera I, Sculean A. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with either a natural bone mineral or beta-tricalcium phosphate. *J Periodontol.* 2005 Dec;76(12):2236-43.
- 36- Zucchelli G, Amore C, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a comparative controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1725-35.
-

- 37- Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Gera I. Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Int J PeriodonticsRestorative Dent*. 2005 Apr;25(2):139-47.
 - 38- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem*. 2000 Jul;37 (Pt 4):432-46.
 - 39- Meyer U, Meyer T, Vosshans J, Joos U. Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg*. 1999 Aug;27(4):222-7.
 - 40- Galli C, Macaluso GM, Guizzardi S, Vescovini R, Passeri M, Passeri G. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand modulation by enamel matrix derivative in human alveolar osteoblasts. *J Periodontol*. 2006 Jul;77(7):1223-8
 - 41- Johnson DL, Carnes D, Steffensen B, Cochran DL. Cellular effects of enamel matrix derivative are associated with different molecular weight fractions following separation by size-exclusion chromatography. *J Periodontol*. 2009 Apr;80(4):648-56.
 - 42- Schwartz Z, Carnes DL Jr, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and
-

increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. J Periodontol. 2000 Aug;71(8):1287-96.

43- Johnson DL, Carnes D, Steffensen B, Cochran DL. Cellular effects of enamel matrix derivative are associated with different molecular weight fractions following separation by size-exclusion chromatography. J Periodontol. 2009 Apr;80(4):648-56.

44- S. Goda, H. Inoue, Y. Kaneshita et al., "Emdogain stimulates matrix degradation by osteoblasts," Journal of Dental Research, vol. 87, no. 8, pp. 782–787, 2008.



GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentagem de osso neoformado em 30 e 60 dias

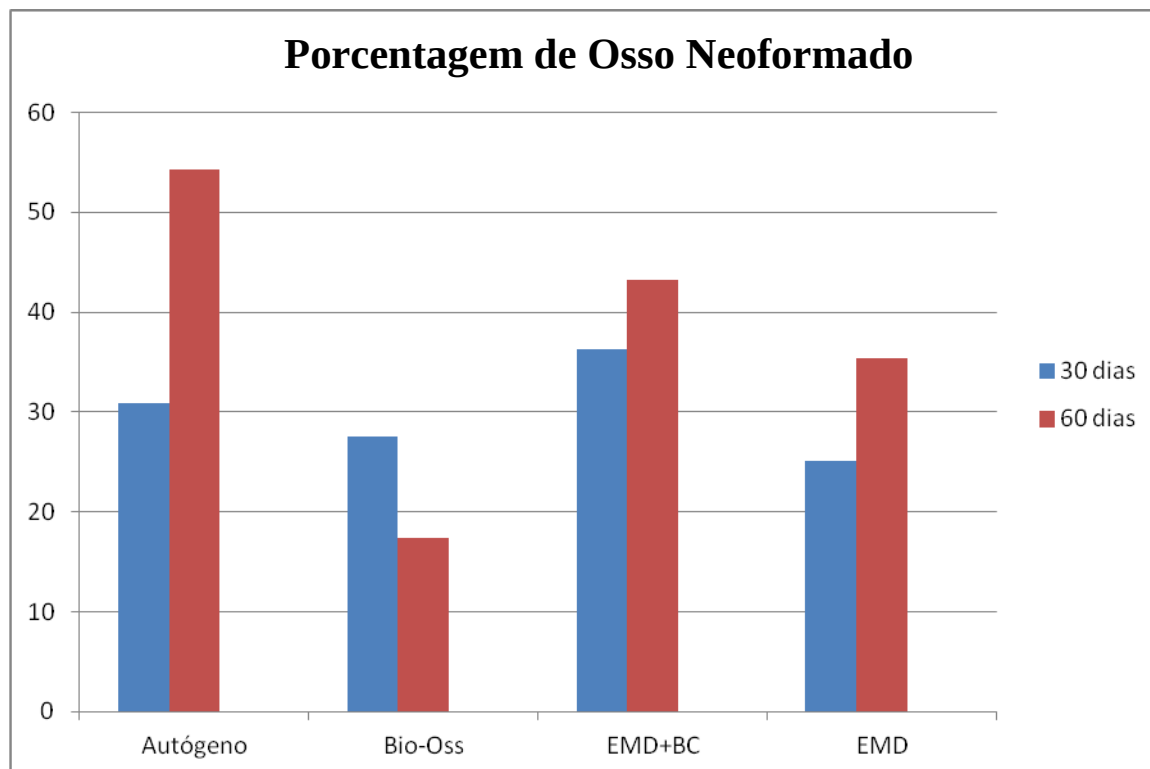


Gráfico representativo dos valores médios dos grupos experimentais (Emdogain + Boneceramic, Emdogain, autógeno e Bio-oss) para o parâmetro área de osso neoformado, aos 30 e 60 dias pós-operatório.

TABELAS

Tabela 1: Quantidade de marcação relacionada ao escore.

Quantidade de marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de marcação	0	0%
Marcação positiva	1	20% (entre 10 à 30%)
Marcação superpositiva	2	60% (entre 50 à 70%)
Marcação hiperpositiva	3	90% (entre 80 à 100%)

Tabela 2: Teste de Tukey comparando diferentes grupos de biomateriais no período de 30 dias.

Comparações por fator:	
Biomateriais	P valor*
Emd + BC vs. Emd	0,518
Emd + BC vs. Bio	0,891
Emd + BC vs. Aut	0,992
Aut vs. Emd	0,692
Aut vs. Bio	0,973
Bio vs. Emd	0,906

*p< 0,05 foi considerado diferença estatisticamente significante

Tabela 3: Teste de Tukey comparando diferentes grupos de biomateriais no período de 60 dias.

Comparações por fator:	
Biomateriais	P valor*
Emd + BC vs. Emd	0,958
Emd + BC vs. Bio	0,036
Emd + BC vs. Aut	0,327
Aut vs. Emd	0,141
Aut vs. Bio	<0,001
Bio vs. Emd	0,101

*p< 0,05 foi considerado diferença estatisticamente significante

Tabela 4: Porcentagem da área de osso neoformado segundo os grupos e os tempos de eutanásia.

Grupo	Tempo (dias)	Área de osso neoformado (%)
Emd+BC	30	36,31
Autógeno	30	34,00
Bio-Oss	30	30,56
Emd	30	25,12
Emd+BC	60	43,24
Autógeno	60	57,25
Bio-Oss	60	19,73
Emd	60	39,19

Tabela 5: Teste de dois fatores ANOVA comparando Biomateriais, Biomateriais versus Períodos e Períodos das análises.

Fonte de variação	P valor*
Biomateriais (Emd+Bc, Bio-Oss, Autógeno e Emd)	0.008
Períodos de análises 30 x 60 dias	0.049
Biomateriais x Períodos	0.041

*p< 0,05 foi considerado diferença estatisticamente significante

Tabela 6: Escores das imunomarcações para Osteocalcina para os períodos de 30 e 60 dias (escore 1- leve; 2- moderado; 3- intenso).

Escore	Emdo	Emdo+BC	Autógeno	Bio-oss
30 dias	2	2	2	1/2
60 dias	3	3	2/3	2

Figuras

Figura 1

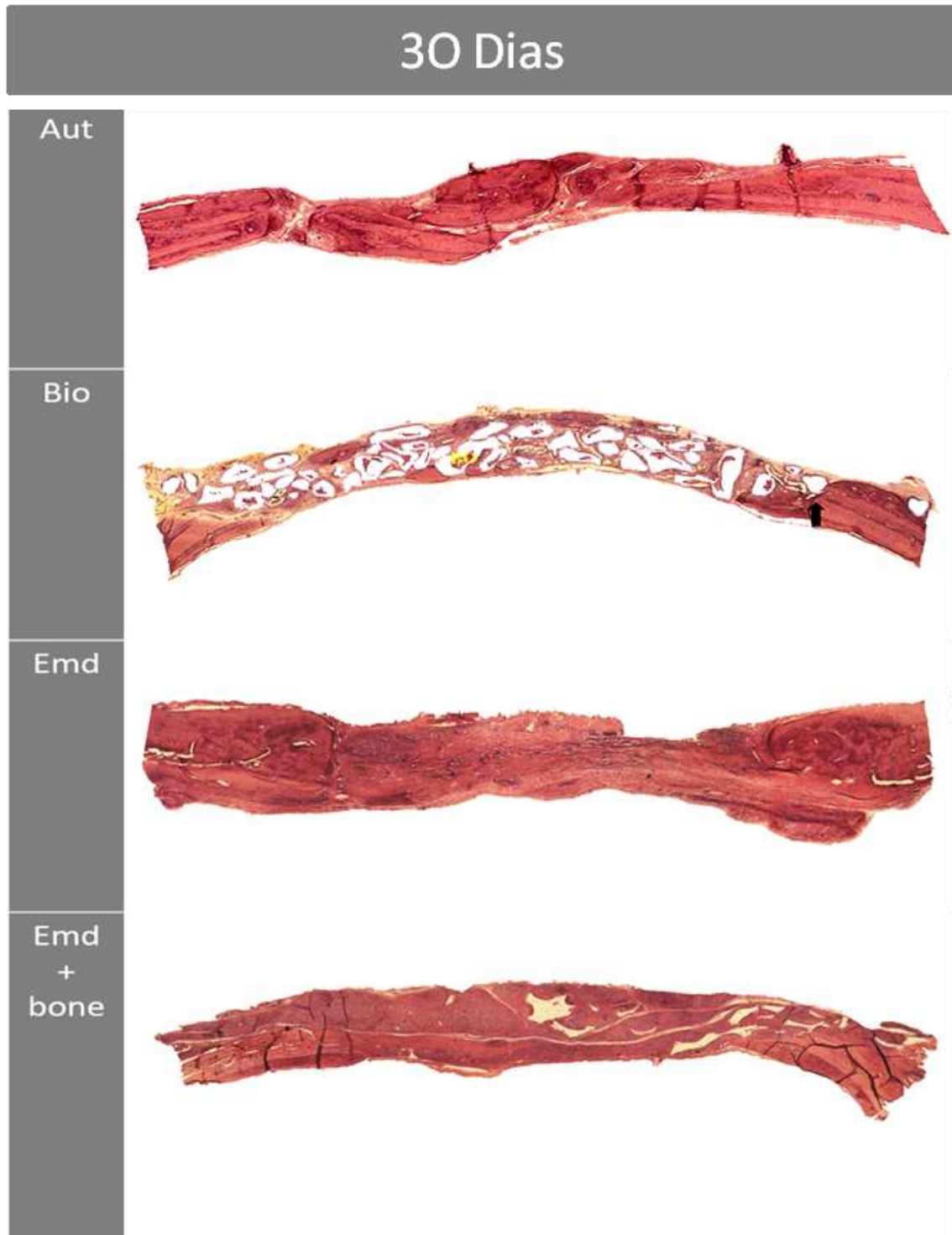


Figura 1. Grupo autógeno aos 30 dias foi observado que toda a extensão do defeito no aspecto horizontal apresentou neoformação de osso até o centro do defeito. Grupo Bio-Oss 30 dias observou-se que as partículas do biomaterial preencheram grande parte do defeito ósseo (extensão horizontal e vertical), estando entremeadas por tecido conjutnivo e pequena quantidade de tecido ósseo neoformado. Grupo EMD 30 dias, nota-se neoformação de tecido ósseo em focos isolados no centro do defeito crítico, com uma fina camada de tecido conjuntivo bem organizado, sem a presença de infiltrado inflamatório. Grupo Emd + BC 30 dias apresentou neste período grande quantidade de partículas do biomaterial remanescente preenchendo o defeito, entremeadas por tecido conjuntivo fibroso organizado, sem infiltrado inflamatório. A partir das margens do defeito e em alguns focos centrais, notou-se formação de tecido ósseo próximo às partículas do biomaterial.

Figura 2.

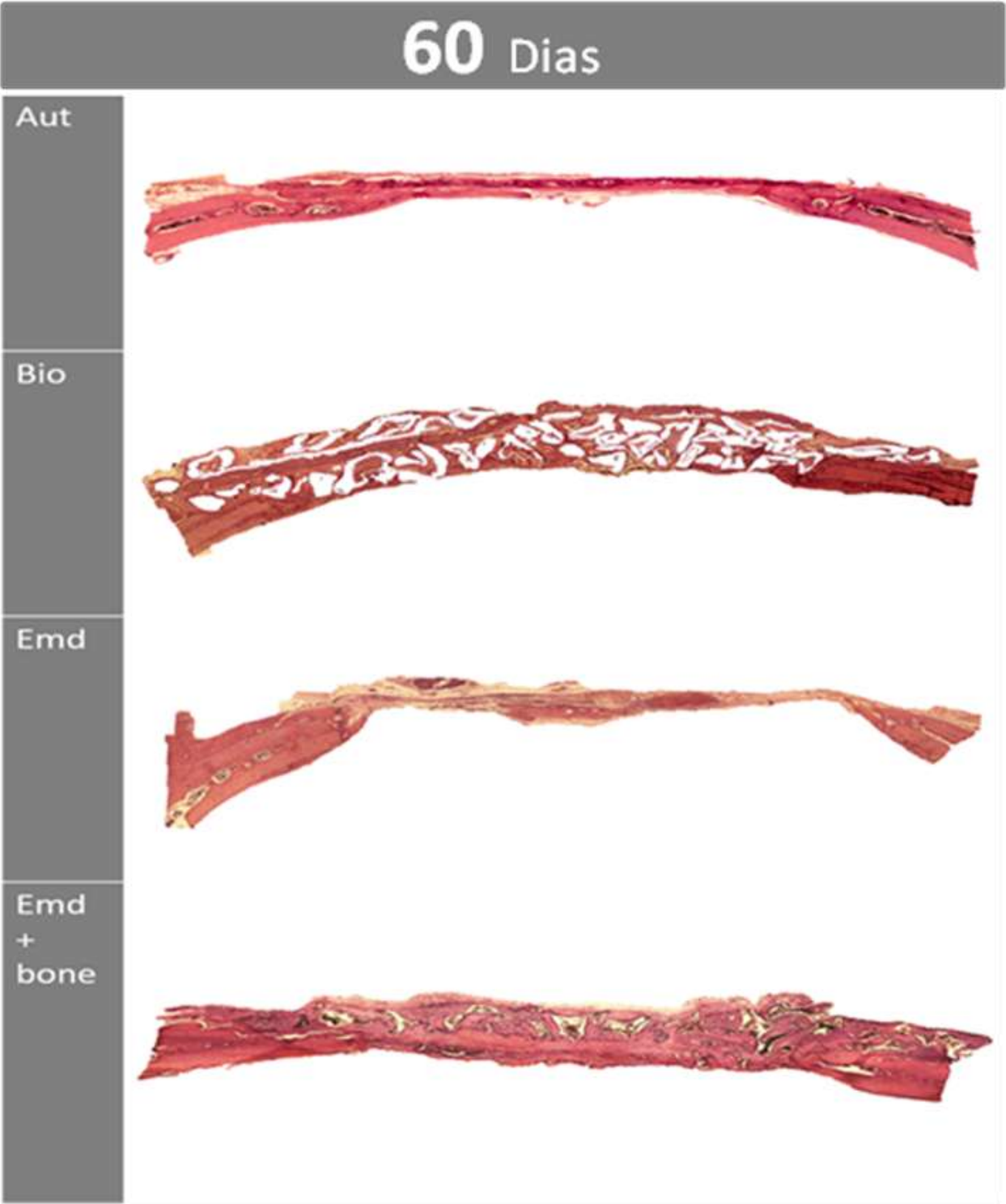


Figura 2. Grupo autógeno 60 dias, Independente do sentido da formação de tecido ósseo, o fechamento do defeito ocorreu em todos os sentidos (horizontal e verticalmente). Grupo Bio-Oss 60 dias notou-se grande quantidade das partículas do biomaterial preenchendo o defeito, entremeadas por tecido conjuntivo e alguns focos de neoformação de tecido ósseo no centro do defeito. Grupo EMD de 60 dias a osteogênese ficou mais concentrada nas margens do defeito ósseo, em função da atividade osteoblástica do osso remanescente. O defeito ósseo apresentou-se preenchido com tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão horizontal e vertical do defeito. Grupo EMD + BC de 60 dias notou-se neoformação óssea proveniente das margens dos defeitos e em função da osteocondução dos substitutos ósseos aproximou-se da área central do defeito. Ainda restavam algumas áreas correspondentes às partículas de biomaterial, entremeadas por tecido ósseo neoformado e preenchimento em toda a extensão vertical do defeito por tecido conjuntivo fibroso organizado.

Figura 3.

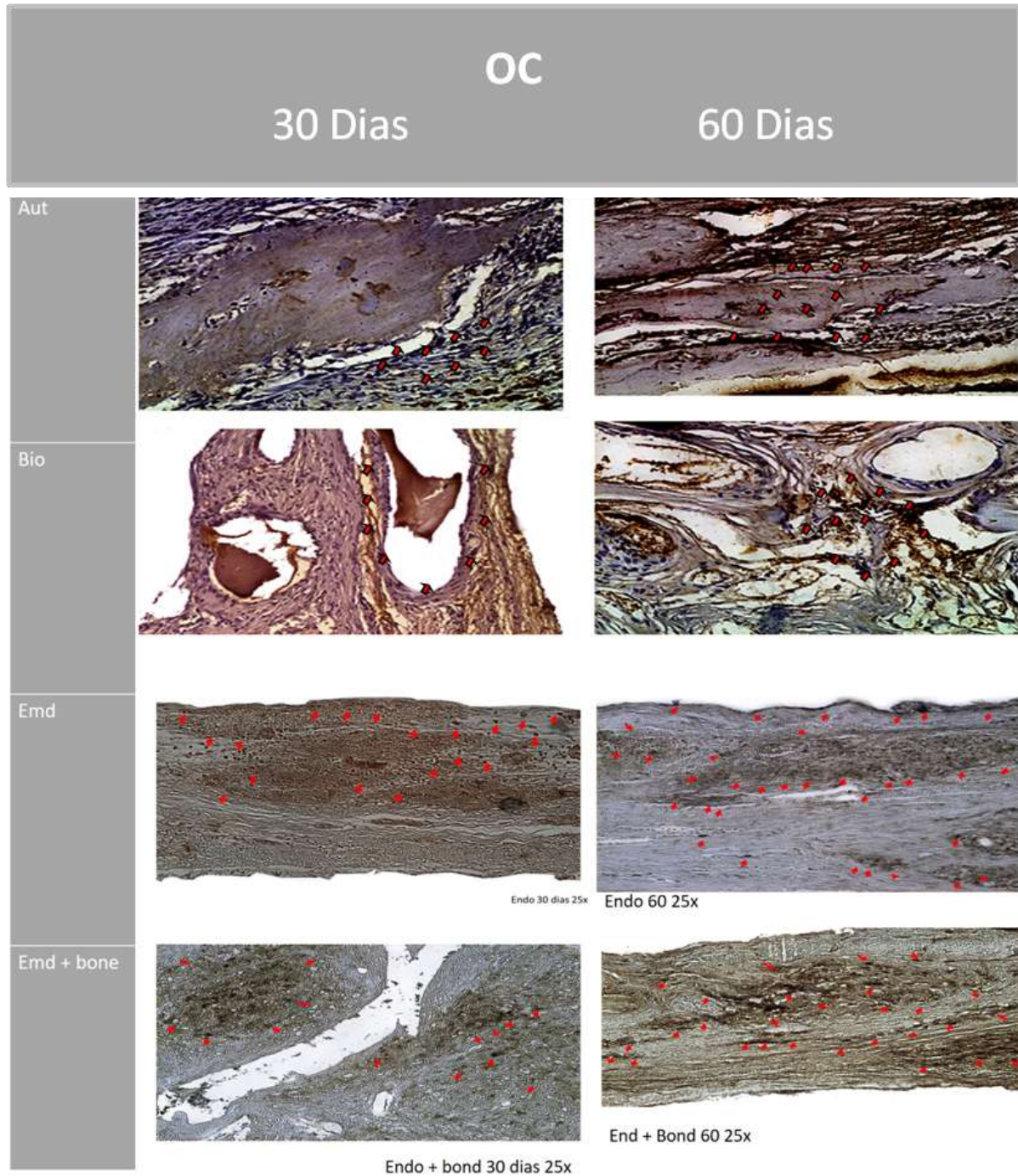


Figura 3. Foi possível observar imunomarcção moderada (2) do biomarcador osteocalcina para os grupos EMD, EMD+BC e Autógeno em 30 dias de reparo ósseo, enquanto que o grupo Bio-oss no mesmo período experimental apresentou imunomarcção variando de leve à moderada (1/2). Já aos 60 dias de reparo ósseo foi possível notar aumento da imunomarcção de OC (3) para os grupos EMD e EMD+BC, compreendendo a região de matriz óssea extracelular, caracterizando o período de aposição óssea mineral. A imunomarcção de OC para o grupo autógeno variou de moderada e intensa (2/3), enquanto que o grupo bio-oss apresentou imunomarcção moderada de OC aos 60 dias de reparo ósseo (Imunomarcção para osteocalcina, setas Vermelhas).

ANEXO

Anexo - Normas para publicação do periódico International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information:

- title of the article

- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants

-
- key words. If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- ; Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references
 - Should be written in the past tense
 - Include exact technical specifications, quantities and generic names
 - Limit the number of subheadings, and use the same in the results section
 - Mention statistical method
 - Do not include results in this section
-

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results
- Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK). The minus sign should be -. If a special designation for teeth is used, a note should

explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov.uk) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be

included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style:

Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a

caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. **The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.**

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements

are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemregs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author. **Elsevier supports responsible sharing** Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Accepted Articles For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact

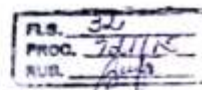
details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the EditorThe IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed: 1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed. 2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article. 3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report. 4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas. 5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority. 6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version. 7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting. 8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.

Anexo – Comitê de ética em pesquisa em animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação histológica, histométrica e imunoistoquímica do reparo de cavidades ósseas em calvárias de ratos preenchidas por proteínas derivadas da matriz de esmalte", Processo FOA nº 00921-2015, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Junho de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Julho de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Histological, histometric and immunochemistry assessment of the bone cavity repair in calvaria of rats filled by derived proteins from enamel matrix", Protocol FOA nº 00921-2015, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 02, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 02, 2016.

Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

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