



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

Campus de Araçatuba

MARIA ROSA FELIX DE SOUSA GOMIDE GUIMARÃES

TESE DE DOUTORADO

Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com β – fosfato tricálcio (RTR[®] – Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos.

Araçatuba - SP

2016

MARIA ROSA FELIX DE SOUSA GOMIDE GUIMARÃES

Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com β – fosfato tricálcio (RTR[®] – Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof Adj. Eloi Dezan Jr.

Araçatuba - SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G963r

Guimarães, Maria Rosa Felix de Sousa Gomide.

Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com β – fosfato tricálcio (RTR® – Septodont) : estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos. - Araçatuba, 2016
62 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Eloi Dezan Júnior

1. RTR® (Septodont) 2. Substitutos ósseos 2. Regeneração
3. óssea I. T.

Black D24
CDD 617.67

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, **Gustav**, meu esposo e **Ana Vitória**, minha filha, pela paciência que tiveram, pelo carinho e compreensão e por me apoiarem e acreditarem na realização deste sonho.*

*Dedico também aos meus pais **Henner** e **Elfrida**, que sempre confiaram e acreditaram na minha capacidade e foram grandes incentivadores neste caminho da docência.*

Obrigado pelo carinho, pela dedicação e pelo amor de vocês.

AGRADECIMIENTOS

*Agradeço a DEUS por ser o meu guia,
por estar presente no meu coração, por
trilhar os meus caminhos, por me dar forças
para conquistar todos os meus sonhos.*

*Agradeço a DEUS pela minha saúde,
pela minha vida e pela minha família, que
são os bens mais preciosos que tenho.*

*Agradeço a DEUS por mais esta
conquista na minha vida.*

AGRADECIMENTO à FAMÍLIA

Agradeço ao Gustav, meu esposo por ser meu porto seguro, pelo amor incondicional, pela confiança, pelo carinho, compreensão e pela paciência que sempre teve comigo.

Agradeço a Ana Vitória, minha filha, pela força e determinação, por ser o orgulho da mamãe, pela doçura, pela paciência, pelo carinho e por sempre estar pronta a me ajudar.

Agradeço ao meu pai Henner, pelos ensinamentos, pelo exemplo de disciplina na pesquisa, pelo amor dedicado e por sempre guiar meus passos no sentido correto.

Agradeço a minha mãe Elfrida, pela ternura, por ser o equilíbrio da família, pelas palavras carinhosas de apoio e pelo amor dedicado na minha formação pessoal e profissional.

Agradeço aos meus dois irmãos, Pedro Alberto e Antônio Augusto, que mesmo distantes, pelo apoio, amizade e confiança e sempre estarão no meu coração.

Aos meus avós, Geralda, Fábio e Mariquinha, que mesmo não estando mais aqui, sempre estiveram em meus pensamentos, e sei que estão orgulhosos de mim.

Agradeço aos meus sogros, Cláudio e Marisa, pelo apoio e presença com a Ana Vitória durante as viagens à Araçatuba.

Agradeço ao meu cunhado Antônio Lessa, pelo grande carinho, amizade e pelas inesquecíveis viagens familiares.

E a todos os meus familiares que direta ou indiretamente participaram da minha formação pessoal e profissional

AGRADECIMENTO AOS PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS DA FOA

Ao Prof. Eloi, que sem ele este sonho não seria possível. Agradeço pelos anos de amizade, por todos os ensinamentos, pelo exemplo, pela dedicação e por acreditar e confiar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Luciano, pela oportunidade de termos trabalhado juntos, por receber todas as suas orientações, pela seriedade, dedicação e competência que conduziu o programa de pós – graduação – DINTER,

Ao Prof. Valdir, por ter sido um grande exemplo na minha vida profissional e ter me incentivado a seguir a carreira de docente.

Aos professores Pedrinho, João, Otoboni e Mauro, que mesmo não estando próximos no doutorado, pela grande amizade e por participaram da minha formação profissional e pessoal no 1º Curso de Especialização em Endodontia de Porto Velho – RO.

Aos professores Juliano, Alberto, Débora, Denise, Célio, Robson e Mirela, por participarem, se deslocarem para Porto Velho, acreditando no programa DINTER e contribuindo muito para a minha formação.

À Nelci, pelo incondicional apoio nas etapas laboratoriais, não medindo esforços para ajudar e realizar a parte experimental do trabalho.

Aos alunos da pós – graduação Francine, Mariane, Diego, Carlos, Ana Maria e Vanessa, por todo o apoio e ajuda durante a realização dos trabalhos experimentais.

AGRADEÇO A MEUS AMIGOS

Aos queridos amigos Júnior e Lucinei, pela harmonia, pela paz, pela paciência, pela torcida e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Aos amigos Lorenza e Thiago, pelos momentos de descontração, pelos jantares maravilhosos e pela grande amizade.

A colega de trabalho Simone, pelas palavras doces, incentivadoras e de força.

A Helena, meu braço direito, pela grande dedicação, paciência, carinho que sempre teve comigo.

Aos nossos colaboradores da clínica, Cleide, Gilmara, Regiane e Daiane, pela grande paciência, pela organização e pela realização de todas atividades.

Aos colaboradores do Centro Universitário São Lucas, por sempre estarem prontos a me atenderem.

Aos amigos de pós-graduação de Porto Velho, do programa DINTER, Isabel, Rui, Paulo, Ranier, Jaime, Kátia, Luna, Dino, Ana Gisele e Gustav pela amizade, companheirismo e colaboração. Ficarei com saudades.

Aos colegas professores do Centro Universitário São Lucas, pelo apoio e por compreender os momentos de ausência em virtude das atividades do doutorado.

AGRADECIMENTO AS INSTITUIÇÕES

À Direção da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do seu diretor professor Dr. Wilson Roberto Poi.

À Direção do Centro Universitário São Lucas, UNISL, de Porto Velho, Rondônia, na pessoa da Magnífica reitora prof^a Maria Eliza

À Vice-diretora do Centro Universitário São Lucas, UNISL, Eloá Gazola, pelo apoio, incentivo e grande amizade.

À coordenação do programa de pós-graduação em Ciência Odontológica – DINTER - da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

À coordenação do Curso de Odontologia do Centro Universitário São Lucas, na pessoa Prof^a Iracema, e à coordenação do Centro Odontológico, na pessoa Prof^a Flávia, pelo grande apoio nesta fase do doutorado.

A todos os docentes do programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos técnicos do laboratório de endodontia, Nelci e Cláudia, pelo conhecimento, paciência, dedicação e por todo auxílio prestado em nossos experimentos.

Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com β – fosfato tricálcio (RTR[®] – Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos.

Resumo

Objetivos: Analisar histologicamente e histometricamente o efeito do RTR[®] em defeitos ósseos cirúrgicos críticos em tíbias de ratos no processo de reparo ósseo.

Materiais e Métodos: Defeitos ósseos críticos foram criados nas tíbias de 32 ratos Wistar divididos em dois grupos: Grupo Coágulo e Grupo RTR[®]. Após o período experimental de 30 e 90 dias, os animais foram sacrificados e as peças incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. Dois parâmetros foram analisados: a área óssea total neoformada (AON) e a área óssea da cortical neoformada (ACN). A análise estatística foi realizada nos dois períodos de observação pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey.

Resultados: Todos os grupos demonstraram reparo ósseo superior quando comparados ao Grupo Coágulo 30 dias nos dois parâmetros analisados. O Grupo RTR[®], em 30 e 90 dias, apresentou reparo da cortical óssea e formações de tecido ósseo na região central do defeito maior do que no Grupo Coágulo de 90 dias, que apresentou reparo parcial da cortical óssea e poucas formações de tecido ósseo na região do defeito ($p < 0,05$).

Conclusões: O RTR[®] favoreceu a neoformação óssea no modelo experimental adotado podendo ser indicado em casos de cavidades ósseas de tamanho crítico.

Palavras Chave: RTR[®] (Septodont), substituto ósseo, regeneração óssea.

Bone repair filled critical surgical defects or not with β - tricalcium phosphate (RTR[®] - Septodont): Histological and Histometric study in the rat tibia.

Abstract

Objectives: To analyze histologically and histometrically the effect of RTR[®] on critical surgical bone defects in rat tibiae in the bone repair process.

Materials and Methods: Critical bone defects were created in the tibia of 32 Wistar rats divided into two groups: Clot Group and RTR[®] Group. After the experimental period of 30 and 90 days, the animals were sacrificed and the paraffin embedded pieces were cut and stained with hematoxylin and eosin. Two parameters were analyzed: total neoformed bone area (AON) and bone area of neoformed cortical (ACN). Statistical analysis was performed in the two observation periods by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Results: All groups demonstrated superior bone repair when compared to the Clot Group 30 days in the two analyzed parameters. The RTR[®] Group, in 30 and 90 days, presented repair of the cortical bone and bone tissue formations in the central region of the defect greater than in the 90-day Clot Group, which presented partial repair of the cortical bone and few bone tissue formations in the region of the defect ($p < 0.05$).

Conclusions: The RTR[®] favored the bone neoformation in the adopted experimental model and can be indicated in cases of bone of critical size.

Keywords: RTR[®] (Septodont), bone substitute, bone regeneration.

SUMÁRIO

| | Páginas |
|------------------------|-----------|
| I INTRODUÇÃO | 14 |
| II ARTIGO | 18 |
| III REFERÊNCIAS | 43 |
| IV ANEXOS | 48 |

I INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos causados após as extrações dentárias ou aqueles resultantes de algum tipo de trauma, impõem dificuldades nas reabilitações cirúrgicas pela falta de um remanescente saudável devido à reabsorção fisiológica do osso. (Zerbo et al. 2004; Wu et al. 2006; Sava-Rosianu, et al. 2013). O enxerto autógeno ainda é considerado o melhor material para garantir o reparo ósseo destas regiões, pois apresenta plena compatibilidade com a área receptora, apresentando propriedades de osteogênese, osteocondutoras e osteoindutoras satisfatórias. (Mazzoneto et al. 2012; Damlar et al. 2015). No entanto, o volume ósseo necessário nem sempre é suficiente além de causar morbidade da área doadora. (Podaropoulos et al. 2009; Hirota et al. 2009; Mazzoneto et al. 2012). Por esta razão, os substitutos ósseos, ou biomateriais, definidos como materiais de origem natural ou sintética, com capacidade de substituir tecidos e órgãos em humanos, vêm sendo amplamente pesquisados, eliminando a necessidade de áreas doadoras. (György Szabó et al. 2001; Hirota et al. 2009; Porrini et al. 2011)

Os materiais para enxerto utilizados após as extrações dentárias devem permanecer no local tempo suficiente permitindo a regeneração do tecido ósseo e fornecendo suporte para o crescimento ósseo e são avaliados com base em três características fundamentais: a osteogênese, a osteocondutividade e a osteoindutividade. A osteogênese é a capacidade que o enxerto tem de transferir células viáveis (osteoblastos e células osteoprogenitoras) que iniciarão o processo de reparo ósseo. A osteocondutividade é uma propriedade do material de servir como arcabouço para que as células do hospedeiro possam se proliferar. A osteoindutividade é uma propriedade dos materiais de enxerto de induzirem a

diferenciação de células mesenquimais pluripotentes a se diferenciarem em osteoblastos, estimulando assim a neoformação óssea. (Mazzoneto et al. 2012). Um enxerto considerado ideal deve apresentar as três propriedades, no entanto, apenas o enxerto autógeno atende estas características. Atualmente, os biomateriais estudados apresentam boa osteocondutividade, mas não apresentam propriedades osteogênicas ou de osteoindutividade. (Mazzoneto et al. 2012). Os substitutos ósseos são divididos de acordo com a fonte e a resposta imune em quatro categorias: autógenos (obtido do próprio paciente), homogêneos (enxerto humano disponível em banco de ossos), heterogêneos (enxerto proveniente de espécies diferentes – matriz óssea bovina) e aloplásticos (produzidos e sintetizados em laboratório). O β - fosfato tricálcico (β -TCP) é um exemplo de um material cerâmico aloplástico que demonstrou boa biocompatibilidade e vários estudos demonstraram a sua capacidade de estimular a formação óssea por osteocondução no reparo dos defeitos ósseos. (Damlar et al. 2015; Kunert-Keil et al. 2015; Mayr et al. 2015; Martinez et al. 2015; Kato et al. 2014; Leventis et al. 2014; Schmidlin et al. 2013; Hirota et al. 2009; Cunha et al. 2007; Jensen et al. 2006).

Diante dos trabalhos e estudos analisados, verificamos que o osso autógeno ainda é a melhor opção no que se refere ao reparo ósseo nos procedimentos de enxerto, mas apresenta limitações como áreas doadoras disponíveis e quantidade suficiente de material necessário. (Podaropoulos et al. 2009). Assim, vários protocolos de tratamentos e novos materiais que podem substituir tecidos orais danificados decorrentes de extrações dentárias, lesões traumáticas, doença periodontal, defeitos congênitos ou perda de substância devido à neoplasia foram

desenvolvidos, com o objetivo de evitar à diminuição do volume do tecido ósseo alveolar, limitando as reabilitações. O RTR[®] (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França) é um substituto ósseo que contém grânulos de β -TCP com resultados clínicos e radiográficos satisfatórios para a neoformação óssea (Bozidar et al. 2008; Pinipe et al. 2014) porém pouco pesquisado quanto a sua ação no processo de regeneração óssea em modelos experimentais. Por este fato, o estudo teve como objetivo analisar a utilização do RTR[®] em defeitos ósseos cirúrgicos críticos e verificar a integridade e qualidade do tecido ósseo neoformado.

II ARTIGO

Reparo ósseo de defeitos cirúrgicos críticos preenchidos ou não com β – fosfato tricálcio (RTR[®] – Septodont): estudo histológico e histométrico em tíbias de ratos.

Palavras Chave: RTR[®] (Septodont), substituto ósseo, regeneração óssea.

Resumo

Objetivos: Analisar histologicamente e histometricamente o efeito do RTR[®] em defeitos ósseos cirúrgicos críticos em tíbias de ratos no processo de reparo ósseo.

Materiais e Métodos: Defeitos ósseos críticos foram criados nas tíbias de 32 ratos Wistar divididos em dois grupos: Grupo Coágulo e Grupo RTR[®]. Após o período experimental de 30 e 90 dias, os animais foram sacrificados e as peças incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. Dois parâmetros foram analisados: a área óssea total neoformada (AON) e a área óssea da cortical neoformada (ACN). A análise estatística foi realizada nos dois períodos de observação pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey.

Resultados: Todos os grupos demonstraram reparo ósseo superior quando comparados ao Grupo Coágulo 30 dias nos dois parâmetros analisados. O Grupo RTR[®], em 30 e 90 dias, apresentou reparo da cortical óssea e formações de tecido ósseo na região central do defeito maior do que no Grupo Coágulo de 90 dias, que apresentou reparo parcial da cortical óssea e poucas formações de tecido ósseo na região do defeito ($p < 0,05$).

Conclusões: O RTR[®] favoreceu a neoformação óssea no modelo experimental adotado podendo ser indicado em casos de cavidades ósseas de tamanho crítico.

Bone repair filled critical surgical defects or not with β - tricalcium phosphate (RTR[®] - Septodont): Histological and Histometric study in the rat tibia.

Keywords: RTR[®] (Septodont), bone substitute, bone regeneration.

Abstract

Objectives: To analyze histologically and histometrically the effect of RTR[®] on critical surgical bone defects in rat tibiae in the bone repair process.

Materials and Methods: Critical bone defects were created in the tibia of 32 Wistar rats divided into two groups: Clot Group and RTR[®] Group. After the experimental period of 30 and 90 days, the animals were sacrificed and the paraffin embedded pieces were cut and stained with hematoxylin and eosin. Two parameters were analyzed: total neoformed bone area (AON) and bone area of neoformed cortical (ACN). Statistical analysis was performed in the two observation periods by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Results: All groups demonstrated superior bone repair when compared to the Clot Group 30 days in the two analyzed parameters. The RTR[®] Group, in 30 and 90 days, presented repair of the cortical bone and bone tissue formations in the central region of the defect greater than in the 90-day Clot Group, which presented partial repair of the cortical bone and few bone tissue formations in the region of the defect ($p < 0.05$).

Conclusions: The RTR[®] favored the bone neoformation in the adopted experimental model and can be indicated in cases of bone of critical size.

O reparo dos defeitos ósseos causados após as extrações dentárias, resultantes de lesões traumáticas, por doença periodontal, defeitos congênitos, perda de substância devido a neoplasias ou resultantes de procedimentos cirúrgicos, têm sido um dos grandes desafios em cirurgia, impondo dificuldades nas reabilitações pela falta de um remanescente saudável devido à reabsorção fisiológica do osso. (Wu et al. 2006; Bernabé et al. 2011; Sava-Rosianu, et al. 2013).

O enxerto autógeno ainda é considerado o melhor material para garantir o reparo ósseo destas regiões, pois apresenta plena compatibilidade com a área receptora, apresentando propriedades de osteogênese, osteocondutoras e osteoindutoras satisfatórias. (Mazzoneto et al. 2012; Damlar et al. 2015). No entanto, o volume ósseo necessário nem sempre é suficiente além de causar morbidade da área doadora. (Podaropoulos et al. 2009; Hirota et al. 2009; Mazzoneto et al. 2012). Por esta razão, os substitutos ósseos ou biomateriais definidos como materiais de origem natural ou sintética, com capacidade de substituir tecidos e órgãos em humanos, vêm sendo amplamente pesquisados, eliminando a necessidade de áreas doadoras. (György Szabó et al. 2001; Hirota et al. 2009; Porrini et al. 2011)

Diferentes materiais sintéticos osteocondutores foram desenvolvidos, dentre eles o β -fosfato tricálcico (β -TCP), material biocompatível e reabsorvível utilizado como um substituto ósseo no processo de reparo e no mecanismo de formação de osso. (Damlar et al. 2015; Kunert-Keil et al. 2015; Mayr et al. 2015; Martinez et al. 2015; Kato et al. 2014; Leventis et al. 2014; Schmidlin et al. 2013; Hirota et al. 2009; Cunha et al. 2007; Nyangoga et al. 2010). Estudos histológicos com o β -TCP

demonstraram que a matriz óssea foi depositada no interior dos grânulos do β -TCP e que este material proporcionou aumento ósseo. (Zerbo et al. 2004; Ortega et al. 2008) e que sua associação com osso autógeno confirmou a presença de tecido ósseo neoformado (Yuan et al. 2007; Zorzano et al. 2007), embora a capacidade de reparo ósseo deste material de enxerto ter sido confirmada sem a adição de osso autógeno. (Horowitz et al. 2009).

O RTR[®] (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França) é um substituto ósseo composto por β – fosfato tricálcio de origem sintética testado apenas clinicamente apontando resultados positivos. O material é composto por grânulos com tamanho variando entre 500 μ m a 1mm, macroporos com tamanho de 100 μ m a 400 μ m e microporos com menos de 10 μ m de diâmetro, usado para as reconstruções de defeitos ósseos em cirurgias odontológicas. (Pinipe et al. 2014)

Resultados clínicos, radiográficos, histológicos, em pacientes tratados com o RTR[®], em associação com colágeno tipo I ou osso autógeno, verificaram neoformação óssea e regeneração óssea satisfatória e que este biomaterial pode ser utilizado como substituto ósseo. (Bozidar et al. 2008; Pinipe et al. 2014).

Entretanto estudos em modelos experimentais adequados para se quantificar a neoformação óssea frente a estes materiais ainda não foram realizados. Assim, o objetivo deste estudo foi, de analisar histologicamente e histometricamente, o efeito do RTR[®] em defeitos ósseos cirúrgicos críticos criados em tíbias de ratos no processo de reparo ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo Experimental

Para a realização dos procedimentos experimentais, o projeto foi aprovado ao comitê de conduta ética no uso de animais em experimentação. (CEUA: 00249-2016). Foram utilizados trinta e dois ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 450 a 500 gramas provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”. Os ratos foram randomicamente divididos em dois grupos experimentais com 16 ratos em cada grupo: Grupo Coágulo e Grupo RTR® (Septodont) e avaliados em dois períodos de observação 30 e 90 dias.

Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados via intramuscular utilizando sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg). O volume anestésico total utilizado para cada animal foi de 0,1 ml para cada 100g de peso. Para isso foi feita uma solução onde 70% da quantidade total seja cloridrato de quetamina e 30% seja xilazina. Após a tricotomia e antissepsia do local cirúrgico, realizou-se incisão linear de aproximadamente 15 mm sobre a tíbia envolvendo a pele, músculo e periósteo

expondo o tecido ósseo. Defeitos ósseos circulares críticos foram preparados com a broca trefina de 4,1mm de diâmetro (3i Implant Innovations Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA) na tíbia de cada animal, de acordo com a metodologia desenvolvida por Bernabé et al. 2011. Na sequência foi realizada uma marcação nas duas margens do defeito ósseo por meio da criação de uma pequena cavidade com auxílio de cinzel e seu preenchimento com amalgama, que serviu para auxiliar nas mensurações de área óssea na análise histométrica.

Os defeitos ósseos foram tratados de acordo com as condições previstas em cada grupo. (Tabela 1). No Grupo I os defeitos ósseos foram preenchidos apenas com coágulo sanguíneo; no Grupo II os defeitos foram preenchidos com o material RTR® (Septodont - França). Após os preenchimentos dos defeitos cirúrgicos, os tecidos foram cuidadosamente reposicionados e suturados com fio de seda 5.0 e 4.0 (Ethicon, São Paulo, Brasil).

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com tempo e com os materiais utilizados nos defeitos ósseos

| Grupos | n (30 dias) | n (90 dias) |
|---------------|--------------------|--------------------|
| Grupo Coágulo | 08 | 08 |
| Grupo RTR® | 08 | 08 |

Coleta de Material para Análise

Após 30 e 90 dias dos preenchimentos dos defeitos ósseos com os materiais selecionados, os animais foram sacrificados com uma superdose de cloridrato de ketamina (anestésico) injetada no coração. Para análise histológica, as tíbias foram removidas e estocadas em formol à 10% e pH neutro durante 24 horas. As peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e desmineralizadas em ácido fórmico citrato de sódio. Após a desmineralização, os espécimes foram processados para a análise histológica pelo método de incorporação em parafina. As peças foram cortadas com 6 µm de espessura na direção longitudinal. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscópio óptico. (DM 4000B, Leicas, Wetzlar, Alemanha).

Análise Histomorfométrica

A análise histológica teve como objetivo descrever o processo de reparo ósseo em cada defeito cirúrgico criado, na cortical óssea rompida e as características do novo tecido que ocupou esta região. Foram selecionados 6 cortes histológicos da área central do defeito cirúrgico de cada espécime. A imagem de cada corte foi capturada e transferida para o “software” ImageLab 2000 (Diracom Bio Informática LTDA, Vargem Grande do Sul, São Paulo Brasil). Em cada imagem foi realizada uma delimitação da área a ser analisada, que correspondeu à região do osso da tíbia onde o defeito foi originalmente criado, denominada Área Total (AT). Na área Total (AT), foram selecionadas e delimitadas as áreas de tecido ósseo neoformado (AON). O valor da AT foi considerado como sendo 100% da área analisada e o valor de AON foi calculada como sendo uma porcentagem de AT da seguinte forma: $AON \% = 100 \times AON / AT \text{ (mm}^2\text{)}$. (Bernabé

et al. 2011). Foi também realizada a mensuração do percentual de formação da cortical óssea. O local do tecido ósseo cortical foi mensurado e considerado como 100% da área cortical total (ACT). Na ACT foram selecionadas e delimitadas as áreas de tecido ósseo cortical neoformado (ACN).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada separadamente para ambos os períodos de tempo (30 e 90 dias). As diferenças entre os resultados apresentados pelos grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey quando existiu uma diferença significativa entre os grupos ($P \lll 0,05$).

RESULTADOS

Análise Descritiva

Grupo Coágulo 30 dias

Observou-se aos 30 dias que o reparo ósseo foi mínimo em todos os espécimes. A região do defeito cirúrgico estava ocupada por tecido conjuntivo em diferenciação com um pequeno número de fibroblastos e ausência de neoformação da cortical óssea rompida. (Figura 1-A).

Grupo Coágulo 90 dias

Aos 90 dias observou-se presença de reparo parcial da cortical óssea e na região do defeito cirúrgico pequenas formações isoladas de tecido ósseo imaturo ao lado de tecido conjuntivo fibroso. (Figura 1-C).

Grupo Grupo RTR® 30 dias:

Observou-se aos 30 dias neoformação completa da cortical, com fechamento total do defeito com tecido de menor espessura que o osso original da tíbia e presença de infiltrado inflamatório. Não foi observada a presença de remanescentes de partículas do biomaterial e verificou-se pequenas formações de tecido ósseo neoformado na região central do defeito. (Figura 1-B).

Grupo Grupo RTR® 90 dias:

Aos 90 dias, observou-se reparo da cortical óssea com tecido neoformado de menor espessura que o osso original da tíbia e na região do defeito cirúrgico formações de tecido ósseo imaturo (Figura 1-D). Não foram observados remanescentes do RTR.

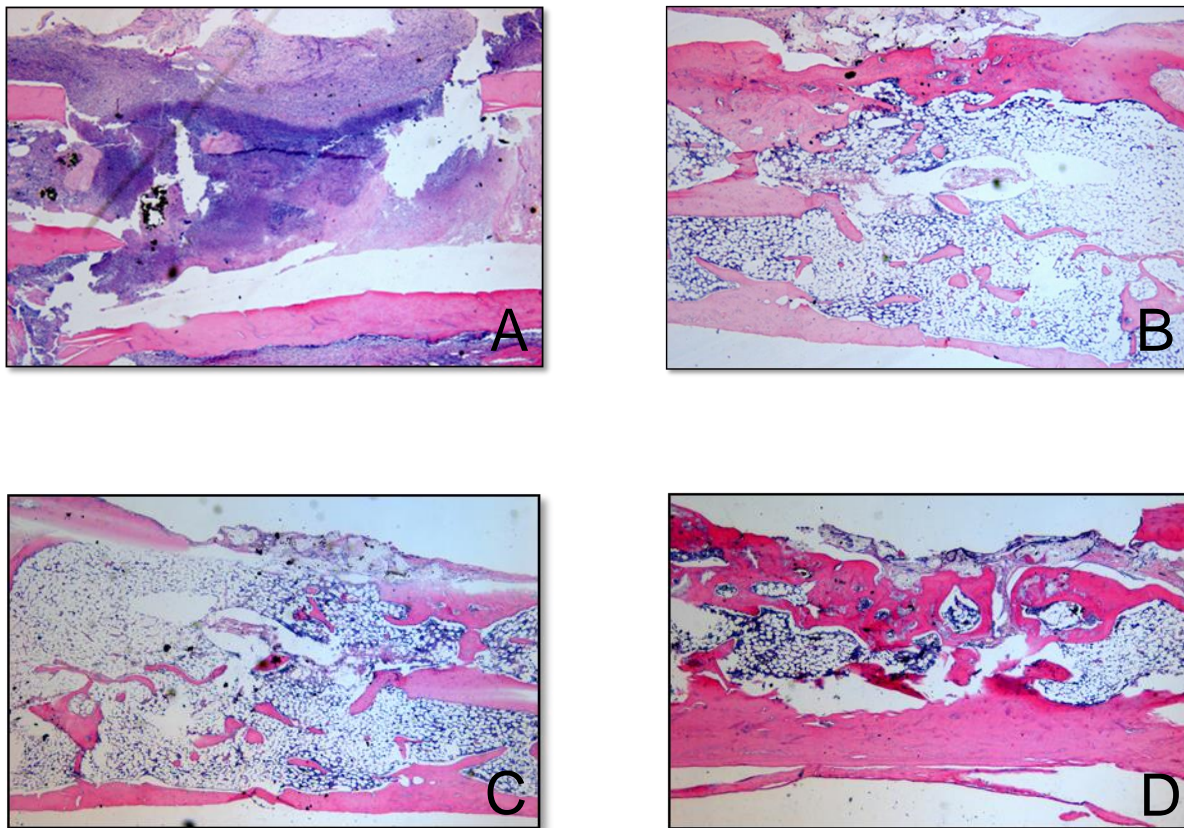


Figura 1. **(A) Grupo coágulo 30 dias:** defeito cirúrgico ocupado por tecido conjuntivo em diferenciação com um pequeno número de fibroblastos e ausência de neoformação da cortical óssea rompida; **(B) Grupo RTR 30 dias:** fechamento da cortical com tecido de menor espessura que o osso original da tíbia e presença de infiltrado inflamatório e poucas formações de tecido ósseo neoformado na região central do defeito; **(C) Grupo coágulo 90 dias:** reparo parcial da cortical e na região do defeito cirúrgico observou-se pequenas formações isoladas de tecido ósseo imaturo ao lado de tecido conjuntivo fibroso; **(D) Grupo RTR 90 dias:** reparo da cortical óssea com tecido neoformado de menor espessura que o osso original da tíbia e na região do defeito cirúrgico observou-se formações de tecido ósseo imaturo.

Análise Histométrica e Estatística

As médias, desvio padrão e medianas do osso neoformado (porcentagens) para cada grupo, nos dois períodos de observação (30 e 90 dias), estão representados na Tabela 2 e na Figura 2.

Tabela 2 – Média de percentual de área óssea total neoformada (AON) e área óssea cortical neoformada (ACN) nos grupos controle e experimental nos tempos de 30 e 90 dias.

| Grupos | | 30 dias (n = 8) | | 90 dias (n = 8) | |
|------------|-----|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | | Mean* (%) | SD** | Mean (%) | SD** |
| I Controle | AON | 2.46 ^A | ±0.43 | 15.10 ^A | ±1.83 |
| | ACN | 0.09 ^a | ±0.09 | 22.01 ^a | ±2.75 |
| II RTR® | AON | 31.31 ^B | ±3,88 | 36.80 ^B | ±5.87 |
| | ACN | 34.95 ^b | ±5.01 | 42.84 ^b | ±5.50 |

*Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa (P < 0.05).

**SD, standard deviation.

Comparações: Letras maiúsculas - Controle x RTR em AON; Letras minúsculas: Controle vs RTR em ACN

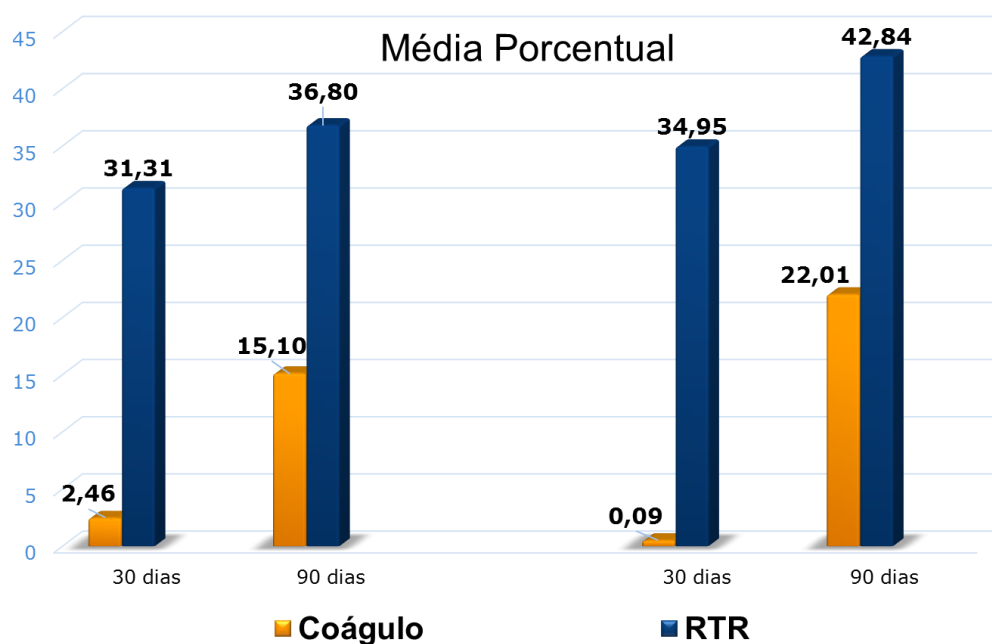


Figura 2: Média de percentual de área óssea total neoformada (AON) e área óssea cortical neoformada (ACN) nos grupos controle e experimental nos tempos de 30 e 90 dias.

DISCUSSÃO

Este estudo analisou histologicamente e histometricamente o efeito do RTR® (β -TCP) em defeitos ósseos cirúrgicos críticos criados em tíbias de ratos no processo de reparo ósseo, onde este favoreceu a neoformação óssea no modelo experimental adotado.

Outras formulações contendo o β – TCP foram objeto de estudos anteriores que demonstraram a sua biocompatibilidade, biodegradação (Damlar et al. 2015; Kunert-Keil et al. 2015; Mayr et al. 2015; Martinez et al. 2015; Kato et al. 2014; Leventis et al. 2014; Schmidlin et al. 2013; Hirota et al. 2009; Cunha et al. 2007; Jensen et al. 2006) a sua capacidade osteocondutora (Kunert-Keil et al. 2015 e Leventis et al. 2014; Luvizuto et al. 2012) e a influência da composição física e química dos grânulos do β -TCP sobre a diferenciação e adesão osteoblástica (Samaved et al. 2013; Cheng et al. 2013), demonstrando que as variações da forma, tamanho e porosidade dos poros do material influenciam diretamente na neoformação óssea. (Ghanaati et al. 2010). A neoformação óssea, segundo Martinez et al. 2015, provavelmente esteja intimamente relacionada com a degradação de partículas β -TCP e estas atuam positivamente sobre as atividades dos osteoblastos. Estas propriedades também foram confirmadas no presente estudo, como reduzida resposta inflamatória ao redor do material, presença após 90 dias de poucas partículas do enxerto pela atividade osteoclástica e neoformação óssea no interior do defeito em íntimo contato com o material.

As seleções dos modelos experimentais para a avaliação da neoformação óssea devem incluir fatores como baixa variação entre os modelos, fácil disponibilidade e aquisição e condições de tratamento mais próximas dos seres

humanos. (Wancket L. M. 2015). Devem ser considerados também o sexo (Kim et al. 2003) pela interferência dos hormônios sexuais no comportamento dos modelos e a idade, onde verifica-se uma maior capacidade de cicatrização óssea em animais mais jovens. (Niederauer et al. 2004; Cardoso H. F. 2008). Diferentes modelos experimentais podem ser utilizados para avaliar esta propriedade, dentre eles: a calvária de coelhos (Martinez et al 2015; Leventis et al. 2014; Delgado-Ruiz et al. 2015; Sung-Min Chung et al. 2016; Schmidlin et al. 2013), mandíbulas de coelhos (Alfotawei et al. 2014), calvária de ratos (Lee et al. 2013; Kunert-Keil et al. 2015; Kato et al. 2014; Al-Qutub et al. 2016; Ramalingam et al. 2016; Luvizuto et al. 2012), osso frontal de suínos (Damlar et al. 2015), mandíbulas de suínos (Jensen et al. 2006), fêmur de ovelhas (Mayr et al. 2015), tíbias de ratos (Truedsson et al. 2010; Yigit Sirin et al. 2011; Bernabé et al. 2011; Borrasca et al. 2015), sendo este último o modelo utilizado neste estudo, pela boa reprodutibilidade das características do modelo com o tecido ósseo humano e por ser um osso longo com um córtex em linha reta, sem contorno, ter um canal medular com grande potencial para a diferenciação de osteoblastos e formação de osso. (Truedsson et al. 2010). Apesar de serem animais mais velhos cujo o efeito sistêmico interfere no processo de reparo ósseo segundo Niederauer et al. 2004 e Wancket L. M. 2015, verificou-se no estudo neoformação óssea nos modelos utilizados.

Para avaliação do reparo com o RTR[®], foram realizados defeitos ósseos críticos circulares de 4,1mm de diâmetro em tíbias de ratos. Segundo Bernabé et al. (2011), o defeito ósseo de 4mm em tíbias de ratos pode ser considerado um tamanho crítico, fato também confirmado no estudo de Heli Rushinek et al. (2014) que avaliaram a ação de um substituto ósseo e pelos nossos achados. Segundo

Ribeiro et al. (2008) e Mendes et al. (2006), defeitos criados cirurgicamente em tíbias de ratos de 3mm reparam espontaneamente, não sendo portando um modelo adequado para avaliação da ação de um material para enxerto. As análises histológicas do defeito ósseo no grupo coágulo após 30 dias não apresentaram reparo ósseo, indicando assim que os defeitos de 4,1mm de diâmetro foram de fato um tamanho crítico para a regeneração óssea em tíbias de ratos.

Os grupos estudados foram o grupo Coágulo e o grupo RTR® em dois períodos de observação (30 e 90 dias). O grupo coágulo em 30 dias não apresentou reparo da cortical óssea e ausência de neoformação óssea na região do defeito cirúrgico que estava ocupada por tecido conjuntivo em diferenciação com pequeno número de fibroblastos. O mesmo resultado foi observado por Bernabé et al. (2011) no grupo coágulo 30 dias, com poucos sinais de cicatrização e formação óssea mínima com ausência da cortical externa. Em períodos de tempo menores do que 30 dias, é possível que a cavidade de menor diâmetro também não se observe o fechamento completo do defeito, como observado por Borrasca et al. (2015), que em defeitos ósseos de 2mm em tíbias de ratos, em 10 dias, o grupo coágulo apresentou uma cápsula fibrosa fina contendo fibras colágenas, fibroblastos, alguns vasos sanguíneos, número discreto de células inflamatórias e presença de trabeculado ósseo imaturo no defeito ósseo. O achado deste estudo relaciona-se ao tempo de observação e não se pode afirmar que as cavidades eram de tamanho crítico. Cunha et al. (2007) em fissuras em tíbias de ratos, em 10 dias no grupo coágulo, a loja cirúrgica apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo em desenvolvimento com numerosos fibroblastos. O grupo coágulo em 90 dias apresentou reparo parcial da cortical óssea e na região do defeito cirúrgico

pequenas formações isoladas de tecido ósseo imaturo. Este achado também foi observado por Bernabé et al. (2011) no mesmo período de observação, onde nos defeitos críticos não verificou-se a presença de osso neoformado. Em fissuras longitudinais em tíbias de ratos, Cunha et al. (2007) observaram em 45 dias reparo da loja cirúrgica com a presença de tecido ósseo imaturo no grupo coágulo.

O grupo RTR[®], nos dois períodos de observação, proporcionou melhor reparo da cortical óssea e maior presença de tecido ósseo no interior do defeito quando comparado ao grupo coágulo. Este achado também foi observado por Khoshzaban et al. 2011, com o componente β -TCP no período de 45 dias e por Luvizuto et al. 2012, em 60 dias, porém em calvárias de ratos. No mesmo modelo experimental, Martinez et al. 2015, verificaram que o β -TCP apresentaram elevada capacidade de formação óssea, observando em 30 dias a presença osteoblastos e os osteócitos em íntimo contato com o material. O reparo ósseo foi confirmado também por Hirota et al. 2009, embora o defeito ósseo não fosse crítico, em 7 dias verificou-se ser eficaz como um substituto ósseo associado ao osso autógeno em mandíbulas de ratos. Em outro estudo aos 30 dias, em defeitos críticos em mandíbulas de cães, Yuan et al. 2007, também confirmaram a neoformação óssea. Em defeitos criados cirurgicamente após extrações dos molares de ratos, Savarosu et al. 2013, verificaram em 5 dias intenso processo inflamatório e em 20 dias formação óssea quando associava-se o β -TCP a células mesenquimais. Em fissuras em tíbias de ratos, Cunha et al. 2007, verificaram neoformação óssea com o uso do fosfato tricálcio em três períodos de observação (10, 20, 30 e 45 dias) evidenciando capacidade osteoindutora. No osso frontal de um modelo suíno, Damlar et al. 2015, testaram três materiais que contém β -TCP (Cerasorb[®],

Kasios® and Poresorb®), em dois períodos de observação (30 e 84 dias), e demonstraram a neoformação óssea diferente para os materiais devido à variação na forma granular e porosidade do β - TCP. Em calvárias de coelhos, em 30 dias, Schmidlin et al. 2013 observaram aumento do tecido ósseo nos defeitos tratados com β -TCP.

A ação do β - TCP também foi testada por Pinipe et al. 2014 em estudos clínicos, cujo objetivo foi de verificar a formação de tecido ósseo em defeitos periodontais, observando que o RTR® associado ou não ao PRP não revelou qualquer benefício adicional nos parâmetros clínicos periodontais analisados em 6 meses de observação. Queiroz et al. em 2012 também observaram os mesmos efeitos, no mesmo período de observação, associando o β -TCP com a matriz derivada do esmalte em lesões de furca Grau II. O RTR® foi testado associado ao colágeno tipo I em alvéolos após extrações por Bozidar et al. 2008, observando a neoformação óssea e a prevenção da reabsorção da crista óssea alveolar. Em um estudo clínico randomizado, Döri et al. 2013 verificaram que a associação do β -TCP com a matriz derivada do esmalte reduziram e a profundidade de bolsa que foi mantida estável por um período de dez anos. Após extrações, a associação do β -TCP com PLGA (lactic-co-glycolic acid), Leventiset et al. 2016, observaram que os defeitos foram substituídos por tecido ósseo. Em cirurgias de levantamento do seio maxilar com uso do β -TCP, através da análise histométrica, verificou-se que o material proporcionou aumento ósseo (Zerbo et al. 2005; Martinez et al. 2010)

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que o RTR® favoreceu a neoformação óssea no modelo experimental adotado podendo ser indicado em casos de cavidades ósseas de tamanho crítico.

REFERÊNCIAS

- Alfotawei R., Naudi K.B., Lappin D., Barbenel J., Di Silvio L., Hunter K., McMahon J., Ayoub A. (2014) The use of TriCalcium Phosphate (TCP) and stem cells for the regeneration of osteoperiosteal critical-size mandibular bony defects, an in vitro and preclinical study. *J Craniomaxillofac Surg.* 42(6):863-9.
- Borrasca, A.G, Aranega, A.M., Filho O.M., Timóteo C.A. (2015) Bone Repair of Surgical Defects Filled with Autogenous Bone and Covered with Demineralized Bone Matrix Membrane or Polytetrafluoroethylene Membrane in Rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.* 30:2.
- Bernabé P.F.E., Melo L.G.N., Cintra L.T.A., Gomes-Filho J.E., Dezan E. Jr., Nagata M.J.H. (2011) Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin. Oral Impl. Res.* xx, 2011; 000–000.
- Bernabé P.F., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L.T., Moretto, M.J., Lodi C.S., Nery M.J., Otoboni Filho J.A. & Dezan E. Jr. (2010) Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 109: 309–314.
- Bornstein M.M., Bosshardt D., Buser D. (2007). Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol.* 78(10): 1943-53.
- Bozidar M.B., Brkovic D.D.S., Hari S., Prasad B.S., George K., Radulovic M., Dragana A., George K.B., Sándor M.D., Rohrer M.D. (2008) Simple Preservation of a

Maxillary Extraction Socket Using Beta-tricalcium Phosphate with Type I Collagen: Preliminary Clinical and Histomorphometric Observations. *JCDA*.74:6.

Cardoso H. F. (2008) Epiphyseal union at the innominate and lower limb in a modern Portuguese skeletal sample, and age estimation in adolescent and young adult male and female skeletons. *Am J Phys Anthropol*.135(2):161–170.

Cheng L., Shi Y., Ye F., Bu H. (2013) Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. *Science and Engineering:C* 33: 1254–1260.

Cunha L.R., Balducci-Roslindo E., Minarelli-Gaspar A.M. (2007) Efeito do fosfato tricálcio na reparação de defeito ósseo em tíbias de ratos. *Revista de Odontologia da UNESP*. 36(4): 293-298

Dahlin C., Lindhe J., Gottlow J., Nyman S. (1998). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Past. Reconstr. Surg*. 81:672-676

Dahlin C., Alberius P., Linde A. (1991). Osteopromotion for cranioplasty: An experimental study in rats using a membrane technique. *J. Neurosurg*.74:487-491

Damlar I., Erdogan O., Tatli U., Arpag O.F., Görmez U., Üstün Y. (2015). Comparison of osteoconductive properties of three different b-tricalcium phosphate graft materials: A pilot histomorphometric study in a pig model. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 43:175-180

Döri F., Arweiler N.B., Szántó E. , Gics A.A., Gera I., Sculean A. (2013) Ten-Year Results Following Treatment of Intrabony Defects With an Enamel Matrix Protein Derivative Combined With Either a Natural Bone Mineral or a β -Tricalcium Phosphate. *J Periodontol*. 84:6.

- Ghanaati S., Barbeck M., Orth C., Willesrshausen I., Thimm B.W., Hoffmann C., Rasic A., Sader R., Unger R.E. & Peters F. (2010) Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomaterialia*. 6: 4476–4487.
- György S., Suba S., Hrabák K., Barabás J., Németh Z. (2001) Autogenous Bone Versus Tricalcium Phosphate Graft Alone for Bilateral Sinus Elevations (2- and 3-Dimensional Computed Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Evaluations): Preliminary Results. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 16:5.
- Hirota M., Matsui Y., Mizuki N., Kishi T., Watanuki K., Ozawa T., Fukui T., Shoji S., Adachi M., Monden Y., Iwai T., Tohnai I. (2009) Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. *Dental Materials Journal* 28(2): 153–161.
- Horowitz R. A., Mazor Z., Foitzik C. (2009) β -Tricalcium Phosphate as Bone Substitute Material: Properties and Clinical Applications. *The International Journal of Dental Implants & Biomaterials*. 1:2.
- Iglhaut J., Aukhil, I., Simpson, D. (1998). Progenitor cell kinetics during experimental guided tissue regeneration procedure. *J. Periodont. Res.* 23: 107-117.
- Jensen S.S., Broggini N., Hjörting-Hansen E., Schenk R. & Buser D. (2006) Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Journal of Clinical Oral Implants Research* 17: 237–243.

- Júnior M.E.F. (1999). Ação do composto de matriz orgânica de osso bovino liofilizado-hidroxiapatita reabsorvível, associada a dois diferentes veículos, no processo de reparo alveolar: estudo microscópico em ratos. Araçatuba. 158p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba– FOA – UNESP.
- Kato E., Lemler J., Sakurai K., Yamada M. (2014) Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 16:2.
- Khoshzaban A. , Mehrzad S., Tavakoli V., Keshel S.H., Behrouzi G.R., Bashtar M. (2011) 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. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*.
- Kunert-Keil C., Scholz F., Gedrange T., Gredes T.(2015) Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects - A molecular-biological and histological study. *Annals of Anatomy* 79–84.
- Leventis M.D., Fairbairn P., Kakar A., Leventis A.D., Margaritis V., Lückerrath W., Horowitz R.A., Rao H.B., Lindner A., Nagursky H. (2016). *International Journal of Dentistry*.
- Leventis M.D., Fairbairn P., Dostas I., Faratzis G., Valavanis K.D., Khaldi L., Kostakis G., Eleftheriadis E. (2014) Biological Response to b-Tricalcium Phosphate/Calcium Sulfate Synthetic Graft Material: An Experimental Study. *IMPLANT DENTISTRY*. 23:1.

- Luvizuto E.R., Queiroz T.P., D.D.S., Margonar R., Panzarini S.R., Hochuli-Vieira E., Okamoto T., Okamoto R. (2012) Osteoconductive Properties of β -Tricalcium Phosphate Matrix, Polylactic and Polyglycolic Acid Gel, and Calcium Phosphate Cement in Bone Defects. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 23:5.
- Martinez A., Franco J., Saiz E. & Guitian F. (2010) Maxillary sinus floor augmentation on humans: packing simulations and 8 months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and β -tricalcium phosphate particles as grafting material. *Materials Science and Engineering*.30: 763–769.
- Martinez A., Balboa O., Gasamans I., Otero-Cepeda X.L., Guitian F. (2015) Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin. Oral Impl. Res.* 26:623–632.
- Mayr H.O., Suedkamp N.P., Hammer T., Hein W., Hube R., Roth P., Bernstein A. (2015). β -Tricalcium phosphate for bone replacement: Stability and integration in sheep. *Journal of Biomechanics*. 48:1023–1031.
- Mazzoneto R., Netto H.D; Nascimento F.F. (2012) Enxertos ósseos em implantodontia. *Biomateriais: Conceitos e aplicações*. Napoleão. 78-104.
- Mendes, S.M., Fonseca, C.E., Bassi, A.P.F., Ponzoni, D. & Carvalho, P.S.P. (2006) Histologic and histomorphometric evaluation of heterogenous demineralized bone or compound bone with and without bone morphogenetic
- Niederauer G. G., Niederauer G. M., Cullen L. C. Jr. (2004) Correlation of cartilage stiffness to thickness and level of degeneration using a handheld indentation probe. *Ann Biomed Eng*.32(3):352–359.

- Nyangoga H., Aguado E., Goyenvalle E., Baslé M. F., Chappard D. (2010) A non-steroidal anti-inflammatory drug (ketoprofen) does not delay β -TCP bone graft healing. *Acta Biomaterialia*.
- Ortega V., Mourelo Júnior P., Méndez A. G., Medel S. R., López F. J. (2008) Estudio clínico e histológico del beta-fosfato tricálcico en la elevación del seno maxilar. *Avances En Periodoncia*. 20: 3.
- Pinipe J., Mandalapu N.B., Manchala S.R., Mannem S., Gottumukkala N.V.S.S., Koneru S.(2014) Comparative evaluation of clinical efficacy of β -tri calcium phosphate (Septodont–RTR)™ alone and in combination with platelet rich plasma for treatment of intrabony defects in chronic periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*.18:3.
- Podaropoulos L., Veis A. A., Papadimitriou S., Alexandridis C., Kalyvas D. (2009) Bone regeneration using β -tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *Journal of Oral Implantology*. XXXV/No. One.
- Porrini R., Rocchetti V., Vercellino V., Cannas M., Sabbatini M. (2011) Alveolar bone regeneration in post-extraction socket: A review of materials to postpone dental implant. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 21:63–74.
- Queiroz L.A., Santamaria M.P., Casati M.Z., Júnior F.H.N., Sallum A.W., Sallum E.A. (2012) The use of Beta tricalcium phosphate in association with enamel matrix derivative in class II furcation defects. *PerioNews* 6(1):67-72
- Ribeiro L.L., Bosco A.F., Nagata M.J. & Melo L.G. (2008) Influence of bioactive glass and/or acellular dermal matrix on bone healing of surgically created defects in rat

tibiae: a histological and histometric study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 23: 811–817.

Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. (2013) Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia* 9: 8037–8045.

Sava-Rosianu R., Podariu A.C., Popovici R.A., Tanasie G., Iliuta I., Oancea R. (2013) Alveolar bone repair using mesenchymal stem cells placed on granular scaffolds in a rat model. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 8:303 – 311.

Schmidlin P.R., Nicholls F., Kruse A., Zwahlen R.A., Weber F.E. (2013) Evaluation of moldable, in situ hardening calcium phosphate bone graft substitutes. *Clin. Oral Impl. Res.* 24:149–157.

Truedsson A., Wang J.S., Lindberg P., Gordh M., Sunzel B., Warfvinge G. (2010) Bone substitute as an on-lay graft on rat tibia. *Clin. Oral Impl. Res.* 21:424–429.

Yuan J., Cui L., Zhang W.J., Liu W., Cao W. (2007) Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium-phosphate. *Biomaterials*. 28: 1005-1013.

Wancket L. M. (2015) Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Veterinary Pathology*. 52(5) 842-850.

Wu W., Chen C., Tianqiu M.A.O., CHEN F., Feng X. (2006) Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandíbula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2006;12(4):268-276.

Zerbo I.R., Bronckers A.L.J.J., Lange G., Burger E.H. (2005) Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous β -tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials*. 26:1445–1451.

Zerbo I.R., Zijdeveld S. A., Boer A., Antonius L. J. J., Bronckers, G. L., Bruggen C. M., Burger E.H. (2004) Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous β -tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin. Oral Impl. Res.*15: 724–732.

Zorzano L.A.A., Tojo M. J. R., Urizar J.M. A. (2007) Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and β – Tricalcium Phosphate: Histological and histomorphometric clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 12(7):532-6.

III REFERÊNCIAS

Bozidar M.B., Brkovic D.D.S., Hari S., Prasad B.S., George K., Radulovic M., Dragana A., George K.B., Sándor M.D., Rohrer M.D. (2008) Simple Preservation of a Maxillary Extraction Socket Using Beta-tricalcium Phosphate with Type I Collagen: Preliminary Clinical and Histomorphometric Observations. *JCDA*.74:6.

Cunha L.R., Balducci-Roslindo E., Minarelli-Gaspar A.M. (2007) Efeito do fosfato tricálcio na reparação de defeito ósseo em tíbias de ratos. *Revista de Odontologia da UNESP*. 36(4): 293-298

Damlar I., Erdogan O., Tatli U., Arpag O.F., Görmez U., Üstün Y. (2015). Comparison of osteoconductive properties of three different β -tricalcium phosphate graft materials: A pilot histomorphometric study in a pig model. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 43:175e180

György S., Suba S., Hrabák K., Barabás J., Németh Z. (2001) Autogenous Bone Versus Tricalcium Phosphate Graft Alone for Bilateral Sinus Elevations (2- and 3-Dimensional Computed Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Evaluations): Preliminary Results. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*.16:5.

Hirota M., Matsui Y., Mizuki N., Kishi T., Watanuki K., Ozawa T., Fukui T., Shoji S., Adachi M., Monden Y., Iwai T., Tohnai I. (2009) Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. *Experimental animal study in rat mandibular bone defects*. *Dental Materials Journal* 28(2): 153–161.

- Jensen S.S., Brogini N., Hjørting-Hansen E., Schenk R. & Buser, D. (2006) Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Journal of Clinical Oral Implants Research* 17: 237–243.
- Kato E., Lemler J., Sakurai K., Yamada M. (2014) Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 16:2.
- Kunert-Keil C., Scholz F, Gedrange T., Gredes T. (2015) Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects - A molecular-biological and histological study. *Annals of Anatomy* 79–84.
- Leventis M.D., Fairbairn P., Kakar A., Leventis A.D., Margaritis V., Lückerrath W., Horowitz R.A., Rao H.B., Lindner A., Nagursky H. (2016). *International Journal of Dentistry*.
- Leventis M.D., Fairbairn P., Dontas I., Faratzis G., Valavanis K.D., Khaldi L., Kostakis G., Eleftheriadis E. (2014) Biological Response to b-Tricalcium Phosphate/Calcium Sulfate Synthetic Graft Material: An Experimental Study. *IMPLANT DENTISTRY*. 23:1.
- Martinez A., Balboa O., Gasmans I., Otero-Cepeda X.L., Guitian F. (2015) Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin. Oral Impl. Res.* 26:623–632.

- Mazzoneto R., Netto H.D; Nascimento F.F. (2012) Enxertos ósseos em implantodontia. Biomateriais: Conceitos e aplicações. Napoleão. 78-104.
- Pinipe J., Mandalapu N.B., Manchala S.R., Mannem S., Gottumukkala N.V.S.S., Koneru S.(2014) Comparative evaluation of clinical efficacy of β -tri calcium phosphate (Septodont–RTR)™ alone and in combination with platelet rich plasma for treatment of intrabony defects in chronic periodontitis. Journal of Indian Society of Periodontology.18:3.
- Podaropoulos L., Veis A. A., Papadimitriou S., Alexandridis C., Kalyvas D. (2009) Bone regeneration using β -tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. Journal of Oral Implantology. XXXV/No. One.
- Porrini R., Rocchetti V., Vercellino V., Cannas M., Sabbatini M. (2011) Alveolar bone regeneration in post-extraction socket: A review of materials to postpone dental implant. Bio-Medical Materials and Engineering. 21:63–74.
- Sava-Rosianu R., Podariu A.C., Popovici R.A., Tanasie G., Iliuta I., Oancea R. (2013) Alveolar bone repair using mesenchymal stem cells placed on granular scaffolds in a rat model. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 8:303 – 311.
- Schmidlin P.R., Nicholls F., Kruse A., Zwahlen R.A., Weber F.E. (2013) Evaluation of moldable, in situ hardening calcium phosphate bone graft substitutes. Clin. Oral Impl. Res. 24:149–157.
- Wu W., Chen C., Tianqiu M.A.O., CHEN F., Feng X. (2006) Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandíbula. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2006;12(4):268-276.

Zerbo I.R., Zijderveld S. A., Boer A., Antonius L. J. J., Bronckers, G. L., Bruggen C. M., Burger E.H. (2004) Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous β -tricalcium phosphate: a prospective study. Clin. Oral Impl. Res.15: 724–732.

IV ANEXOS

ANEXO 1



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 do RTR™ no reparo ósseo em defeitos cirúrgicos críticos em tíbia de ratos", Processo FOA nº 00249-2016, sob responsabilidade de Eloi Dezan Junior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 23 de junho de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Abril de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Maio de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of RTR™ in osseous critical defects in rat thibiae", Protocol FOA nº 00249-2016, under the supervision of Eloi Dezan Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 23, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 30, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 30, 2018.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA 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

ANEXO 2

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Clinical Oral Implants Research

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Lisa J. A. Heitz-Mayfield

Impact Factor: 3.464

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 7/89 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 11/76 (Engineering Biomedical)

Online ISSN: 1600-0501

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Submission of Manuscripts](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#).

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in *Clinical Oral Implants Research*](#), [Author Services](#), [Wiley's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.



1. GENERAL

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing,

biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors

accredited. 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.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Clinical Oral Implants Research requires authors of pre-clinical animal studies submit with their manuscript the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines checklist.

Clinical Oral Implants Research requires authors of human observations studies in epidemiology to review and submit a STROBE statement. Authors who have completed the ARRIVE guidelines or STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist. Checklists should be included in the submission material under "Supplementary Files for Review".

Additional guidance on compliance with various research guidelines can be found on the Guideline Information - Enhancing the Quality and Transparency of Health Research: www.equator-network.org.

The ARRIVE guidelines can be found here: www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=1206&page=1357&skin=0

The STROBE checklists can be found here: www.strobe-statement.org/index.php?id=strobe-home

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material under "Supplementary Files for Review".

If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

The CONSORT checklist can be downloaded from: mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jdr/CONSORT+2010+checklist%5b1%5d.doc

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at CLROffice@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>).

It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. Please find the form below:

Conflict of Interest Disclosure Form

(If you encounter any problems when accessing the above form, please copy the link and open the form in an Internet Explorer browser)

2.5 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements(OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please

visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office at CLRoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page,

abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Single Blind Review

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* will be reviewed by two experts in the field. *Clinical Oral Implants Research* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' . Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. In vitro, in vivo, in situ and other Latin expressions are to be italicised. 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.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on 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 capitalised 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, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers,

email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material 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. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Clinical trial registration number and name of the trial register should be included in the Materials and Methods at the submission stage.

Authors who have completed the ARRIVE guidelines or STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise 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.

Main Text of Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

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 should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988).

Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

c) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **4**: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

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

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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.

Figures: 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 (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 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. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart:

>600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor. Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Clinical Oral Implants Research is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-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 <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including

