
GUSTAVO AUGUSTO GROSSI DE OLIVEIRA

**Avaliação comparativa do potencial
osteocondutor de quatro diferentes
substitutos ósseos em defeitos críticos em
calvárias de coelhos**

Araçatuba – São Paulo

2016

GUSTAVO AUGUSTO GROSSI DE OLIVEIRA

**Avaliação comparativa do potencial
osteocondutor de quatro diferentes
substitutos ósseos em defeitos críticos em
calvárias de coelhos**

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

Orientador: Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho

Araçatuba – São Paulo

2016

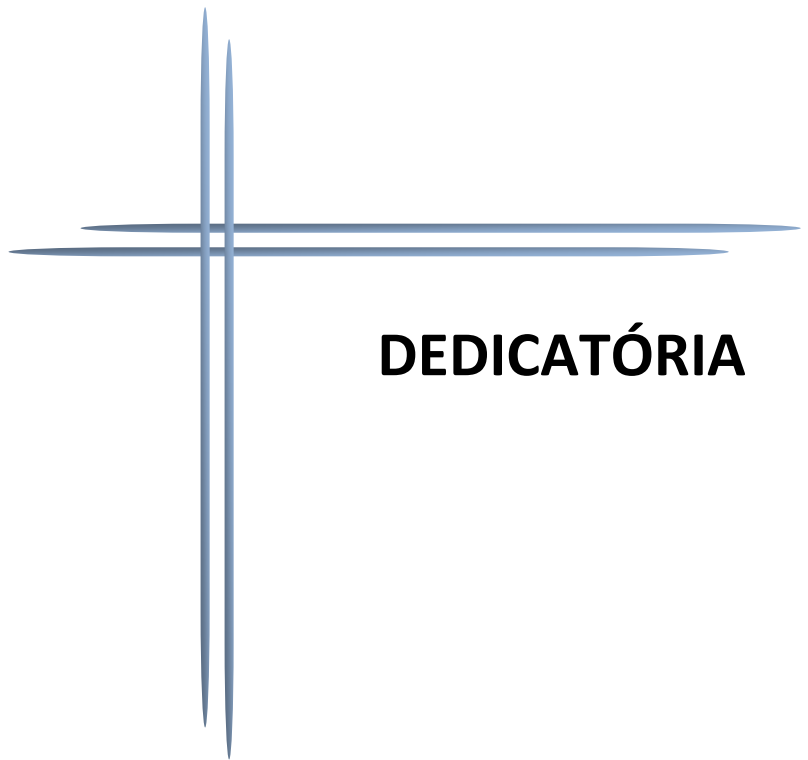
Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

O48a Oliveira, Gustavo Augusto Grossi.
Avaliação comparativa do potencial osteocondutor de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calvárias de coelhos / Gustavo Augusto Grossi Oliveira. - Araçatuba, 2016
77 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Osvaldo Magro Filho

1. Osso e ossos 2. Materiais biocompatíveis 3. Substitutos ósseos I. T.

Black D7
CDD 617.64



DEDICATÓRIA



Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, a coisa mais importante da minha vida:

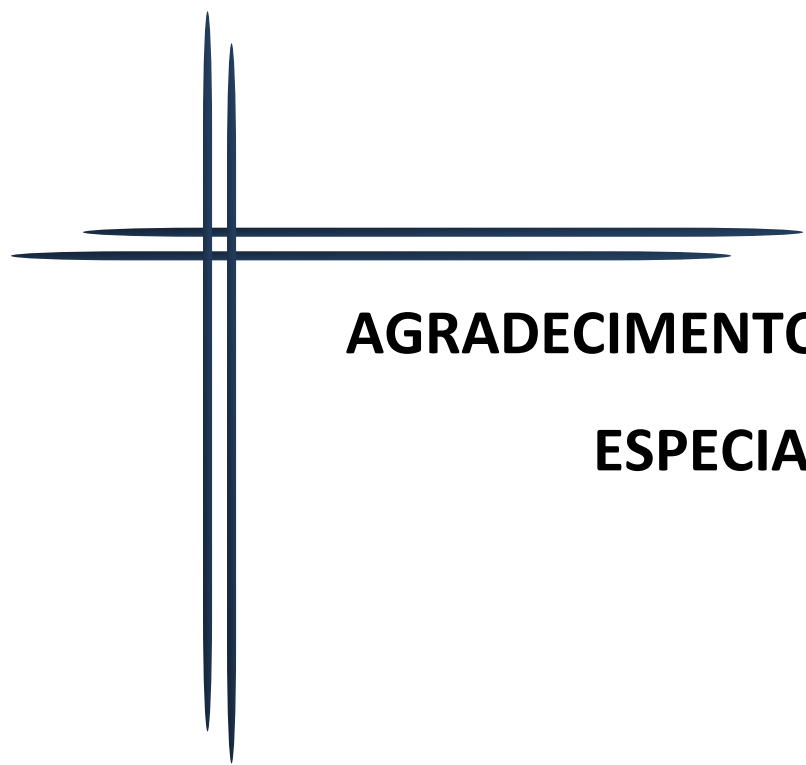
Vanessa Silva Grossi, minha esposa. Obrigado pelo apoio incondicional durante estes anos. Olho nossa história e transbordo de amor e orgulho. Sem você, nada teria sentido e nada seria possível. Te amo.

Meus filhos, **Manuela e Murilo Silva Grossi**. Vocês são minha alegria, minha paz, o motivo para eu acordar, de querer ser uma pessoa melhor. O amor que o papai sente por vocês é inexplicável e infinito.

Aos meus pais, **Helemilton Dias de Oliveira e Marlene Grossi Resende de Oliveira**, meus primeiros professores da vida. Obrigado por tudo que já fizeram e ainda fazem por mim. Sinto a vossa presença em mim todos os dias de minha vida.

A minha irmã, **Izabella Grossi de Oliveira**, obrigado pelo carinho irrestrito que nem a ausência e o tempo podem diminuir, seu irmão te ama.

Aos meus sogros **Manoel e Nilce**. Obrigado pelo carinho e apoio a mim e à toda minha família durante minha ausência. Minha gratidão é imensurável.



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS



Agradecimentos Especiais

Este trabalho só foi possível devido ao apoio de pessoas extraordinárias que tive a sorte de conhecer durante meu caminho. Minha imensa gratidão à vocês que facilitaram o caminho dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho Pela confiança depositada em mim e a paciência durante estes anos de doutorado. Obrigado pelo tratamento sempre gentil e solícito dispensado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani, meu amigo de longa data que dei os meus primeiros passos na cirurgia lado a lado e o ví crescer com habilidade e talento nato. Obrigado por ter me conduzido por tantas vezes neste trabalho com a paciência e serenidade que lhe é peculiar.

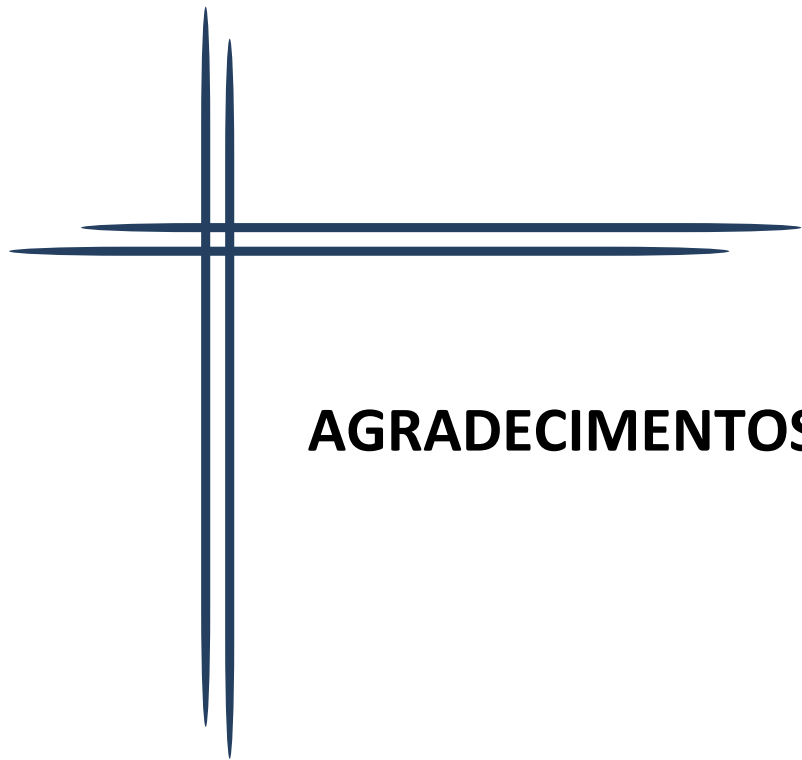
Ao Prof. Dr. Paulo Domingos Ribeiro Junior, por ter aceitado e possibilitado a realização desta pesquisa na Universidade do Sagrado Coração (USC). Obrigado pelo apoio irrestrito na parte experimental e confecção das lâminas.

A Prof. Roberta Okamoto, sempre afável, bem humorada e pacienciosa, tirou inúmeras dúvidas durante o doutorado e realizou o processamento e análise imunoistoquímica com surpreendente presteza e rapidez. Muito obrigado por tudo!

Aos Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Àvila Campos, Idelmo Rangel Garcia pelos ensinamentos oferecidos durante o curso e o delicioso clima de amizade cultivado em nosso departamento. Ofereço meu carinho e admiração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do doutorado.





AGRADECIMENTOS



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof Titular Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de realização do curso de Doutorado. Terminei este curso com uma profunda admiração e afeto por esta instituição que me proporcionou crescimento científico em um ambiente leve e descontraído.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Profa. Adj André Luiz Fraga Briso**.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, Valéria, Critiane e Lilian pela paciência no esclarecimento e resolução dos meus problemas burocráticos, vocês são o máximo!

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do doutorado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

À técnica de processamento laboratorial da USC, Maira Couto, pela eficiência e qualidade ímpar no processamento das lâminas deste trabalho. Receba meu reconhecimento e gratidão.

Aos pós-graduandos do curso de cirurgia da USC, Gabriel Cury Batista, Jordan Lima, Marcelo Munerato e Ricardo Senko bem como os técnicos Alexandre e David e a Veterinária Camila. Pela ajuda indispensável na parte experimental do trabalho.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Elisa, Igor, Julierme, Eduardo, Julio Maciel, Julio Oliveira, Sabrina,

André Fabris, Bianca, Ricardo, Carlos Timóteo, Gabriel Ferreira, William Moraes, William Caetano, Rafael Santiago, Tarik, Mônica, William Ricardo, Ana Carulina, Juliana Zorzi, Patrícia Bermejo, Fernanda Boss, Rodrigo). Obrigado pela troca de conhecimento nos corredores da instituição e pelos inúmeros momentos de alegria e descontração.

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.



LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

- Figura 1** – Organograma dos grupos experimentais. 29
- Figura 2** – Desenho esquemático do defeito ósseo criado em ambos os lados da calvária com trefina de 8 mm. 30
- Figura 3** – Aspecto histológico representativo dos biomateriais de preenchimento dos defeitos ósseos (BIO, BFL, CLN e LBP), no período experimental de 14 dias (coloração HE, aumento original 40X). Na amostra de CLN, observa-se presença de partículas com início de neoformação óssea na periferia e intensa atividade osteoblástica. Em LBP, presença de tecido conjuntivo sem presença de atividade osteoblástica. Os grupos BIO apresentaram partículas do biomaterial com osteogênese ativa, enquanto que BFL também mostrou presença do biomaterial entremeado por tecido conjuntivo frouxo, sem osteogênese ativa. 36
- Figura 4** – Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BIO 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do BIO (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) em íntimo contato com as partículas de BIO e início de deposição óssea (ON) (aumento original 40 X). 37
- Figura 5** - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BFL 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do BFL (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo frouxo ao redor das partículas (aumento original 40 X). 37
- Figura 6** - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial CLN 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Observa-se presença de neoformação óssea ao redor das partículas com presença de osso neofromado (ON), presença de células gigantes multinucleadas (CGM) (seta vermelha) e tecido conjuntivo organizado (TC) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo (TC) e osso neoformado (ON) ao redor das partículas (aumento original 40 X). 38
-

Figura 7 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial LBP 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do LBP e início de deposição óssea (ON) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor das partículas e início de deposição óssea (ON) (aumento original 40 X). 38

Figura 8 - Aspecto histológico representativo dos biomateriais no preenchimento dos defeitos ósseos (BIO, BFL, CLN e LBP), no período experimental de 40 dias (coloração HE, aumento original 40X). O padrão histológico demonstrou maior neoformação de tecido ósseo da periferia para o centro do defeito somente no grupo CLN. Os grupos BIO e BFL mantiveram-se as partículas de biomateriais entremeadas por tecido conjuntivo. O grupo LBP apresentou poucas partículas do biomaterial, porém, com áreas de osteogênese ativas. 40

Figura 9 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BIO 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do BIO e presença de osso neoformado (ON) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor das partículas o material (BIO) e formação de tecido osteóide (TO) (aumento original 40 X). 41

Figura 10 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BFL 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do BFL (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) (aumento original 40 X). 41

Figura 11 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial CLN 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC), deposição de tecido osteóide (TO) e diferenciação de células da linhagem osteoblástica (CLO) (aumento original 40 X). 42

Figura 12 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial LBP 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do LBP (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo

tecido conjuntivo organizado (TC) e presença de células da linhagem osteoblástica (CLO) (aumento original 40 X). 42

Figura 13 – Gráfico mostrando valores médios e desvio padrão de AON pelos grupos experimentais (BIO, BFL, CLN e LBP) utilizados no tempo 14 dias. 45

Figura 14 – Gráfico mostrando valores médios e desvio padrão de AON pelos grupos experimentais (BIO, BFL, CLN e LBP) utilizados no tempo 40 dias. 46

Figura 15 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcacão da proteína Runx2 nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X). 47

Figura 16 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcacão da proteína VEGF nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X). 48

Figura 17 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcacão da proteína OC nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X). 49

Figura 18 – Gráfico representando os escores das proteínas marcadas nos diferentes grupos de biomateriais período de 14 dias. 50

Figura 19 – Gráfico representando os escores das proteínas marcadas nos diferentes grupos de biomateriais período de 40 dias. 52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Diferença estatística entre as fontes de variação tempo e grupo (teste ANOVA dois fatores).	43
Tabela 2 – Interações entre os grupos de biomateriais (teste Tukey).	44
Tabela 3 – Interações entre os valores percentuais de neoformação óssea dos biomateriais utilizados na pesquisa no período de 14 dias (teste Tukey).	44
Tabela 4 – Interações entre os valores percentuais de neoformação óssea dos biomateriais utilizados na pesquisa no período de 40 dias (teste Tukey).	45
Tabela 5 – Escores da análise imunoistoquímica atribuídos aos grupos estudados (Runx2, VEGF e OC) aos 14 e 40 dias.	50

Lista de Abreviaturas

mm	= Unidade de medida milímetros
BIO	= Substituto ósseo Bio-Oss®
LBP	= Substituto ósseo Lumina Bone Porus®
BFL	= Substituto ósseo Bone Fill®
CLN	= Substituto ósseo Clonos dental®
AON	= Área de osso neoformado
Runx2	= Fator 2 de transcrição relacionado a Runt
VEGF	= Fator de crescimento do endotélio vascular
OC	= Osteocalcina
α	= Coeficiente estatístico de confiabilidade
p	= Nível de significância estatística (p,0,05)
mg/kg	= Unidade de medida miligramas por quilograma
IM	= Via de administração intramuscular
%	= Percentual
RPM	= Rotação por minuto
ml	= Unidade de volume mililitro
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	= Corantes Hematoxilina e Eosina
μm^2	= Unidade de medida micrometros ao quadrado
ON	= Osso neoformado
TC	= Tecido conjuntivo

CLO	= Células da linhagem osteoblástica
TO	= Tecido osteóide
BTCP	= β -tricálcio fosfato
BMP	= Proteína óssea morfogenética

Sumário

Avaliação comparativa do reparo ósseo de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calvárias de coelhos	20
Resumo	21
Abstract	23
Introdução	25
Materiais e métodos	28
Resultados	35
Discussão	53
Referências	58
Anexos	63

Avaliação comparativa do potencial osteocondutor de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calvárias de coelhos

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Clinical Oral Implants Research*

Grossi-Oliveira GA. Avaliação comparativa do reparo ósseo de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calvárias de coelhos [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

Resumo

Objetivos: Avaliar o potencial osteocondutor de quatro biomateriais utilizados no preenchimento de defeitos ósseos críticos em calvárias de coelhos.

Material e métodos: 24 coelhos machos *albinus* foram submetidos à confecção de defeito ósseo de 8 mm de diâmetro na calvária bilateralmente. Os grupos foram divididos aleatoriamente pelos materiais utilizados: hidroxiapatita bovina - Bio-oss®(BIO), Lumina Bone Porus®(LBP) e Bonefill®(BFL) e, um material aloplástico - Clonos® (CLN), submetidos à eutanásia aos 14 e 40 dias após a cirurgia. A descalcificação das peças foi realizada e assim, as lâminas obtidas foram submetidas às análises histológica; análise histométrica, por meio da mensuração da área de osso neoformado (AON) no centro dos defeitos; análise imunohistoquímica, por meio da marcação do fator 2 de transcrição relacionado a Runt (Runx2), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e osteocalcina (OC). Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística ($\alpha=0,05$).

Resultados: O grupo CLN mostrou maior AON nos dois períodos analisados em relação aos demais grupos ($p<0,001$, Teste Tukey). Aos 14 dias, o BIO foi superior quanto a AON aos grupos LBP e BFL, entretanto aos 40 dias, o grupo LBP superou os resultados do BIO ($p<0,001$, Teste Tukey). A imunomarcação para Runx2 mostrou diminuição na intensidade para BIO aos 40 dias, enquanto que aumentou para LBP ($p<0,05$, Teste

Tukey). O CLN mostrou aumento para OC em comparação aos demais grupos em ambos os períodos analisados ($p < 0,05$, Teste Tukey).

Conclusões: O CLN apresentou o melhor comportamento osteocondutor em defeitos críticos na calvária de coelhos.

Palavras-Chaves: Osso e ossos, Materiais biocompatíveis, Substitutos ósseos

Grossi-Oliveira GA. Comparative evaluation of bone repairment with four different bone substitutes in critical size defects in rabbit's calvaria. [Thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

Abstract

Objectives: To evaluate the osteoconductive potential of four biomaterials used in bone defects filling in rabbit's calvaria.

Methods: 24 male *Albinus* rabbits underwent to bone defect creation of 8 mm in diameter bilaterally in calvaria region. The groups were divided according to the bone substitute used to fill the calvaria defect: bovine hydroxyapatite - Bio-Oss[®] (BIO), Lumina Bone Porus[®] (LBP) and Bonefill[®] (BFL), and an alloplastic material - Clonos[®] (CLN), and were submitted to euthanasia at 14 and 40 days after the surgery. The removed pieces were processed, histological slides were obtained and subjected to histological analysis; histometric analysis, through the measurement of newly formed bone area (NB) in the center of the defects; immunohistochemical analysis, by labelling the Runt-related transcription factor 2 (Runx2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and osteocalcin (OC). Quantitative data were statistically analyzed ($\alpha = 0.05$).

Results: The CLN group showed greater AON in both periods analyzed in relation to the other groups ($p < 0.001$, Tukey test). At 14 days, the AON showed greater values in BIO in relation with LBP and BFL groups, however, after 40 days, the LBP group surpassed the results of BIO ($p < 0.001$, Tukey test). The immunostaining showed a decrease in Runx2 intensity in BIO after 40 days, while it increased for LBP ($p < 0.05$, Tukey test). The CLN showed increased OC compared to the other groups in both periods analyzed ($p < 0.05$, Tukey test).

Conclusions: The CLN showed the best osteoconductive behavior in critical defects in rabbit's calvaria.

Key-words: Bone, Biocompatible materials, Bone substitutes.

Introdução

A utilização dos implantes dentários para a reabilitação bucal dos pacientes desdentados totais ou parciais tornou-se uma modalidade terapêutica bastante promissora nas últimas décadas, devolvendo aos pacientes as funções do sistema estomatognático por meio do restabelecimento mastigatório, bem como a estética, melhorando a qualidade de vida dos mesmos (Goiato, et al. 2009, Johannsen, et al. 2012, Paulus & Martin 2013, Takemae, et al. 2012, Vogel, et al. 2013).

Após a perda dos elementos dentários, fisiologicamente estabelece-se o processo de reabsorção óssea em espessura e altura, de forma mais acelerada na maxila quando comparada com a mandíbula, o que impossibilita a instalação dos implantes osseointegráveis sem que a região seja reconstruída anteriormente com enxertos ósseos (Pietrokovski 2013, Rachana, et al. 2012, Vera, et al. 2012). Neste contexto, diversos biomateriais podem ser utilizados para a reconstrução óssea dos maxilares atrofiados, tais como os enxertos autógenos, homogêneos, heterogêneos e de forma restrita, os materiais aloplásticos (Kolk, et al. 2012, Liu & Kerns 2014, Vahabi, et al. 2012).

A implantodontia é uma modalidade de tratamento altamente previsível no tocante à reabilitação bucal (Hayacibara, et al. 2013, Penarrocha-Oltra, et al. 2012). Entretanto, um fator limitante para a colocação dos implantes osseointegráveis é a falta de osso nos rebordos alveolares (Esposito, et al. 2006), que geralmente ocorre em pacientes que sofreram traumatismos dentoalveolares (Mimura & Fukuyo 2013), extrações dentárias traumáticas (Caplanis, et al. 2005), ausência dentária congênita (Paulus & Martin 2013), ou com outras patologias que envolvam maxila e mandíbula

(de Oliveira Diniz, et al. 2012). O volume ósseo inadequado compromete a estabilidade primária (Penarrocha-Oltra, Demarchi, Maestre-Ferrin & Penarrocha-Diago 2012, Ravald, et al. 2012).

Quando o processo de reabsorção é instalado nos maxilares atingindo progressivamente diferentes graus de atrofia, algumas alternativas para a reconstrução dos mesmos estão disponíveis, que variam de uma simples reabilitação com prótese fixa, até o preenchimento dos defeitos com enxertos ósseos (Dinopoulos, et al. 2012, Kolk, et al. 2012).

Os enxertos ósseos autógenos ainda são considerados como “padrão ouro” principalmente por serem os únicos com propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (Pike & Boyne 1973, Smiler, et al. 2007, Soltan, et al. 2005). Em algumas situações em que os defeitos ósseos são extensos atrelados a algumas contraindicações para o enxerto autógeno (Lundgren, et al. 1996), tais como impossibilidade do paciente submeter-se a anestesia geral, quantidade limitada de enxerto e alta morbidade do procedimento cirúrgico (Al-Nawas & Schiegnitz 2014), é necessário lançar mãos de outras técnicas.

Devido os inconvenientes da remoção de osso autógeno para a realização de reconstruções ósseas, novos materiais são desenvolvidos com o intuito de auxiliar o reparo ósseo em regiões onde se pretende manter ou devolver volume ósseo (Blank & Levy 1999). Estes materiais têm por finalidade manter o arcabouço tridimensional da região a ser reparada e sua superfície servir de estrutura condutora dos osteoblastos para a migração e deposição de matriz óssea (Polo-Corrales, et al. 2014). Apesar dos substitutos ósseos possuírem a mesma finalidade de biocondução, a qualidade da

formação óssea pode diferir entre características físico-químicas. Podemos afirmar então, que o método de fabricação é interamente responsável pelas propriedades conferidas ao biomaterial, e logo, sua capacidade de interagir com o leito ósseo receptor.(Urist 2002).

Bio-Oss® (BIO) é um substituto ósseo natural obtido a partir da parte mineral do osso bovino, o qual favorece a proliferação de vasos sanguíneos e a imigração de células ósseas através do sistema de poros interconectante de malha larga, de acordo com o fabricante (Bio-Oss®). Existe grande quantidade de estudos que o indicam como um substituto ósseo que é capaz de conferir excelente padrão de formação óssea nos sítios onde é utilizado (Acil, et al. 2000, Gokhale & Dwarakanath 2012, Norton, et al. 2003)

Devido a essa ausência notória de evidências científicas em meio aos biomateriais, o presente trabalho se propõe a elucidar a neoformação óssea e o potencial osteocondutor em defeitos críticos de calvária de coelhos de três substitutos ósseos comparando com o Bio-Oss® (controle positivo), nos períodos de 14 e 40 dias. A hipótese deste estudo é que haveria diferença no parâmetro analisado entre os grupos experimentais, com provável superioridade do Bio-Oss® e a hipótese nula é que não haveria diferença estatística entre os grupos.

Materiais e métodos

Inicialmente o projeto foi submetido à apreciação e aprovação pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade do Sagrado Coração (USC/Bauru) por meio do número de protocolo 18/14.

Desenho Experimental

Vinte e quatro coelhos machos *albinus* (Grupo Genético de Botucatu, São Paulo, Brasil), com 3 a 4 meses de idade e peso corporal entre 3,5 e 4 kg foram utilizados para esta pesquisa. Cada animal recebeu 2 substancias na calvária, totalizando 48 peças obtidas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão - ração sólida (Pro coelho, Primor, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum* no Biotério da Universidade do Sagrado Coração– USC/Bauru, nos momentos pré e pós-operatórios. Estes animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de defeitos críticos de 8 mm em calvária bilateralmente e subsequente preenchimento com substituto ósseo, em que os grupos foram distribuídos aleatoriamente. O período de eutanásia compreendeu 14 e 40 dias pós-cirurgia e assim, foram obtidos 6 defeitos preenchidos por cada biomaterial utilizado na pesquisa.

Os grupos foram divididos aleatoriamente de acordo com o biomaterial utilizado no preenchimento do defeito crítico: Bio-Oss (BIO), Lumina Bone Porus (LBP), Bonefill (BFL) ou Clonos Dental (CLN) (Fig. 1).

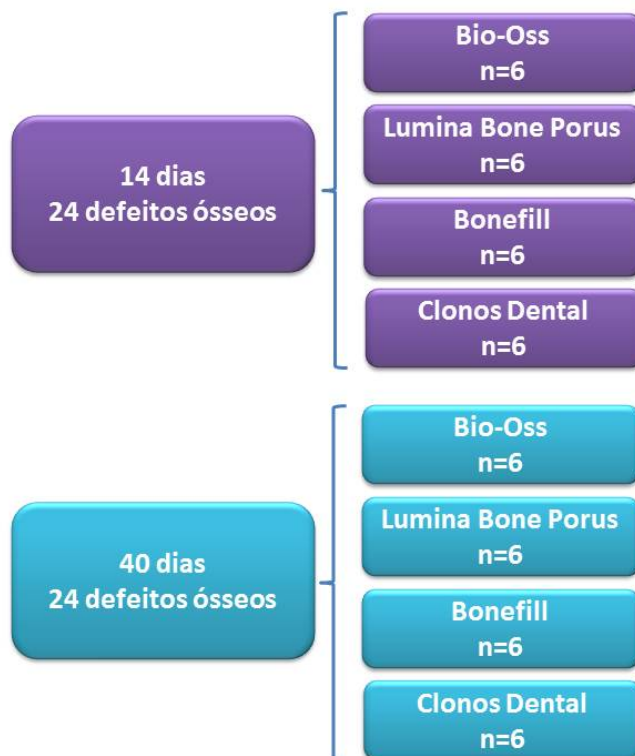


Figura 1 – Organograma dos grupos experimentais.

Cirurgia

Oito horas previamente à cirurgia, os animais foram mantidos em jejum. Os mesmos foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Quetamina intramuscular (IM) (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil). A tricotomia na região da calvária foi realizada e posteriormente a antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico. A região recebeu infiltração local com mepivacaína 2% e adrenalina 1: 200.000 (DFL, Indústria & Comércio S.A, Rio de Janeiro, Brazil). Todos os procedimentos foram realizados com rigorosa manutenção da cadeia asséptica e pelo mesmo cirurgião.

A incisão foi confeccionada linearmente na calvária, mais precisamente na região sagital, com 4 cm de extensão. A incisão envolveu inicialmente a pele, tecido subcutâneo, músculo occipitofrontal e gálea aponeurótica, seguida da incisão do pericrânio e com isso, exposição da área doadora.

Para a remoção dos blocos ósseos de espessura total, foi utilizada broca trefina de 8 mm de diâmetro externo (Fig. 2), montada em contra-ângulo redutor (20:1) e em motor de implante na rotação de 1200 rpm e, irrigação abundante com solução salina fisiológica a 0,9% (Faria, et al. 2008, Hawthorne, et al. 2013, Pedrosa, et al. 2009).

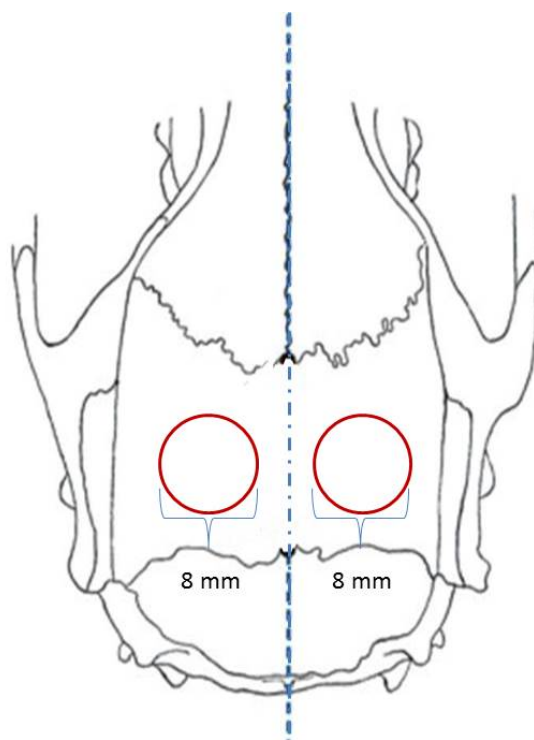


Figura 2 – Desenho esquemático do defeito ósseo criado em ambos os lados da calvária com trefina de 8 mm.

Após a criação dos defeitos ósseos, estes foram preenchidos com biomateriais heterógenos de acordo com o grupo, umedecidos em soro fisiológico 0,9%. Os planos

anatômicos internos foram suturados com fio Poliglactina 910 4-0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) e fio monofilamentar (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos na derme. No pós-operatório, os animais receberam administração IM de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de tramadol (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil), no total de 3 doses.

Doze animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose excessiva de Pentobarbital de Sódico (200 mg/kg), em cada tempo de observação, de 14 e 40 dias após a cirurgia.

Processamento laboratorial

Após a eutanásia dos animais, as peças foram reduzidas com serra oscilatória, respeitando 2 mm de margem anterior e posterior ao bloco ósseo enxertado. As peças foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas, descalcificação em EDTA (10%) e em seguida, a desidratação utilizando uma sequência de alcoóis. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 5 µm de espessura, transversal ao defeito e montados em lâminas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Mallory (Pedrosa, Okamoto, Faria, Arnez, Xavier & Salata 2009) e outras para as reações de imunoistoquímica.

Previamente a realização das análises histológicas e imunoistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecia quais grupos pertenciam. Este estudo foi simples cego, onde um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

Análise histológica

As imagens obtidas foram capturadas no microscópio óptico convencional (Leica Aristoplan Microsystems Leitz, Benshein, Alemanha), acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador.

A avaliação histológica constou da investigação dos eventos que ocorreram na área central do defeito ósseo e a relação do osso remanescente e osso neoformado entre as partículas dos substitutos utilizados para o preenchimento do defeito, nos períodos de 14 e 40 dias pós-operatórios.

Análise histométrica

Após a coloração das lâminas com HE (Merck & Co., Inc., Germany), as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador. Foram obtidas três imagens de cada defeito (objetiva de 40X) e estas foram digitalizadas e gravadas em arquivos TIFF. No programa Adobe Photoshop CS6, as imagens foram unidas para a obtenção de imagens panorâmicas dos defeitos, através

da ferramenta “Photomerge”. Por fim, as imagens foram analisadas no *software* analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada).

A análise histométrica foi realizada por meio do cálculo da área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. Para tanto, antes da análise, o programa foi calibrado utilizando uma régua de calibração que foi fotografada em microscópio com a mesma objetiva das lâminas histológicas (aumento original de 40X). Assim, foi mensurada a área de osso neoformada (AON) em μm^2 , dos diferentes biomateriais utilizados e períodos experimentais (14 e 40 dias).

Análise imunoistoquímica

A reação de imunoistoquímica foi realizada por meio da detecção pela imunoperoxidase. Após a desparafinização dos cortes histológicos, a atividade da peroxidase endógena será inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) e o bloqueio da biotina endógena através de leite destanado. Os anticorpos primários utilizados foram contra Runx2 ,VEGF e OC (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) (Pedrosa, Okamoto, Faria, Arnez, Xavier & Salata 2009).

O anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories) foi utilizado e o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector laboratories, Burlingame, CA, EUA) e, a diaminobenzidina (Dako, Glostrup Denmark) como cromógeno. Após a revelação das reações com o cromógeno, foi realizada a contra-coloração dos cortes histológicos utilizando a Hematoxilina de

Harris. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “escores” de acordo com a área imunomarcada no processo de reparo ósseo. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e a intensidade das imunomarcações foi determinada semiquantitativamente, com escores de 0 a 3, sendo 0 para ausência de imunomarcação, 1 para imunomarcação leve, 2 para imunomarcação moderada e 3 para marcação intensa (Pedrosa, Okamoto, Faria, Arnez, Xavier & Salata 2009).

Análise estatística

Para a comparação dos dados histométricos (AON e escores da imunoistoquímica), foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, em que foi observado homogeneidade dos resultados ($p > 0,05$). As comparações por meio das interações isoladas (biomateriais, tempo) e a interação biomateriais *versus* tempo, foram realizadas pela Análise de Variância ANOVA 2 fatores e para os valores que mostraram significância estatística, aplicou-se o teste Tukey. Todos os testes foram realizados no programa estatístico SigmaPlot 13.0 (Scientific Data Analysis and Graphing Software, San Jose, CA, USA), o qual foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

Análise histológica por período (14 e 40 dias)

14 dias

BIO – perifericamente observa-se grânulos do biomaterial circundado por tecido ósseo neoformado e osteogênese ativa, em meio a tecido de granulação ricamente celularizado e vascularizado. Na região central do defeito, observam-se grânulos do biomaterial em meio a tecido conjuntivo frouxo moderadamente celularizado e rico em vasos sanguíneos (Fig. 3 e 4).

BFL – os fragmentos do biomaterial mostraram-se com aspecto de tecido ósseo cortical não-viável, os quais apresentam-se permeados ora por tecido de granulação ricamente celularizado, ora por tecido conjuntivo frouxo. Não se observa atividade osteogênica ou de neoformação óssea em contato com o biomaterial. Perifericamente, tem-se tecido ósseo neoformado em contato com as paredes do defeito (Fig. 3 e 5.).

CLN – observam-se fragmentos irregulares do biomaterial em meio a tecido de granulação ricamente celularizado. Sobre suas superfícies, é possível visualizar discreta e direta deposição de tecido ósseo neoformado e intensa atividade osteoblástica (Fig. 3 e 6).

LBP – os grânulos do biomaterial mostraram-se de diversos tamanhos, alguns discretamente arredondados. De permeio tem-se tecido conjuntivo rico em células e ausência de neoformação óssea associada (Fig. 3 e 7).

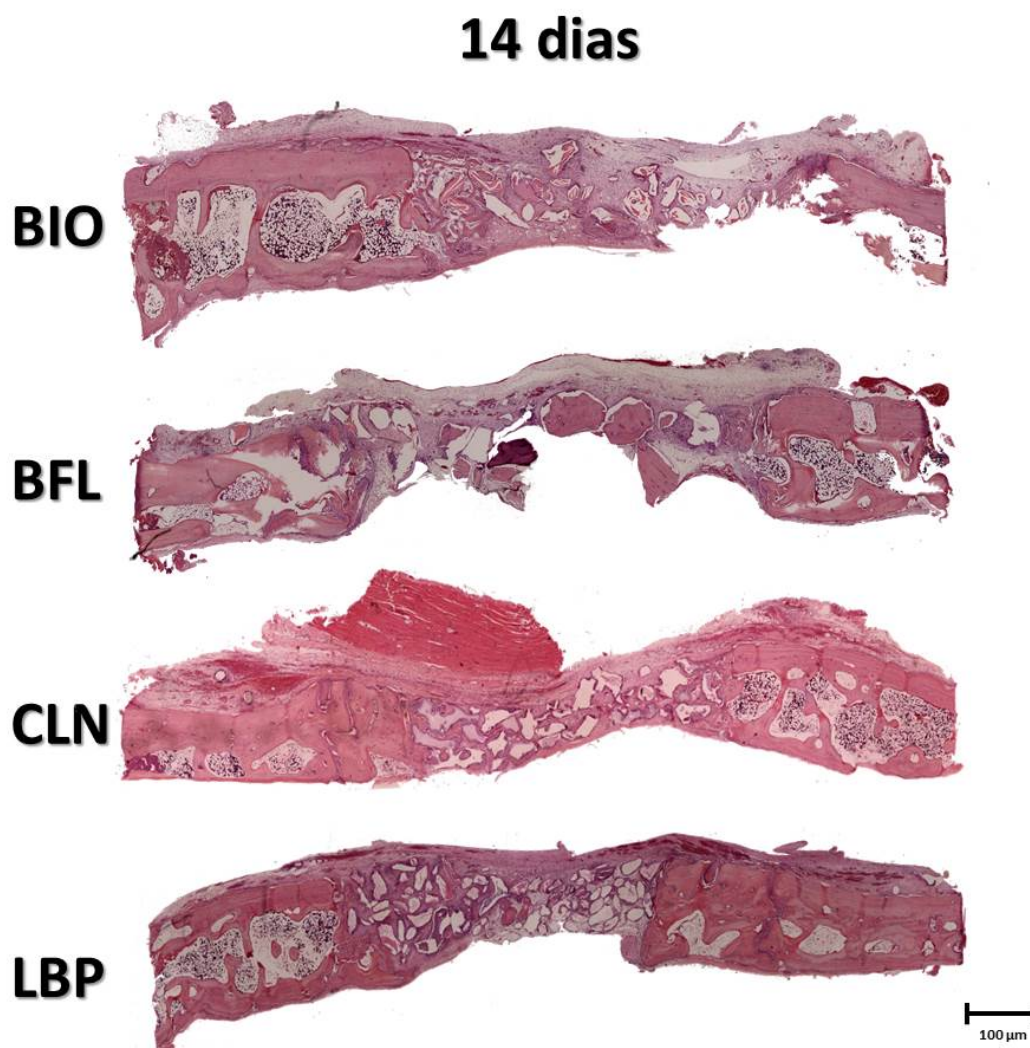


Figura 3 – Aspecto histológico representativo dos biomateriais de preenchimento dos defeitos ósseos (BIO, BFL, CLN e LBP), no período experimental de 14 dias (Coloração HE, aumento original 40X). Na amostra de CLN, observa-se presença de partículas com início de neoformação óssea na periferia e intensa atividade osteoblástica. Em LBP, presença de tecido conjuntivo sem presença de atividade osteoblástica. Os grupos BIO apresentaram partículas do biomaterial com osteogênese ativa, enquanto que BFL também mostrou presença do biomaterial entremeado por tecido conjuntivo frouxo, sem osteogênese ativa.

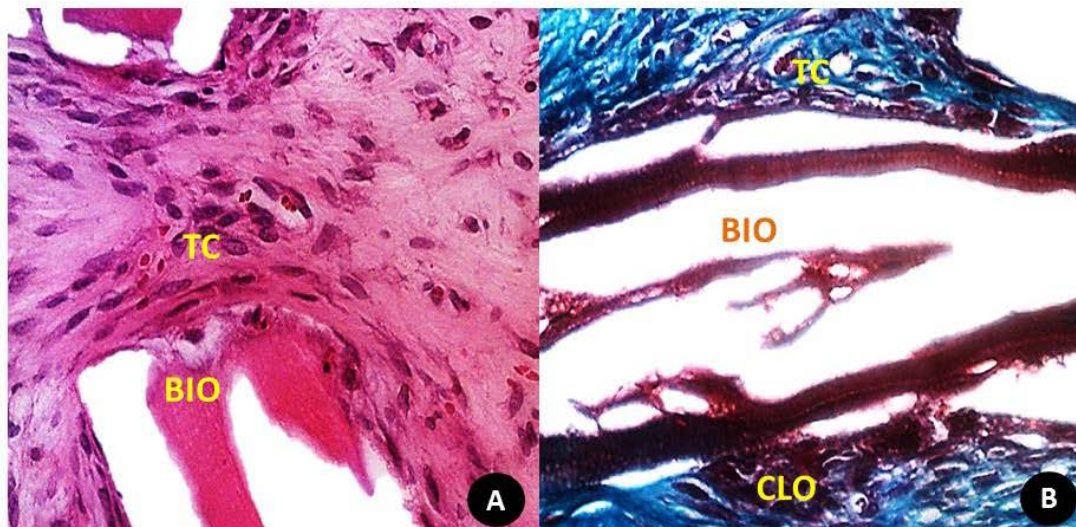


Figura 4 – Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BIO 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do BIO (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) em íntimo contato com as partículas de BIO e início de deposição óssea (CLO) (aumento original 40 X).

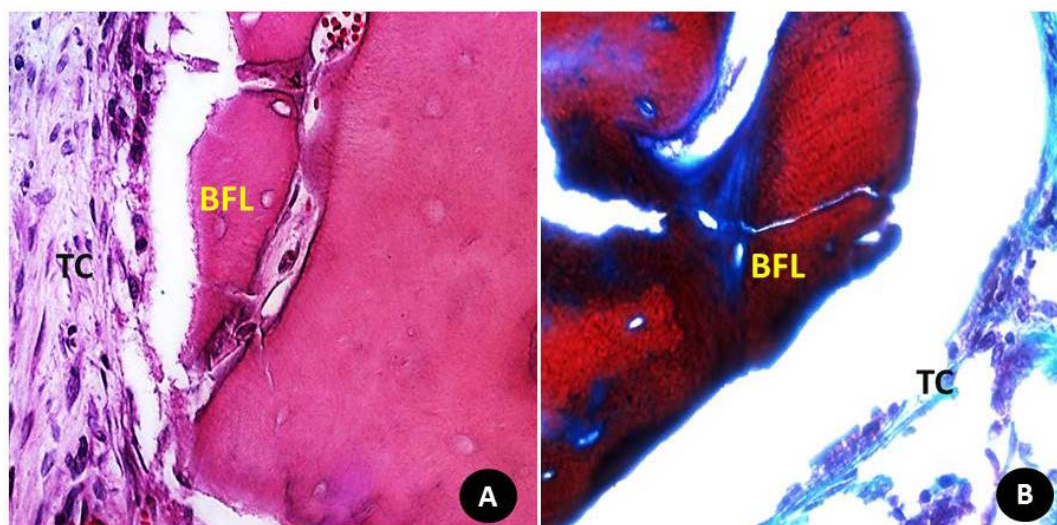


Figura 5 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BFL 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do BFL (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo frouxo ao redor das partículas (aumento original 40 X).

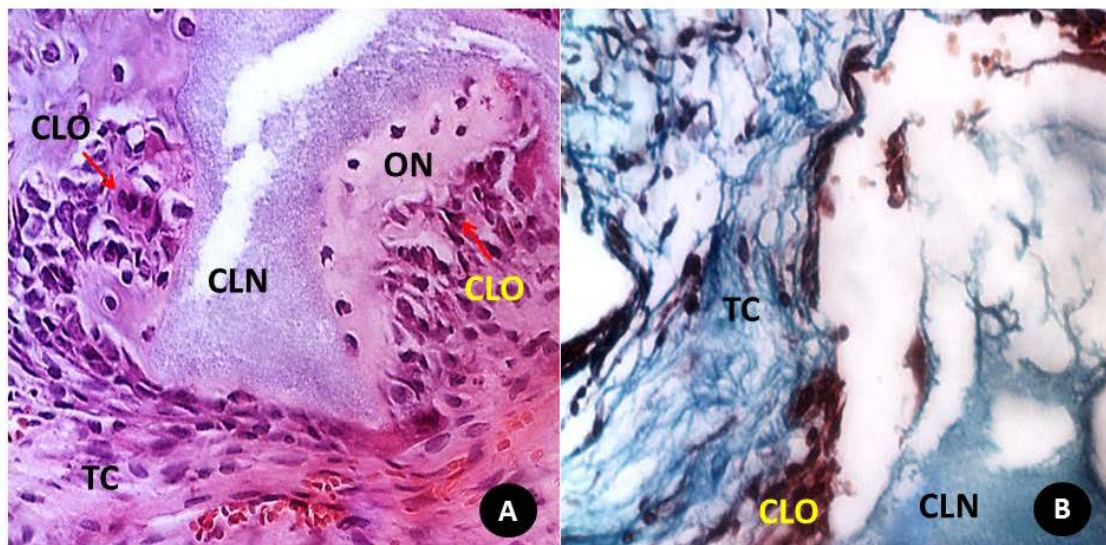


Figura 6 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial CLN 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Observa-se presença de neoformação óssea ao redor das partículas com presença de osso neofromado (ON), presença de células da linhagem osteoblástica (CLO) (seta vermelha) e tecido conjuntivo organizado (TC) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo (TC) e diferenciação das células da linhagem osteoblástica (CLO) ao redor das partículas (aumento original 40 X).

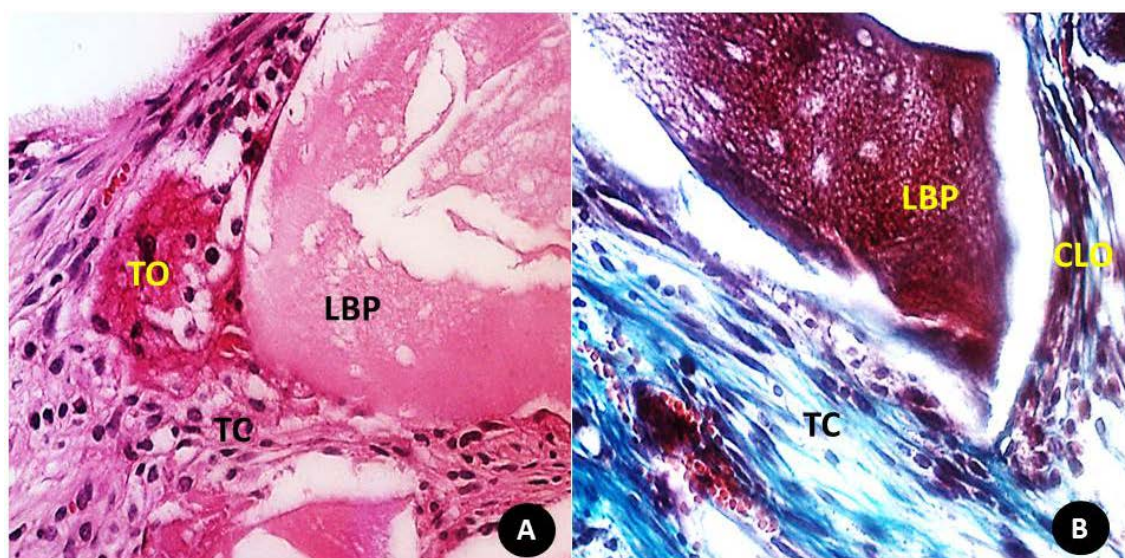


Figura 7 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial LBP 14 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do LBP e início de deposição óssea com formação de tecido osteóide (TO) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor das partículas e início da diferenciação das células de linhagem osteoblástica (CLO) (aumento original 40 X).

40 dias

BIO – aos 40 dias, observam-se eventuais trabéculas ósseas em fase de maturação, apresentando bordas arredondadas e isoladas. De permeio aos grânulos do biomaterial, tem-se predominância de tecido conjuntivo fibroso com discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso, bem como focos de tecido adiposo maduro. Observam-se eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CGM) na superfície do biomaterial (Fig. 8 e 9).

BFL – neste período notam-se fragmentos do biomaterial permeados por tecido conjuntivo fibroso apresentando focos de intenso infiltrado inflamatório mononuclear, e circundadas por CGM associadas a leucócitos mononucleares (Fig. 8 e 10).

CLN – aos 40 dias, observa-se tecido ósseo lamelar em remodelação circundando as partículas do biomaterial, marcado por numerosas linhas de reversão. Na região central do defeito, tem-se ainda a presença de tecido conjuntivo fibroso frouxo, e eventuais regiões de osteogênese. Nota-se reação tipo corpo estranho pela presença de inúmeras CGMs na superfície dos grânulos (Fig. 8 e 11).

LBP – observam-se poucos grânulos do biomaterial em meio a tecido conjuntivo fibroso frouxo e eventuais focos de tecido adiposo, sem associação de neoformação óssea. Observa-se trabécula óssea madura em meio à região central do defeito em processo de remodelação. Notam-se também, regiões de osteogênese ativa (Fig. 8 e 12).

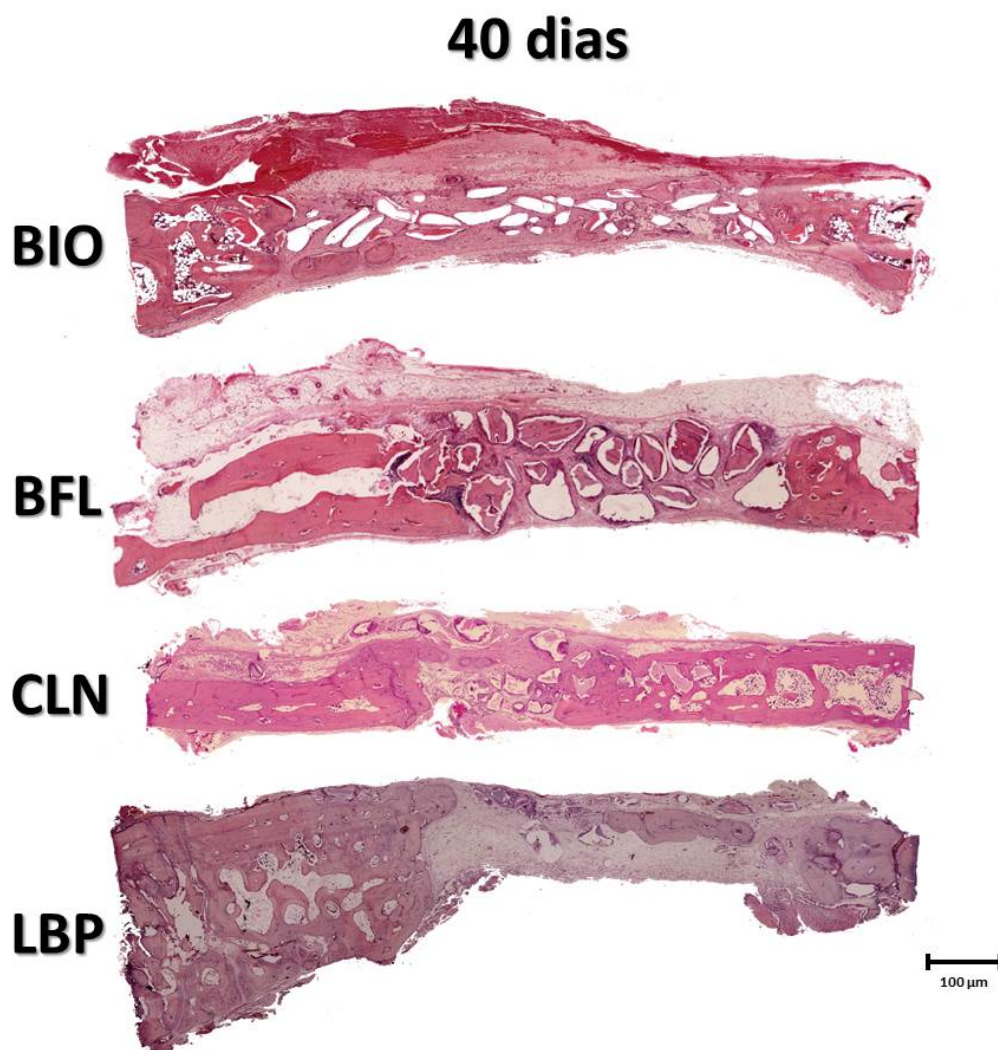


Figura 8 - Aspecto histológico representativo dos biomateriais no preenchimento dos defeitos ósseos (BIO, BFL, CLN e LBP), no período experimental de 40 dias (Coloração HE, aumento original 40X). O padrão histológico demonstrou maior neoformação de tecido ósseo da periferia para o centro do defeito somente no grupo CLN. Os grupos BIO e BFL mantiveram-se as partículas de biomateriais entremeadas por tecido conjuntivo. O grupo LBP apresentou poucas partículas do biomaterial, porém, com áreas de osteogênese ativas.

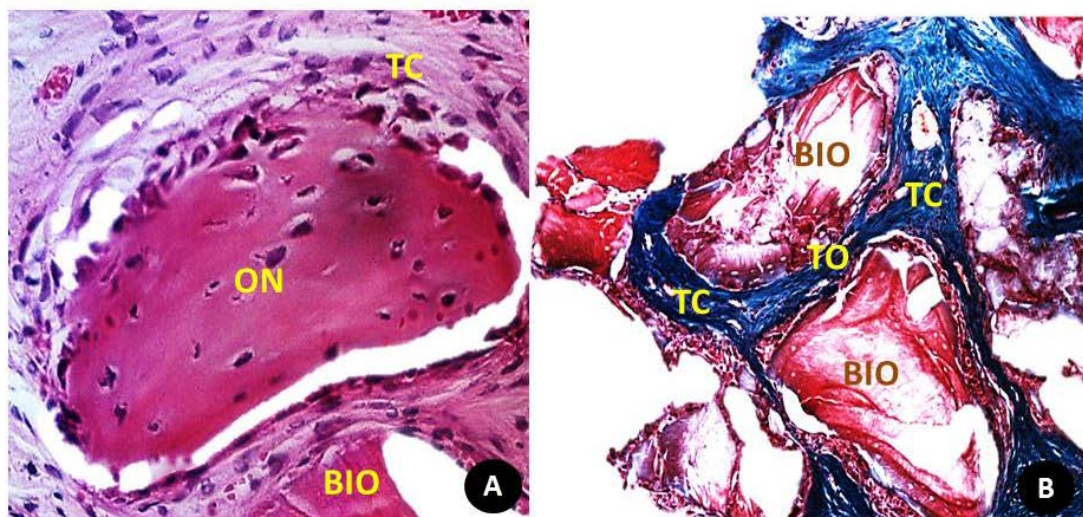


Figura 9 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BIO 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor de partículas do BIO e presença de osso neoformado (ON) (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) ao redor das partículas o material (BIO) e formação de tecido osteóide (TO) (aumento original 40 X).

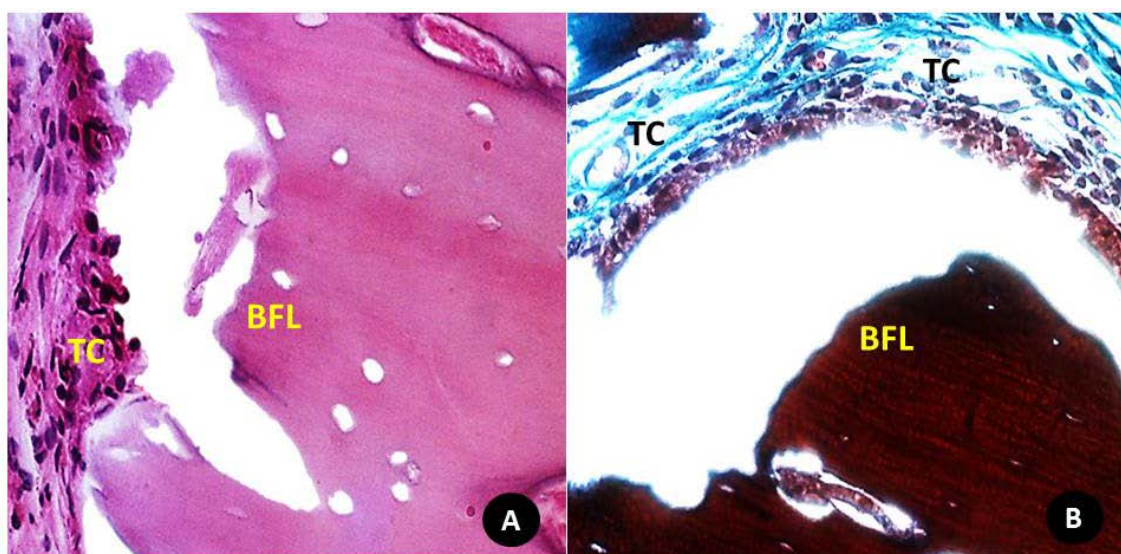


Figura 10 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial BFL 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do BFL (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) (aumento original 40 X).

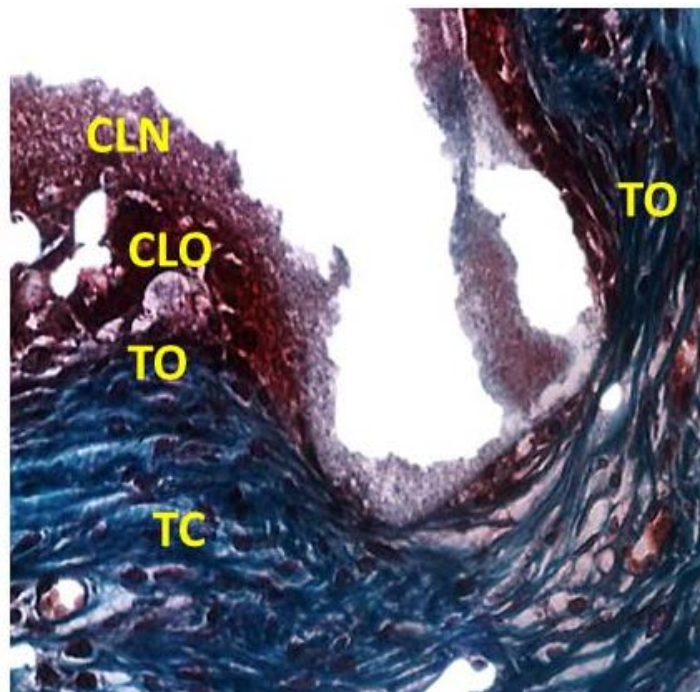


Figura 11 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial CLN 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC), deposição de tecido osteóide (TO) e diferenciação de células da linhagem osteoblástica (CLO) (aumento original 40 X).

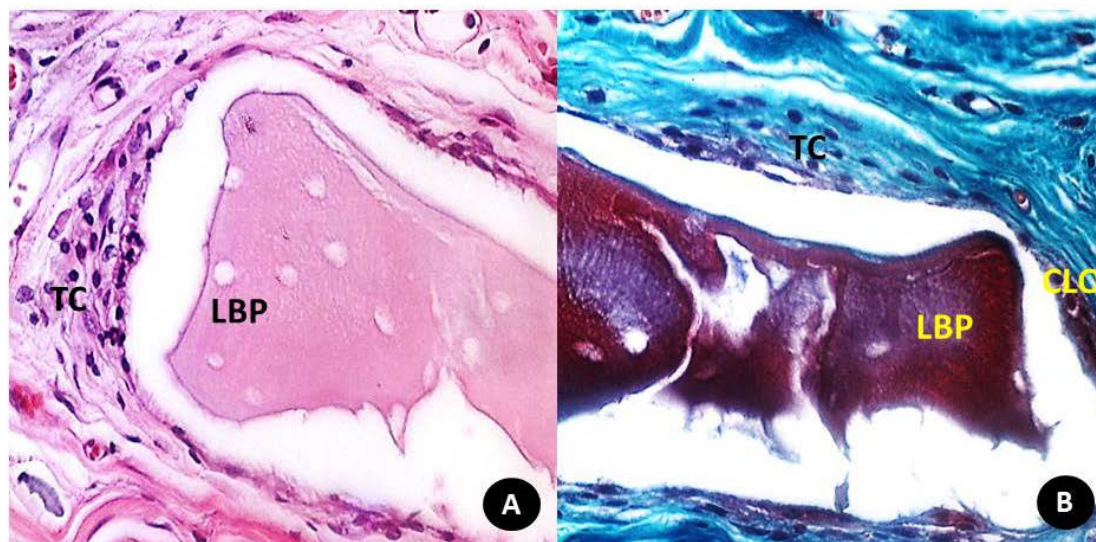


Figura 12 - Aspecto histológico em detalhe da relação do biomaterial LBP 40 dias e tecidos circunjacentes na região central do defeito. A – Notou-se tecido conjuntivo (TC) ao redor de partículas do LBP (HE, aumento original 40 X). B- Coloração de tricômico de Mallory exibindo tecido conjuntivo organizado (TC) e presença de células da linhagem osteoblástica (CLO) (aumento original 40 X).

Análise Histométrica

Independente das interações, sejam isoladas (biomateriais, tempo) ou a interação biomateriais vs tempo, todas apresentaram significância estatística ($p < 0,001$, ANOVA 2 fatores) (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferença estatística entre as fontes de variação tempo e grupo (teste ANOVA dois fatores).

Fator de Variação	*p
Biomateriais	<0,001
Tempo	<0,001
Biomateriais x Tempo	<0,001

* $p < 0,005$ denota significância estatística

Avaliando os dados intragrupos, todos os materiais demonstraram diferenças estatisticamente significantes comparando o período de 14 com 40 dias. ($p < 0,001$)

Quando observamos a média de porcentagem de neoformação óssea independente do tempo, os grupos BIO e LBP demonstraram comportamento semelhante, a comparação entre os demais grupos apresentou diferenças significantes entre eles ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Interações entre os grupos de biomateriais (teste Tukey).

Biomateriais (Interações)	Diferença (%)	p	*p<0,05 (significância)
CLN vs BFL	23,56	<0,001	Sim
CLN vs BIO	17,00	<0,001	Sim
CLN vs LBP	16,79	<0,001	Sim
LBP vs BFL	6,76	<0,001	Sim
LBP vs BIO	0,20	0,934	Não
BIO vs BFL	6,56	<0,001	Sim

*p<0,05 denota significância estatística

Observando isoladamente a neoformação óssea presente no período de 14 dias, o grupo CLN apresentou os maiores valores em relação aos demais grupos ($21,62 \pm 1,23$). O grupo BIO apresentou média percentual de $7,52 \pm 0,27$ neoformação óssea, o grupo LBP $2,55 \pm 0,3$, e o grupo BFL $2,85 \pm 0,56$. Ao comparar os valores entre os biomateriais, LBP e BFL não houve diferença estatística entre eles, as demais interações apresentaram diferenças significativa ($p<0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Interações entre os valores percentuais de neoformação óssea dos biomateriais utilizados na pesquisa no período de 14 dias (teste Tukey).

Biomateriais (Interações)	Diferença (%)	p	*p<0,05 (significância)
CLN vs LBP	19,07	<0,001	Sim
CLN vs BFL	18,76	<0,001	Sim
CLN vs BIO	14,10	<0,001	Sim
BIO vs LBP	4,97	<0,001	Sim
BIO vs BFL	4,66	<0,001	Sim
BFL vs LBP	0,30	0,93	Não

*p<0,05 denota significância estatística.

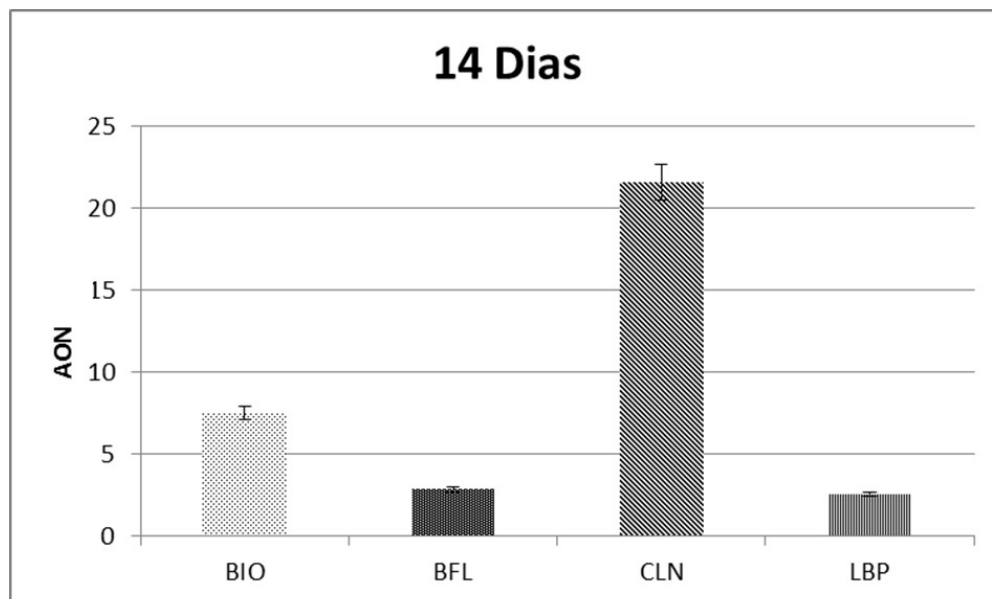


Figura 13 – Gráfico mostrando valores médios e desvio padrão de AON pelos grupos experimentais (BIO, BFL, CLN e LBP) utilizados no tempo 14 dias.

No período de 40 dias, os valores apresentados foram de $32,29 \pm 1,2$ para CLN, $12,38 \pm 0,73$ para BIO, $17,75 \pm 0,78$ para LBP e $3,92 \pm 0,3$ para BFL. Todas as interações entre grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre elas ($p < 0,001$ teste Tukey) (Tabela 4).

Tabela 4 – Interações entre os valores percentuais de neoformação óssea dos biomateriais utilizados na pesquisa no período de 40 dias (teste Tukey).

Biomateriais (Interações)	Diferença (%)	P	* $p < 0,05$ (significância)
CLN vs BFL	28,35	<0,001	Sim
CLN vs BIO	19,90	<0,001	Sim
CLN vs LBP	14,52	<0,001	Sim
LBP vs BFL	13,82	<0,001	Sim
LBP vs BIO	5,37	<0,001	Sim
BIO vs BFL	8,45	<0,001	Sim

* $p < 0,05$ denota significância estatística

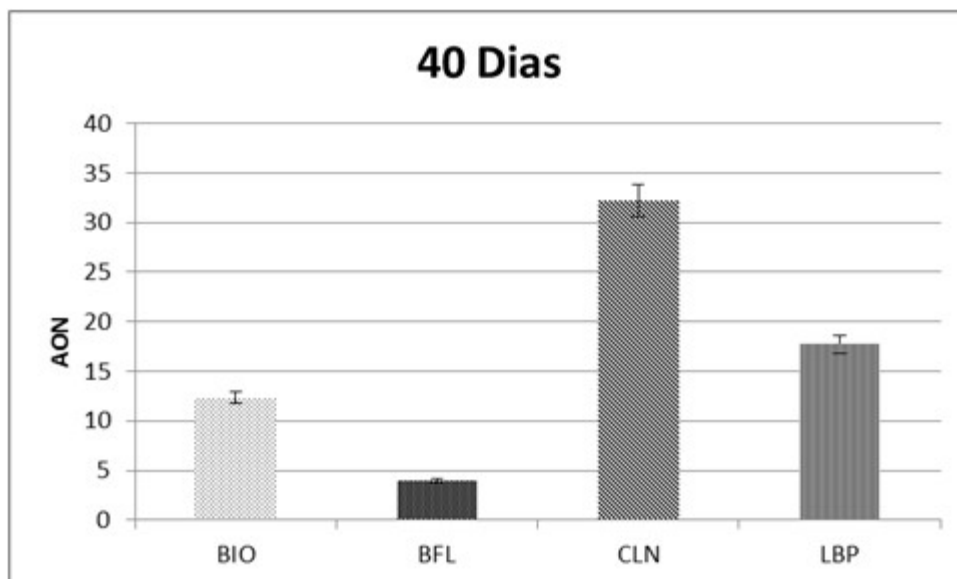


Figura 14 – Gráfico mostrando valores médios e desvio padrão de AON pelos grupos experimentais (BIO, BFL, CLN e LBP) utilizados no tempo 40 dias.

Análise Imunoistoquímica

Os valores representativos dos escores atribuídos em relação a intensidade de imunomarcagem das proteínas Runx2, VEGF e OC para cada grupo, podem ser visualizados na tabela 5 e representados nas figuras 15, 16 e 17.

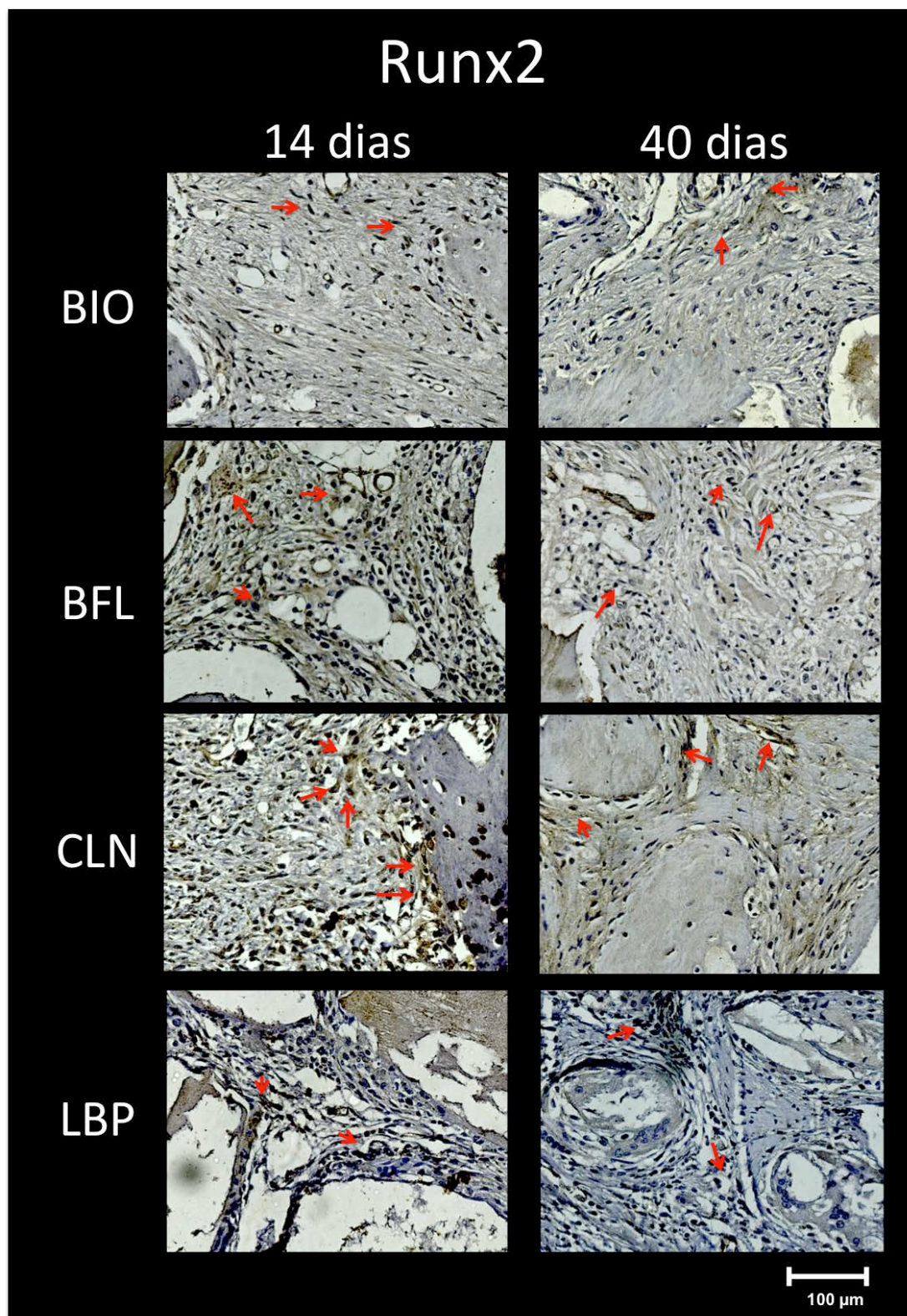


Figura 15 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcção da proteína Runx2 nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X).

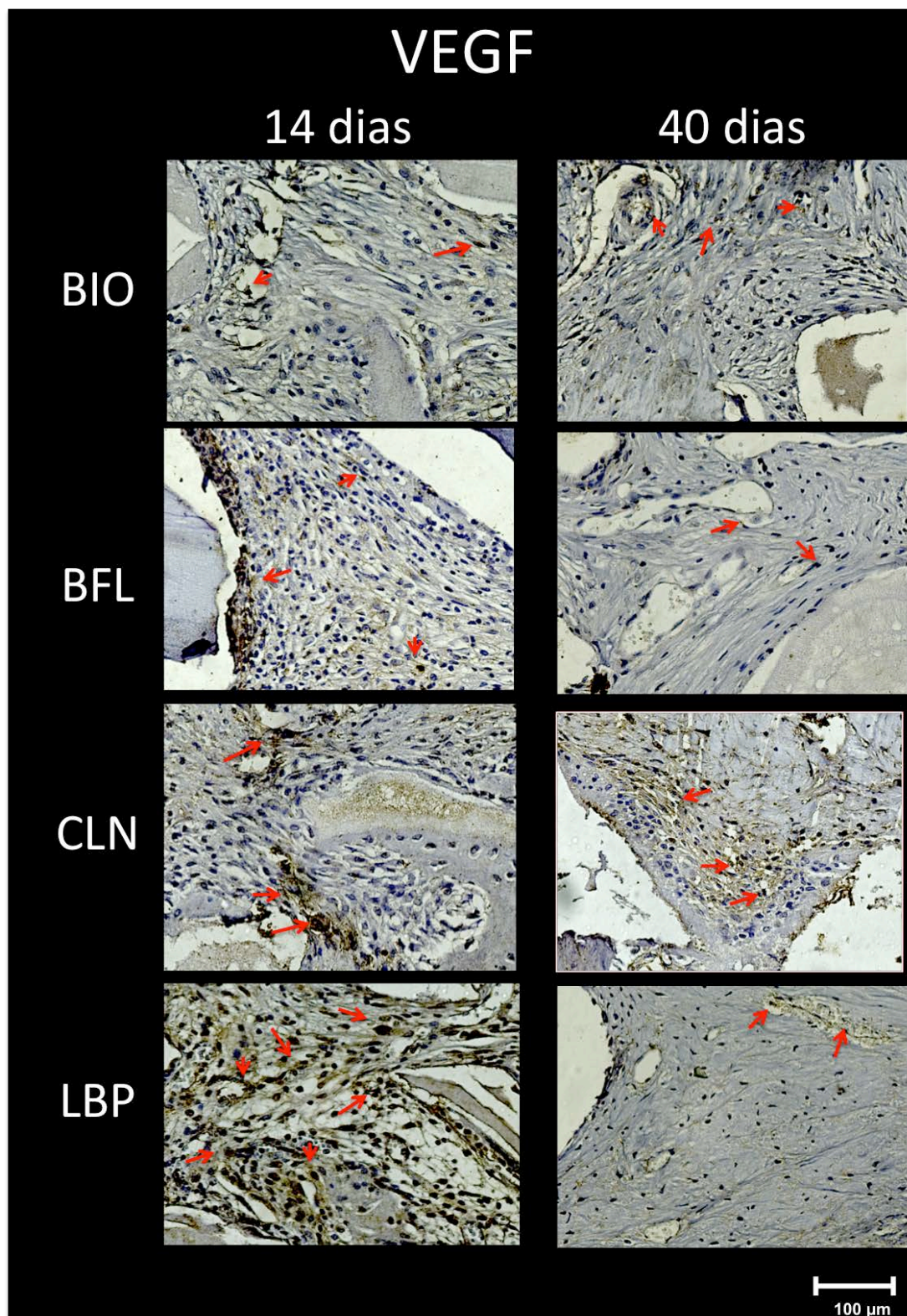


Figura 16 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcção da proteína VEGF nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X).

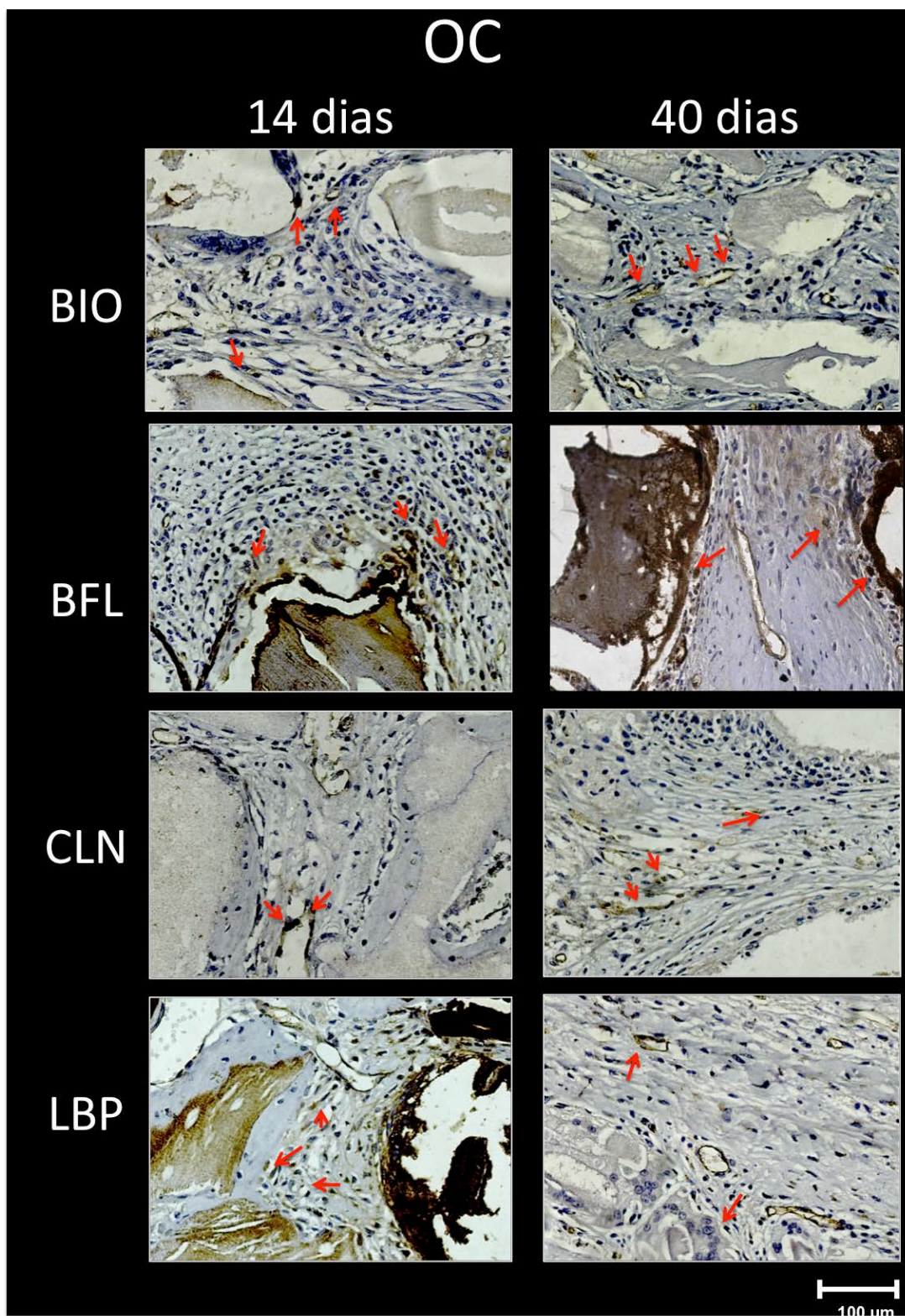


Figura 17 – Imagens representativas da intensidade de imunomarcação da proteína OC nos grupos experimentais BIO, BFL CLN e LBP, nos períodos de análises (14 e 40 dias) (Aumento original 40X).

Tabela 5 – Escores da análise imunoistoquímica atribuídos aos grupos estudados (Runx2, VEGF e OC) aos 14 e 40 dias (Moda).

	Runx2		VEGF		OC	
	14 Dias	40 Dias	14 Dias	40 Dias	14 Dias	40 Dias
LBP	1	2	2	1	2	1
BFL	2	2	2	1	2	2
CLN	2	2	2	2	1	2
BIO	1	1	1	1	2	2

14 dias

A imunomarcção para a proteína RUNX 2 foi levemente marcada (1) para os grupos LBP e BIO, enquanto que para os grupos BFL e CLN, foi moderadamente marcada (2). Para VEGF, somente o grupo BIO apresentou imunomarcção leve (1), os demais grupos apresentaram marcação moderada (2). Já para OC, os grupos LBP, BFL e BIO mostraram marcação moderada (2) e, somente o grupo CL foi levemente imunomarcada (1).

Imunomarcções – 14 dias

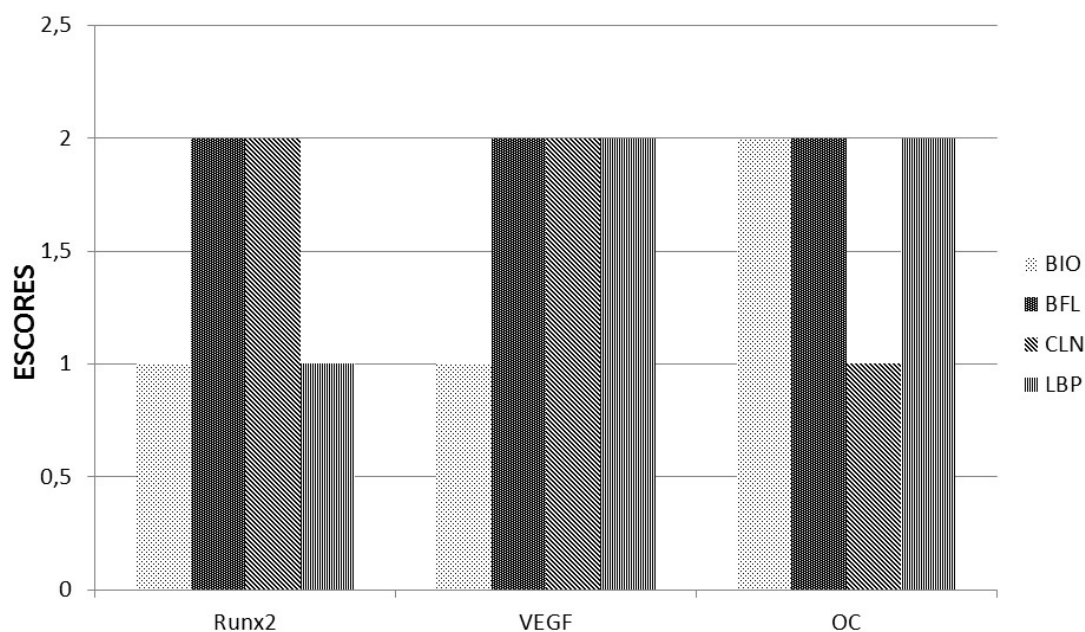


Figura 18 – Gráfico representando os escores das proteínas marcadas nos diferentes grupos de biomateriais período de 14 dias.

40 dias

Os grupos LBP, BFL e CLN foram imunomarcados de forma moderada (2) e somente o grupo BIO foi levemente marcado (1) para RUNX 2. Em relação a VEGF, o grupo CLN apresentou imunomarcaçã moderada (2), enquanto que os demais grupos, apresentaram imunomarcaçã leve (1). Já para a proteína OC, somente LBP teve marcaçã leve (1), sendo que os demais apresentaram marcaçã moderada (2).

Após a aplicaçã do teste estatístico ANOVA 2 fatores (grupos vs períodos) e pós teste de Tukey em razã dos escores obtidos pela análise imunoistoquímica, foram observadas para cada proteína as seguintes interações estatisticamente significantes ou não significantes:

Para RUNX 2, as alterações de imunomarcaçã intragrupos foi significante somente no grupo LBP ($p < 0,05$, Teste Tukey). Na análise intergrupos, aos 14 dias notou-se significância estatística nas interações entre os grupos CLN vs BFL, BFL vs BIO, BFL vs LBP e LBP vs BIO. E aos 40 dias, somente a comparaçã entre os grupos LBP vs BIO foi significante ($p < 0,05$, Teste Tukey).

A proteína VEGF mostrou alteraçã na comparaçã 14 vs 40 dias, somente nos grupos LBP e BFL ($p < 0,05$, Teste Tukey). Aos 14 dias, a interaçã LBP vs BIO apresentou alteraçã significante ($p < 0,05$, Teste Tukey), e aos 40 dias, não foram encontradas diferenças entre os grupos testados ($p > 0,05$, Teste Tukey).

Para OC, notou-se que tanto na análise intragrupos como intergrupos, todas as interações apresentaram alterações significantes ($p < 0,001$, Teste Tukey).

Imunomarcações – 40 dias

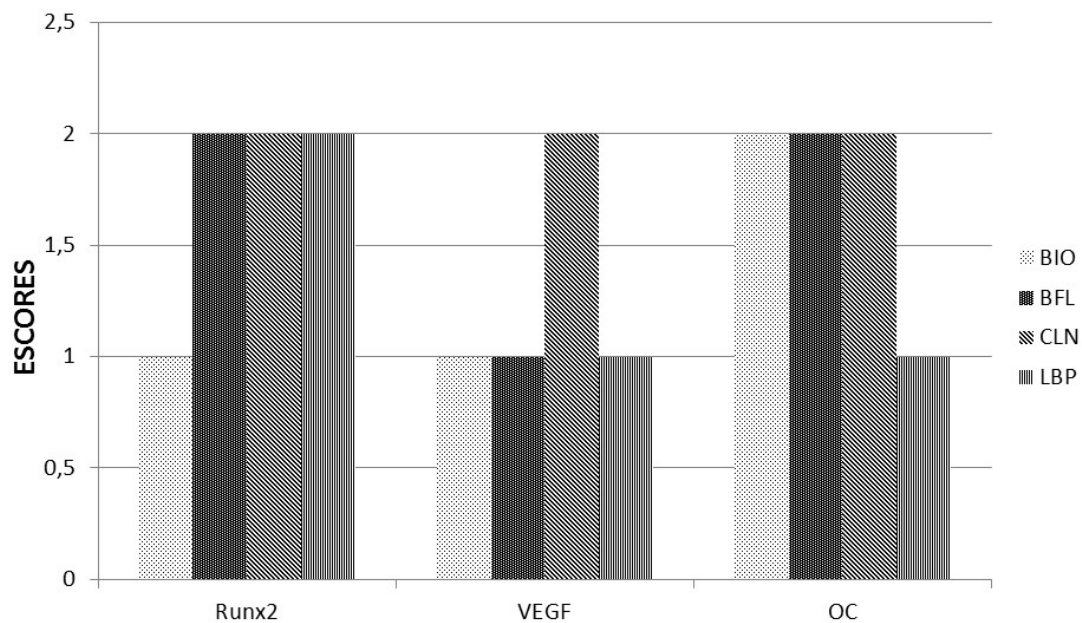


Figura 19 – Gráfico representando os escores das proteínas marcadas nos diferentes grupos de biomateriais período de 40 dias.

Discussão

A hipótese apresentada pelo estudo de que a área de osso neoformada nos defeitos críticos dos diferentes grupos analisados, em que se esperava diferença entre os grupos experimentais, com a superioridade do biomaterial BIO foi parcialmente aceita. Houve diferença significativa entre os grupos em ambos os períodos investigados ($p < 0,05$), no entanto, independente do período, foi notada a superioridade de AON para o biomaterial CLN ($p < 0,001$).

Sobre o modelo animal utilizado para avaliação da osteocondução de biomateriais, foram adotados defeitos ósseos considerados como críticos, os quais até o último período analisado sem o preenchimento com biomateriais, não ocorre o fechamento total do defeito ósseo. Neste contexto, suportado pela revisão sistemática publicada por Delgado-Ruiz, et al. (2015), a eleição do defeito criado com a magnitude de 8mm de diâmetro, nos tempos de eutanásia entre 2 e 10 semanas foi favorável para as análises do comportamento osteocondutor dos biomateriais. Ainda, estudos sobre o comportamento de substitutos ósseos consagraram a calvária de coelhos como região anatômica recomendada para este tipo de análises (Azevedo-Neto, et al. 2013, Behfarnia, et al. 2012, Borie, et al. 2011, Dumas, et al. 2012, Faratzis, et al. 2012, Gomes, et al. 2012, Hassanein, et al. 2013, Oliveira, et al. 2013, Pelegrine, et al. 2014).

Dentre os substitutos ósseos empregados na reconstrução óssea, o Bio-Oss® é o material composto de hidroxiapatita bovina com maior número de comprovações clínico-científicas na literatura (Araujo, et al. 2008, Lundgren, Moy, Johansson & Nilsson 1996, Traini, et al. 2008). Comprovadamente, o BIO é indicado no preenchimento de defeitos circunferenciais, fenestrações ao redor de implantes

dentários e na técnica de *sinus lift* na região posterior da maxila (Araujo, Linder, Wennstrom & Lindhe 2008, Araujo, et al. 2011, Lundgren, Moy, Johansson & Nilsson 1996). É sabido que no âmbito clínico, as reconstruções de grande magnitude, geralmente causadas após ressecção de tumores, por traumas faciais com perda de substância óssea ou por alterações congênitas, são dificilmente tratadas com êxito com substitutos ósseos isolados (Marx, et al. 2013, Marx & Harrell 2014). Este fato foi observado nos resultados obtidos com a presente investigação, tendo em vista que o Bio-Oss® mesmo com resultados bastante interessantes na reconstrução óssea apresentou valores inferiores para os parâmetros analisados em relação à osteocondução em comparação aos outros biomateriais, mais acessíveis (CLN e LBP).

Similarmente como encontrado nos resultados deste estudo, Tovar, et al. (2014), também observaram que o BIO em defeitos críticos criados em calvária de coelhos apresentou menor área de osso neoformado, contrariando a expectativa inicial. Ficou claro que o BIO até o final do processo reparacional analisado, se mantém preenchendo o defeito em toda a sua extensão. Inicialmente com atividade osteogênica ativa e em seguida, com a formação de tecido conjuntivo organizado. Estes achados, corroborados pela histometria e ainda pela imunomarcação do fator de transcrição Runx2, que mostra a atividade pré-osteoblástica, confirmou que o BIO por mais que seja um bom substituto ósseo nos defeitos de pequena e média magnitude, para os defeitos críticos, ainda se faz necessário a associação com fatores de crescimento (PDGF, VEGF, FGF, PRF, L-PRF e células troncos mesenquimais) (Almubarak, et al. 2016, Cheng, et al. 2016, Kim, et al. 2014, Knapen, et al. 2013) ou as

proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (Luvizuto, et al. 2011, Marx, Armentano, Olavarria & Samaniego 2013, Marx & Harrell 2014).

A utilização de osso inorgânico heterógeno tal como o BIO, BFL e LBP ou até o enxerto proveniente de banco de ossos (osso homogêneo) nos defeitos extensos, obriga a associação de outros biomateriais, para categorizar o complexo formado pelo substituto osteocondutor, substância sinalizadora (fatores de crescimento) e uma substância osteoindutora (BMP), denominada como tríade de Marx (Marx, Armentano, Olavarria & Samaniego 2013, Marx & Harrell 2014).

Mesmo com menores valores quanto à neoformação óssea dos substitutos provenientes da hidroxiapatita bovina (BIO, BFL e LBP), os parâmetros histológicos, histométricos e imunoistoquímicos foram bastante interessantes no grupo LBP, até com a inversão dos valores de AON aos 40 dias (LBP > BIO, $p < 0,001$). Até o último período, os defeitos preenchidos com este substituto ósseo, possuíam ainda partículas preenchendo o defeito ósseo e com osteogênese ativa, suportada pelo aumento da imunomarcagem de Runx2. Tendo em vista que este grupo em comparação aos demais apresentou menor marcação para OC, importante proteína que denota maturação do tecido ósseo reparacional, e que ainda havia estímulo para formação de tecido ósseo, provavelmente no longo prazo, a neoformação óssea aumentará. Portanto, novos estudos deverão ser conduzidos no intuito de avaliar o comportamento osteocondutor das partículas de LBP em defeitos críticos em períodos mais longos (60 e 90 dias), possibilitando a maior indicação deste biomaterial alternativo ao BIO.

Contrariando as expectativas iniciais, um resultado surpreendente foi obtido com o CLN. Independente da análise empregada, este substituto ósseo foi superior aos

demais avaliados nesta pesquisa. Já no primeiro período, havia intensa atividade osteoblástica, o que proporcionou no último período analisado maior área de neoformação óssea com o fechamento quase total dos defeitos críticos. Ainda na especulação com a aplicabilidade clínica, a maturação do tecido ósseo, fator importante para a estabilidade primária na instalação de implantes osseointegráveis (Chang, et al. 2010, Chang, et al. 2013), mostrou por meio das reações de imunohistoquímica aumento da expressão de osteocalcina para o grupo CLN aos 40 dias em comparação aos 14 dias.

Luvizuto, Tangl, Zanoni, Okamoto, Sonoda, Gruber & Okamoto (2011) investigaram as propriedades osteocondutoras de um β -tricálcio fosfato (BTCP) já consagrado no mercado (Cerasorb[®]), suplementados ou não por BMP-2 em defeitos críticos em calvárias de ratos. Os autores observaram que mesmo com aplicação sem a suplementação de BMP, o BTCP apresentou propriedades osteocondutoras bastante promissoras, inclusive com o fechamento total do defeito com osso neofrmado. Na revisão publicada por Damron (2007), o BTCP foi comprovado clinicamente como um material indicado para enxerto na região da coluna vertebral, em defeitos periodontais e em tumores ortopédicos.

Por mais que a engenharia tecidual investigue constantemente a associação do BTCP com outros biomateriais, especialmente com fatores de crescimento para a reconstrução de defeitos ósseos (Cheng, Li, Xing, Li & Li 2016, Dori, et al. 2008), os resultados do presente trabalho evidenciaram que um substituto ósseo (CLN) com baixo custo, foi capaz de promover a neoformação óssea com superioridade em relação à biomateriais consagrados no mercado nacional e mundial.

As limitações da presente pesquisa foram relacionadas principalmente ao último período de eutanásia investigado (40 dias). Diante das respostas biológicas, principalmente do LBP, que apresentou partículas remanescentes do substituto ósseo ainda com capacidade osteocondutora, imunomarcagem para Runx2 e redução da expressão de OC, uma avaliação do potencial osteocondutor mais tardia deverá ser realizada em estudos futuros.

Fundamentados na literatura e diante dos resultados observados neste estudo, foi possível concluir que:

- O CLN apresentou o melhor comportamento osteocondutor quando empregado no preenchimento de defeitos críticos criados em calvárias de coelhos;
- O LBP apresentou maior AON aos 40 dias quando comparado aos grupos BIO e BFL e, mostrou ainda atividade osteogênica e pré-osteoblástica no último período analisado;
- Aos 40 dias, o BFL apresentou menor propriedade osteocondutora.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa Doutorado

Referências

- Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B. & Jepsen, S. (2000) Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* **51**: 703-710.
- Al-Nawas, B. & Schiegnitz, E. (2014) Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol* **7 Suppl 2**: S219-234.
- Almubarak, S., Nethercott, H., Freeberg, M., Beaudon, C., Jha, A., Jackson, W., Marcucio, R., Miclau, T., Healy, K. & Bahney, C. (2016) Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone* **83**: 197-209.
- Araujo, M., Linder, E., Wennstrom, J. & Lindhe, J. (2008) The influence of bio-oss collagen on healing of an extraction socket: An experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent* **28**: 123-135.
- Araujo, M. G., Linder, E. & Lindhe, J. (2011) Bio-oss collagen in the buccal gap at immediate implants: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **22**: 1-8.
- Azevedo-Neto, R. D., Gonzaga, C. C., Deliberador, T. M., Klug, L. G., da Costa Oliveira, L., Zielak, J. C., de Andrade Urban, C., de Araujo, M. R. & Giovanini, A. F. (2013) Fragmented adipose tissue transplanted to craniofacial deformities induces bone repair associated with immunoexpression of adiponectin and parathyroid hormone 1-receptor. *Cleft Palate Craniofac J* **50**: 639-647.
- Behfarnia, P., Shahabooei, M., Mashhadiabbas, F. & Fakhari, E. (2012) Comparison of bone regeneration using three demineralized freeze-dried bone allografts: A histological and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Dent Res J (Isfahan)* **9**: 554-560.
- Blank, B. S. & Levy, A. R. (1999) Combined treatment of a large periodontal defect using gtr and dfdba. *Int J Periodontics Restorative Dent* **19**: 481-487.
- Borie, E., Fuentes, R., Del Sol, M., Oporto, G. & Engelke, W. (2011) The influence of fdba and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: A pilot study. *Ann Anat* **193**: 412-417.
- Caplanis, N., Lozada, J. L. & Kan, J. Y. (2005) Extraction defect assessment, classification, and management. *J Calif Dent Assoc* **33**: 853-863.
- Chang, P. C., Lang, N. P. & Giannobile, W. V. (2010) Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants. *Clin Oral Implants Res* **21**: 1-12.
- Chang, P. C., Seol, Y. J., Goldstein, S. A. & Giannobile, W. V. (2013) Determination of the dynamics of healing at the tissue-implant interface by means of microcomputed tomography and functional apparent moduli. *Int J Oral Maxillofac Implants* **28**: 68-76.
- Cheng, G., Li, Z., Xing, X., Li, D. Q. & Li, Z. B. (2016) Multiple inoculations of bone marrow stromal cells into beta-tricalcium phosphate/chitosan scaffolds enhances the formation and reconstruction of new bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* **31**: 204-215.
- Damron, T. A. (2007) Use of 3d beta-tricalcium phosphate (vitoss) scaffolds in repairing bone defects. *Nanomedicine (Lond)* **2**: 763-775.
-

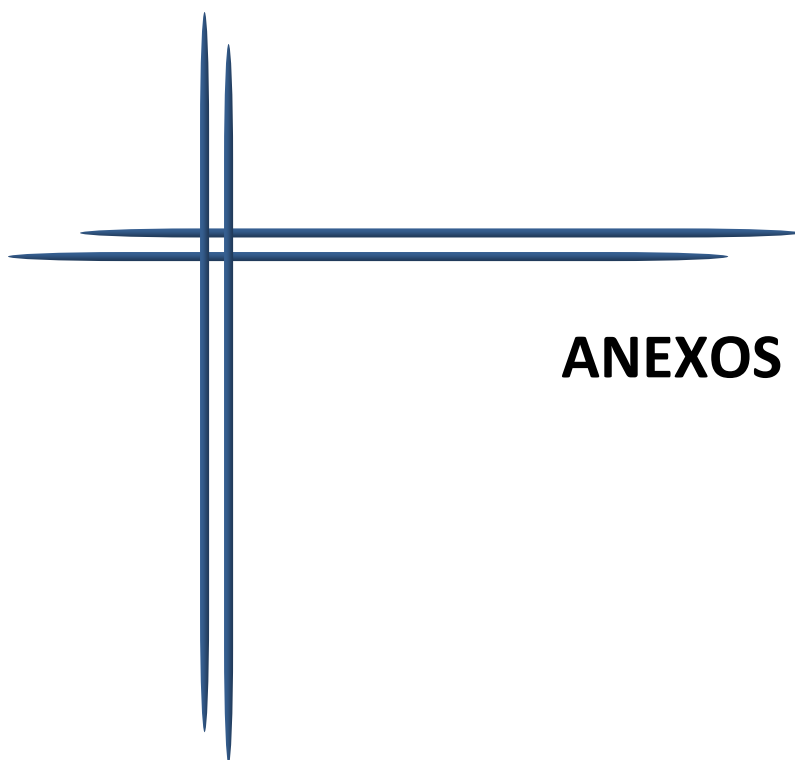
- de Oliveira Diniz, C. K., Correa, M. G., Casati, M. Z., Nociti, F. H., Jr., Ruiz, K. G., Bovi Ambrosano, G. M. & Sallum, E. A. (2012) Diabetes mellitus may increase bone loss after occlusal trauma and experimental periodontitis. *J Periodontol* **83**: 1297-1303.
- Delgado-Ruiz, R. A., Calvo-Guirado, J. L. & Romanos, G. E. (2015) Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: Systematic review and quality evaluation using arrive guidelines. *Clin Oral Implants Res* **26**: 915-930.
- Dinopoulos, H., Dimitriou, R. & Giannoudis, P. V. (2012) Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon*: 2012 Royal College of Surgeons of Edinburgh (Scottish charity number SC005317) and Royal College of Surgeons in Ireland. Published by Elsevier Ltd.
- Dori, F., Huszar, T., Nikolidakis, D., Tihanyi, D., Horvath, A., Arweiler, N. B., Gera, I. & Sculean, A. (2008) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with beta tricalcium phosphate and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *J Periodontol* **79**: 660-669.
- Dumas, J. E., BrownBaer, P. B., Prieto, E. M., Guda, T., Hale, R. G., Wenke, J. C. & Guelcher, S. A. (2012) Injectable reactive biocomposites for bone healing in critical-size rabbit calvarial defects. *Biomed Mater* **7**: 024112.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Worthington, H. V. & Coulthard, P. (2006) Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*: Cd003607.
- Faratzis, G., Leventis, M., Chrysomali, E., Khaldi, L., Eleftheriadis, A., Eleftheriadis, I. & Dontas, I. (2012) Effect of autologous platelet-rich plasma in combination with a biphasic synthetic graft material on bone healing in critical-size cranial defects. *J Craniofac Surg* **23**: 1318-1323.
- Faria, P. E., Okamoto, R., Bonilha-Neto, R. M., Xavier, S. P., Santos, A. C. & Salata, L. A. (2008) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res* **19**: 393-401.
- Goiato, M. C., Pellizzer, E. P., Barao, V. A., dos Santos, D. M., de Carvalho, B. M., Magro-Filho, O. & Garcia, I. R., Jr. (2009) Clinical viability for immediate loading of dental implants: Part ii--treatment alternatives. *J Craniofac Surg* **20**: 2143-2149.
- Gokhale, S. T. & Dwarakanath, C. D. (2012) The use of a natural osteoconductive porous bone mineral (bio-oss) in infrabony periodontal defects. *J Indian Soc Periodontol* **16**: 247-252.
- Gomes, S. P., Deliberador, T. M., Gonzaga, C. C., Klug, L. G., da Costa Oliveira, L., de Andrade Urban, C., Zielak, J. C. & Giovanini, A. F. (2012) Bone healing in critical-size defects treated with immediate transplant of fragmented autogenous white adipose tissue. *J Craniofac Surg* **23**: 1239-1244.
- Hassanein, A. H., Couto, R. A., Kurek, K. C., Rogers, G. F., Mulliken, J. B. & Greene, A. K. (2013) Experimental comparison of cranial particulate bone graft, rhbmp-2, and split cranial bone graft for inlay cranioplasty. *Cleft Palate Craniofac J* **50**: 358-362.
- Hawthorne, A. C., Xavier, S. P., Okamoto, R., Salvador, S. L., Antunes, A. A. & Salata, L. A. (2013) Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part iii: Allografts. *Clin Oral Implants Res* **24**: 1164-1172.
- Hayacibara, R. M., Goncalves, C. S., Garcez-Filho, J., Magro-Filho, O., Esper, H. & Hayacibara, M. F. (2013) The success rate of immediate implant placement of
-

- mandibular molars: A clinical and radiographic retrospective evaluation between 2 and 8 years. *Clin Oral Implants Res* **24**: 806-811.
- Johannsen, A., Westergren, A. & Johannsen, G. (2012) Dental implants from the patients perspective: Transition from tooth loss, through amputation to implants - negative and positive trajectories. *J Clin Periodontol* **39**: 681-687.
- Kim, T. H., Kim, S. H., Sandor, G. K. & Kim, Y. D. (2014) Comparison of platelet-rich plasma (prp), platelet-rich fibrin (prf), and concentrated growth factor (cgf) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol* **59**: 550-558.
- Knapen, M., Gheldof, D., Drion, P., Layrolle, P., Rompen, E. & Lambert, F. (2013) Effect of leukocyte- and platelet-rich fibrin (l-prf) on bone regeneration: A study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*.
- Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., Heiland, M., Wolff, K. D. & Smeets, R. (2012) Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials *J craniomaxillofac surg*: 2012 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd.
- Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., Heiland, M., Wolff, K. D. & Smeets, R. (2012) Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg* **40**: 706-718.
- Liu, J. & Kerns, D. G. (2014) Mechanisms of guided bone regeneration: A review. *Open Dent J* **8**: 56-65.
- Lundgren, S., Moy, P., Johannsen, C. & Nilsson, H. (1996) Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 760-766.
- Luvizuto, E. R., Tangl, S., Zanoni, G., Okamoto, T., Sonoda, C. K., Gruber, R. & Okamoto, R. (2011) The effect of bmp-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* **32**: 3855-3861.
- Marx, R. E., Armentano, L., Olavarria, A. & Samaniego, J. (2013) Rhbmp-2/acs grafts versus autogenous cancellous marrow grafts in large vertical defects of the maxilla: An unsponsored randomized open-label clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants* **28**: e243-251.
- Marx, R. E. & Harrell, D. B. (2014) Translational research: The cd34+ cell is crucial for large-volume bone regeneration from the milieu of bone marrow progenitor cells in craniomandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Implants* **29**: e201-209.
- Mimura, H. & Fukuyo, S. (2013) [orthodontic reconstruction with autotransplantation and bone grafting after a traffic accident]. *Orthod Fr* **84**: 191-200.
- Norton, M. R., Odell, E. W., Thompson, I. D. & Cook, R. J. (2003) Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: A human histologic study. *Clin Oral Implants Res* **14**: 775-783.
- Oliveira, L. D., Giovanini, A. F., Abuabara, A., Klug, L. G., Gonzaga, C. C., Zielak, J. C., Urban, C. D. & Deliberador, T. M. (2013) Fragmented adipose tissue graft for bone healing: Histological and histometric study in rabbits' calvaria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **18**: e510-515.
-

- Paulus, C. & Martin, P. (2013) [hypodontia due to ectodermal dysplasia: Rehabilitation with very early dental implants]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale* **114**: 106-109.
- Pedrosa, W. F., Jr., Okamoto, R., Faria, P. E., Arnez, M. F., Xavier, S. P. & Salata, L. A. (2009) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part ii: Calvarial bone. *Clin Oral Implants Res* **20**: 1254-1264.
- Pelegrine, A. A., Aloise, A. C., Zimmermann, A., de Mello, E. O. R. & Ferreira, L. M. (2014) Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: A histomorphometric study in rabbit calvaria. Part i: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res* **25**: 567-572.
- Penarrocha-Oltra, D., Demarchi, C. L., Maestre-Ferrin, L. & Penarrocha-Diago, M. (2012) Comparison of immediate and delayed implants in the maxillary molar region: A retrospective study of 123 implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **27**: 604-610.
- Pietrokovski, J. (2013) The residual edentulous arches--foundation for implants and for removable dentures; some clinical considerations. A review of the literature 1954-2012. *Refuat Hapeh Vehashinayim* **30**: 14-24, 68.
- Pike, R. L. & Boyne, P. J. (1973) Composite autogenous marrow and surface-decalcified implants in mandibular defects. *J Oral Surg* **31**: 905-912.
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M. & Ramirez-Vick, J. E. (2014) Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* **14**: 15-56.
- Rachana, C., Sridhar, N., Rangan, A. V. & Rajani, V. (2012) Horizontal ridge augmentation using a combination approach. *J Indian Soc Periodontol* **16**: 446-450.
- Ravald, N., Dahlgren, S., Teiwik, A. & Grondahl, K. (2012) Long-term evaluation of astra tech and branemark implants in patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years. *Clin Oral Implants Res*.
- Smiler, D., Soltan, M. & Lee, J. W. (2007) A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells *Implant dent*, 42-53. United States.
- Soltan, M., Smiler, D. G. & Gailani, F. (2005) A new "Platinum" Standard for bone grafting: Autogenous stem cells *Implant dent*, 322-325. United States.
- Takemae, R., Uemura, T., Okamoto, H., Matsui, T., Yoshida, M., Fukazawa, S., Tsuchida, K., Teruya, K. & Tsunoda, T. (2012) Changes in mental health and quality of life with dental implants as evaluated by general health questionnaire (ghq) and health utilities index (hui). *Environ Health Prev Med* **17**: 463-473.
- Tovar, N., Jimbo, R., Gangolli, R., Perez, L., Manne, L., Yoo, D., Lorenzoni, F., Witek, L. & Coelho, P. G. (2014) Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: An experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg* **43**: 251-260.
- Traini, T., Degidi, M., Sammons, R., Stanley, P. & Piattelli, A. (2008) Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol* **79**: 1232-1240.
- Urist, M. R. (2002) Bone: Formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res*: 4-10.
- Vahabi, S., Amirzadeh, N., Shokrgozar, M. A., Mofeed, R., Mashhadi, A., Aghaloo, M., Sharifi, D. & Jabbareh, L. (2012) A comparison between the efficacy of bio-oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J* **35**: 28-37.
-

Vera, C., De Kok, I. J., Chen, W., Reside, G., Tyndall, D. & Cooper, L. F. (2012) Evaluation of post-implant buccal bone resorption using cone beam computed tomography: A clinical pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **27**: 1249-1257.

Vogel, R., Smith-Palmer, J. & Valentine, W. (2013) Evaluating the health economic implications and cost-effectiveness of dental implants: A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* **28**: 343-356.



ANEXOS

Anexo A – Aprovação do projeto pelo comitê de ética**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA - USC****CERTIFICADO**

PROTOCOLO N°18/14

A CEUA USC dentro de suas competências e seguindo normas vigentes no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal – CONCEA analisou o projeto “Avaliação comparativa do reparo ósseo de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calotas de coelhos”, com numero total de 24 coelhos machos sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Paulo Domingos Ribeiro Junior e o considerou APROVADO.

Bauru, 09 de setembro de 2014.



Dra. Dulce H. J. Constantino
Presidente CEUA – USC



Francine Souza
Secretária CEUA - USC

Anexo B - Normas para publicação do periódico Clinical Oral Implants Research

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-Blackwell'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.

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.

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.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

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 Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) 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. Blinded 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.

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; halftones (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.
