



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

**Estudo do processo de reparo de enxerto  
ósseo em bloco submetido ao recobrimento com  
etil-cianoacrilato: Análise histométrica e  
imunoistoquímica em ratos**

Rafael Santiago de Almeida

Araçatuba – SP

2015

RAFAEL SANTIAGO DE ALMEIDA

**Estudo do processo de reparo de enxerto  
ósseo em bloco submetido ao recobrimento  
com etil-cianoacrilato: Análise histométrica  
e imunoistoquímica em ratos**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara

**Coorientador:** Prof. Adj. Dr. Idelmo Rangel Garcia  
Júnior

Araçatuba – SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A447e Almeida, Rafael Santiago de.  
Estudo do processo de reparo de enxerto ósseo em bloco submetido ao recobrimento com etil-cianoacrilato : análise histométrica e imunoistoquímica em ratos / Rafael Santiago de Almeida. – Araçatuba, 2015  
56 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Élio Hitoshi Shinohara

Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Cianoacrilatos 2. Transplante ósseo 3. Materiais bio-compatíveis I. T.

Black D7

CDD 617.64

## *Dedicatória*

*Dedico primeiramente à Deus e Nossa Senhora por estarem sempre ao meu lado e tornarem possível o que já parecia apenas um sonho distante e estarem me abençoando em cada momento de minha vida.*

*Aos meus pais, Antônio Geraldo e Magda, pelo amor, apoio incondicional, compreensão e dedicação, vocês foram os responsáveis pela minha formação como ser humano. Não tenho dúvidas de que sempre acreditaram em mim!*

*Eu amo vocês!*

*Aos meus irmãos, sobrinhas e sobrinho por todo carinho.  
Aos meus familiares e amigos.*

## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP** e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela oportunidade de aprendizado.

**Ao meu orientador, Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara**, sou grato primeiramente pela oportunidade da convivência, além do privilégio de aprender, seja na pesquisa, clínica ou no crescimento enquanto ser humano, através de sua humildade, generosidade, retidão, ética, humanidade e outras virtudes tão raras nos dias de hoje. Agradeço pela amizade, pelo convívio e estágios no Hospital Geral de Vila Penteadado. Muito obrigado, professor!

**Ao meu coorientador, Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior**, uma pessoa extraordinária, que passa calma, equilíbrio, humildade e grande conhecimento.

**Ao Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda**. Por ser meu amigo e me guiar na pós-graduação. Agradeço imensamente pela confiança e paciência comigo. Por me proporcionar aprendizado constante e partilhar do privilégio da sua convivência. Você é um exemplo de competência, garra e coragem, obrigado por tudo e que Deus o abençoe!

À **Professora Dra. Roberta Okamoto**, por toda ajuda, paciência e por ter sempre um sorriso simpático para nos receber em sua sala com muito carinho.

Aos **Professores. Dr. Osvaldo Magro (Dinho), Professoras Dra. Ana Paula, Dra. Daniela e Dra. Alessandra, Dra. Eloá Luvizuto** e também ao **professor** e amigo **Dr.**

**Francisley** pela amizade, pelos ensinamentos, preciosa contribuição e dedicação durante a nossa convivência.

**Ao Professor Dr. Wilson Roberto Poi**, pelos ensinamentos de como ser professor e pelo exemplo como pessoa.

**Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender e carinho.

**Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Paulo Gratão, Marco Ianner, Dirce, Gilmar, Joílson, Odaír e Renato)**, muito obrigado pelas ajudas, amizade e bate-papo agradável.

**Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba: Valéria de Queiroz M. Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada**, pela presteza, simpatia e paciência em todos os momentos.

Aos alunos da graduação **Jadison Junio, Luan Benetti, Fernanda Yogui, Karen Lumi, Mariana Martins, Luíza Salzedas, Bruno Mendes, Maryelisa** (e aos seus pais e irmão por me receberem com tanto carinho em sua clínica e casa), pela amizade e ajuda nos diferentes momentos do mestrado.

**Aos colegas e amigos da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Júlio César**, aos **Willian's (Caetano e Moraes)** (amigos e colegas de pesquisa e publicações), **Moniquita "Salomé"** (sempre de alto astral e prestativa), **Léo Faverani** (por ser um professor e amigo, ajudando sempre em todos os momentos de meu mestrado com grande carinho e presteza), **Andrezinho** (sempre amigo, companheiro, de alegria constante), **Tárik** (grande amigo e uma pessoa que sabe olhar a vida de maneira positiva, muito prestativo e companheiro de pesquisa), **Sabrina** (pelo carinho e por estar sempre presente e pronta para ajudar), **Igor Benetti, Lamis**,

**Gustavo Grossi, Carlos Timóteo, Julierme, Eduardo, Gabriel, Elisa, Ellen Gaetti, Heldo, Cristian, Willian Ricardo, Pedro, Erick, Gustavo Momesso, Igor Puttini, Leonardo, Valthierre, João Paulo; e da Implantodontia (Júlio Maciel “JJ”, Rodrigo “Carioca”, Caru, Geraldo Griza, Maria del Pilar, Juceléia Maciel e Járede).**

**Aos colegas da pós-graduação da Periodontia (Naida, Fabrízio e Adriele); da Clínica Integrada (Vanessinha, Melyna e Marina); da Endodontia (Loiane Massunari, Gustavo Sivieri, Nelci, Renata Samuel, Mariane Azuma, Ludmila Santos, Luciana Louzada, Marcelo Wayama, Chris Men);** pela amizade e respeito que existe entre nós.

**Aos colegas e professores de faculdade de Diamantina e aos meus amigos de clínica odontológica de Itacarambi** pelos anos de amizade e convivência.

**Aos meus grandes amigos de vários lugares,** primeiramente à **Índia** que me incentivou a tentar o mestrado e ajudou em diversos momentos da “pós”, e mesmo desde os tempo de Itacarambi. **Aos meus grandes amigos Paulo Sérgio, Waguim e Mona, Leozão, Marcelo Lafetá, Silvério, Adriano Franca, João Henrique Mota, Tati Barreto, Manú Mendes, Stéphanie (Tifa), Karol Noronha, Brunninha, Carlinha, Simone Carrijo, Daniel Sanguinetti, Joazinho Normanha, Jú Boa Sorte, Wagner Barros.** E à **Tilcinha,** que sempre está presente, me ouvindo, dando conselhos, orações e carinho.

**Ao meu primo-irmão Hugo Santiago e aos meus primos Wagner Santiago e Valéria Santiago** que sempre me trazem carinho e querem ajudar.

**Aos segundos pais e mães que tive, Didi, Madrinha Luiza, Sr. Fernando Bueno,** que mesmo quando distantes, sempre estão presentes em minha vida.

## *Epígrafe*

Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive.

(Fernando Pessoa)

Almeida RS. Estudo do processo de reparo de enxerto ósseo em bloco submetido ao recobrimento com etil-cianoacrilato: Análise histométrica e imunoistoquímica em ratos [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

## *RESUMO*

**Objetivos:** Por meio de estudo histométrico e imunoistoquímico, o presente estudo teve como objetivo estudar o processo de reparo de enxerto autógeno de calota craneana de ratos, quando submetido ao recobrimento com uma camada de cianoacrilato em sua superfície.

**Material e Métodos:** 24 ratos, machos, adultos foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo I (n=12): animais submetidos ao enxerto ósseo em bloco, fixados com gotas de etil-cianoacrilato em suas bordas; Grupo II (n=12): animais submetidos ao enxerto ósseo em bloco, fixado com gotas de etil-cianoacrilato, e recobertos com uma camada de 200µL de etil-cianoacrilato. Os animais foram submetidos à eutanásia após períodos de 30 e 60 dias de pós-operatório. A análise dos resultados foi realizada por meio da análise histométrica, pela coloração de hematoxilina e eosina, para verificar os índices de reabsorção óssea. A análise imunoistoquímica pela imunomarcagem através dos anticorpos RANK-L e TRAP foram realizados para verificar a atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, considerando o nível de significância de 5%.

**Resultados:** Os resultados demonstraram não haver diferença quanto ao reparo dos enxertos ósseos recobertos ou não com cianoacrilato. A análise imunoistoquímica mostrou que o grupo com membrana apresentou marcação moderada para a RANK-L e TRAP tanto no período de 30 quanto de 60 dias. Já no grupo sem membrana de 30

dias a proteína RANK-L teve marcação leve, mas a marcação para TRAP foi moderada.

E no grupo sem membrana de 60 dias as proteínas RANK-L e TRAP apresentam-se de forma leve, havendo assim menor formação e atividade osteoblástica.

**Conclusões:** Os resultados mostram que a cola não cumpriu os requisitos para a regeneração tecidual guiada. Porém, trabalhos futuros com variações metodológicas poderiam trazer resultados adicionais e mais conclusivos sobre a utilização do etil-cianoacrilato como barreira de membrana.

**Palavras-chave:** Cianoacrilatos, Transplante ósseo, Materiais biocompatíveis.

Almeida RS. Study of chip bone graft repair process subjected to coating with ethyl-cyanoacrylate: histometric and immunohistochemical analysis in rats. [Dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2015.

## *ABSTRACT*

**Objectives:** Through histometric and immunohistochemical study, this study aimed to study the autograft repair process cranial cap of rats when subjected to coating with a cyanoacrylate layer on its surface.

**Material and Methods:** 24 rats, adults were divided into two groups: Group I (n = 12): animals submitted to bone graft block fixed with drops of ethyl cyanoacrylate on its edges; Group II (n = 12): animals submitted to graft block fixed with drops of ethyl cyanoacrylate adhesive and covered with a layer of 200µL of ethyl-cyanoacrylate. The animals were sacrificed after 30 and 60 days postoperatively. The analysis was performed using the histometric analysis by hematoxylin and eosin in order to verify the bone resorption rates. The immunohistochemical analysis by immunostaining through the RANK-L and TRAP antibodies were conducted to verify the activity of osteoclasts and osteoblasts. The data were submitted to the Kruskal-Wallis test, with significance level of 5%.

**Results:** The results showed no difference in the repair of bone graft covered or not with cyanoacrylate. Immunohistochemical analysis showed that the group with membrane showed moderate labeling for RANK-L and TRAP both within 30 as 60 days. Already in 30 days without membrane group to RANK-L protein was lightweight markup, but was to TRAP was moderate. And in the group without 60 days the membrane RANK-L protein and TRAP are presented lightly, therefore reducing training

and osteoblastic activity.

**Conclusions:** The results show that the glue did not fulfill the requirements for guided tissue regeneration. However, future studies with methodological variations could bring additional and more conclusive results on the use of ethyl cyanoacrylate as a membrane barrier.

**Keywords:** Cyanoacrylates, bone transplantation, biocompatible materials.

## *LISTA DE FIGURAS*

- Figura 1** - Cirurgia Experimental dos ratos (1a: Enxerto ósseo em bloco foi fixado à calvária com etil-cianoacrilato, 1b: Calvária do rato removida). ..... 32
- Figura 2** - Imagens histológicas dos grupos (2a: Grupo CM30; 2b: Grupo SM30; 2c: Grupo CM60; 2d: Grupo SM60). Coloração de Hematoxilina-eosina (HE) 63 x..... 33
- Figura 3** - Imagens histológicas dos grupos em visão panorâmica (3a: Grupo CM30; 3b: Grupo SM30; 3c: Grupo CM60; 3d: Grupo SM60). Coloração de HE; 63 x. .... 34
- Figura 4** - Imunomarcagem das proteínas TRAP e RANK-L pela análise imunoistoquímica (4a: RANK-L no Grupo CM30; 4b: TRAP no Grupo CM30; 4c: RANK-L no Grupo CM60; 4d: TRAP no Grupo CM60; 4e: RANK-L no Grupo SM30; 4f: TRAP no Grupo SM30; 4g: RANK-L no Grupo SM60; e 4h: TRAP no Grupo SM60). ..... 35
- Figura 5** - Resultados da análise estatística (programa SigmaEstat, versão 3.5). ..... 36

# SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>17</b>
<i>Delineamento Experimental .....</i>	<i>17</i>
<i>Cirurgia Experimental.....</i>	<i>18</i>
<i>Análise histométrica.....</i>	<i>19</i>
<i>Análise imunoistoquímica .....</i>	<i>20</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>21</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<i>Histometria.....</i>	<i>21</i>
<i>Imunoistoquímica .....</i>	<i>24</i>
<i>Estatística.....</i>	<i>25</i>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>37</b>

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

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a técnica preconizada para a instalação de implantes de titânio osseointegráveis está bem estabelecida, obtendo-se resultados com elevada margem de sucesso (Hjorting-Hansen, E. 2002). Porém, em alguns pacientes, observam-se grandes perdas ósseas devido a traumas, doenças periodontais e tratamento de neoplasias, inviabilizando uma adequada reabilitação do sistema estomatognático com próteses implanto-suportadas. Assim, com relação à espessura e altura óssea, se faz necessária a utilização de técnicas de enxertia óssea para a recuperação e manutenção da arquitetura do rebordo alveolar, com o objetivo da reabilitação com próteses implanto-suportadas (Donos et al. 2002).

Com isso, frente a perda óssea, busca-se o melhor material para estimular regeneração óssea, sendo o enxerto ósseo autógeno considerado “padrão-ouro” em função de suas características de alta capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora (Khan et al. 2005). Assim, durante o processo de reparação óssea, a qualidade do enxerto ósseo, bem como a qualidade da área receptora desempenha papel importante. No entanto, imprevisíveis reabsorções dos enxertos ósseos durante o processo de remodelação continuam sendo problemas frequentes (Adeyemo et al. 2008 a; Adeyemo et al. 2008 b).

Objetivando diminuir os índices de reabsorção do enxerto ósseo autógeno, muitas técnicas têm sido desenvolvidas, como a utilização da fixação com parafusos de titânio, o preparo da área receptora com realização de perfurações e decorticalizações, o cuidado com a síntese do perióstio cobrindo o enxerto ósseo, e a utilização da regeneração tecidual guiada para manter o volume do enxerto ósseo e favorecer a sua

integração à área receptora (Lin et al. 1990; De Carvalho et al. 2000; Donos et al. 2005; Jardini et al. 2005).

O conceito de regeneração tecidual guiada é baseado na utilização de barreira de membrana, de forma a permitir apenas a migração de células desejáveis na área do defeito ósseo e impedir que células indesejáveis entrem em contato com a área receptora, determinando o conceito da osteopromoção (Dahlin et al. 1991; Karring et al. 1993). Então, a regeneração óssea guiada tem sido empregada de forma contínua utilizando conceitos da regeneração tecidual guiada, quando aplicada sobre enxertos ósseos, objetivando diminuir índices de reabsorção do enxerto (Maionara et al. 2005). Contudo, o uso clínico de barreiras de membrana para as técnicas de regeneração óssea guiada nem sempre apresentam resultados previsíveis com relação à neoformação óssea na área receptora ou manutenção do volume do enxerto ósseo utilizado (Kostopoulos et al. 1994; Lundgren et al. 1995).

Inserido nesse contexto, observa-se que a utilização de adesivos teciduais, tais como cianoacrilatos, têm sido empregados para a fixação de enxertos ósseos autógenos, apresentando boa compatibilidade tecidual (Saska et al. 2009). Saska et al. (2009) observaram diminuição da reabsorção óssea do enxerto ósseo autógeno fixado com etil-cianoacrilato. Outros autores encontraram resultados semelhantes aos observados por Saska et al. (2009) utilizando adesivos teciduais similares. Assim, foi observada de forma significativa a manutenção do volume ósseo quando o enxerto ósseo autógeno foi fixado com N-butil 2-cianoacrilato (De Oliveira Neto et al. 2012). Recentemente, De Melo et al. (2013) constataram baixa citotoxicidade do etil-cianoacrilato em cultura de células osteoblásticas.

Os alquil-2-cianoacrilatos foram primeiramente sintetizados, em 1949, por Ardis et al. (1949), mas somente em 1959, suas propriedades adesivas foram relatadas por Coover et al. (1959). O grupo destes adesivos possui diferentes tipos de cianoacrilato, alterando somente o comprimento da cadeia lateral, como: metil ( $R=CH_3$ ), etil ( $R=C_2H_5$ ), butil e isobutil ( $R=C_4H_9$ ) e octil-cianoacrilato ( $R=C_8H_{17}$ ) (Toriumi et al. 1990). Os cianoacrilatos se polimerizam em poucos segundos quando entram em contato com a água e superfícies, tais como: endotélio, mucosa, pele, sangue e osso, degradando-se em cianoacetato e formaldeído, com uma ligeira reação exotérmica. Por serem de forma líquida, possuem a habilidade de penetrar nas superfícies irregulares dos tecidos, promovendo uma forte adesão (Weber et al. 1984; Shermak et al. 1998).

Na Literatura não há relatos da investigação e utilização do etil-cianoacrilato aplicado nos conceitos da regeneração tecidual guiada (como barreira de membrana) sobre enxertos ósseos, permitindo a manutenção do volume do enxerto ósseo. Diante desse cenário, achamos oportuna a realização do presente estudo, usando modelo experimental *in vivo*, que objetivou avaliar o efeito do etil-cianoacrilato utilizado como barreira de membrana sobre enxertos ósseos autógenos fixados com gotas de etil-cianoacrilato nas bordas do enxerto, e que poderá favorecer o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas no campo da regeneração tecidual guiada.

## MATERIAL E MÉTODO

### Delineamento Experimental

Inicialmente o projeto desta pesquisa foi enviado para análise do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e obteve parecer favorável (processo 2013-01581). Para a realização deste estudo, foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) adultos, machos, com 3 a 4 meses de idade e peso variando de 300 a 400 g, provenientes do Biotério da referida Instituição. Estes animais foram mantidos em gaiolas na sala de experimentação do biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e em ambiente climatizado variando de 22 a 24°C, com ciclos de 12 horas de luz/dia.

Durante a realização do estudo experimental, os ratos consumiram ração sólida (Ração Ativada Produtor; Anderson & Clayton S.A. Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Nos períodos de jejum (12 horas) que antecederam ao procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos apenas com água. Após a cirurgia, eles foram alimentados com ração sólida e água.

Sendo assim, em cada animal foi realizado enxerto ósseo autógeno em bloco, fixados na calvária com gotas de etil-cianoacrilato (Super Bonder®, Ethicon Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) nas bordas, como discriminado a seguir:

- Grupo I (Controle; n=12): sem a utilização de membrana sobre o enxerto;
- Grupo II (Teste; n=12): tiveram o enxerto recoberto com 200µL de etil-cianoacrilato (Super Bonder®, Ethicon Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil).

## **Cirurgia Experimental**

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de quetamina na dose de 70mg/Kg (Doálen, AgriBands Ltda, Paulínea, SP, Brasil), associado ao cloridrato de xilazina na dose de 30mg/Kg (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil). Após tricotomia e antissepsia da área a ser operada com solução de polivinilpirrolidona iodada a 10% (Riodeine – Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil), foi realizada uma incisão em formato de “U” na região fronto-parietal, com sua base voltada para a região posterior, e um retalho de espessura total foi elevado. A seguir, o enxerto ósseo autógeno da calvária (região frontal) foi obtido com a utilização de uma broca trefina de 05 mm de diâmetro (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, Flórida, EUA), acoplada a uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante de solução salina esterilizada. Em seguida, o enxerto ósseo em bloco foi fixado à calvária (Figura 1a).

No Grupo I, os enxertos ósseos autógenos foram fixados com gotas de etil-cianoacrilato nas bordas do enxerto, sem a utilização de membrana sobre esse enxerto; No Grupo II, os enxertos ósseos autógenos foram fixados com gotas de etil-cianoacrilato nas bordas do enxerto, e foi aplicada sobre os mesmos uma camada de 200µL (mensurado com a utilização de uma pipeta) de etil-cianoacrilato.

Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados, de modo a obter fechamento primário da ferida com fio de sutura seda 4-0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Cada animal recebeu dose única de 24.000 UI de Pentabiótico (Benzilpenicilina benzatina - 12.000 UI, Benzilpenicilina procaína - 6.000 UI, Benzilpenicilina potássica - 6.000 UI, Sulfato de Diidroestreptomicina - 5 mg, Sulfato de

Estreptomicina - 5 mg; Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil), por via intramuscular.

Decorridos 30 e 60 dias do ato operatório os animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose excessiva de anestésico.

Após a eutanásia dos animais, as calvárias dos ratos foram removidas (Figura 1b) e fixadas em solução de formaldeído 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas através da imersão em EDTA 20% (solução de ácido etilenodiaminotetracético). Após a descalcificação, as peças foram lavadas, desidratadas em sequência crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Para a inclusão em parafina, a peça foi dividida ao meio, e posicionada com as faces medias voltadas para o lado do corte. Cortes seriados de 6 µm de espessura foram obtidos e montados em lâminas histológicas, em que algumas foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina e outras para a técnica da imunohistoquímica.

### **Análise histométrica**

As imagens dos cortes foram capturadas por meio de uma câmera Axio Cam MRc5 (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) acoplada a um Estereomicroscópio Stemi 2000 C (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com um aumento de 1:25 para permitir uma visão panorâmica. Essas imagens foram salvas como figuras no programa Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss do Brasil LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e utilizadas para a quantificação no programa Image J (Wayne Rasband - Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Toda a extensão do enxerto foi delimitada para obtenção de sua área total. Os espaços medulares foram delimitados, mensurados e os valores somados para obtenção da área de tecido conjuntivo. A partir de uma regra de três, foi obtida a média da área de tecido ósseo para cada espécime. Essas medidas foram empregadas para o cálculo estatístico.

### ***Análise imunoistoquímica***

Foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60°C por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos.

Foram utilizados os anticorpos primários contra RANK-L e TRAP (Santa Cruz Biotechnology (SCBT), Dallas, Texas, EUA) anticorpo secundário biotilado (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, EUA), o amplificador Streptavidina Biotina (Kit Dako, Glostrup, Copenhaga, Dinamarca) e a diaminobenzidina (DAB, Dako Co, Carpinteria, Califórnia, EUA) como cromógeno. Ao término das reações foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos.

Para a análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Hesse, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Sankt Gallen, Suíça) e conectado a um microcomputador com software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software, Heerbrugg, Sankt Gallen, Suíça). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise: As duas bordas e o centro do defeito. Para efeito comparativo da

intensidade das imunomarcações entre os grupos experimentais, foi criado um escore onde as imunomarcações foram classificadas em uma escala de 4 graus, de ausentes a intensas (ausente, leve, moderada e intensa).

### ***Análise estatística***

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Após isso, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste. O nível de significância considerado foi de 5%. E foi utilizado o programa estatístico SigmaEstat, versão 3.5 (StatCon, Witzenhausen, Hesse, Alemanha).

## **RESULTADOS**

Os animais suportaram os procedimentos experimentais de forma adequada uma vez que foram seguidas as normas para manipulação sugeridas pelo comitê de ética no uso de animais. Um animal de cada grupo foi descartado por conta de ocorrência de deiscência do enxerto com subsequente infecção.

Os grupos ficaram assim com 11 animais em cada grupo distribuídos da seguinte maneira: Grupo I (controle) SM 30 = 5 animais; SM 60 = 6 animais; e Grupo II (teste) CM 30 = 5 animais; CM 60 = 6 animais.

### ***Histometria***

A análise histométrica, realizada por meio de microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Sankt Gallen, Suíça) e conectado a um microcomputador com software analisador de imagens digitalizadas Image J (Software de Processamento e Análise de Imagens, Richmond Hill, Ontário, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em

arquivos JPEG e foi realizada análise histológica da interface enxerto ósseo/área receptora.

### **Análise dos Grupos de 30 dias**

Em 3 espécimes do grupo CM30 e do grupo SM30 (figuras 2a, 2b, 3a e 3b), pode-se observar a imagem sugestiva da presença de fragmentos de cianoacrilato na interface enxerto/leito. Localizavam principalmente na periferia, mas em alguns espécimes esse material ocupava grande parte da interface. O cianoacrilato encontrava-se em íntimo contato com a superfície do enxerto, mas interpondo com seu leito, havia a presença de uma estreita faixa de tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão. Esse tecido era rico em fibras colágenas e fibroblastos e apresentava um infiltrado inflamatório que variava de leve a moderado. Em alguns pontos o infiltrado era mais intenso com a presença de polimorfonucleares neutrófilos. Junto a essas áreas, pontos de reabsorção eram encontrados. Suas fibras colágenas estavam dispostas paralelamente ao cianoacrilato à semelhança de uma cápsula fibrosa. Muitas áreas de tecido ósseo neoformado foram encontradas tanto na superfície do enxerto quanto no leito receptor. Esse tecido apresentava grande número de osteoblastos em sua periferia, espaços medulares amplos. Em muitos pontos, era possível observar as linhas de reversão indicando grande atividade osteoblástica. Vários pontos de reabsorção também foram encontrados, com a presença de clastos juntos às lacunas localizadas principalmente na interface enxerto/leito.

No grupo CM30 (figura 2a e 3a) pode se observar em todos os espécimes, a presença da camada de cianoacrilato sobre o bloco do enxerto. Esse material encontrava-se em íntimo contato com a cortical óssea em 3 espécimes. Em dois deles

havia a presença de uma estreita camada de tecido conjuntivo fibroso, onde se observava em alguns pontos, um infiltrado inflamatório leve.

### **Análise dos Grupos de 60 dias**

Da mesma forma que no período anterior, em ambos os grupos foi possível observar a imagem sugestiva da camada de cianoacrilato na porção periférica da interface enxerto/leito (figuras 2c, 2d, 3c e 3d). Em alguns casos esse material é encontrado em toda interface. A faixa de tecido conjuntivo fibroso interpondo o leito ósseo com o cianoacrilato, também é observada nesse período. Em alguns espécimes encontra-se mais estreita apresentando um infiltrado de leve a moderado. Em outros, onde o cianoacrilato estava ausente, essa faixa é mais espessa com ausência de infiltrado inflamatório. Em alguns casos pode-se observar uma continuidade do enxerto com o leito ósseo. O tecido ósseo do enxerto e do leito encontrava-se mais maduro, com espaço medulares menores. Mais frequentes no grupo SM60, áreas de remodelação foram encontradas nas extremidades do enxerto, resultando em arredondamento dos bordos (figura 3d). Nas demais áreas, poucos pontos de reabsorção foram encontrados nesse período. A presença de clastos junto à área reabsorvida foi encontrada com menor frequência do que no período anterior. A presença da camada de cianoacrilato sobre o bloco do enxerto pode ser observada somente em parte dos espécimes do grupo CM60. Quando não se encontrava em íntimo contato com o enxerto, havia a presença de uma fina camada de tecido conjuntivo fibroso.

### **Análise histométrica**

Após a avaliação histológica, os dados para avaliação do nível de reabsorção (tanto superficial, quanto profunda) foram obtidos por meio da separação da parte de

tecido conjuntivo formada na reparação e mensurando somente a parte de tecido ósseo, e esses dados transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, dando resultado em porcentagem que depois foi comparado com a área total do enxerto (Tabela 1). Esses dados foram usados para análise estatística.

Tabela 1. Resultado histométrico em percentuais.

CM 30	a. pixel	a. %	CM60	a. pixel	a. %
1	965793	37,349	1	817141	35,785
2	801510	27,351	2	1009071	49,775
3	981425	54,936	3	1078927	37,093
4	1274872	44,906	4	1001586	42,221
5	1177649	46,144	5	848313	40,130
			6	1167362	54,702

SM 30	a. pixel	a. %	SM 60	a. pixel	a. %
1	954972	42,445	1	1383332	55,398
2	1013216	45,412	2	755005	40,005
3	1017865	41,174	3	613160	47,906
4	836730	38,359	4	623144	33,224
5	630650	37,595	5	668240	22,265
			6	1195037	40,315

### **Imunoistoquímica**

O grupo CM30 apresentou marcação moderada para a RANK-L (figura 4a) que é responsável pela ligação aos receptores RANK das células precursoras de osteoclastos. A proteína TRAP apresentou-se de forma moderada, caracterizando presença de atividade osteoclástica (figura 4b). Para o grupo CM60, as imunomarcações para RANK-L e para TRAP foram moderadas mostrando uma continuidade no processo de remodelação óssea (figuras 4c e 4d).

No grupo SM30, a proteína RANK-L teve marcação leve (figura 4e), revelando discreta presença de RANK-L, logo haverá menor ativação das células precursoras

osteoblásticas em osteoclastos. Já a marcação para TRAP foi moderada (figura 4f), mostrando presença de atividade osteoclástica (reabsorção óssea). E para SM60 as proteínas RANK-L e TRAP apresentam-se de forma leve (figuras 4g e 4h), havendo assim menor formação e atividade osteoblástica (tabela 2).

Tabela 2. Resultados da marcação de proteínas da análise imunoistoquímica.

	RANK-L		TRAP	
	SM	CM	SM	CM
<b>30</b>	1	2	2	2
<b>60</b>	1	2	1	2

### ***Estatística***

Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis que mostrou que não foi encontrada significância estatística do grupo tratado com etilcianoacrilato usado como barreira de membrana se comparado ao grupo não tratado ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).

## DISCUSSÃO

Os trabalhos relacionados à reparação óssea têm sido realizados há anos, com a intenção de adquirir conhecimentos que possam auxiliar em cirurgias de reconstruções ósseas, objetivando a reabilitação do sistema estomatognático. Como parte desses estudos, a utilização dos princípios de regeneração tecidual guiada tem sido empregada também nos enxertos ósseos autógenos, objetivando diminuir os índices de reabsorção óssea do enxerto inerente ao processo de remodelação óssea.

Diante disso, através da análise histométrica, este estudo verificou a baixa citotoxicidade do etil-cianoacrilato, visto que não foram achadas áreas de infiltrado inflamatório com maior intensidade ou mesmo a presença de osteoclastos de maneira muito significativa na área de contato entre a cola e os tecidos adjacentes. Esse também foi o achado de De Melo et al. (2013) corroborando a biocompatibilidade desse tipo de material. Outro fator que confirma esse achado é a ausência de necrose na área de contato do material com o tecido ósseo e com o tecido conjuntivo fibroso. A necrose poderia ocorrer por conta da impermeabilização da camada superior do enxerto onde a membrana recobria, impedindo ou atrapalhando a irrigação nessa área, ou mesmo em função de um efeito irritante de algum dos componentes da cola.

Ainda relacionado à toxicidade destes adesivos, Weber et al. (1984) e Shermak et al. (1998) verificaram que sua velocidade de degradação está relacionada ao tamanho da cadeia, ou seja, quanto maior for a cadeia lateral, menor a velocidade de degradação e menor a histotoxicidade, porém maior é o tempo de cura. Sendo assim, o butil, o isobutil e principalmente o Octil 2-cianoacrilato apresentam maior cadeia lateral, menor velocidade de degradação e menor histotoxicidade, porém um maior tempo de cura, além de apresentarem elevado custo e menor disponibilidade. Esses

motivos nos levaram a optar pela utilização do etil-cianoacrilato comercial. Também, na literatura foram encontrados mais trabalhos usando cianoacrilatos com cadeia lateral longa (principalmente relacionados a trabalhos de cirurgia, para coaptação de feridas e em timpanoplastias) e menos trabalhos encontrados usando o etil-cianoacrilato, que apresenta cadeia lateral curta, e nenhum trabalho usando essas colas como membrana. Diante das possibilidades que esses diferentes materiais poderiam trazer acreditamos que trabalhos adicionais deveriam ser realizados empregando a estratégia da barreira de membrana.

No preparo das peças para processamento histológico, pode-se observar clinicamente que houve estabilidade do fragmento ósseo empregado como enxerto. Esse dado sugere que a cola poderia se constituir em opção ao uso do parafuso para fixação do enxerto. Esse recurso poderia ser importante em regiões que apresentem osso tipo 3 ou 4, ou que apresentem menor espessura, como a região anterior de maxila com pneumatização, normalmente visto em pacientes edêntulos há longo tempo. A estabilidade do enxerto fixado com cianoacrilato também foi relatada por outros autores (Saska et al., 2009, De Oliveira Neto et al., 2012). Esses estudos demonstraram diferenças estatísticas quando comparados ao enxerto fixado com parafuso. Para os autores esse método evitava as micromovimentações do enxerto quando se empregava a cola em alguns pontos de suas bordas ou recobrimo toda a sua superfície.

A análise histológica das lâminas mostrou resultados semelhantes para os grupos com membrana (CM) e sem membrana (SM), apresentando resposta inflamatória compatível com um processo de remodelação óssea, sendo discreto ou moderado dependendo da área analisada. As lâminas do grupo SM60 mostraram

maior intensidade de resposta inflamatória e arredondamento dos bordos do enxerto. Tal aspecto, também relatado por Saska et al. (2009), demonstra que a reabsorção se inicia das bordas para o centro do enxerto. Na análise imunoistoquímica, foram encontradas marcações leves para RANK-L nos grupos SM30 e SM60, marcação leve para TRAP no grupo SM60 e marcações moderadas tanto para RANK-L, quanto TRAP, nos grupos CM30, CM60 e SM30. Apesar de indicar uma tendência para formação e atividade osteoclástica nos grupos com membrana, não houve diferença estatística. Isso poderia indicar que a membrana não ofereceu proteção adicional ao enxerto, mas também não acentuou a reabsorção ou promoveu inflamação adicional ou necrose associada à cola.

No trabalho de Saska et al. (2009) o estudo foi realizado em coelhos e no grupo controle, empregou-se enxerto autógeno fixado com parafuso, como é o habitual na prática clínica. Nesse estudo, optou-se por utilizar no grupo controle, a fixação das bordas do enxerto com cola, para evitar uma possível interferência, caracterizada pela compressão do enxerto contra o leito consequente da ação do parafuso. Além disso, a perfuração do parafuso poderia oferecer uma irrigação adicional a partir do leito ósseo.

Os resultados desse trabalho indicaram que, até o período estudado, o emprego da cola como barreira não proporcionou diferença quanto à manutenção do volume do enxerto ósseo. Tampouco houveram áreas de irritação ou necrose nos tecidos estudados, o que sugere a importância da realização de estudos adicionais com variações metodológicas poderiam trazer resultados complementares e mais conclusivos sobre a utilização do etil-cianoacrilato como barreira de membrana.

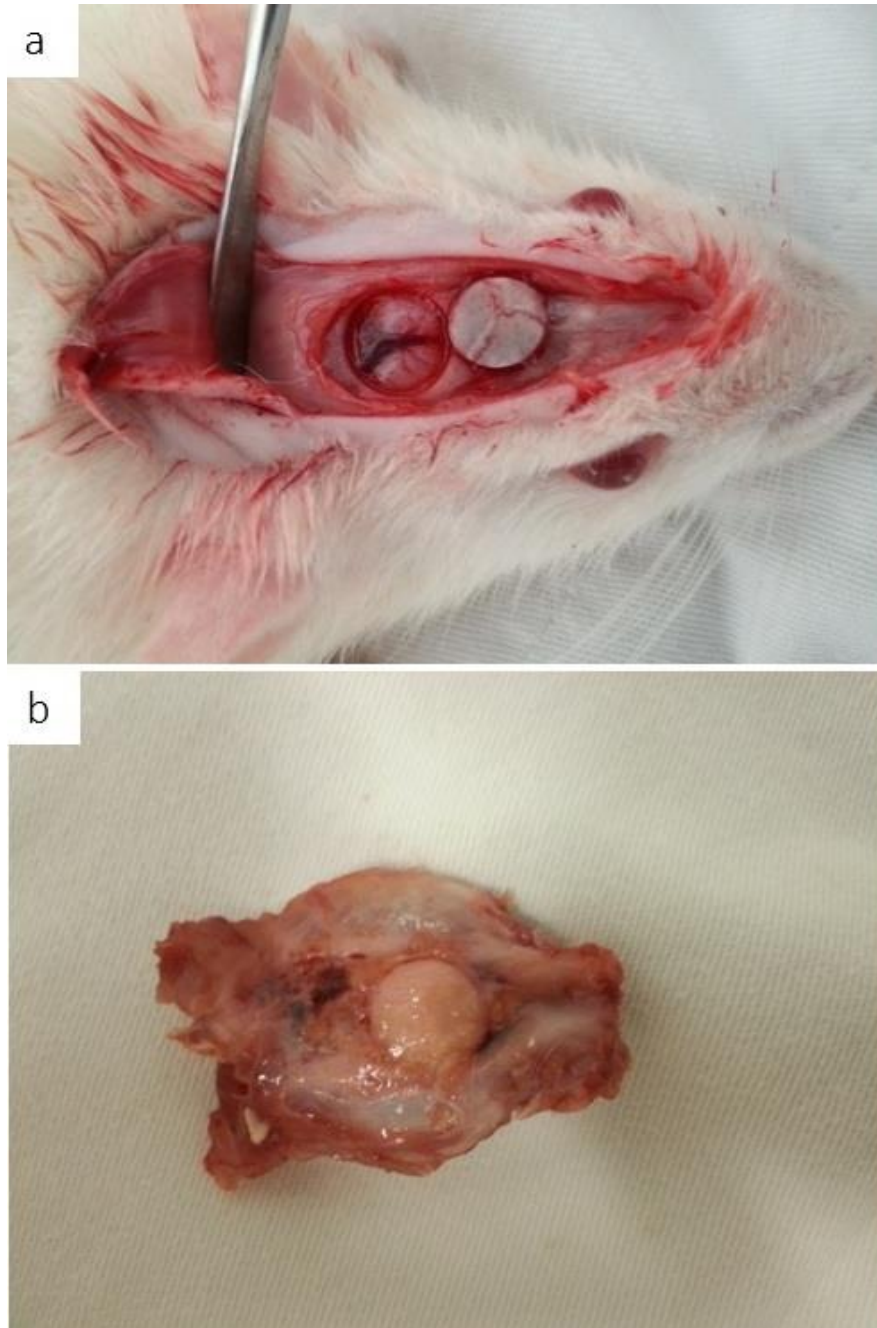
## REFERÊNCIAS

1. Adeyemo WL, Reuther T, BlochW, Korkmaz Y, Fischer JH, Zoller JE, Kuebler AC (2008,a) Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep. *Oral Maxillofac Surg* 12 (1):19–28
2. Adeyemo WL, Reuther T, BlochW, Korkmaz Y, Fischer JH, Zoller JE, Kuebler AC (2008,b) Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37(7):651–659.
3. Ardis AE. U.S. Patents No. 2467926 and 2467927(1949).
4. Coover HW, Joyner FB, Shearer Jr NH, Wicker Jr TH. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesive. *J Soc Plast Eng.* 1959;15:413-17
5. Dahlin C, Alberius P, Linde A (1991) Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique *J Neurosurg* 74(3):487–491.
6. De Carvalho PS, Vasconcellos LW, Pi J (2000) Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15(4):565–570
7. De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *J Oral Maxillofac Surg* 2013,71(1):35-41.
8. De Oliveira Neto PJ, Cricchio G, Hawthorne AC, Okamoto R, Sennerby L, Lundgren S, Salata LA. Tomographic, histological, and immunohistochemical

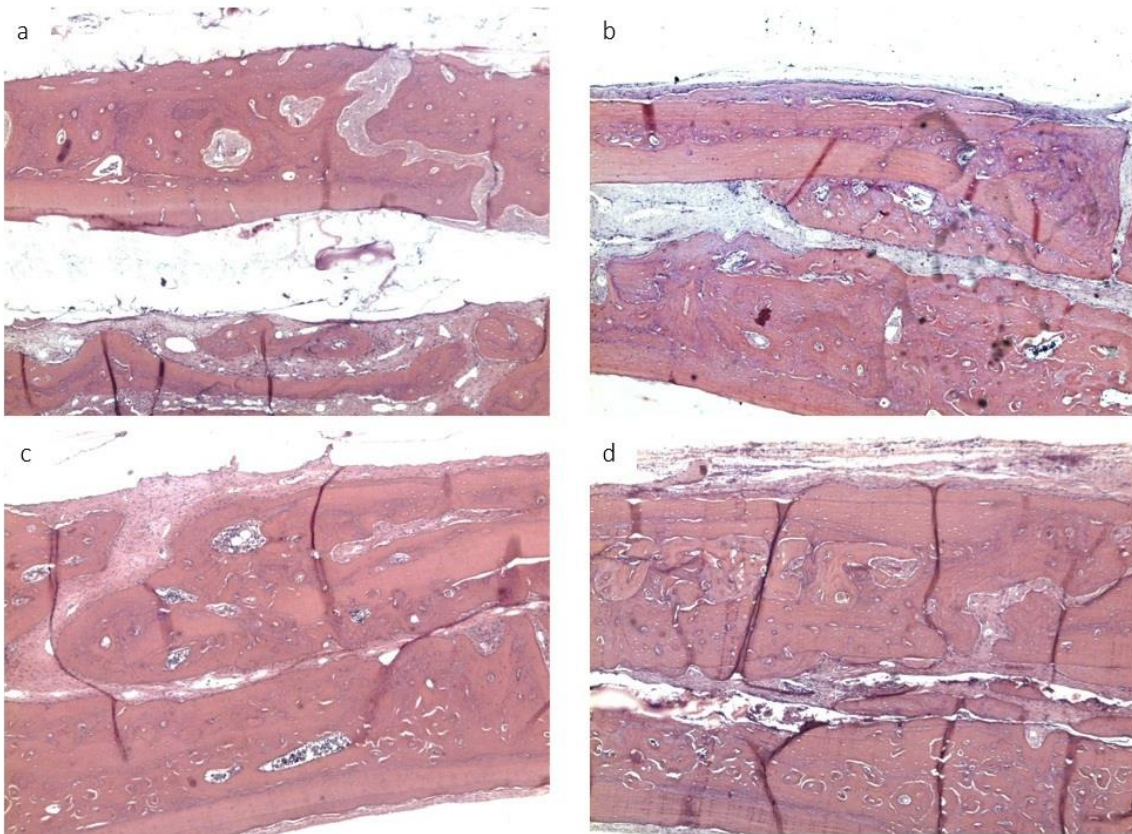
- evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrilate for onlay graft fixation in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012, 14(6):861-71.
9. Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the mandible with GTR and onlay cortical bone grafting. *Clin Oral Implant Res* 2002, 13: 175-184
  10. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T (2005) Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 16(2):133–139
  11. Hjorting-Hansen E (2002) Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6(1):6–14
  12. Jardini MA, De Marco AC, Lima LA (2005) Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(6):666–673.
  13. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontol* 1:26–35
  14. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005) The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13(1):77–86
  15. Kostopoulos L, Karring T (1994) Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Implants Res* 5(2):66–74
  16. Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA (1990) The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 86 (3):449–456

17. Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S (1995) Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit *Clin Oral Implants Res* 6(2):67–72
18. Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F (2005) Reduction of autogenous bone graft resorption by means of Bio-Oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 25(1):19–25
19. Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, et al: Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38:180, 2009
20. Shermak MA, Wong L, Inoue W, Crain BJ, Im MJ, Chao EY, et al. Fixation of the craniofacial skeleton with butyl-2-cyanoacrylate and its effect on histotoxicity and healing. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102:309-18.
21. Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy E. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116:546-50
22. Weber SC, Chapman MW. Adhesives in orthopedic surgery a review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. *Clin Orthop.* 1984;191: 249-56.

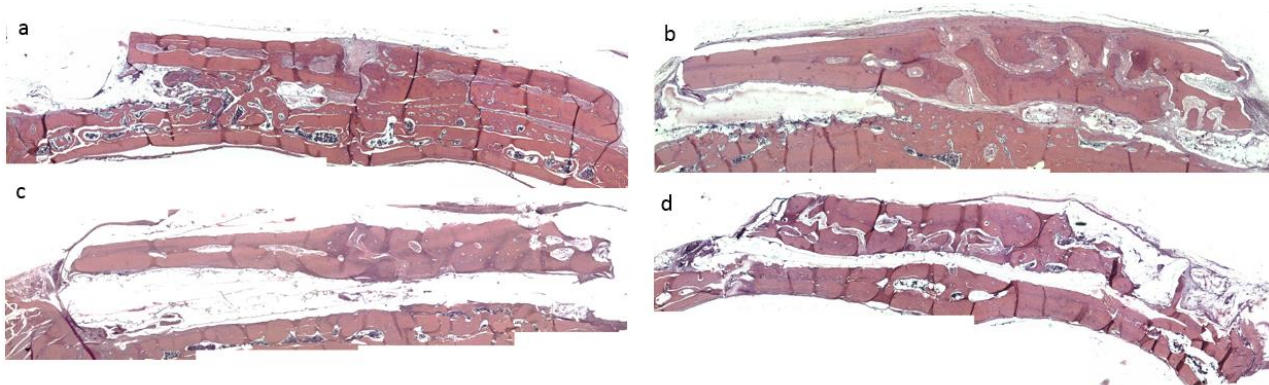
## *FIGURAS*



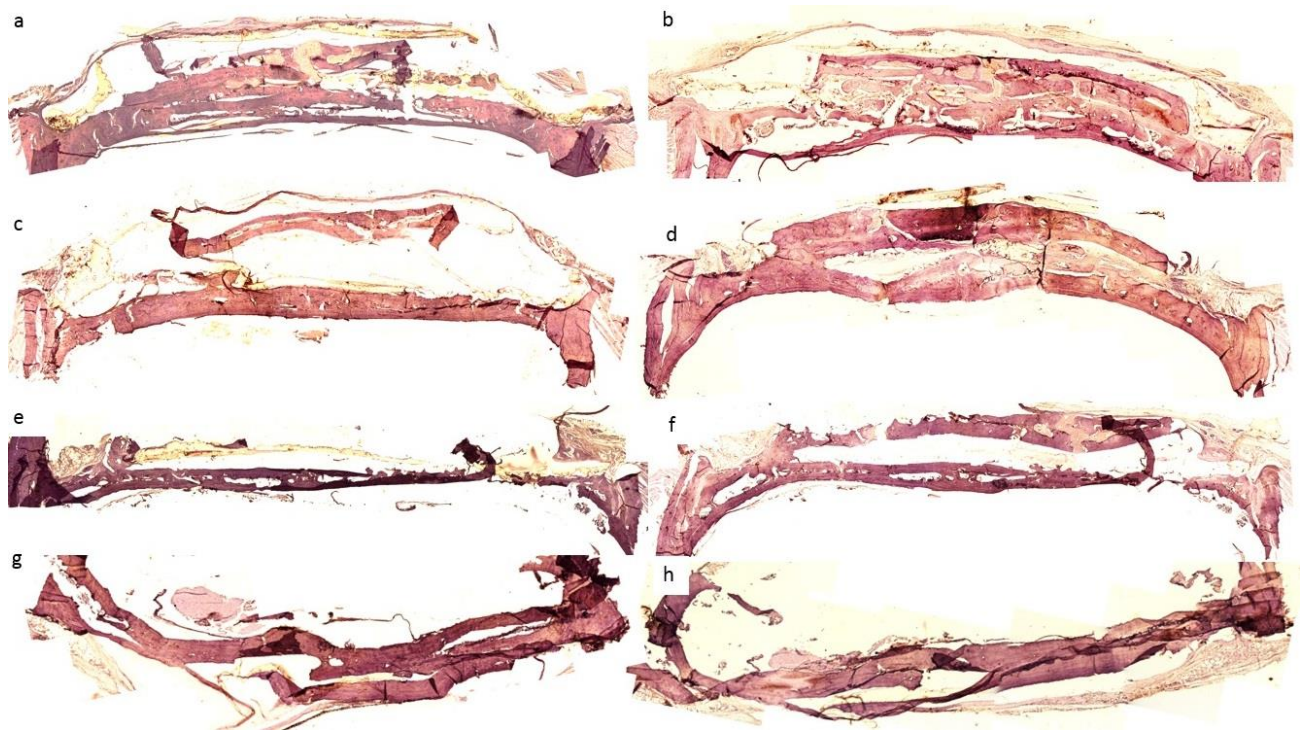
**Figura 1** - Cirurgia Experimental dos ratos (1a: Enxerto ósseo em bloco foi fixado à calvária com etil-cianoacrilato, 1b: Calvária do rato removida).



**Figura 2** - Imagens histológicas dos grupos (2a: Grupo CM30; 2b: Grupo SM30; 2c: Grupo CM60; 2d: Grupo SM60). Coloração de Hematoxilina-eosina (HE) 63 x.



**Figura 3** - Imagens histológicas dos grupos em visão panorâmica (3a: Grupo CM30; 3b: Grupo SM30; 3c: Grupo CM60; 3d: Grupo SM60). Coloração de HE; 63 x.



**Figura 4** - Imunomarcção das proteínas TRAP e RANK-L pela análise imunoistoquímica (4a: RANK-L no Grupo CM30; 4b: TRAP no Grupo CM30; 4c: RANK-L no Grupo CM60; 4d: TRAP no Grupo CM60; 4e: RANK-L no Grupo SM30; 4f: TRAP no Grupo SM30; 4g: RANK-L no Grupo SM60; e 4h: TRAP no Grupo SM60).

C:\Windows\system32\cmd.exe

Comparação entre médias dos postos das amostras

Amostras comparadas (comparações duas a duas)		Diferenças entre médias	Valores críticos ( $\alpha$ )			Signifi- cância
			0,05	0,01	0,001	
CM30	X SM30	: 1.0000	9.2437	12.6622	17.2511	ns
CM30	X CM60	: 0.0667	8.8502	12.1232	16.5167	ns
CM30	X SM60	: 1.4333	8.8502	12.1232	16.5167	ns
SM30	X CM60	: 1.0667	8.8502	12.1232	16.5167	ns
SM30	X SM60	: 0.4333	8.8502	12.1232	16.5167	ns
CM60	X SM60	: 1.5000	8.4383	11.5590	15.7480	ns

Quer salvar o que está na tela (S/N) ? // (Não tecle ENTER após digitar)

Figura 5 - Resultados da análise estatística (programa SigmaEstat, versão 3.5).

## ANEXOS

### ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA).

	
<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"</b>	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA	
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals	
<b>CERTIFICADO</b>	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado <b>"Efeito do etil-cianoacrilato e octil-2-cianoacrilato empregados como barreiras de membrana sobre enxertos ósseos em bloco: análise histológica qualitativa e histomorfométrica em ratos"</b> . Processo FOA nº 2013-01581, sob responsabilidade de Celso Koogi Sonoda apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de março de 2014.	
<b>VALIDADE DESTE CERTIFICADO:</b> 16 de Junho de 2016.	
<b>DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:</b> até 16 de Julho de 2016.	
<b>CERTIFICATE</b>	
We certify that the study entitled <b>"Effect of ethyl-cyanoacrylate and octyl-2-cyanoacrylate used as membrane barriers for bone grafts block: qualitative histological and histomorphometric analysis in rats"</b> , Protocol FOA nº 2013-01581, under the supervision of Celso Koogi Sonoda presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 12, 2014.	
<b>VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:</b> June 16, 2016.	
<b>DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:</b> July 16, 2016.	
 <b>Prof. Dr. Edison Ervolino</b> Coordenador da CEUA CEUA Coordinator	
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Aracatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP Fone (18) 3636-3234      Email CEUA: ceua@roa.unesp.br	

## **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, 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.

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](http://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://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



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](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](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](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](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](mailto: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](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](http://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](http://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.