

ANDRÉ LUIS DA SILVA FABRIS

**Análise do processo de reparo de defeitos
ósseos críticos em calvária de ratos
preenchidos com osso autógeno ou Bone
Ceramic[®]. Um estudo histométrico e
imunoistoquímico**

Araçatuba – São Paulo

2014

ANDRÉ LUIS DA SILVA FABRIS

**Análise do processo de reparo de defeitos
ósseos críticos em calvária de ratos
preenchidos com osso autógeno ou Bone
Ceramic[®]. Um estudo histométrico e
imunoistoquímico**

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).

Orientadora: Profa. Dra Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Titular Tetuo Okamoto

Processo FAPESP número 2012/06309-0

Araçatuba – São Paulo

2014

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Aos meus pais Abílio Fabris (*in Memoriam*), porém vivo em mim, e Maria Ivone da Silva Fabris (Dona Ivone) por serem tão especiais não só na minha formação, educação, mas pelo homem no qual me formei. Só uma palavra que resume isso, Amor.

Aos meus irmãos Rodrigo Da Silva Fabris e Gustavo Da Silva Fabris por sempre me apoiar em todas as fases da minha vida e me amparando nas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora, Professora Assistente Doutor. Roberta Okamoto. Com certeza, a maior dádiva do professor é proporcionar ao aluno oportunidades que levam ao crescimento sou eternamente grato primeiramente pela oportunidade da convivência com a senhora, além do privilégio de aprender dia-a-dia, seja na pesquisa, ou no meu crescimento enquanto ser humano. Nunca vou me esquecer da sua compreensão e ajuda constante, não houve um dia se quer no qual a senhora não tenha me recebido com um belo sorriso no rosto. Espero que nossa parceria continue por toda nossa vida pois eu sempre estarei disposto. Deixo aqui minha eterna gratidão e amizade!

Ao Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Definitivamente, ser mestre é o seu dom. mestre, no maior significado da palavra. Serenidade, humildade e paciência são características marcantes que o faz um ser humano especial. Aprendo com o senhor sempre. Muito obrigado por confiar em mim e nunca se esqueça de que a sua presença é fundamental para nós. Por toda a minha vida serei grato pela oportunidade que o senhor me deu, por nos receber sempre com toda atenção e disposto a ajudar com total liberdade e é com prazer que digo pelo que fez por mim que o tenho como meu amigo. Meu muito obrigado e receba meu carinho!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Tetuo Okamoto. Desde a minha graduação o senhor esteve ao meu lado segurando minha mão durante cirurgias , tendo como

espelho e um exemplo de vida como pessoa e como pesquisador. Com toda certeza o senhor fez e faz parte de minha formação ao senhor meu eterno respeito

Ao Professor Adj Osvaldo Magro Filho, por ser um exemplo para todos os alunos da FOA de professor. Sempre extremamente carinhoso no qual me recepcionou com um aperto de mão e palavras de conforto e tranquilidade , nos mostra o caminho desta linda profissão. Muito obrigado pelo incentivo e ensinamentos. Receba minha admiração!

À Professora Dra Thallita Pereira Queiroz, por aceitar com prontidão o convite para participar da banca examinadora. Agradeço de coração a atenção e disponibilidade.

Ao Professor Assistente, Dr. Francisley Ávila De Souza. Por várias conversas de incentivo pela confiança e a oportunidade em abrir caminhos aonde jamais havia pensado seguir, mesmo sem me conhecer. Agradeço por sempre me ajudar em tudo. Saiba que é uma dádiva a confiança depositada em mim.

Aos Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial , Paulo Sergio Perri De Carvalho, Michel Saad Neto, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, pela amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

Ao Professor Wilson Roberto Poi, pelo maior exemplo do "Ser Professor". Muito obrigado por fazer parte da minha formação e me fazer descobrir o professor que está em mim.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada (Sônia Regina Panzarini Barioni, Denise Pedrini, Daniela Brandini e Celso Sonoda), por serem os maiores

exemplos de professores. Pela disposição e empenho com o crescimento da nossa faculdade. Pelo cuidado no trato com os alunos da graduação e da pós-graduação. Vocês são mestres por excelência. Recebam minha eterna gratidão, carinho e admiração neste momento.

À Maria Dirce Colli, pelo carinho em me acolher não só no laboratório como em sua casa com todo o carinho, fazendo-nos sentir como se fossemos da família. a nossa mãezona de Araçatuba. Você faz a diferença nas nossas vidas. Agradeço pelo carinho, atenção, amor dispensado por nós da Cirurgia. Muito obrigado por fazer o nosso dia e a nossa vida muito mais fácil. Por acalantar o nosso sofrimento e nos agradecer com a sua presença. Meu eterno agradecimento!

À “Cleidinha” (Cleide Lemos Toquetão), por sempre nos receber com total educação, carinho e dedicação perido no qual estivemos juntos muito obrigado.

À “Sassá” (Sabrina Ferreira), pelo imenso carinho e respeito que existe entre nós. O mestrado não seria tão legal sem a sua presença. És um exemplo de aluna na pós-graduação e amiga. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por tantos momentos aqui vividos e que permanecerão por toda a vida.

A Adhara Smitch Nobrega por sempre me ajudar nas horas complicadas e corridas no mestado e também nos momentos engraçados no qual uma gargalhada ajuda a amenizar os problemas, aprendi muito com seu temperamento e amizade sincera. Obrigado.

À “Ju Zorzi” (Juliana Zorzi Colete), pelo respeito, amor e amizade. Obrigado por estar ao meu lado.

À **“Pili” (Maria del Pilar)**, pela amizade, carinho e alegria que você irradia.

Receba meu carinho!

Ao amigo Joel Santiago , por estar ao nosso lado e sempre disposto a nos ajudar no desenvolvimento de nossas pesquisas você é um exemplo a ser seguido.

Ao senhor Camilo Roberto Venancio pela disponibilidade carinho e atenção com os animais do biotério desta faculdade assim como o senhor **Arnaldo Cezar Dos Santos** que com o mesmo carinho vem tratando dos animais aqui operados sendo de fundamental importância para o andamento de nossas pesquisas. Deixo aqui um grande abraço.

Aos alunos da graduação, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado. Em especial, agradeço imensamente ao querido amigo **Tárik Ocon Braga Polo**, um aluno espetacular, um amigo que ficará para sempre agora iniciando o mestrado. Muito obrigado pela confiança, auxílio nas nossas pesquisas, na clínica e na minha vida. O que precisar pode contar comigo. Ao amigo **Igor de Oliveira Puttini**, pela amizade e grande disposição em nos ajudar. Um abraço ao **Luan Pier Beneti e Ana Carla Ornelas**. Agradeço pela atenção, disposição em me ajudar e pela alegria da nossa convivência no departamento .

Aos meus irmãos do coração “Leozinho e Gabrielzinho” (Leonardo Perez Faverani e Gabriel Ramalho Ferreira). Por terem me ajudado desde o início de meus caminhos na cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial em Bauru na residência, durante explicações e ensinamentos de companheirismo, seguido pelos caminhos traçados aqui nesta casa (UNESP) através de pesquisas e trabalhos realizados, nos momentos de conversa amizade e de confraternizações onde cada dia mais reforça a

nossa amizade. E você em especial Leozinho por não me deixar perdido durante os caminhos que foram seguidos neste período. Saiba que você tem um lugar especial no meu coração. Deixo meu muito obrigado pela cumplicidade e união.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 2012/06309-0), indispensável para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa da diretora **Profa Adj. Ana Maria Pires Soubhia** pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado. A cada dia admiro mais esta universidade, pela união e grande esforço para que a tríade fundamental da instituição representada pelo ensino, pesquisa e extensão universitária seja o maior lema desta casa. Agradeço de coração por permitir que estes sonhos se contrizem em minha vida.

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. Maria José Hitomi Nagata**, pela competência e afinco na condução da nossa pós-graduação. Estendo os meus sinceros agradecimentos ao vice-coordenador, o **Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda**, um exemplo de professor e ser humano. Aprendo muito com a sua serenidade e humildade.

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.

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 (Dirce, Gilmar, Odair, Tina, Paulo Gratão, Renato e Joilson). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação de Odontologia, da área de Prótese (Mayara, Ana Carol, Bruna Amélia, Joel Santiago, Rosse, Aline, Ana Paula, Amália, Daniel, Thais, Leonardo, Emily, Liliane, Aljomar, Rodrigo, Adhara, Agda, Mariana, Vitor e Carol Cantieri). Por me recepcionar no Departamento com muito respeito e amizade. Meu muito obrigado.

Aos colegas da pós-graduação da Dentística (André Godas, Rafael Simões e Laura Molinar Franco); da Estomatologia (Lígia e Gláucia), pela amizade e respeito que existe entre nós.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (Pedrão, Fernando, Heloísa, Marcelo, Pâmela, Elisa, Igor, Lamis, Willian Moraes, Gustavo, Bianca, Carlos Timóteo, Julierme, Fernanda Boss, Juliana Zorzi, Patrícia, Ana Paula, Júlio César, Rafael e Willian Caetano); e da Implantodontia (Eduardo Faco, Flávia, Cristiano, Geraldo Griza, Maria del Pilar, Giovana Francisconi, Juceleia Maciel e Rodrigo). Tenho aprendido a cada momento com cada um de vocês. Obrigado pelo auxílio constante na minha vida e na pós-graduação.

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.

Epígrafe

“Que eu continue com vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos,
uma lição difícil de ser aprendida.

Que eu permaneça com vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo,
eles vão indo embora de nossas vidas.

Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver,
sentir, entender ou utilizar essa ajuda.

Que eu realmente a minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes
tão fortes quanto o sucesso e a alegria.

Que eu atenda sempre mais à minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico eu possuo.

Que eu pratique mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses.

Que eu manifeste amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes
me exige muito para manter sua harmonia. E, acima de tudo...

Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte dessa maravilhosa teia chamada vida,
criada por Alguém bem superior a todos nós!

E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas
parcelas cotidianas de todos nós!”

Chico Xavier

LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

Figura 1 – Imagens histológicas dos grupos (1a: grupo GC 14 dias e 1b: grupo GC 28 dias; 1c: grupo GA 14 dias e 1c: grupo GA 28 dias; 1e: grupo GBC 14 dias e 1f: grupo GBC 28 dias). (Objetiva 1,6X – Lupa). As imagens mostram que os defeitos preenchidos com coágulo apresentaram apenas um tecido conjuntivo fino fechando o defeito ósseo nos dois períodos do experimento (14 e 28 dias). No grupo GA, o osso particulado preencheu o defeito aos 14 dias e aos 28 dias, notou-se fechamento do defeito original. No grupo GBC, o biomaterial preencheu o defeito aos 14 dias e permaneceu em grande quantidade aos 28 dias.

37

Figura 2. Tecido ósseo neoformado. Período de 14 dias: *,****: ($p < 0.05$); *,*: $p > 0.05$. Período de 28 dias:*, **,***: ($p < 0.05$).

38

Figura 3. Tecido conjuntivo neoformado. Período de 14 dias: *,****: ($p < 0.05$); **, **: $p > 0.05$. Período de 28 dias:*, **: ($p < 0.05$); *,*: $p > 0.05$.

39

Figura 4. Tecido ósseo neoformada. Período de 14 dias: *,**,***: ($p < 0.05$); 28 dias: *, **,*****: ($p < 0.05$).

40

Figura 5. Gráfico Box-plot indicando do grupo Bone Ceramic. Área de tecido ósseo: *,* $p > 0.05$. Área de tecido conjuntivo: *,*: $p > 0.05$; *, **: $p < 0.05$.

41

Figura 6. Período de tempo analisado e área óssea formada. Área de tecido ósseo: *,* p>0.05; *,** : p<0.05.

42

Figura 7. Período de tempo analisado e área óssea formada. Área de tecido conjuntivo: *,* p>0.05; *,** : p<0.05.

43

Figura 8 – Imunomarcção de osteocalcina (OC) aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

45

Figura 9 – Imunomarcção de RUNX 2 aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: leve; GA: moderada; GBC: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

48

Figura 10 – Imunomarcção de TRAP aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: leve). Aos 28 dias (GC: leve; GA: leve; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

49

Figura 11 – Imunomarcção de VEGF aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: moderada; GA: leve; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: moderada; GA: moderada; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

50

Figura 12 – Imagens obtidas da análise por microtomografia dos grupos GC, GA e GBC (14 e 28 dias). Notou-se neoformação óssea por meio do fechamento total do defeito aos 28 dias no grupo GA e no grupo GBC houve preenchimento do defeito com o biomaterial até os 28 dias.

51

Lista de Abreviaturas

GC =	Grupo Coágulo (defeito ósseo preenchido com coágulo somente)
GA =	Grupo Autógeno (defeito ósseo preenchido com osso autógeno)
GBC =	Grupo Bone Ceramic® (defeito ósseo preenchido com osso sintético (Bone Ceramic® - Straumann))
OC =	Osteocalcina
RUNX 2 =	Fator 2 de transcrição relacionado ao Runt
TRAP =	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
VEGF =	fator de crescimento vascular endotelial
3D	Imagem tridimensional
BC =	Bone Ceramic
HA =	Hidroxiapatita
g =	Gramas (unidade de medida)
Ca =	Cálcio
P =	Fósforo
ml =	Mililitro (unidade de volume)
ml/kg =	Mililitro/quilograma (concentração anestésica)
cm =	Centímetros (unidade de medida linear)
HE =	Hematoxilina e eosina (corantes histológicos)
RT-PCR =	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
βTCP =	Beta-tricálcio fosfato

μg = Microgramas (unidade de medida)

BMP-2 = Proteína morfogenética óssea – 2

TCP = Tricálcio fosfato

Sumário

Análise do processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou Bone Ceramic®. Um estudo histométrico e imunoistoquímico

1.1 Resumo	23
1.2 Abstract	25
1.3 Introdução	27
1.4 Materiais e métodos	30
1.5 Resultados	36
1.6 Discussão	52
1.7 Referências	57
1.8 Anexos	60

Análise do processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou Bone Ceramic®. Um estudo histométrico e imunoistoquímico

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Archives of Oral Biology. Entretanto, em se tratando da dissertação e para melhor entendimento dos resultados, foram inseridas diversas imagens, as quais serão reduzidas no momento do envio do artigo para publicação.*

1.1 Resumo

(1) Objetivos: Avaliar por meio da análise histométrica e imunoistoquímica, o potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita e beta- tricálcio fosfato (Bone Ceramic - Straumann®) no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

(2) Métodos: Foram utilizados ratos divididos em três grupos (n=8), submetidos à eutanásia aos 14 dias e 28 dias pós-cirúrgicos. Em cada animal foi realizado um defeito ósseo de 5mm na calvária, sendo o Grupo Coágulo (GC) com o defeito preenchido somente com coágulo; Grupo Osso Autógeno (GA), preenchido com osso autógeno e Grupo Bone Ceramic (GBC), com osso aloplástico (Straumann®). Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. Para a comparação entre os valores obtidos, foi realizado o teste ANOVA e como pós-teste, Tukey. Foi adotado como nível de significância $p < 0,05$. Foi realizada análise imunoistoquímica, com os anticorpos primários contra OC, RUNX 2, TRAP e VEGF, para a avaliação dos diferentes estágios do processo de reparo ósseo. Como análise adicional, foram obtidas imagens 3D das calvárias em microtomografia. **(3) Resultados:** O local do defeito ósseo originalmente tratado com BC foi totalmente preenchido por um conglomerado de biomateriais e osso neoformado, o qual foi estatisticamente superior ao GC, em ambos os períodos analisados ($p < 0,05$). Remanescentes de BC eram visíveis e estavam em íntimo contato com o tecido ósseo. Além disso, no grupo GA as observações foram semelhantes, porém foi notado fechamento total do defeito aos 28 dias e houve maior área de neoformação óssea em todos os períodos analisados, comparando-se aos demais biomateriais ($p < 0,05$). Defeitos que foram preenchidos com CO apresentaram

apenas um tecido conjuntivo delgado fechando o defeito ósseo. A proteína TRAP foi imunomarcada de forma leve. Já a imunomarcção da VEGF foi moderada. A imunomarcção da osteocalcina se mostrou presente em todos os períodos analisados (14 e 28 dias). As imagens obtidas pela microtomografia computadorizada mostraram o preenchimento do defeito pelo Bone Ceramic (BC) e osso autógeno aos 14 e 28 dias. O grupo GA evidenciou aos 28 dias na imagem em 3 dimensões compatibilidade com total neoformação óssea. **(4) Conclusões:** A suplementação do biomaterial testado (BC) foi favorável para o preenchimento do defeito ósseo até o final do período analisado, porém com menor taxa de neoformação óssea quando comparado ao autoenxerto.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis. Regeneração Óssea. Imunoistoquímica.

1.2-Abstract

Analysis of repair of critical rats calvarial defects after reconstruction with autogenous bone or Bone Ceramic®. A histometric and immunohistochemical study

(1)Objectives: To evaluate by histometric and immunohistochemical analysis, the osteoconductive potential of hydroxyapatite granules and beta-tricalcium phosphate (Bone Ceramic - Straumann ®) in the repair of critical bone defects in rat calvaria process. **(2)Methods:** The rats were divided into three groups (n = 8) and submitted to euthanasia at 14 days and 28 days post-surgery. In each animal a 5 mm calvaria bone defect was performed. In Blood Clot Group (CG) the defect was filled only with clot; in the Autogenous Bone Group (AG) the defect was filled with autogenous bone and in Bone Ceramic Group (BC), with alloplastic bone (Straumann ®).The bone tissue area was evaluated in the central region of bone defects. The results were submitted to ANOVA and Tukey's test at 5% level of significance. For the evaluation of the different stages of the bone healing process, immunohistochemical analysis was performed with primary antibodies against OC, RUNX 2, TRAP and VEGF. As an additional analysis, calvaria's 3D images were obtained in microtomography. **(3)Results:** The bone defect treated with BC was filled with a conglomerate of biomaterials and bone formation, which was statistically higher than CG in both periods analyzed. Remnants of BC were visible and were in intimate contact with bone tissue. Furthermore, the AG group

observations were similar, but it was observed a complete defect closure after 28 days and there was a greater area of bone formation in all periods analyzed, comparing to other biomaterials ($p < 0.05$). The defects filled with CO showed only a slender conjunctive tissue closing the bone defect. The TRAP protein was lightly immunomarked, while immunostaining of VEGF was moderate. The osteocalcin immunostaining was present in all analyzed periods (14 and 28 days). The AG group's 3D image showed full compatibility bone formation at 28 days. **(4)Conclusions:** The supplementation of tested biomaterial (BC) was favorable to the bone defect filling until the end of analyzed period, although with a lower rate of bone formation when compared to autograft.

Key-words: Biocompatible Materials. Bone Regeneration. Immunohistochemistry

1.3 Introdução

Para o restabelecimento funcional dos maxilares por meio dos implantes dentários é necessário que haja o mínimo de espessura e altura dos rebordos alveolares (1-3). Diversos fatores culminam na falta de osso alveolar, o que se torna fator limitante para a instalação dos implantes. Geralmente ocorre em pacientes que sofreram traumatismos dentoalveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita ou com outras patologias que envolvam maxila e mandíbula (4-6).

Nestas situações os pacientes devem ser informados das possibilidades terapêuticas para a reabilitação protética, desde uma simples confecção de prótese fixa até o preenchimento dos defeitos com enxertos ósseos (7-10). Estes possuem alta previsibilidade de sucesso, por ser o único biomaterial com potencial osteogênico, osteoindutor, osteocondutor, e não exibir propriedades antigênicas, existir em abundância e prover adequada estabilidade e suporte (11-13). Entretanto, diante de algumas situações como a morbidade da área doadora, quantidade limitada de enxerto que pode ser removido de regiões intrabuciais e a necessidade de anestesia geral para a remoção de enxertos de áreas extrabuciais, em que os indivíduos apresentem alguma contra-indicação sistêmica para a anestesia geral, estes enxertos podem não ser a melhor opção (13-15).

Sendo assim, os defeitos ósseos extensos podem demandar um grande período de tempo para o reparo, diminuindo as chances de sucesso. A tendência atual é desenvolver e utilizar biomateriais que acelerem ou, ao menos, permitam o reparo normal e completo do defeito ósseo, diminuindo a taxa de insucesso pós-operatória

(16, 17). Com isso, a engenharia tecidual possui o principal objetivo de criar um biomaterial no mínimo osteocondutor e que esteja a contento para o reparo ósseo, semelhantemente ou até superior aos enxertos ósseos (18).

Os substitutos ósseos sintéticos com a propriedade osteocondutora são investigados há décadas e a sua estrutura serve de arcabouço para a migração celular e deposição óssea oriunda das imediações, desta forma, podem ser gradativamente reabsorvidos e simultaneamente substituídos por novo tecido ósseo (18, 19). Neste contexto, os biomateriais cerâmicos a base de fosfato de cálcio são utilizados com frequência na realidade clínica médica e odontológica (20). As propriedades físicas destes biomateriais são específicas à área de superfície ou formato (bloco, partícula), à porosidade (denso, macro ou microporoso) e à cristalinidade (cristalino ou amorfo). As propriedades químicas dizem respeito à composição química, à razão molar cálcio / fosfato, ao grau de impureza elementar e à substituição iônica na estrutura atômica (21).

Bone Ceramic® - Straumann (BC) é um substituto ósseo 100% sintético, com morfologia para estimular a formação de osso vital. Possui índice de porosidade de 90%, com poros interconectados de diâmetro entre 100 a 500 microns. É composto por fosfato de cálcio bifásico, uma combinação de hidroxiapatita (HA) a 60% em peso e 40% em peso de beta- tricálcio fosfato. A estabilidade mecânica do volume aumentado é mantida graças à lenta reabsorção da hidroxiapatita, que impede o excesso de reabsorção, de acordo com informações do fabricante. Nos estudos de Daculsi et al (2003) (22), Cordaro et al. (2008) (23) e Frenken et al (2010) (24), o BC mostrou ser um substituto ósseo com propriedades osteocondutoras favoráveis para o reparo em

defeitos ósseos, com resultados semelhantes, no tocante a quantidade de osso mineralizado, quando o mesmo foi comparado com osso bovino anorgânico (Bio-Oss®). Entretanto, houve maior quantidade dos componentes de tecido mole e diferentes características de reabsorção para o grupo BC (23), o que estes autores sugeriram novos estudos para a confirmação dos resultados.

A proposta deste estudo foi avaliar por meio da análise histométrica e imunoistoquímica, o potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (Bone Ceramic - Straumann®) no processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos, aos 14 dias e aos 28 dias, comparados com o preenchimento dos defeitos com coágulo apenas (controle negativo) ou, enxerto ósseo autógeno (controle positivo).

Este estudo apresenta como hipótese nula que a área de tecido ósseo neoformado de defeitos ósseos preenchidos com BC ou osso autógeno não irá apresentar diferença estatística.

1.4 Materiais e métodos

Delineamento do Experimento

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 2012/01097). Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=8), submetidos à eutanásia em dois momentos do experimento, aos 14 dias e aos 28 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP.

Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (5 mm), como discriminado a seguir :

- Grupo Coágulo (GC) – n=16: O defeito ósseo crítico foi preenchido somente com coágulo;
- Grupo Osso Autógeno (GA) – n=16: O defeito ósseo crítico foi preenchido com osso autógeno (proveniente do próprio osso coletado da calvária);
- Grupo Bone Ceramic (GBC) – n=24: O defeito ósseo crítico foi preenchido com osso aloplástico (Straumann®). Para este grupo, foram operados adicionalmente 8 animais e submetidos à eutanásia aos 42 dias, com o intuito de verificar o comportamento deste grupo no longo prazo.

Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foi realizada incisão linear no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 (dois) cm com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca trefina de 5mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 5 mm de diâmetro (Furlaneto et al., 2007), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter. De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos somente com coágulo (n=16), preenchidos com osso autógeno (n=16) ou, preenchidos com osso sintético – Straumann® Bone Ceramic (n=24), como relatado anteriormente.

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e

fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico. Somente no grupo GBC, 8 animais foram submetidos à eutanásia aos 42 dias pós-operatórios.

As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por seis semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas em xilol. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e cortadas em micrótomo, obtendo cortes de 6 µm de espessura e posteriormente, montadas em lâminas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras para as reações de imunistoquímica.

Previamente a realização das análises histométrica e imunistoquímica, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecesse a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

Análise histométrica

Após a coloração das lâminas em HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando uma lupa (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um *software* analisador de imagens digitalizadas Image J (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas). Inicialmente o programa foi calibrado pela ferramenta “set scale”, a partir da imagem de régua fotografada em microscópio com aumento de 1,6X na lupa. Com isso todas as imagens manteriam o padrão de acordo com a captura dos grupos no aumento de 1,6X.

Sendo assim, as imagens dos grupos analisados foram transportadas uma a uma para o programa Image J. Através da ferramenta “free hands”, a área de tecido ósseo neoformada foi selecionada entre os cotos ósseos osteotomizados, bem como a área de tecido conjuntivo, biomaterial e coágulo, e o programa calculava na grandeza de μm^2 . Além disso, adotou-se um cálculo para a proporção de osso neorformado em relação aos demais tecidos presentes no defeito, de acordo com a seguinte fórmula:
Tecido ósseo: $\text{Tecido ósseo} / \text{Coágulo} + \text{Tecido conjuntivo} + \text{Tecido ósseo}$.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Sigma Plot 12.3 (San Jose, CA, EUA), seguindo um padrão de trabalhos prévios (18, 25, 26). A análise comparativa

dos biomateriais foi realizada utilizando análise de variância a dois critérios, após ter se realizado teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de igualdade de variância. A análise específica do grupo Bone Ceramic (14, 28 e 42 dias) foi realizada utilizando análise de variância a um critério (27) após ter se realizado teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de igualdade de variância. Análises dos períodos de tempo foram realizadas utilizando o teste t pareado (25, 26) e, empregou-se o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Para todas as análises, o teste Tukey foi utilizado como pós-teste. Adotou-se um nível de significância de $p < 0.05$.

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 RUNX 2 (fator 2 de transcrição relacionado ao Runt), TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e OC (osteocalcina) (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo secundário biotilado (Pierce Biotechnology), o amplificador Streptavidina Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) 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 16 e 25X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). 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 (ausente – 0, leve -1, moderada-2 e intensa-3).

Análise microtomográfica

Após a eutanásia dos animais e remoção das calvárias (aos 14 e 28 dias), estas foram fixadas em paraformaldeído e, anteriormente ao processamento laboratorial para obtenção das lâminas histológicas, duas amostras de cada grupo e período foram submetidas à avaliação em microtomógrafo computadorizado (Bruker micro CT, Skyscan, Be), em que foi avaliado o padrão de tecido ósseo neoformado por meio das imagens tridimensionais, obtidas pelos *softwares* Dataview e CTvox (Skyscan, Be).

1.5 Resultados

Análise Histológica

O local do defeito ósseo originalmente tratado com BC foi totalmente preenchido por um conglomerado de biomaterial e osso neoformado. Remanescentes de BC eram visíveis e estavam em íntimo contato com o tecido ósseo. Além disso, no grupo GA as observações foram semelhantes. Defeitos que foram preenchidos com coágulo apresentaram apenas um tecido conjuntivo fino fechando o defeito ósseo. Neste grupo, a suplementação com BC pode ter favorecido a formação óssea, o que foi observado nas amostras. Como esperado, nenhuma formação óssea substancial foi observada nos defeitos do grupo coágulo, enquanto o grupo osso autógeno particulado resultou no fechamento dos defeitos originais (Figuras 1a, 1b, 1c, 1d, 1e e 1f).

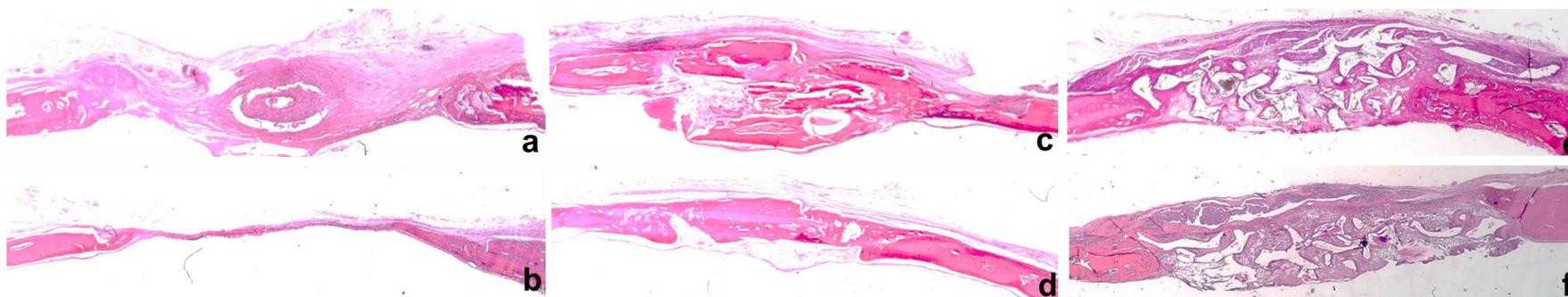


Figura 1 – Imagens histológicas dos grupos (1a: grupo GC 14 dias e 1b: grupo GC 28 dias; 1c: grupo GA 14 dias e 1c: grupo GA 28 dias; 1e: grupo GBC 14 dias e 1f: grupo GBC 28 dias). (Objetiva 1,6X – Lupa). As imagens mostram que os defeitos preenchidos com coágulo apresentaram apenas um tecido conjuntivo fino fechando o defeito ósseo nos dois períodos do experimento (14 e 28 dias). No grupo GA, o osso particulado preencheu o defeito aos 14 dias e aos 28 dias, notou-se fechamento do defeito original. No grupo GBC, o biomaterial preencheu o defeito aos 14 dias e permaneceu em grande quantidade aos 28 dias.

Análise Histométrica

Análise do Biomaterial

Tecido ósseo

Em uma análise dos diferentes biomateriais empregados observou-se que houve diferença estatística na área de formação do tecido ósseo ($p < 0.001$). Em 14 dias, o pós-teste de Tukey indicou que o osso autógeno formou mais tecido ósseo quando comparado com o coágulo ($p < 0.001$), resultados semelhantes foram apresentados pelo grupo Bone Ceramic vs. coágulo ($p < 0.001$). Em 28 dias, a maior área de formação óssea foi apresentada pelo osso autógeno, quando comparado com coágulo ($p < 0.001$) e, grupo Bone Ceramic ($p = 0.002$). O Grupo Bone Ceramic foi mais favorável à formação do tecido ósseo quando comparado com o coágulo ($p < 0.001$). A situação mais desfavorável dentro do período analisado foi para grupo coágulo, conforme figura 2.

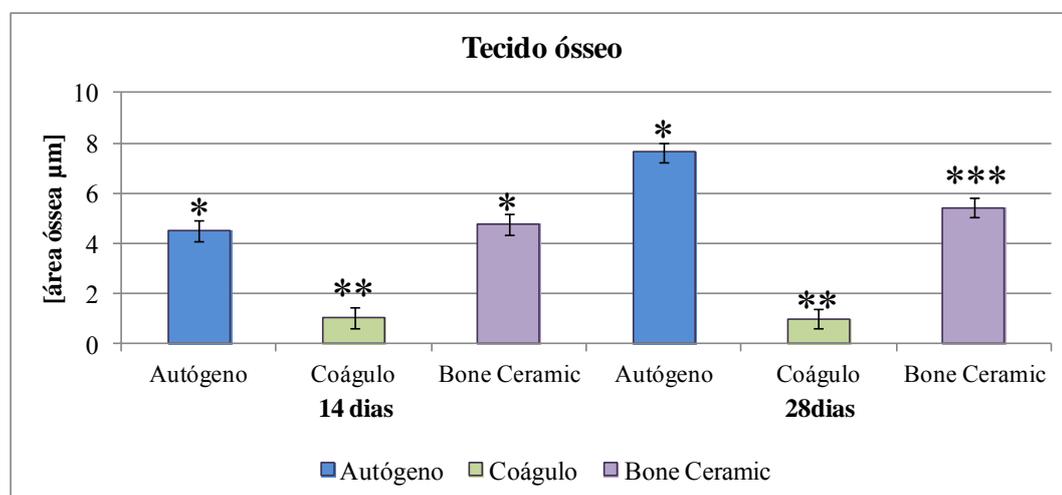


Figura 2. Tecido ósseo neoformado. Período de 14 dias: *,****: ($p < 0.05$); *,*: $p > 0.05$. Período de 28 dias: *,**,***: ($p < 0.05$).

Tecido conjuntivo

Em uma análise da área registrada de tecido conjuntivo houve diferença significativa para o quesito biomaterial ($p < 0.001$). No período de 14 dias, o grupo Bone Ceramic apresentou maior formação de tecido conjuntivo quando comparado com o grupo autólogo ($p < 0.001$), assim como o grupo coágulo apresentou maior formação de tecido conjuntivo quando comparado com o grupo autólogo ($p < 0.001$), porém não houve diferença significativa na comparação do grupo Bone Ceramic e coágulo ($p = 0.922$), poder do teste $\alpha = 1.0$. No período de 28 dias, o bone ceramic apresentou a maior formação de tecido conjuntivo quando comparado com o grupo autólogo e coágulo ($p < 0.001$), porém na comparação dos grupos coágulo e autólogo não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,162$), poder do teste $\alpha = 1.0$, conforme figura 3.

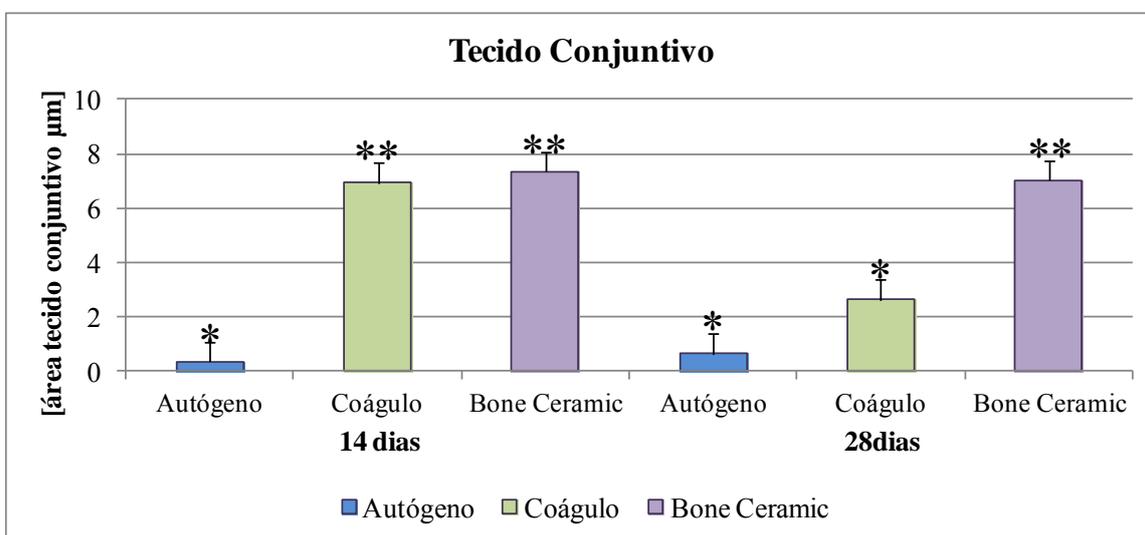


Figura 3. Tecido conjuntivo neoformado. Período de 14 dias: *,****: ($p < 0.05$); **,**: $p > 0.05$. Período de 28 dias: *,** : ($p < 0.05$); *,* : $p > 0.05$.

Área óssea neoformada

(obtida pela fórmula: $Tecido\ ósseo = \frac{tecido\ ósseo}{coágulo + tecido\ ósseo + conjuntivo}$)

Em uma análise da área óssea neoformada houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos biomateriais ($p < 0.001$). No período de 14 dias, o grupo autógeno foi o mais favorável à formação óssea quando comparado com o grupo coágulo e grupo Bone Ceramic ($p < 0.001$), em seguida o grupo Bone Ceramic foi o que apresentou a maior área neoformada quando comparado com o grupo coágulo ($p < 0.001$). No período de 28 dias, a tendência se manteve, o grupo autógeno foi o mais favorável quando comparado com os demais ($p < 0.001$) e, o grupo Bone Ceramic foi mais favorável quando comparado com coágulo ($p = 0.019$), conforme figura 4.

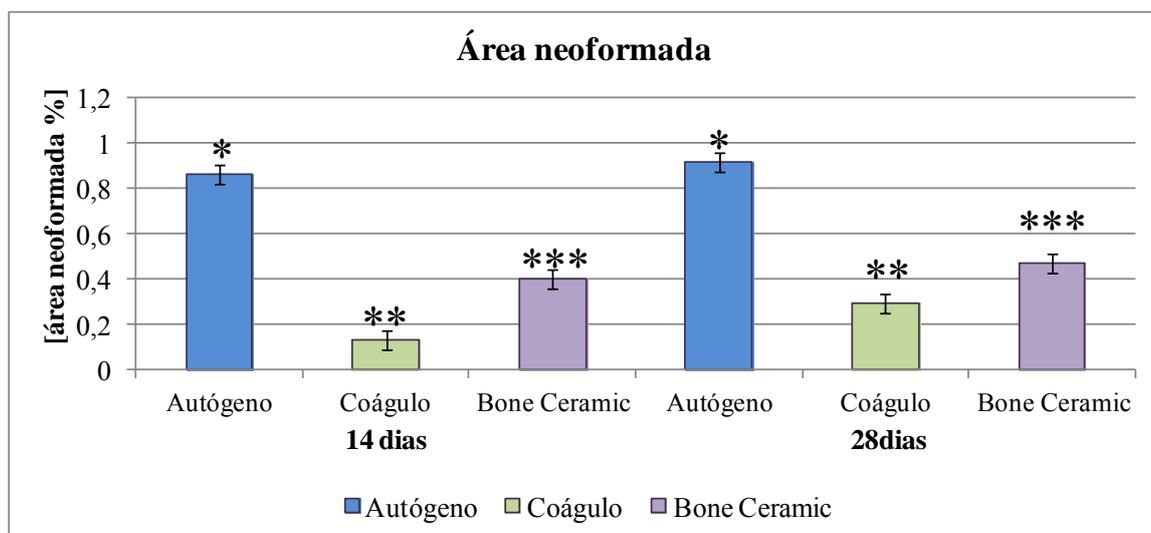


Figura 4. Área óssea neoformada. Período de 14 dias: *, **, ***: ($p < 0.05$); 28 dias: *, **, ****, *****: ($p < 0.05$).

Grupo Bone Ceramic

O grupo Bone Ceramic devido suas particularidades foi analisado independentemente dos demais grupos nos períodos 14, 28 e 42 dias. Em uma análise

do tecido ósseo, não houve diferença estatisticamente significativa na formação do tecido ósseo para os três períodos analisados. Em uma análise do tecido conjuntivo, o pós-teste de Tukey indicou o período de 42 dias como sendo o período de menor formação de tecido conjuntivo e, sendo estatisticamente significativa quando comparado com 28 dias ($p=0.021$) e 14 dias ($p=0.013$). Porém, na comparação dos períodos de 14 e 28 dias não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.971$), conforme figura 5.

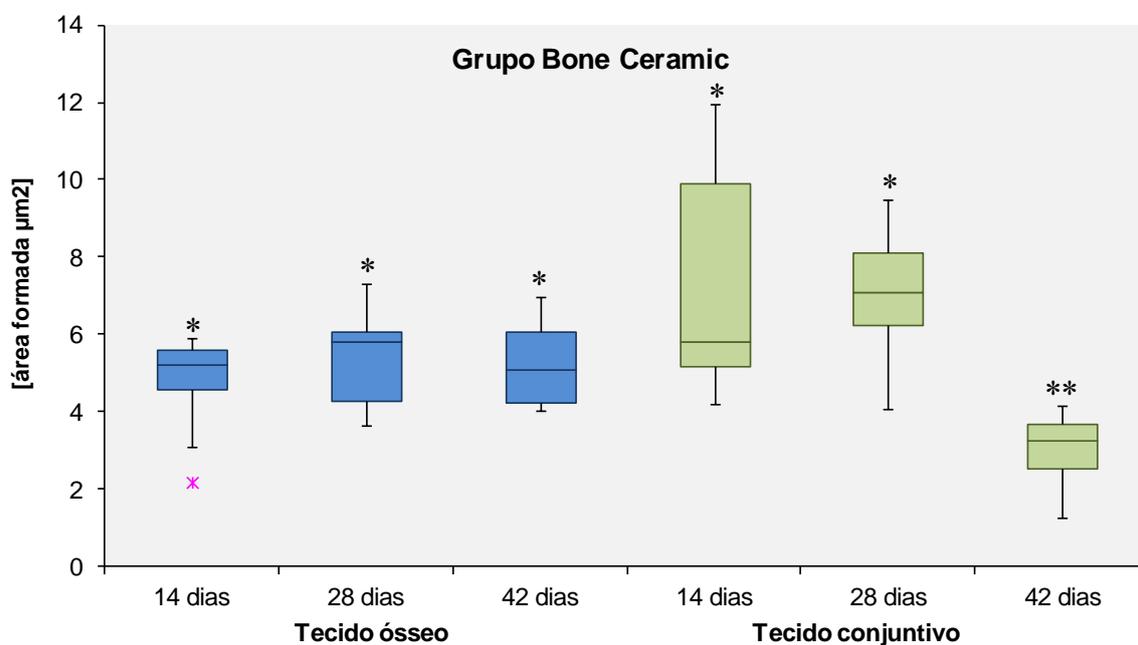


Figura 5. Gráfico Box-plot indicando do grupo Bone Ceramic. Área de tecido ósseo: *, * $p>0.05$. Área de tecido conjuntivo: *, * $p>0.05$; **, ** $p<0.05$.

Análise do fator tempo

Tecido ósseo

Em uma análise do fator tempo para cada biomaterial, observou-se que houve um aumento da formação de tecido ósseo autógeno de 14 para 28 dias ($p=0.002$), porém os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa

para o coágulo ($p=0.845$) e, grupo bone ceramic ($p=0.511$), conforme figura 6. Uma análise específica do grupo bone ceramic indicou que não houve diferença estatisticamente na formação de tecido ósseo nos períodos 14 vs. 28 dias ($p=0.511$), 14 vs. 42 ($p=0.319$), 28 vs. 42 dias ($p=1.000$).

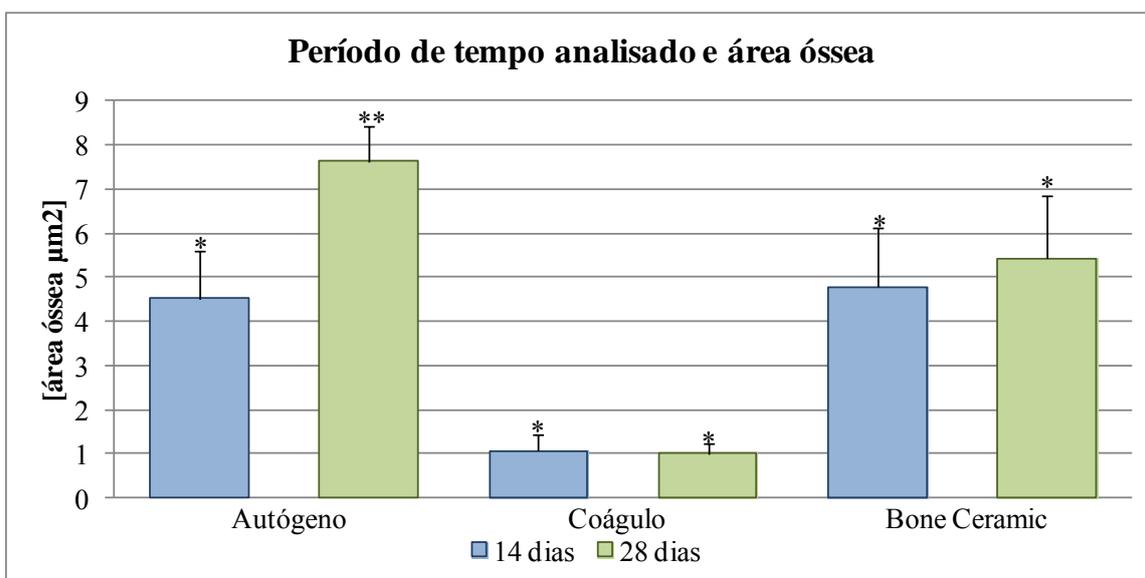


Figura 6. Período de tempo analisado e área óssea formada. Área de tecido ósseo: *, * $p > 0.05$; *, ** $p < 0.05$.

Tecido conjuntivo

Em uma análise da formação de tecido conjuntivo, observou-se que para o osso autógeno não houve diferença estatisticamente significativa no período de 14 para 28 dias ($p=0.145$). Porém, em uma análise do tecido conjuntivo houve uma redução significativa de tecido conjuntivo no período de 14 para 28 dias ($p=0.008$). O grupo Bone Ceramic apresentou redução de formação de tecido conjuntivo, porém não foi estatisticamente significativa ($p=0.468$), conforme figura 7. O grupo Bone ceramic não apresentou diferença estatisticamente significativa nos grupos 14 vs. 28 dias ($p=0.468$),

apresentou diferença estatisticamente significativa 14 vs. 42 ($p=0.007$), 28 vs 42 dias ($p=0.001$).

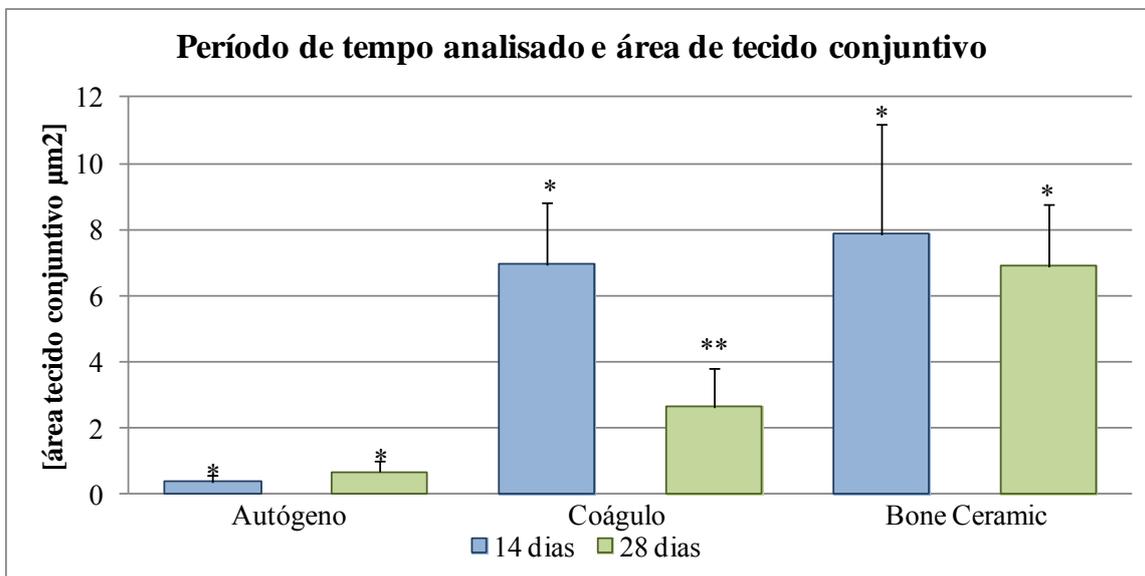


Figura 7. Período de tempo analisado e área óssea formada. Área de tecido conjuntivo: *, * $p>0.05$; *, **: $p<0.05$.

Imunoistoquímica

Osteocalcina (OC): A osteocalcina é uma proteína da matriz extracelular relacionada com o processo de mineralização do tecido ósseo. Caracteriza-se por apresentar marcação positiva em osteoblastos, osteócitos e matriz extracelular. Vale destacar que a sua presença no tecido ósseo neoformado também deve ser considerada uma vez que a osteocalcina caracteriza-se também por impregnar-se junto ao cálcio no momento da sua precipitação sobre a matriz de colágeno tipo I. Na análise das imunomarcações foram observadas marcações positivas nos osteoblastos dos três grupos experimentais avaliados. Especificamente aos 28 dias, nas áreas em que houve formação óssea, foi observada a marcação de osteocalcina junto à matriz óssea mineralizada, mostrando maior grau de maturidade nestes espécimes. Foi

observada imunomarcção leve para o grupo GC aos 14 e 28 dias. Para os grupos GA e GBC em ambos os períodos a imunomarcção foi moderada (Figura 8).

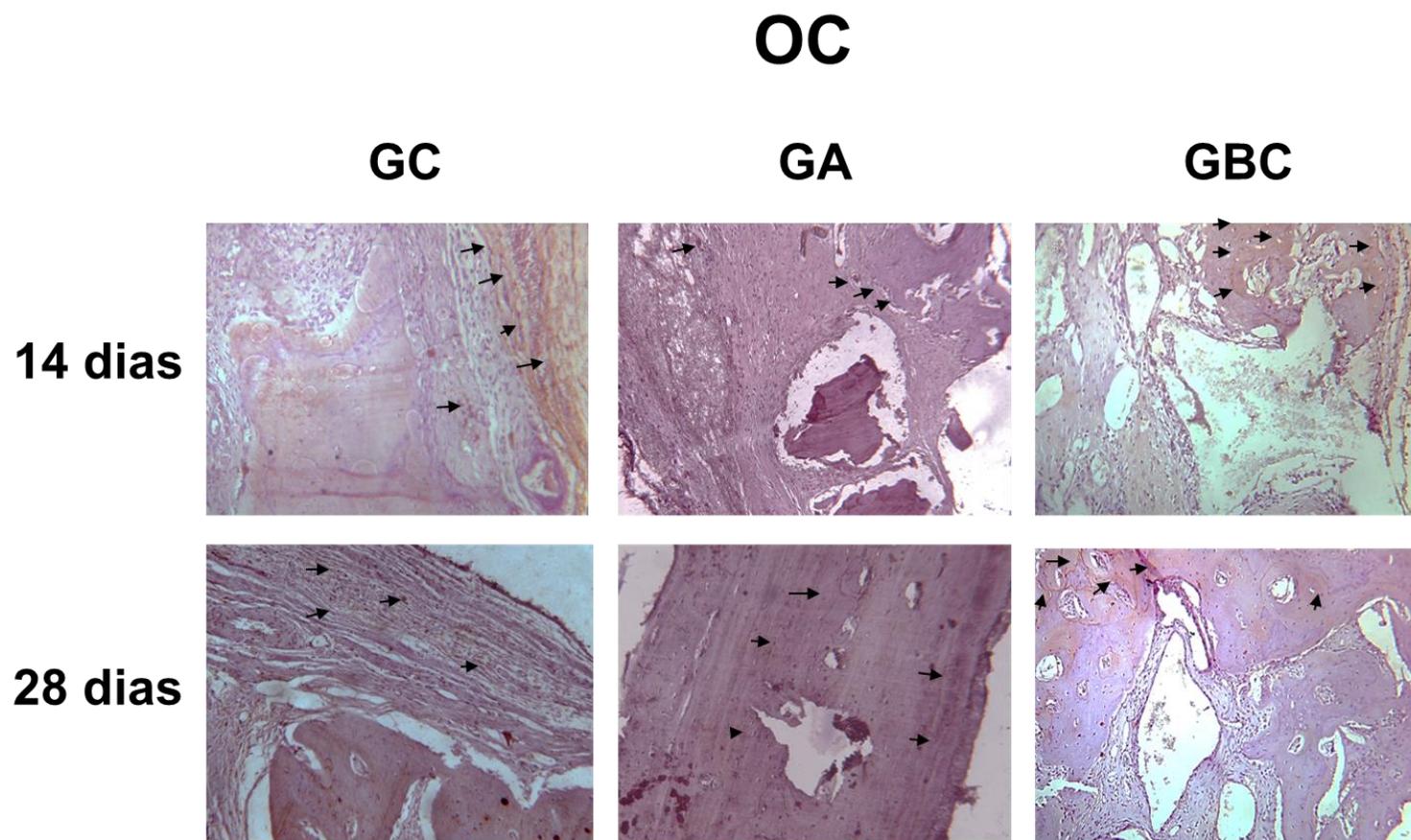


Figura 8 – Imunomarcção de osteocalcina (OC) aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

RUNX 2: A RUNX 2 é um fator de transcrição que caracteriza-se por expressar-se nos pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. Portanto, a sua presença caracteriza a capacidade de osteoindução, ou seja, a maior presença de pré-osteoblastos no momento em que se diferenciarão em osteoblastos ativos. Na análise dos três grupos experimentais, observou-se que a marcação positiva deste fator de transcrição foi observada em pré osteoblastos e osteoblastos bastante jovens especialmente nos grupos autógeno e Bone ceramic. No entanto, aos 28 dias, especialmente nos grupos coágulo e Bone Ceramic observou-se uma queda na marcação positiva deste fator nas células da linhagem osteoblástica. Esta proteína expressou-se de maneira leve no grupo GC (14 e 28 dias), enquanto que no grupo GA foi expressa de forma moderada tanto aos 14 quanto aos 28 dias. Já para o grupo GBC aos 14 dias foi marcada de forma moderada, porém aos 28 dias, houve diminuição na sua imunomarcação (leve) (Figura 9).

TRAP: A TRAP é uma enzima que caracteriza a presença de osteoclastos em atividade de reabsorção da matriz óssea mineralizada. Apresentam marcação positiva para TRAP tanto os osteoclastos mononucleados como multinucleados. Aos 14 e 28 dias para o grupo GC, a imunomarcação desta proteína foi leve. Para o grupo GA, aos 14 dias foi marcada moderadamente e houve diminuição da expressão aos 28 dias (leve). Ao contrário para o grupo GBC, que aos 14 dias exibiu imunomarcação leve e aos 28 dias, moderada (Figura 10).

VEGF: A VEGF é um fator de crescimento presente em osteoblastos bem como em células endoteliais. Foi observada uma marcação positiva importante para este fator de crescimento nos três grupos experimentais, especialmente nos grupos

Coágulo e Bone Ceramic. Para os grupos GC e GBC, esta proteína foi expressa moderadamente em ambos os períodos analisados. Já para o grupo GA, aos 14 dias foi expressa de forma leve e aos 28 dias, moderada (Figura 11)

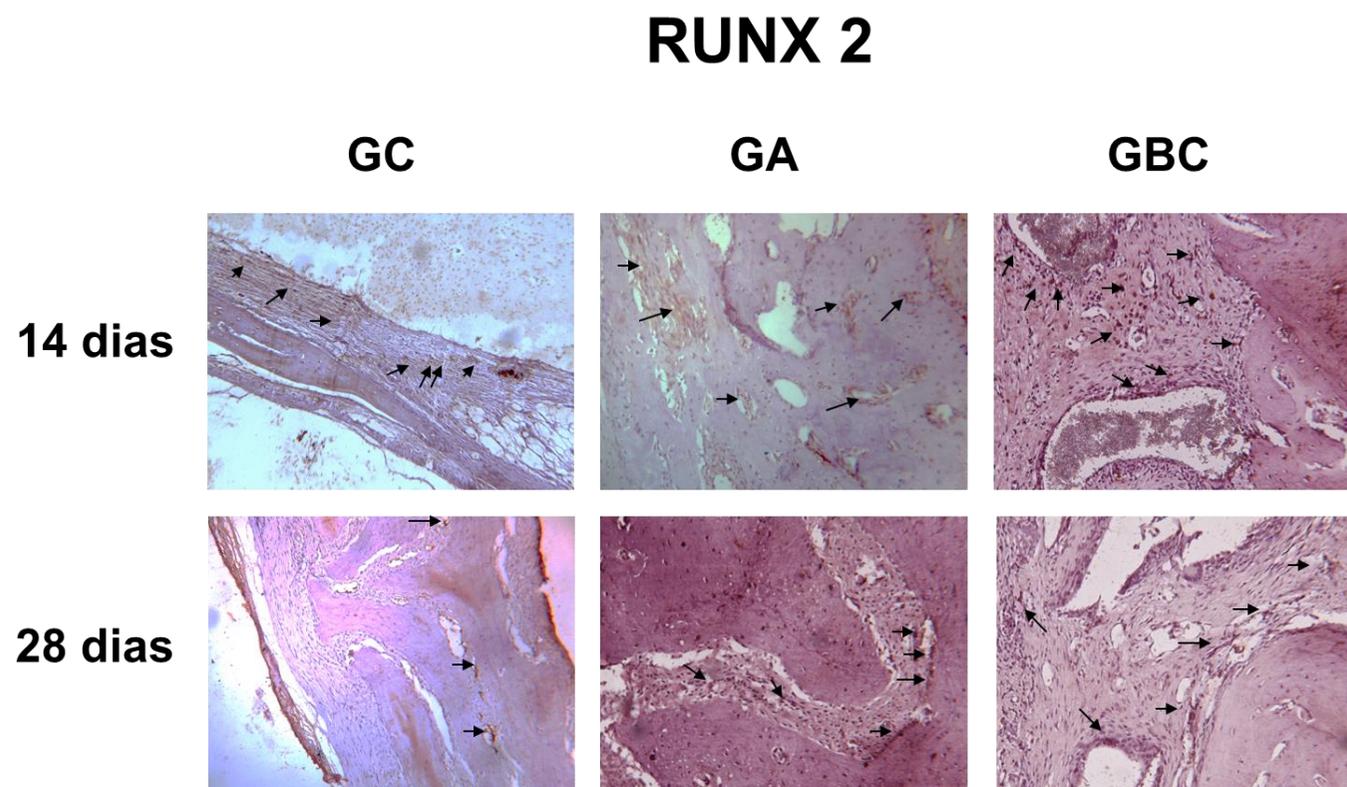


Figura 9 – Imunomarcação de RUNX 2 aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: leve; GA: moderada; GBC: leve) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

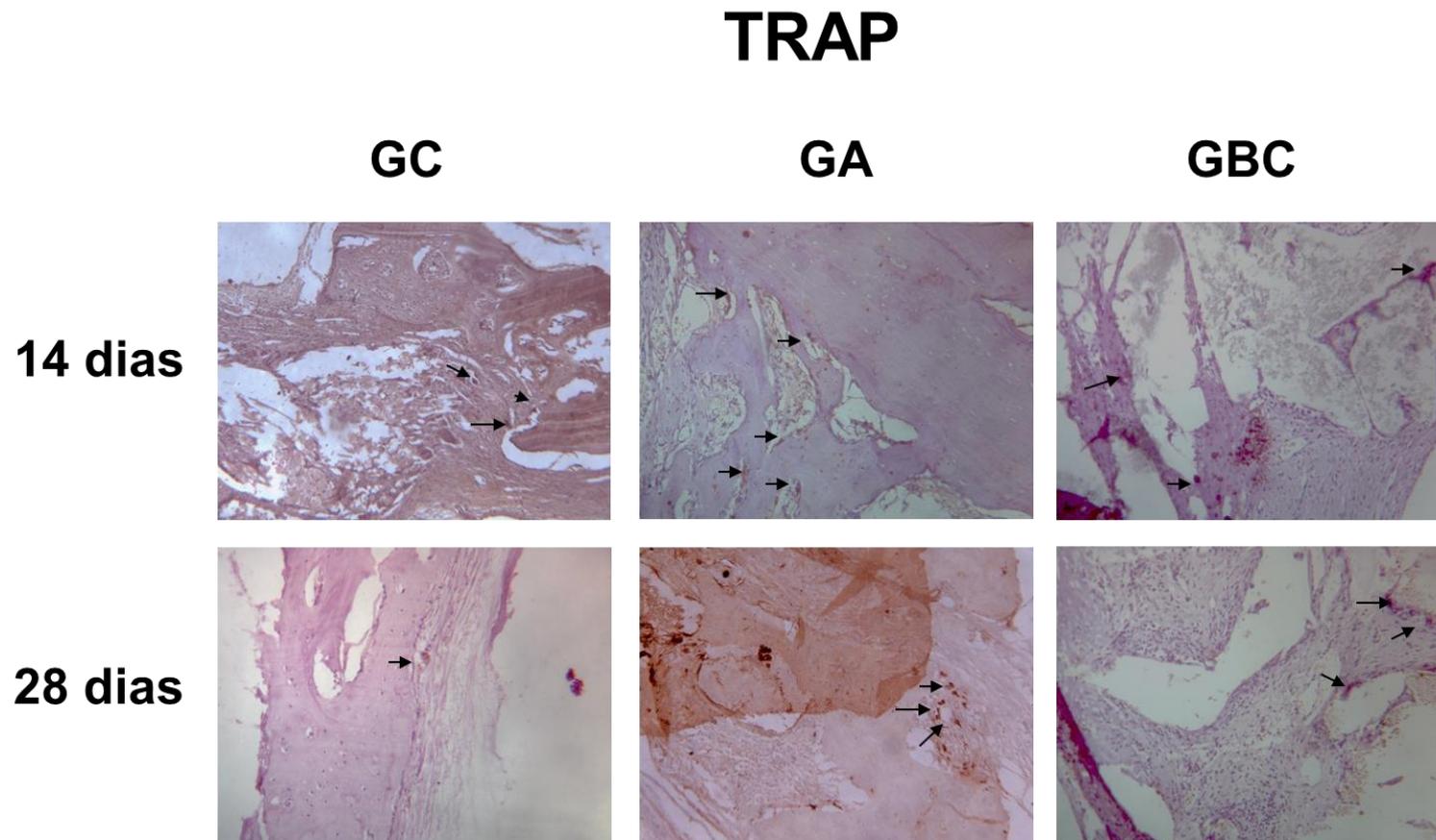


Figura 10 – Imunomarcção de TRAP aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: leve; GA: moderada; GBC: leve). Aos 28 dias (GC: leve; GA: leve; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

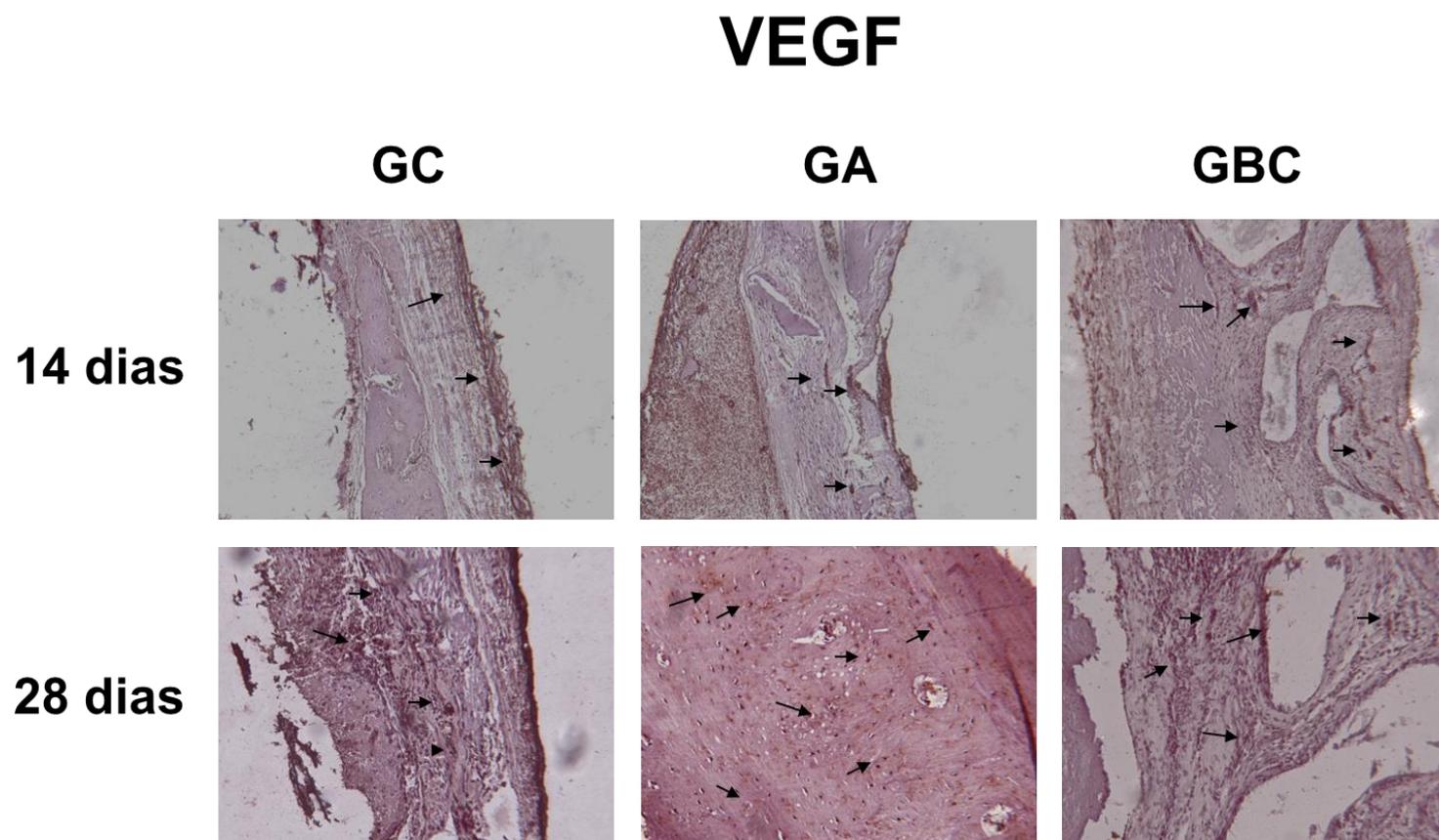


Figura 11 – Imunomarcção de VEGF aos 14 dias para os grupos experimentais (GC: moderada; GA: leve; GBC: moderada). Aos 28 dias (GC: moderada; GA: moderada; GBC: moderada) pela análise imunoistoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas).

Microtomografia

As imagens obtidas através da microtomografia computadorizada mostraram o preenchimento do defeito pelo BC e osso autógeno aos 14 e 28 dias. O grupo GA evidenciou aos 28 dias na imagem em 3 dimensões compatibilidade com total neoformação óssea (Figura 12).

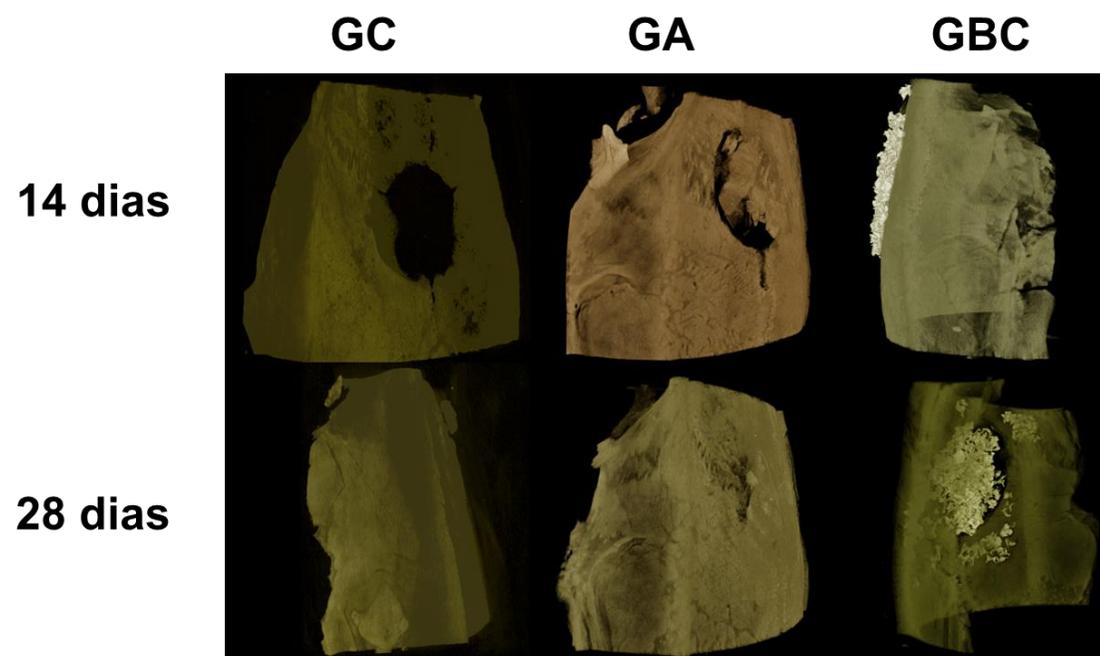


Figura 12 – Imagens obtidas da análise por microtomografia dos grupos GC, GA e GBC (14 e 28 dias). Notou-se neoformação óssea por meio do fechamento total do defeito aos 28 dias no grupo GA e no grupo GBC houve preenchimento do defeito com o biomaterial até os 28 dias.

1.6 Discussão

A hipótese nula apresentada que a área de tecido ósseo neoformado dos defeitos ósseos preenchidos com BC ou osso autógeno não apresentaria diferença estatística foi rejeitada, tendo em vista que para todos os períodos analisados o osso autógeno apresentou maior neoformação óssea em comparação aos demais biomateriais ($p < 0,05$). Entretanto, a utilização do Bone Ceramic foi satisfatoriamente responsável pelo preenchimento do defeito ósseo, quando comparado com o grupo GC ($p < 0,05$).

Os resultados deste trabalho, obtidos com as reações de imunohistoquímica evidenciam que a mineralização do tecido ósseo neoformado após a confecção dos defeitos ósseos foi similar para os biomateriais utilizados (GA e GBC), tanto aos 14 dias quanto aos 28 dias, por meio da marcação moderada da proteína OC. Os defeitos sem preenchimento com biomateriais particulados (GC) apresentaram marcação leve desta proteína. Sendo assim, a OC, proteína não colágena mais abundante da matriz óssea, que expressa a mineralização do tecido ósseo e também representa a marcação de células da linhagem osteoblástica, não mostrou diferença na sua expressão entre os biomateriais testados. Deste modo, a comparação entre os grupos GBC e GC, por meio da expressão de OC, sugere que a suplementação com o Bone Ceramic® mostrou-se favorável para o preenchimento do defeito criado em calvária de ratos.

A diferenciação osteoblástica, expressa pela proteína RUNX 2, evidenciou baixa atividade osteoblástica no grupo coágulo em ambos os períodos do experimento, o que foi comprovada pela análise histológica, em que os defeitos foram preenchidos por tecido conjuntivo, sem a presença de células da linhagem osteoblástica. Já no

grupo GA, essa proteína foi marcada moderadamente aos 14 e 28 dias, o que reforça a longevidade da formação óssea do enxerto autógeno. Diferentemente dos defeitos preenchidos com Bone Ceramic®, o qual aos 28 dias, a expressão da RUNX 2 foi diminuída, porém foi expressa moderadamente aos 14 dias e mesmo que leve, ainda estava presente aos 28 dias. Portanto, mesmo que seja conhecido o potencial osteocondutivo deste material, podemos sugerir que a sua presença no interior do defeito ósseo pode levar a resposta de diferenciação osteoblástica, evidenciadas pelo aumento na expressão do fator de transcrição RUNX-2. Neste contexto, novos estudos deverão ser realizados para quantificar esta proteína, por meio da biologia molecular na reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

A angiogênese após um dano tecidual, marcada pela proteína VEGF, mostrou nesta investigação *in vivo* que o suprimento sanguíneo, em especial para combater o *déficit* de oxigênio local, foi expressa moderadamente nos dois períodos analisados para os grupos GC e GBC. Especialmente no grupo GBC a presença de VEGF caracteriza o seu conhecido potencial osteocondutor. Como o osso autógeno, já possui células viáveis para o reparo, incluindo células endoteliais, aos 14 dias a marcação de VEGF foi leve, aumentando aos 28 dias.

A atividade osteoclástica, por meio da expressão de TRAP, evidenciou que o osso autógeno diminuiu o processo de reabsorção no último período analisado, enquanto que no grupo GBC, a reabsorção aumentou ao longo do tempo. Isso indica que o biomaterial continua sendo reabsorvido e com isso, atrasa o reparo ósseo. Estudos futuros com maior tempo de análise devem ser realizados para investigar se a

reabsorção permanece neste grupo, com maior preenchimento do defeito com osso maduro.

Ficou evidenciado com os resultados deste estudo que a suplementação do biomaterial testado (GBC) com o coágulo foi favorável para o defeito ósseo quando comparado ao preenchimento com coágulo isoladamente. Entretanto, foi substancialmente menor que o enxerto autógeno. A associação de hidroxiapatita/ β TCP (Bone Ceramic[®]) manteve nos três períodos analisados a função de preenchimento do defeito, porém mesmo aos 42 dias, a área de neoformação óssea no centro do defeito permaneceu inferior ao autógeno. Isso provavelmente ocorreu pela adição de hidroxiapatita (40%) para a composição do Bone Ceramic[®], a qual apresenta baixíssima reabsorção. Desta forma, o material manteve-se no local de inserção, preenchendo o defeito até os 42 dias, contradizendo a enxertia óssea autógena, que fechou o defeito com osso mineralizado neste período.

Em relação à propriedade osteocondutora dos biomateriais, Luvizuto et al. (2011) (18) um outro Beta tricálcio-fosfato (100% de β TCP, Cerasorb[®]) e outros biomateriais (gel de ácido poliláctico e poliglicólico e cimento de fosfato de cálcio) no preenchimento de defeitos ósseos de 5 mm na calvária de ratos, aos 45 dias pós-cirúrgico. Estes biomateriais foram utilizados isolados ou suplementados com 5 μ g de proteína morfogenética óssea (BMP-2) e comparados com defeitos preenchidos com osso autógeno. Os autores observaram que o TCP utilizado isoladamente promoveu neoformação óssea de forma mais eficiente quando comparado com os autoenxertos. E que a suplementação de BMP-2 não é necessária para o preenchimento dos defeitos ósseos. O TCP foi reabsorvido e permitiu formação

de tecido ósseo maduro, fechando o defeito cirúrgico. Deste modo, os resultados destes autores nos faz inferir que a presença de hidroxiapatita, de baixa reabsorção, preencheu o defeito ósseo até último período analisado neste trabalho, com menor taxa de neoformação óssea. Clinicamente, Daculsi et al. (1999) (22) observaram taxa de reabsorção de aproximadamente 50% do BC utilizado como enxerto no levantamento da membrana do seio maxilar 1 ano pós-cirúrgico, confirmando a lenta reabsorção do material.

Isso não quer dizer que a preservação do material, sem fechamento total do defeito com osso neoformado seja desfavorável para o reparo ósseo, somente surge o questionamento sobre a qualidade deste osso para suportar os implantes dentários, primeiramente no que diz respeito à estabilidade primária do implante e, em seguida, para a osseointegração.

Achados anteriores que analisaram o BC e osso bovino anorgânico (Bio-Oss®) em cirurgias para ganho de altura na região do seio maxilar ou no preenchimento de alvéolos pós-exodônticos, afirmaram não haver diferenças estatisticamente significantes, no tocante a quantidade de osso mineralizado entre os biomateriais testados (23, 28). Entretanto, não verificaram a estabilidade dos implantes dentários após instalados, principal objeto da reabilitação bucal. Somente Frenken et al. (2010) (24) realizaram um estudo visando avaliar a qualidade e quantidade de osso formado na elevação do seio maxilar com Bone Ceramic, em que foi observada após seis meses da cirurgia, manutenção da altura vertical alcançada. Os implantes pareciam osseointegrados após três meses do período de reparo. Portanto, outros estudos que investiguem esta situação devem ser realizados, avaliando a estabilidade dos

implantes em diferentes períodos pela análise de frequência por ressonância. A partir disso, poderemos comprovar se o preenchimento do defeito ósseo com o BC no longo prazo permite estabilidade para o implante osseointegrável, inclusive após a instalação das próteses.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho experimental pode-se concluir que a suplementação do biomaterial testado (BC) foi favorável para o preenchimento do defeito ósseo até o final do período analisado, porém com menor taxa de neoformação óssea quando comparado ao autoenxerto.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo número 2012/06309-0) pela concessão da bolsa mestrado para o primeiro autor (André Luis da Silva Fabris).

1.7 Referências

1. Mijiritsky E, Lorean A, Mazor Z, Levin L. Implant Tooth-Supported Removable Partial Denture with at Least 15-Year Long-Term Follow-Up. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Dec 27. PubMed PMID: 24373248. Epub 2014/01/01. Eng.
2. Grandi T, Guazzi P, Samarani R, Grandi G. Immediate provisionalisation of single post-extractive implants versus implants placed in healed sites in the anterior maxilla: 1-year results from a multicentre controlled cohort study. *Eur J Oral Implantol.* 2013 Autumn;6(3):285-95. PubMed PMID: 24179982. Epub 2013/11/02. eng.
3. Zuffetti F, Esposito M, Capelli M, Galli F, Testori T, Del Fabbro M. Socket grafting with or without buccal augmentation with anorganic bovine bone at immediate post-extractive implants: 6-month after loading results from a multicenter randomised controlled clinical trial. *Eur J Oral Implantol.* 2013 Autumn;6(3):239-50. PubMed PMID: 24179978. Epub 2013/11/02. eng.
4. Scheuber S, Bosshardt D, Bragger U, von Arx T. [Implant therapy following trauma of the anterior teeth - a new method for alveolar ridge preservation after post-traumatic ankylosis and external root resorption]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2013;123(5):417-39. PubMed PMID: 23720038. Epub 2013/05/31. Implantattherapie nach Frontzahntrauma. Eine neue Methode zum Erhalt des Alveolarkammes nach posttraumatischer Ankylose und externer Wurzelresorption. *fre ger.*
5. Binderman I, Gadban N, Yaffe A. Cytoskeletal disease: a role in the etiology of adult periodontitis. *Oral Dis.* 2014 Jan;20(1):10-6. PubMed PMID: 23679579. Epub 2013/05/18. eng.
6. Monje A, Chan HL, Suarez F, Galindo-Moreno P, Wang HL. Marginal bone loss around tilted implants in comparison to straight implants: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012 Nov-Dec;27(6):1576-83. PubMed PMID: 23189313. Epub 2012/11/29. eng.
7. Shankar YR, Srinivas K, Surapaneni H, Reddy SV. Prosthodontic treatment using vital and non vital submerged roots-two case reports. *J Clin Diagn Res.* 2013 Oct;7(10):2396-9. PubMed PMID: 24298542. Pubmed Central PMCID: Pmc3843394. Epub 2013/12/04. eng.
8. Malo P, Nobre M, Lopes A. Immediate loading of 'All-on-4' maxillary prostheses using trans-sinus tilted implants without sinus bone grafting: a retrospective study reporting the 3-year outcome. *Eur J Oral Implantol.* 2013 Autumn;6(3):273-83. PubMed PMID: 24179981. Epub 2013/11/02. eng.
9. Bodnar C. [Some possibilities to assess maxillary-mandibular occlusion in fixed dental prosthesis]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2006 Apr-Jun;110(2):443-8. PubMed PMID: 17802959. Epub 2007/09/07. Posibilitati de inregistrare a relatiilor mandibulo-maxilare in tratamentul protetic fix. *rum.*
10. Zakhary IE, El-Mekawi HA, Elsalanty ME. Alveolar ridge augmentation for implant fixation: status review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Nov;114(5 Suppl):S179-89. PubMed PMID: 23063396. Epub 2013/04/10. eng.
11. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional

- outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 May;84-a(5):716-20. PubMed PMID: 12004011. Epub 2002/05/11. eng.
12. Jung YS, Kim HJ, Choi SW, Kang JW, Cha IH. Regional thickness of parietal bone in Korean adults. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Dec;32(6):638-41. PubMed PMID: 14636616. Epub 2003/11/26. eng.
 13. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Nov-Dec;11(6):760-6. PubMed PMID: 8990638. Epub 1996/11/01. eng.
 14. O'Malley MJ, Sayres SC, Saleem O, Levine D, Roberts M, Deland JT, et al. Morbidity and complications following percutaneous calcaneal autograft bone harvest. *Foot Ankle Int.* 2014 Jan;35(1):30-7. PubMed PMID: 24318626. Epub 2013/12/10. eng.
 15. Yamada Y, Hara K, Nakamura S, Ueda M, Ito K, Nagasaka T. Minimally invasive approach with tissue engineering for severe alveolar bone atrophy case. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Feb;42(2):260-3. PubMed PMID: 22884637. Epub 2012/08/14. eng.
 16. Blank BS, Levy AR. Combined treatment of a large periodontal defect using GTR and DFDBA. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999 Oct;19(5):481-7. PubMed PMID: 10709514. Epub 2000/03/10. eng.
 17. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jan-Feb;14(1):72-6. PubMed PMID: 10074755. Epub 1999/03/13. eng.
 18. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials.* 2011 May;32(15):3855-61. PubMed PMID: 21376389. Epub 2011/03/08. eng.
 19. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Feb(395):4-10. PubMed PMID: 11937861. Epub 2002/04/09. eng.
 20. Lee HR, Kim HJ, Ko JS, Choi YS, Ahn MW, Kim S, et al. Comparative characteristics of porous bioceramics for an osteogenic response in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(12):e84272. PubMed PMID: 24391927. Pubmed Central PMCID: Pmc3877265. Epub 2014/01/07. eng.
 21. Yang Y, Dennison D, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Mar-Apr;20(2):187-92. PubMed PMID: 15839111. Epub 2005/04/21. eng.
 22. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Mar;14(3):195-200. PubMed PMID: 15348464. Epub 2004/09/07. eng.
 23. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803. PubMed PMID: 18705811. Epub 2008/08/19. eng.
 24. Frenken JW, Bouwman WF, Bravenboer N, Zijderfeld SA, Schulten EA, ten Bruggenkate CM. The use of Straumann Bone Ceramic in a maxillary sinus floor

elevation procedure: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Feb;21(2):201-8. PubMed PMID: 19958374. Epub 2009/12/05. eng.

25. Guo J, Meng Z, Chen G, Xie D, Chen Y, Wang H, et al. Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2012 Jun;18(11-12):1239-52. PubMed PMID: 22320360. Epub 2012/02/11. eng.

26. Moller B, Terheyden H, Acil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, et al. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 May;41(5):638-45. PubMed PMID: 22406235. Epub 2012/03/13. eng.

27. Ziebart T, Schnell A, Walter C, Kammerer PW, Pabst A, Lehmann KM, et al. Interactions between endothelial progenitor cells (EPC) and titanium implant surfaces. *Clin Oral Investig.* 2013 Jan;17(1):301-9. PubMed PMID: 22406922. Epub 2012/03/13. eng.

28. Mardas N, D'Aiuto F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Apr;22(4):416-23. PubMed PMID: 21561483. Epub 2011/05/13. eng.

ANEXOS

1.8 Anexo A – Certificado do Comitê de Ética

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

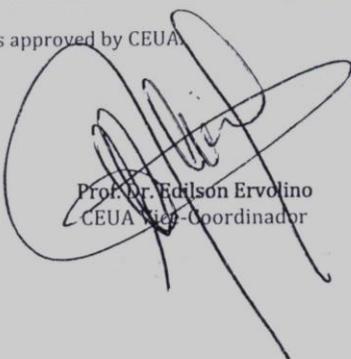
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise do processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou Bone Ceramic®. Um estudo histométrico e imunoistoquímico" sob responsabilidade da Pesquisadora ROBERTA OKAMOTO e colaboração de Tetuo Okamoto, André Luis da Silva Fabris, Leonardo Perez Faverani e Gabriel Ramalho Ferreira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo 2012-01097.

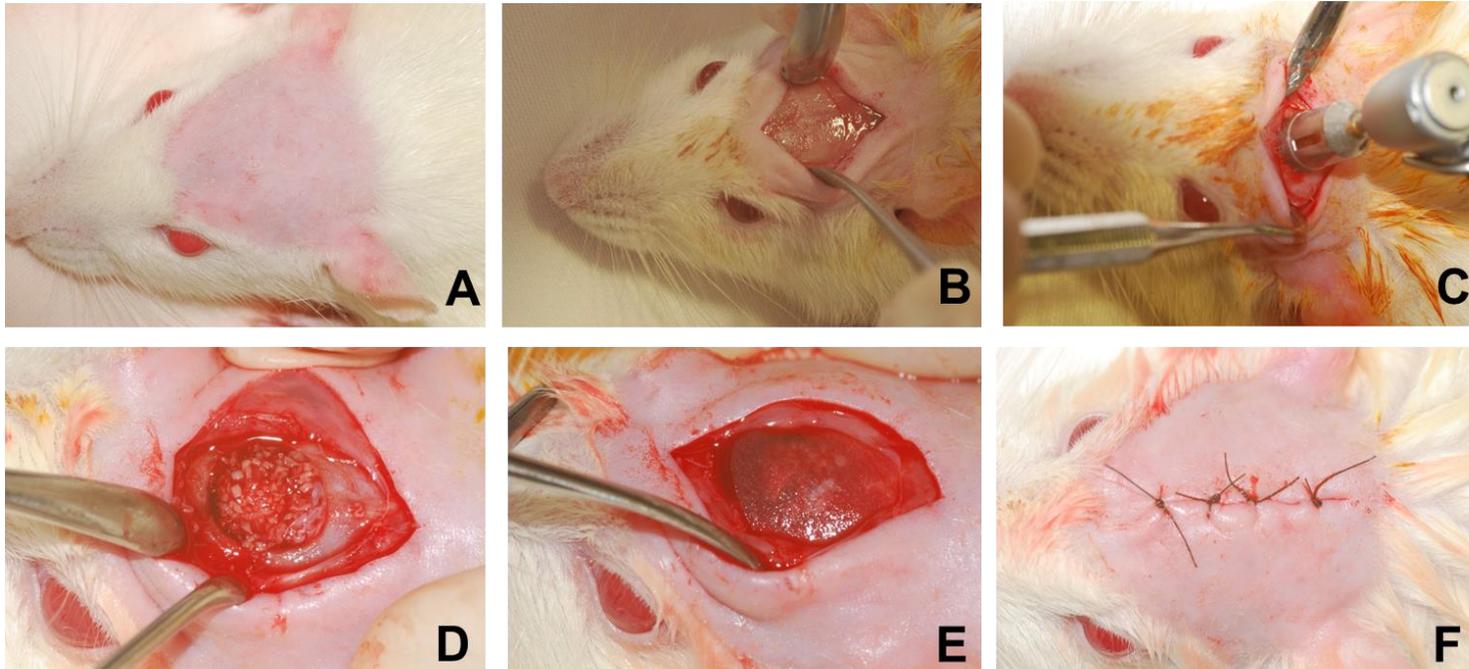
CERTIFICATE

We certify that the research "Análise do processo de reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos preenchidos com osso autógeno ou Bone Ceramic®. Um estudo histométrico e imunoistoquímico", protocol number 2012-01097, under responsibility of ROBERTA OKAMOTO and with collaboration of Tetuo Okamoto, André Luis da Silva Fabris, Leonardo Perez Faverani and Gabriel Ramalho Ferreira agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA - Sup-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Rua Clóvis Prestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmvz.unesp.br

1.8 Anexo B – Metodologia cirúrgica para confecção dos defeitos em calvária



A – Tricotomia da calvária e em seguida antissepsia com polivinilpirrolidona; B – Incisão linear na direção occipito-frontal (2 cm); C - Defeito (5mm) foi criado na calvária de cada animal com uma broca trefina e preenchido com coágulo sanguíneo (GC), osso autógeno (GA) ou Bone Ceramic (GBC) - D. Finalmente, o defeito foi coberto com membrana óssea bovina (E) e a ferida foi fechada com sutura por planos(F).

1.8 Anexo C - Normas para publicação do periódico

Archives of Oral Biology

Guide for Authors

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA

Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

Online submission of papers

<http://ees.elsevier.com/aob>

Submission and peer review of all papers is now conducted entirely online. Authors are guided stepwise through the entire process, and can follow the progress of their paper. The system

creates a PDF version of the submitted manuscript for peer review, revision and proofing. All correspondence, including the editors' decision and request for revisions, is conducted by e-mail. Authors requesting further information about online submission should follow the tutorial, at <http://ees.elsevier.com/aob>.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by all authors that the manuscript in its submitted form has been read and approved by them. Authors must supply details of related papers submitted or recently published elsewhere. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until it is supplied.

Authors are invited to suggest up to three referees they consider suitable to review their submission. The suggested reviewers should not have collaborated with the authors in the last 5 years. Full postal and email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilize these suggestions.

Authorship

All authors should have made substantial and material contributions to the paper. These would include the individuals responsible for the conception and design of the experiments and the interpretation of data. If the work was conducted using non-institutional grant funds the Principal Investigator on the funded grant should be included in the authorship. Individuals who gave purely technical help or advise, for example, on statistical tests or provided materials such as cell lines and antibodies should be included in the Acknowledgements. 'Guest' authors are unacceptable. The Acknowledgements should also include the source of the funds used and the Principal Investigator to whom they were awarded. If the manuscript has four or more authors listed, a letter describing the contribution of each should be included. Submissions lacking this documentation will not be reviewed until they are supplied.

Conflict of interest

The potential for conflict of interest exists when an author (or the author's institution), has financial or personal relationships that may influence his or her actions. Authors are specifically asked to reflect on financial conflicts of interest (such as employment, consultancy, stock ownership, honoraria and paid expert testimony) as well as other forms of conflict of

interest, including personal, academic and intellectual issues. At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships that could influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest a statement confirming such should be included

Ethics

Studies on human beings.

Such studies submitted to Archives of Oral Biology should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. The declaration was adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989 (www.wma.net/e/policy/b3.htm). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. A copy of the institutional approval should be included. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Studies on animals.

The experimental procedures and care of animals should be in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (<http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Html/123.htm>). The authors must state that animal care was in accordance with both these and institution guidelines. Signed documents of approval by institutional committees should be included as well as a statement from the authors that the study met the standards described in the European Convention. Submissions lacking these documents will not be reviewed until they are supplied.

Copyright

Accepted papers become the copyright of the Journal and are accepted on the understanding that they have not been published, are not being considered for publication elsewhere and are

subject to editorial revision. If papers closely related to the submitted manuscript have been published or submitted for publication elsewhere, the author must state this in their cover letter. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be British or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the

author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Council of Biology Editors Style Manual Committee. *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 6th edition. New York: Cambridge University Press, 1994.

We suggest that authors consider using a language editing service to improve the English language usage and quality of a paper. A number of language editing companies will provide their services to our authors at competitive rates. Please follow this link for further details <http://elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languageediting/>.

The editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 10 or 12 points. The corresponding author should be identified (include a fax number and email address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Received/accepted dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to

repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).

- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and symbols

In general, Archives of Oral Biology will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'.

Numbers, measurements and statistics.

Numbers one to nine are spelled out unless they are measurements (e.g. 5 ml). Numbers greater than nine are spelled out if they begin a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than ml.h⁻¹ or ml per h.

Drugs

These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparation, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, London, UK).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/artworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for artwork and illustrations may be found at www.elsevier.com/authors. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate page.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome. Please note that figures supplied in colour will appear online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Begin each table on a separate page. Footnotes to tables should be typed below the table and referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

Revised manuscripts

Frequently authors are required to submit revised versions of manuscripts in the light of reports from expert reviewers and editorial comments. Revised manuscripts must clearly show revisions and authors must clearly indicate the positions of revisions in a covering letter that addresses the concerns of reviewers/ editors.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author which they are requested to correct and return within 48 hours. Only minor corrections are acceptable at this stage. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post. Elsevier now sends PDF proofs that can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate

PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting the line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Funding body agreements and policies

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

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines,

copyright information, frequently asked questions and more. Further questions may be directed to the journal editorial office: Archives of Oral Biology, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK. Email: aob@elsevier.com