

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA INTEGRADA

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA BENVINDO

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA ESPONTÂNEA EM CALVÁRIA DE
RATOS PARA DETERMINAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO DE ACORDO COM O
TAMANHO E A LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA**

Recife

2019

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA BENVINDO

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA ESPONTÂNEA EM CALVÁRIA DE
RATOS PARA DETERMINAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO DE ACORDO COM O
TAMANHO E A LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira.

Co-orientadores: Prof. Dr. André Vajgel Fernandes

Prof. Dr. Nikos Donos

Recife

2019

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B478a Benvindo, Raphaella Karlla Machado Gonzaga.
Avaliação da reparação óssea espontânea em calvária de ratos para determinação do defeito crítico de acordo com o tamanho e a localização anatômica / Raphaella Karlla Machado Gonzaga Benvindo. – 2019.
64 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Renata Cimões Jovino Silveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Ratos. 2. Modelos animais. 3. Regeneração óssea. I. Silveira, Renata Cimões Jovino (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-263)

RAPHAELLA KARLLA MACHADO GONZAGA BENVINDO

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA ESPONTÂNEA EM CALVÁRIA DE
RATOS PARA DETERMINAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO DE ACORDO COM O
TAMANHO E A LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Odontologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Odontologia.

Aprovada em: 21/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Irani De Farias Cunha Junior

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Felipe Bravo Machado De Andrade

Faculdade de Odontologia de Recife

Profa. Dra. Leila Santana Coimbra

FACIPE

Dedico este trabalho ao Todo-Poderoso Deus, por suas misericórdias que se renovam a cada dia e pelas bênçãos incontáveis que concede.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, pelo dom da vida e por me dar saúde e sabedoria para conquistar mais essa etapa de minha vida profissional.

Aos meus pais, *George* e *Adriana*, pelo amor incondicional, pelo investimento e incentivo constante ao meu aperfeiçoamento profissional e acadêmico e por todo suporte provido.

À minha irmã, *Stephanie*, pelo amor, paciência, por sempre embarcar nas minhas ideias e não medir esforços para tornar essas ideias em realidade.

Ao meu marido, *Fernando*, pelo amor, carinho, paciência, disposição infinita para ouvir e por sua presença que inspira calma e confiança.

À instituição *UFPE*, pela oportunidade, bem como a todos os que fazem parte do *Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPE*, pelo auxílio nesta conquista, em especial aos professores que descortinaram novos conhecimentos e horizontes.

À minha orientadora, *Professora Doutora Renata Cimões*, por se fazer presente nessa caminhada desde o mestrado, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo exemplo e até pelos (merecidos) puxões de orelha.

Ao meu co-orientador, *Professor Doutor André Vajgel*, pela disposição em ajudar e sanar todas minhas dúvidas e por ter doado uma parcela de seu tempo tão corrido para que as cirurgias fossem realizadas.

À *Professora Doutora Bruna Vajgel*, por partilhar seu conhecimento com os alunos e nos permitir o enriquecimento científico.

Ao *Prof. Nikos Donos*, pela contribuição e por trazer outro olhar para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao biotério do Departamento de Nutrição da UFPE, na pessoa de *S. Edeones de França*, por prover os animais para a pesquisa e dicas valiosas.

A todos que fazem parte do *Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE-UFPE)*; veterinários, técnicos, pesquisadores, funcionários; por ceder o espaço e materiais para que os animais fossem alojados e operados, pela compreensão e apoio logístico. Agradeço em especial

à *Veridiana Sales e S. Paulo da Silva*, por todo auxílio e apoio, sem a ajuda deles com certeza o percurso teria sido mais árduo.

Ao Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica da UFPB (LAMIB-UFPB), na pessoa do *Professor Frederico Sousa*, por permitir a utilização de suas instalações e por gentilmente ajudar com sua experiência. Em especial, agradeço ao mestrando *Basílio Rodrigues*, pelo trabalho incessante e pela solicitude.

Ao Laboratório de Patologia Oral da UFPE, na pessoa do *Professor Danyel Perez*, por abrir as portas de seu laboratório para que fosse realizado o estudo histológico e também por partilhar seu conhecimento. Agradeço em especial a *S. Rogério Clericuzi*, pela paciência de ensinar uma leiga o passo a passo da confecção das lâminas histológicas. Ao doutorando *Augusto Leal* fica minha gratidão por toda disposição em ajudar.

Aos funcionários da Pós-graduação em Odontologia, *Oziclere Sena, Tamires Oliveira* e mais recentemente *Isaac Simoni*, por ajudarem a resolver aqueles “probleminhas” da vida acadêmica. Em especial à *D. Tânia Esteves*, por sempre trazer uma palavra de apoio e sabedoria.

Aos meus colegas de turma, pelos bons momentos de aprendizado, crescimento e diversão que tivemos juntos.

Ao grupo de pesquisa *Perio-Implante*, pelo conhecimento partilhado, pelo apoio e pelos momentos agradáveis que proporcionaram.

À aluna de iniciação científica (hoje profissional), *Sinara Cunha*, pela ajuda incalculável, responsabilidade e maturidade.

Ao *Professor David Oliveira e Marina Maymone*, por cederem equipamentos pessoais para realização da pesquisa.

Ao *Professor Doutor Gustavo Godoy*, por sua disposição em ajudar e pela valiosa contribuição na análise histológica das lâminas.

A *Straumann*, por prover equipamentos para a pesquisa.

À amiga *Priscylla Marcelos*, pela generosidade e disposição em ajudar.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus amigos, os de perto, de longe, de todos os locais, todos têm uma participação nessa conquista; obrigada por me ouvir, aconselhar, apoiar, animar e estimular.

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas. (LÉVI-STRAUSS, 1964, p. 15).

RESUMO

Defeitos críticos são aqueles que não apresentam cura espontânea durante a vida do animal, e são utilizados como protótipos da perda óssea, e para avaliação de biomateriais e reparação óssea. Não há na literatura padronização quanto ao tamanho ideal desses defeitos em calotas cranianas de ratos. O presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes tamanhos de defeitos ósseos em calvária de ratos da espécie *Wistar*, a fim de identificar e padronizar qual o menor tamanho dos defeitos críticos, relacionados com o sítio anatômico, que deverá ser utilizado em futuros estudos para avaliação da reparação óssea. Cento e quatro ratos machos, adultos (3-4 meses) foram distribuídos em 5 grupos experimentais para realização de defeitos em calota craniana (defeitos de tamanhos 4mm e 5mm – localizados lateralmente à sutura sagital; de tamanho 6mm – localizados lateralmente ou centralmente à sutura sagital; de 9mm – apenas central). Após períodos de observação de 30 ou 120 dias, os animais foram sacrificados. A neoformação óssea espontânea dos defeitos foi então avaliada através das técnicas de maceração e histológica/histomorfométrica. A análise histológica revelou ausência de infiltrado inflamatório na maioria das amostras analisadas, tanto no período de 120 dias (65,63%), como no período de observação de 30 dias (88,57%). Nas amostras que apresentaram infiltrado inflamatório todos eram de intensidade discreta e tipo crônico. Quanto ao tipo de neoformação óssea evidenciou-se formação em ilhas e em trabéculas. Quanto à densidade de tecido conjuntivo encontrou-se amostras tanto de tecido conjuntivo fibroso denso, quanto tecido conjuntivo fibroso frouxo. As médias de porcentagem de fechamento dos defeitos variaram muito entre os grupos e até mesmo dentro do mesmo grupo (10,60% a 43,96%), entretanto nenhum defeito apresentou fechamento completo. Os diferentes tamanhos de defeito, localização anatômica central ou lateral à sutura sagital, períodos de avaliação de 30 ou 120 dias e métodos de avaliação por maceração ou histomorfométrico (no período de 120 dias) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Os achados do presente estudo permitem concluir que defeitos de 4mm, 5mm, 6mm e 9mm em calvária de ratos podem ser considerados críticos. A localização do defeito, se lateral ou central, não influenciou no reparo ósseo. Períodos de avaliação de 1 mês são suficientes para avaliar o fechamento do defeito. Os métodos da maceração e histomorfométrico não apresentaram diferença estatística entre si, no período de observação de 120 dias.

Palavras-chave: Ratos. Modelos Animais. Regeneração Óssea.

ABSTRACT

Critical Size Defects (CSD) are the defects that will not heal spontaneously during the lifetime of the animal, they are used as prototypes of bone loss and to evaluate biomaterials and bone regeneration. There is no standardization in the literature regarding what is the most appropriate dimension of a calvaria defect to be considered as critical. The aim of the present study was to compare different sizes of bone defects in calvaria of Wistar rats, in order to identify and standardize the smallest size of the critical defects related to anatomical site, that could be used in future studies to evaluate the bone repair. One hundred and four male adult rats (3-4 months) were allocated to 5 experimental groups to create defects of different sizes in calvaria (diameters of 4mm and 5mm – located laterally to the sagittal suture; 6mm – located laterally or centrally to the sagittal suture; 9mm – only a central defect). After periods of observation of 30 days or 120 days the animals were sacrificed. The spontaneous bone neoformation of the defects was then evaluated, throughout maceration and histological/histomorphometric techniques. The histological analysis revealed absence of inflammatory infiltrate in most samples analyzed, both within 120 days (65,63%) and 30 days (88,57%) of observation. The samples that presented inflammatory infiltrate, all were of slight intensity and chronic type. Regarding the type of bone neoformation, formation in islands and trabeculae was evidenced. As for connective tissue density, samples of both dense fibrous connective tissue and loose fibrous connective tissue were found. The mean percentage of defect closure had a huge variation between groups and even within the same group (10,60% a 43,96%), although no defects showed complete closure. The different sizes of defect, central or lateral anatomical location to sagittal suture, evaluation periods of 30 or 120 days and method of maceration or histomorphometric evaluation (in 120 days period) did not present statistically significant differences between them. Our findings suggest that defects of 4mm, 5mm, 6mm and 9mm in calvaria of rats may be considered as critical. The location of the defect, whether lateral or central, did not influence the bone repair. Evaluation periods of 30 days are sufficient to evaluate the defect closure. The maceration and histomorphometric methods did not present statistical difference between them, in 120 days of observation.

Key-words: Rats. Models, Animal. Bone Regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática da calota craniana do rato	21
Figura 2 –	Fotografia de amostra de maceração	24
Figura 3 –	Exemplo de medição da área óssea formada	24
Figura 4 –	Parâmetros avaliados na histomorfometria	25
Figura 5 –	Fotomicrografia de lâmina histológica. Ilhas de formação óssea. Magnificação de 2x	36
Figura 6 –	Fotomicrografia de lâmina histológica. Magnificação de 10x	37
Figura 7 –	Painel de fotomicrografias de lâminas histológicas. Magnificação de 2x	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Distribuição dos grupos em relação ao tamanho e sítio do defeito, métodos de avaliação e período de observação	21
Quadro 2 –	Distribuição dos grupos em relação ao tamanho e sítio do defeito, métodos de avaliação e período de observação	31
Quadro 3 –	Distribuição dos defeitos por grupo estudado	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Teste de normalidade para as variáveis dos dados de maceração	26
Tabela 2 –	Teste de normalidade para as variáveis dos dados histomorfométricos	27
Tabela 3 –	Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área formada e % da área formada) dos dados da maceração dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos	35
Tabela 4 –	Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área aumentada e área óssea formada) dos dados histomorfométricos dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos	39
Tabela 5 –	Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área óssea formada) dos dados histomorfométricos dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos	39
Tabela 6 –	Distribuição dos valores médios de desvio-padrão das mensurações % área óssea formada de cada grupo e em cada momento comparando a maceração com o histomorfométrico	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
NCE-UFPE	Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	DESENHO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	20
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
3.3	CÁLCULO DA AMOSTRA	21
3.4	CIRURGIAS EXPERIMENTAIS	22
3.5	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA PEÇA OPERATÓRIA	22
3.6	ANÁLISE DE MACERAÇÃO	23
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA	24
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E LOCALIZAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE)	54
	ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO	55

1 INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos, resultantes de envelhecimento, trauma, cirurgias ablativas, malformações congênitas ou patologias se apresenta como um grande desafio clínico (1,2). O osso autógeno é considerado “padrão ouro” devido a sua capacidade osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva e de remodelação (3). Porém, apenas quantidades limitadas de osso podem ser obtidas do local da cirurgia, e em consequência, frequentemente há necessidade de uma segunda cirurgia intraoral, ou até mesmo extraoral (por exemplo, crista ilíaca). A inclusão de um segundo sítio cirúrgico requer tempo e custo extras, e está associada a morbidade e resistência à aceitação por parte dos pacientes, requerendo também habilidades extras do operador (4).

Com o objetivo de evitar o uso de osso autógeno ou reduzir as quantidades necessárias, vários materiais substitutos ósseos, isolados ou em combinação com substâncias bioativas, são cada vez mais considerados como alternativas, sejam eles autossuficientes ou adjuntos ao osso autógeno. Após testes *in vitro* positivos para eficácia potencial, segurança e possíveis reações inesperadas dos materiais investigados, estudos experimentais pré-clínicos *in vivo* são realizados previamente aos testes clínicos (4).

Testes pré-clínicos para novas terapias regenerativas em modelos animais clinicamente relevantes são um importante aspecto da pesquisa translacional e, em muitos casos, é uma exigência das agências regulatórias de saúde antes de iniciar testes clínicos em humanos (4,5). A vantagem de modelos animais, além dos testes de segurança e eficácia terapêuticas, é a possibilidade de melhor compreender os processos biológicos subjacentes através de métodos que seriam considerados muito invasivos para aplicação em humanos (repetidas coletas de amostras biológicas, biópsias, etc.) (6). Modelos de animais pequenos (roedores e coelhos) usualmente constituem um ponto de partida de prova de princípio da factibilidade dos estudos, ao passo que estudos em animais maiores (cachorros, porcos, ovelhas e primatas) tentam simular condições clínicas mais fidedignas e predizer a eficácia terapêutica (4, 5, 7).

Animais pequenos podem suportar procedimentos cirúrgicos complexos com aparentemente menos desconforto e menos complicações, comparado aos animais maiores. Também são mais resistentes às doenças e infecções, dessa forma reduzindo o risco de perda de animais durante o curso do experimento. Os roedores apresentam diversas vantagens como menor custo, fácil manipulação e alocação, reportam mínima preocupação social e ética (não

encontram a mesma resistência que o uso de animais de estimação ou primatas, por exemplo) e permitem padronização de condições experimentais em indivíduos com contexto genético bem definido e controlado, apresentando menor variação individual entre os animais em termos de resposta biológica. Logo, menos animais são necessários para atingir dados estatisticamente válidos, se comparado aos animais maiores (4, 5, 8, 9).

O defeito na calota craniana de ratos pode ser usado para avaliar reparo ósseo e diferentes biomateriais, antes de avançar para animais maiores com potencial de transferir aplicações ao complexo craniofacial de humanos (10). A estrutura da calvária de ratos e a localização anatômica permitem o estabelecimento de defeitos uniformes, padronizados e facilmente reproduzíveis, comumente criados com trefina. Pode-se utilizar diversos métodos para análise e, usualmente, um período de observação de 4 a 8 semanas é empregado, tendo sido demonstrado que a formação óssea em defeitos controle vazios atinge o platô durante este período com mínima formação óssea em períodos de avaliação maiores (11, 12). Por outro lado, este modelo não permite a avaliação da reparação óssea em condições de carga fisiológica/biomecânica (13). Levando em consideração o objetivo de investigar biomateriais ou reparo ósseo, os defeitos em calvária de ratos podem servir como método rápido e direto para avaliação *in vivo* do reparo ósseo (10).

O defeito crítico em calvária de ratos é um dos modelos experimentais mais comumente utilizados em pesquisas que testam biomateriais, drogas ou dispositivos com potencial de estimular a formação óssea local (2, 14-16). O termo “defeito crítico” foi definido originalmente por Schmitz e Hollinger em 1986 como “o menor defeito intraósseo em determinado osso e espécie animal que não irá reparar espontaneamente durante a vida do animal” (14). No entanto, como a maioria dos estudos pré-clínicos possuem um tempo de avaliação limitado, Gosain *et al.* (2000) estabeleceram que “o tamanho do defeito crítico em pesquisas animais se refere ao tamanho de defeito que não irá reparar durante o período de duração do estudo” (12).

Há bastante controvérsia na literatura em relação à dimensão mais apropriada de defeito na calota craniana de ratos que pode ser considerado crítico (2, 11, 13, 17, 18). Defeitos menores permitem modelos com dois defeitos por animal, possibilitando estabelecer no mesmo animal tanto defeito teste quanto controle, reduzindo o número de animais pesquisados. Além das dimensões do defeito, a sua localização anatômica, especialmente em relação ao envolvimento ou não da sutura sagital também tem sido debatido por sua possível influência no processo de reparo (19).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi comparar diferentes tamanhos de defeitos ósseos em calvária de ratos da espécie Wistar, a fim de identificar e padronizar qual o menor tamanho dos defeitos críticos, relacionados com o sítio anatômico, que deverão ser utilizados em futuros estudos para avaliação da reparação óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes tamanhos de defeitos ósseos em calvária de ratos da espécie Wistar, a fim de identificar e padronizar qual o menor tamanho dos defeitos críticos, relacionados com o sítio anatômico, que deverão ser utilizados em futuros estudos para avaliação da reparação óssea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar qual o menor tamanho de defeito ósseo que não apresenta reparação óssea completa de acordo com o sítio anatômico;

Comparar se há diferença no processo de reparação óssea de defeitos do mesmo tamanho em localizações anatômicas distintas;

Avaliar se há interferência da sutura sagital mediana no processo de reparação óssea;

Comparar diferentes métodos de análise das amostras.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa tratou-se de um estudo experimental *in vivo* randomizado, e foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o seguinte protocolo 23076.051218/2012-96 (Anexo A). O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e *The National of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals*.

A pesquisa foi realizada entre dezembro de 2015 e dezembro de 2017 no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco (NCE-UFPE). Foram utilizados no presente estudo 104 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, adultos (3-4 meses), pesando entre 350 gramas $\pm$ 50 g, obtidos no biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram armazenados em gaiolas com 4 animais cada, sob controle de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, e mantidos com ração balanceada e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos 5 dias para aclimação do laboratório.

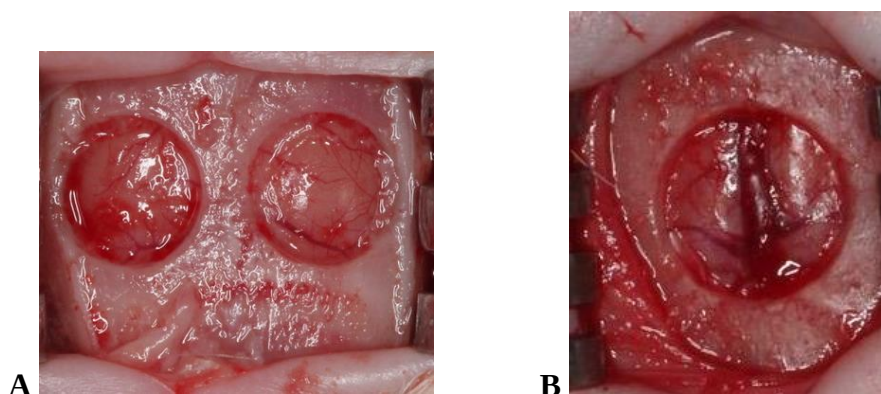
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, de acordo com o tamanho do defeito ósseo produzido na calvária (dimensão dos defeitos: 4mm, 5mm, 6mm ou 9mm) e também com a localização do defeito – realizado no osso parietal bilateralmente, sem envolvimento da sutura sagital, ou defeito único realizado na porção central da calvária, com envolvimento da sutura sagital (Figura 1). Os animais foram avaliados em dois períodos em relação à reparação: após 30 dias (30d) da cirurgia, correspondendo à reparação precoce e após 120 dias (120d), representando a reparação tardia. (Quadro 1). Os períodos de avaliação de 30 e 120 dias foram planejados de acordo com os períodos de avaliação encontrados na literatura. Foram realizados 16 defeitos por grupo por período de avaliação, com exceção do Grupo 1, que por se tratar do piloto do estudo, apresentou apenas 8 defeitos.

O defeito de 6mm foi realizado lateralmente e centralmente para que se pudesse avaliar se a sutura sagital influencia no reparo ósseo. Ao passo que o defeito de 9mm foi executado

apenas centralmente, pois pelas dimensões da calota craniana do rato é inviável realizar mais que um defeito.

Figura 1 – Representação esquemática da calota craniana do rato. A) Defeitos ósseos confeccionados nos ossos parietais, sem envolvimento da sutura sagital, B) Defeito ósseo confeccionado na porção central da calota, com envolvimento da sutura sagital.



Quadro 1: Distribuição dos grupos em relação ao tamanho e sítio do defeito, métodos de avaliação e período de observação.

Grupos	Número de Animais	Número de Defeitos	Tamanho do Defeito	Sítio do Defeito	Período de Observação	Métodos de Avaliação	
						Maceração	Histológico
G1	4	8	4 mm	Lateral	30 dias	N=4	N=4
	4	8	4 mm	Lateral	120 dias	N=4	N=4
G2	8	16	5 mm	Lateral	30 dias	N=8	N=8
	8	16	5 mm	Lateral	120 dias	N=8	N=8
G3	8	16	6 mm	Lateral	30 dias	N=8	N=8
	8	16	6 mm	Lateral	120 dias	N=8	N=8
G4	16	16	6 mm	Central	30 dias	N=8	N=8
	16	16	6 mm	Central	120 dias	N=8	N=8
G5	16	16	9 mm	Central	30 dias	N=8	N=8
	16	16	9 mm	Central	120 dias	N=8	N=8
Total	104	144				72 análises	72 análises

3.3 CÁLCULO DA AMOSTRA

A definição do tamanho da amostra baseou-se em dados encontrados na literatura (20, 21), optando-se pelo número mínimo que não pudesse comprometer os resultados. Para Rang *et al.* 2008, considerações éticas e financeiras pedem que um teste deva abranger uma amostra com o menor “N” possível (22).

3.4 CIRURGIAS EXPERIMENTAIS

Nenhum dos procedimentos foi efetuado no local destinado ao armazenamento dos animais a fim de impedir estresse comportamental dos mesmos.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 0,1 mg/Kg (SESPO, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) associado a xilazina 0,1 mg/Kg (Bayer do Brasil, Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil), por via intramuscular.

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal e a assepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2%. Em seguida, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15c, foi realizada uma incisão linear, na região da sutura sagital, no tegumento de revestimento do crânio, e com auxílio de um descolador de Molt, o retalho de espessura total foi descolado, expondo a cortical óssea da região. Com uma trefina cirúrgica de diâmetro externo correspondente a cada grupo de estudo, e com auxílio de uma peça de mão com irrigação constante de soro fisiológico, foi confeccionado de acordo com cada grupo um defeito ósseo de espessura total, transpassando toda a espessura da díploe, tomando-se bastante cuidado para não danificar a dura-máter e o seio venoso sagital. Posteriormente, o defeito foi irrigado com soro fisiológico para remover as espículas ósseas que permaneceram após a confecção do defeito.

Os retalhos foram, em seguida, recolocados em sua posição e suturados por plano anatômico com fio de sutura tipo seda 3-0. Imediatamente após a cirurgia, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 10mg/Kg de cefalosporina e 10mg/Kg de dipirona. Após as cirurgias, os animais foram alocados em gaiolas individuais por 15 dias. Passado esse prazo os animais foram realocados em gaiolas maiores, com 4 animais por gaiola. Durante o período de reparação nenhuma medicação foi administrada. As suturas não foram removidas, saindo espontaneamente de acordo com a renovação epitelial dos animais.

3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DA PEÇA OPERATÓRIA

Após o período de reparação de 30 dias ou 120 dias, de acordo com o grupo a que pertenciam, os animais foram sacrificados com sobredose de anestésico (tiopental), e as peças foram processadas para análise histológica e de maceração.

Para obtenção da peça operatória, foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com lâmina de bisturi nº 15c montada em cabo Bard-Parker nº3, com o intuito de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole sobre a calota craniana foi

removido com o auxílio de tesoura Matzenbaum e pinça Adson Brown, promovendo uma ampla visualização da calota, incluindo os ossos parietais. Para as peças que foram analisadas pelo método da maceração, a mandíbula foi desarticulada e o crânio seguiu para processamento. Já nas peças que foram avaliadas histologicamente e histomorfometricamente, foi realizada a osteotomia da calota craniana com broca multilaminada tronco-cônica nº 701, em baixa rotação e sob irrigação constante com solução fisiológica a 0,9%, a uma distância de 4mm além dos bordos dos defeitos. A peça operatória foi removida com auxílio de descolador de Molt e pinça Adson Brown e imersa em recipiente identificado contendo solução de acordo com a análise realizada.

Após a eutanásia e necropsia, os animais foram considerados como lixo biológico, sendo os mesmos recolhidos, congelados e incinerados, seguindo as normas de protocolo do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6 ANÁLISE DE MACERAÇÃO

Espécimes de cada grupo, de acordo com o período de avaliação, foram submetidos ao processo de maceração através da imersão em solução de papaína a 1%. Após 30 dias de incubação a 20°C, foram removidos os tecidos moles com auxílio de um fluxo de água corrente. Em seguida, os espécimes foram submersos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 3% por 7 dias e então se procedeu à secagem das peças (23).

Em seguida, foram realizadas fotografias em distância padronizada e com escala (paquímetro). A câmera fotográfica utilizada foi Canon® T4i lente 18mm-55mm. Com o auxílio de um *software* (*ImageJ*), as amostras foram avaliadas de forma quantitativa e foram calculadas a área óssea formada em mm² e a porcentagem de reparação óssea espontânea em cada defeito (Figuras 2 e 3). Esta metodologia foi desenvolvida especificamente para esse estudo.

Figura 2 – Fotografia de amostra de maceração



Figura 3 – Exemplo de medição da área óssea formada

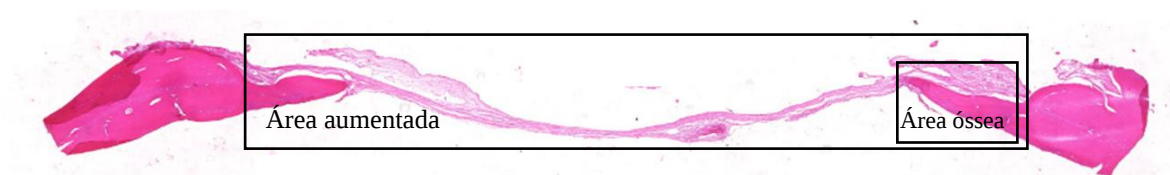


3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Espécimes dos grupos de acordo com o período de avaliação foram imersos em solução de formol neutro a 10% por 48 horas e após a fixação, as calotas foram descalcificadas em ácido nítrico a 5% por 48 horas. Foram realizados cortes de 5 μ m de espessura no sentido coronal e corados em hematoxilina-eosina. De cada bloco, os dois cortes mais centrais foram selecionados. A análise histológica consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros: presença, intensidade e tipo de infiltrado inflamatório; presença e tipo de neoformação óssea; densidade do tecido conjuntivo. Após análise microscópica, a fotomicrografia de cada espécime foi

tomada com auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio e magnificação de 2x e foi utilizada para avaliação histomorfométrica, realizada através de *software* (*ImageJ*). Três parâmetros foram mensurados: área aumentada, área óssea neoformada e proporção de osso formado. Área aumentada (mm^2) levou em consideração todo tecido dentro dos limites do osso neoformado. Área óssea neoformada (mm^2) foi mensurada como osso mineralizado neoformado, excluindo tecido medular e fibrovascular. Proporção de osso neoformado (%) foi estabelecida como a porcentagem de novo osso dentro da área inicial do defeito (Figura 4).

Figura 4 – Parâmetros avaliados na histomorfometria



3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a estudo estatístico comparativo entre todos os grupos e períodos. Foram aplicados os testes t de Student para amostras pareadas, ANOVA para comparação entre os 5 grupos e Teste de Tukey para o Pos-hoc utilizando o programa estatístico IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 21.0, para a obtenção dos resultados. O valor da significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. As tabelas 1 e 2 mostram o teste de normalidade de Shapiro Wilk para as variáveis de maceração e histomorfometria e mostram que os dados seguem uma distribuição normal ($p > 0,05$) e logo, os testes utilizados para comparação de médias foram os testes paramétricos.

Tabela 1 - Teste de normalidade para as variáveis dos dados de maceração

Momento	Parâmetros analisados	Grupo	Shapiro-Wilk		
			Estatística	Graus de liberdade	P-valor
30 Dias	Área óssea formada (mm ²)	G1	0,876	4	0,323
		G2	0,941	8	0,624
		G3	0,929	7	0,543
		G4	0,951	8	0,718
		G5	0,879	8	0,186
120 dias	Área óssea formada (mm ²)	G1	0,943	4	0,673
		G2	0,906	8	0,327
		G3	0,952	7	0,752
		G4	0,869	8	0,146
		G5	0,948	8	0,696
30 Dias	Área óssea formada (%)	G1	0,876	4	0,323
		G2	0,941	8	0,625
		G3	0,929	7	0,543
		G4	0,951	8	0,718
		G5	0,880	8	0,186
120 dias	Área óssea formada (%)	G1	0,943	4	0,674
		G2	0,906	8	0,327
		G3	0,952	7	0,752
		G4	0,869	8	0,146
		G5	0,949	8	0,697

Tabela 2 - Teste de normalidade para as variáveis dos dados histomorfométricos

Momento	Parâmetros analisados	Grupo	Shapiro-Wilk		
			Estatística	Graus de liberdade	P-valor
30 Dias	Área aumentada (mm ²)	G1	0,868	4	0,289
		G2	0,961	8	0,822
		G3	0,955	7	0,773
		G4	0,880	8	0,189
		G5	0,943	8	0,642
120 dias	Área aumentada (mm ²)	G1	0,960	4	0,780
		G2	0,863	8	0,128
		G3	0,921	7	0,476
		G4	0,678	8	0,001
		G5	0,811	8	0,038
30 Dias	Área óssea formada (mm ²)	G1	0,709	4	0,015
		G2	0,943	8	0,637
		G3	0,937	7	0,614
		G4	0,842	8	0,079
		G5	0,925	8	0,468
120 dias	Área óssea formada (mm ²)	G1	0,814	4	0,130
		G2	0,939	8	0,605
		G3	0,971	7	0,905
		G4	0,756	8	0,010
		G5	0,880	8	0,190
30 Dias	Área óssea formada no defeito (%)	G1	0,949	4	0,708
		G2	0,917	8	0,404
		G3	0,937	7	0,613
		G4	0,934	8	0,550
		G5	0,931	8	0,521
120 dias	Área óssea formada no defeito (%)	G1	0,900	4	0,432
		G2	0,914	8	0,380
		G3	0,915	7	0,434
		G4	0,891	8	0,241
		G5	0,879	8	0,182
30 Dias	Proporção de osso neoformado (%)	G1	0,889	4	0,377
		G2	0,957	8	0,777
		G3	0,909	7	0,386
		G4	0,779	8	0,017
		G5	0,922	8	0,446
120 dias	Proporção de osso neoformado (%)	G1	0,945	4	0,683
		G2	0,923	8	0,456
		G3	0,885	7	0,249
		G4	0,829	8	0,058
		G5	0,843	8	0,081

4 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E LOCALIZAÇÃO DO DEFEITO CRÍTICO NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS

AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA ESPONTÂNEA EM CALVÁRIA DE RATOS

Resumo

Objetivos: comparar diferentes tamanhos de defeitos ósseos em calvária de ratos Wistar, a fim de identificar e padronizar qual o menor tamanho dos defeitos críticos, relacionados com o sítio anatômico.

Material e Métodos: Cento e quatro ratos machos, adultos (3-4 meses) foram distribuídos em 5 grupos experimentais para realização de defeitos em calota craniana (tamanhos: 4mm, 5mm, 6mm e 9mm, localizados centralmente ou lateralmente à sutura sagital). Após períodos de observação de 30 ou 120 dias, os animais foram sacrificados. A neoformação óssea espontânea dos defeitos foi então avaliada através das técnicas de maceração e histológica/histomorfométrica.

Resultados: A análise histológica revelou ausência de infiltrado inflamatório na maioria das amostras analisadas, nas amostras que apresentaram infiltrado inflamatório todos eram de intensidade discreta e tipo crônico. Quanto ao tipo de neoformação óssea evidenciou-se formação em ilhas e em trabéculas. Quanto à densidade de tecido conjuntivo encontrou-se amostras tanto de tecido conjuntivo fibroso denso, quanto tecido conjuntivo fibroso frouxo. As médias de porcentagem de fechamento dos defeitos variaram muito entre os grupos e até mesmo dentro do mesmo grupo, entretanto nenhum defeito apresentou fechamento completo. Os diferentes tamanhos de defeito, localização anatômica central ou lateral à sutura sagital, períodos de avaliação de 30 ou 120 dias e métodos de avaliação por maceração ou histomorfométrico (no período de 120 dias) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Conclusões: Os achados do presente estudo permitem concluir que defeitos de 4mm, 5mm, 6mm e 9mm em calvária de ratos podem ser considerados críticos; a localização do defeito não influenciou no reparo ósseo; períodos de avaliação de 1 mês são suficientes para avaliar o fechamento do defeito e que os diferentes métodos de análise não diferiram entre si. Mais

estudos se fazem necessários para otimizar o uso de defeitos críticos em calvária de ratos em pesquisa.

Palavras-chave: Ratos. Modelos Animais. Regeneração Óssea.

Introdução

O reparo de defeitos ósseos, resultantes de envelhecimento, trauma, cirurgias ablativas, malformações congênitas ou patologias se apresenta como um grande desafio clínico (Götz, Warnke, Kolk, 2015; Susin et al., 2018). Embora o transplante de osso autólogo seja considerado o padrão ouro para o reparo ósseo da região maxilofacial, defeitos maiores necessitam de volumes ósseos indisponíveis localmente (Fretwurst, Gad, Nelson, Schmelzeisen, 2015; Corbella, Taschieri, Weinstein, Del Fabbro, 2016; Shanbhag, Pandis, Mustafa, Nyengaard, Stavropoulos, 2017). Além disso, a morbidade associada à coleta de osso pode ser um fator limitante (Nkenke e Neukam, 2014). Procurando contornar esta dificuldade, diferentes biomateriais e técnicas têm sido sugeridos para reparo de defeitos ósseos, e modelos experimentais pré-clínicos são usados para investigar sua aplicabilidade (Vajgel et al., 2014). Modelos animais experimentais podem prover uma prova de princípio, estabelecendo intervenções clínicas mais eficazes (Gomes e Fernandes, 2011).

A seleção de modelos pré-clínicos frequentemente leva em consideração a árvore filogenética, no entanto se os resultados podem ser alcançados utilizando animais menores, como os roedores, é preferível (Gomes e Fernandes, 2011). Os roedores apresentam diversas vantagens como menor custo, fácil manipulação e alocação, reportam mínima preocupação social e permitem padronização de condições experimentais em indivíduos geneticamente semelhantes, com menor variação individual, o que implica que menos unidades experimentais são necessárias para atingir dados estatisticamente válidos, se comparado aos animais maiores (Jordan 1971; Pellegrini, Seol, Gruber, Giannobile, 2009; Gomes e Fernandes, 2011; Stavropoulos, Sculean, Bosshardt, Buser, Klinge, 2015).

O defeito crítico em calvária de ratos é um dos modelos experimentais mais comumente utilizados em pesquisas que testam biomateriais, drogas ou dispositivos com potencial de estimular a formação óssea local (Schmitz e Hollinger, 1986; Herberg et al., 2014; Moreira et al., 2018; Susin et al., 2018). O termo “defeito crítico” foi definido originalmente por Schmitz e Hollinger em 1986 como “o menor defeito intraósseo em determinado osso e espécie animal que não irá reparar espontaneamente durante a vida do animal”. No entanto, como a maioria

dos estudos pré-clínicos possuem um tempo de avaliação limitado, Gosain et al. (2000) estabeleceram que “o tamanho do defeito crítico em pesquisas animais se refere ao tamanho de defeito que não irá reparar durante o período de duração do estudo”.

Defeitos críticos em calotas cranianas de ratos apresentam diversas vantagens como padronização das dimensões do defeito; acesso cirúrgico adequado e suporte para o emprego de biomateriais devido à presença de dura-máter e pele; não requer fixação ou estabilização e possibilidade de executar análises diretas e em períodos de tempo relativamente curtos (Gomes e Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012; Stavropoulos, et al., 2015). Por outro lado, este modelo não permite a avaliação da reparação óssea em condições de carga fisiológica/biomecânica e a quantidade de tecidos disponíveis para avaliação – histológica, por exemplo – pode ser limitada (Vajgel et al., 2014).

Há bastante controvérsia na literatura em relação à dimensão mais apropriada de defeito na calota craniana de ratos que pode ser considerado crítico (Hollinger & Kleinschmidt 1990; Bosch, Melsen, Vargervik, 1998; Cooper et al., 2010; Vajgel et al., 2014; Susin et al., 2018). Defeitos menores permitem modelos com dois defeitos por animal, possibilitando estabelecer no mesmo animal tanto defeito teste quanto controle, reduzindo o número de animais pesquisados. Além das dimensões do defeito, a localização anatômica do defeito, especialmente em relação ao envolvimento ou não da sutura sagital também tem sido debatido por sua possível influência no processo de reparo (Bosch, Melsen, Gibbons, Vargervik, 1996).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi comparar diferentes tamanhos de defeitos ósseos em calvária de ratos da espécie Wistar, a fim de identificar e padronizar qual o menor tamanho dos defeitos críticos, relacionados com o sítio anatômico, que deverão ser utilizados em futuros estudos para avaliação da reparação óssea.

Material e Métodos

Desenho do estudo e considerações éticas

A presente pesquisa tratou-se de um estudo experimental *in vivo* randomizado, e foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o seguinte protocolo 23076.051218/2012-96. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e The National of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals.

A pesquisa foi realizada entre dezembro de 2015 e dezembro de 2017 no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco (NCE-UFPE). Foram utilizados no presente estudo 104 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), machos, adultos (3-4 meses), pesando entre 350 gramas $\pm$ 50 g, obtidos no biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram armazenados em gaiolas com 4 animais cada, sob controle de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, e mantidos com ração balanceada e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos 5 dias para aclimação do laboratório.

Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, de acordo com o tamanho do defeito ósseo produzido na calvária (dimensão dos defeitos: 4mm, 5mm, 6mm ou 9mm) e também com a localização do defeito – realizado no osso parietal bilateralmente, sem envolvimento da sutura sagital ou defeito único realizado na porção central da calvária, com envolvimento da sutura sagital. Os animais foram avaliados em dois períodos em relação à reparação: após 30 dias (30d) da cirurgia, correspondendo à reparação precoce e após 120 dias (120d), representando a reparação tardia (Quadro 2). Os períodos de avaliação de 30 e 120 dias foram planejados de acordo com os períodos de avaliação encontrados na literatura. Foram realizados 16 defeitos por grupo por período de avaliação, com exceção do Grupo 1, que por se tratar do piloto do estudo, apresentou apenas 8 defeitos.

Quadro 2: Distribuição dos grupos em relação ao tamanho e sítio do defeito, métodos de avaliação e período de observação.

Grupos	Número de Animais	Número de Defeitos	Tamanho do Defeito	Sítio do Defeito	Período de Observação	Métodos de Avaliação	
						Maceração	Histológico
G1	4	8	4 mm	Lateral	30 dias	N=4	N=4
	4	8	4 mm	Lateral	120 dias	N=4	N=4
G2	8	16	5 mm	Lateral	30 dias	N=8	N=8
	8	16	5 mm	Lateral	120 dias	N=8	N=8
G3	8	16	6 mm	Lateral	30 dias	N=8	N=8
	8	16	6 mm	Lateral	120 dias	N=8	N=8
G4	16	16	6 mm	Central	30 dias	N=8	N=8
	16	16	6 mm	Central	120 dias	N=8	N=8
G5	16	16	9 mm	Central	30 dias	N=8	N=8
	16	16	9 mm	Central	120 dias	N=8	N=8
Total	104	144				72 análises	72 análises

O defeito de 6mm foi realizado lateralmente e centralmente para que se pudesse avaliar se a sutura sagital influencia no reparo ósseo. Ao passo que o defeito de 9mm foi executado apenas centralmente, pois pelas dimensões da calota craniana do rato é inviável realizar mais que um defeito.

Cálculo da amostra

A definição do tamanho da amostra baseou-se em dados encontrados na literatura (Mardas, Stavropoulos, Karring, 2008; Patel et al., 2008), optando-se pelo número mínimo que não pudesse comprometer os resultados.

Cirurgias experimentais

Nenhum dos procedimentos foi efetuado no local destinado ao armazenamento dos animais a fim de impedir estresse comportamental dos mesmos.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 0,1 mg/Kg (SESPO, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) associado a xilazina 0,1 mg/Kg (Bayer do Brasil, Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil), por via intramuscular.

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal e a assepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2%. Em seguida, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15c, foi realizada uma incisão linear, na região da sutura sagital, no tegumento de revestimento do crânio, e com auxílio de um descolador de Molt, o retalho de espessura total foi descolado, expondo a cortical óssea da região. Com uma trefina cirúrgica de diâmetro externo correspondente a cada grupo de estudo, e com auxílio de uma peça de mão com irrigação constante de soro fisiológico, foi confeccionado de acordo com cada grupo um defeito ósseo de espessura total, transpassando toda a espessura da díploe, tomando-se bastante cuidado para não danificar a dura-máter e o seio venoso sagital. Posteriormente, o defeito foi irrigado com soro fisiológico para remover as espículas ósseas que permaneceram após a confecção do defeito.

Os retalhos foram, em seguida, recolocados em sua posição e suturados por plano anatômico com fio de sutura tipo seda 3-0. Imediatamente após a cirurgia, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 10mg/Kg de cefalosporina e 10mg/Kg de dipirona. Após as cirurgias, os animais foram alocados em gaiolas individuais por 15 dias. Passado esse prazo os animais foram realocados em gaiolas maiores, com 4 animais por gaiola. Durante o período de

reparação nenhuma medicação foi administrada. As suturas não foram removidas, saindo espontaneamente de acordo com a renovação epitelial dos animais.

Eutanásia dos animais e obtenção da peça operatória

Após o período de reparação de 30 dias ou 120 dias, de acordo com o grupo a que pertenciam, os animais foram sacrificados com sobredose de anestésico (tiopental), e as peças foram processadas para análise histológica e de maceração.

Para obtenção da peça operatória, foi realizada uma incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça, com lâmina de bisturi nº 15c montada em cabo Bard-Parker nº3, com o intuito de não danificar a região óssea de interesse. O tecido mole sobre a calota craniana foi removido com o auxílio de tesoura Matzenbaum e pinça Adson Brown, promovendo uma ampla visualização da calota, incluindo os ossos parietais. Para as peças que foram analisadas pelo método da maceração, a mandíbula foi desarticulada e o crânio seguiu para processamento. Já nas peças que foram avaliadas histologicamente e histomorfometricamente, foi realizada a osteotomia da calota craniana com broca multilaminada tronco-cônica nº 701, em baixa rotação e sob irrigação constante com solução fisiológica a 0,9%, a uma distância de 4mm além dos bordos dos defeitos. A peça operatória foi removida com auxílio de descolador de Molt e pinça Adson Brown e imersa em recipiente identificado contendo solução de acordo com a análise realizada.

Após a eutanásia e necropsia, os animais foram considerados como lixo biológico, sendo os mesmos recolhidos, congelados e incinerados, seguindo as normas de protocolo do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Análise de macerações

Espécimes de cada grupo de acordo com o período de avaliação foram submetidos ao processo de maceração através da imersão em solução de papaína a 1%. Após 30 dias de incubação a 20°C, foram removidos os tecidos moles com auxílio de um fluxo de água corrente. Em seguida, os espécimes foram submersos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 3% por 7 dias e então se procedeu à secagem das peças (Donos et al., 2004).

Em seguida, foram realizadas fotografias em distância padronizada e com escala (paquímetro). A câmera fotográfica utilizada foi Canon® T4i lente 18mm-55mm. Com o auxílio de um software (ImageJ), as amostras foram avaliadas de forma quantitativa e foram

calculadas a área óssea formada em mm² e a porcentagem de reparação óssea espontânea em cada defeito.

Análise histológica e histomorfométrica

Espécimes dos grupos de acordo com o período de avaliação foram imersos em solução de formol neutro a 10% por 48 horas e após a fixação, as calotas foram descalcificadas em ácido nítrico a 5% por 48 horas. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura no sentido coronal e corados em hematoxilina-eosina. De cada bloco, os dois cortes mais centrais foram selecionados. A análise histológica consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros: presença, intensidade e tipo de infiltrado inflamatório; presença e tipo de neoformação óssea; densidade do tecido conjuntivo. Após análise microscópica, a fotomicrografia de cada espécime foi tomada com auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio e magnificação de 2x e foi utilizada para avaliação histomorfométrica, realizada através de software (ImageJ). Três parâmetros foram mensurados: área aumentada, área óssea neoformada e proporção de osso formado. Área aumentada (mm²) levou em consideração todo tecido dentro dos limites do osso neoformado. Área óssea neoformada (mm²) foi mensurada como osso mineralizado neoformado, excluindo tecido medular e fibrovascular. Proporção de osso neoformado (%) foi estabelecida como a porcentagem de novo osso dentro da área inicial do defeito.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a estudo estatístico comparativo entre todos os grupos e períodos. Foram aplicados os testes t de Student para amostras pareadas, ANOVA para comparação entre os 5 grupos e Teste de Tukey para o Pos-hoc utilizando o programa estatístico IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 21.0, para a obtenção dos resultados. O valor da significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. O teste de normalidade de Shapiro Wilk para as variáveis de maceração e histomorfometria mostraram que os dados seguem uma distribuição normal ($p > 0,05$) e logo, os testes utilizados para comparação de médias foram os testes paramétricos.

Resultados

Cento e quatro animais foram divididos em 5 grupos conforme apresentado no quadro 2, onde em cada animal foram realizados defeitos com diferentes tamanhos e avaliados em diferentes períodos de tempo (30 dias e 120 dias), no qual apenas no grupo 1 foram investigados 8 defeitos e nos demais grupos foram realizados 16 defeitos, por período de tempo.

Quadro 3: Distribuição dos defeitos por grupo estudado

Grupos		Número de Defeitos
G1-Defeito Inicial = 12,56636mm ²	04 mm lateral (02 defeitos)	8 (30d) + 8 (120d)
G2-Defeito Inicial = 19,634937mm ²	05 mm lateral (02 defeitos)	16 (30d) + 16 (120d)
G3-Defeito Inicial = 28,27431mm ²	06 mm lateral (02 defeitos)	16 (30d) + 16 (120d)
G4-Defeito Inicial = 28,27431mm ²	06 mm central (01 defeito)	16 (30d) + 16 (120d)
G5-Defeito Inicial = 63,617197mm ²	09 mm central (01 defeito)	16 (30d) + 16 (120d)

Análise de Maceração

A tabela 3 apresenta os valores médios da área óssea formada em mm² e porcentagem de reparação óssea espontânea (avaliados através do método da maceração). Tanto a porcentagem de área formada, quanto os valores em mm² não apresentaram diferenças com significância estatística entre os momentos 30 dias e 120 dias. Em relação a comparação entre os grupos do momento 30 dias da área em mm² (p=0,004) o grupo 5 apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros grupos, com média $12,43 \pm 4,32\text{mm}^2$.

Tabela 3 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área formada e % da área formada) dos dados da maceração dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos

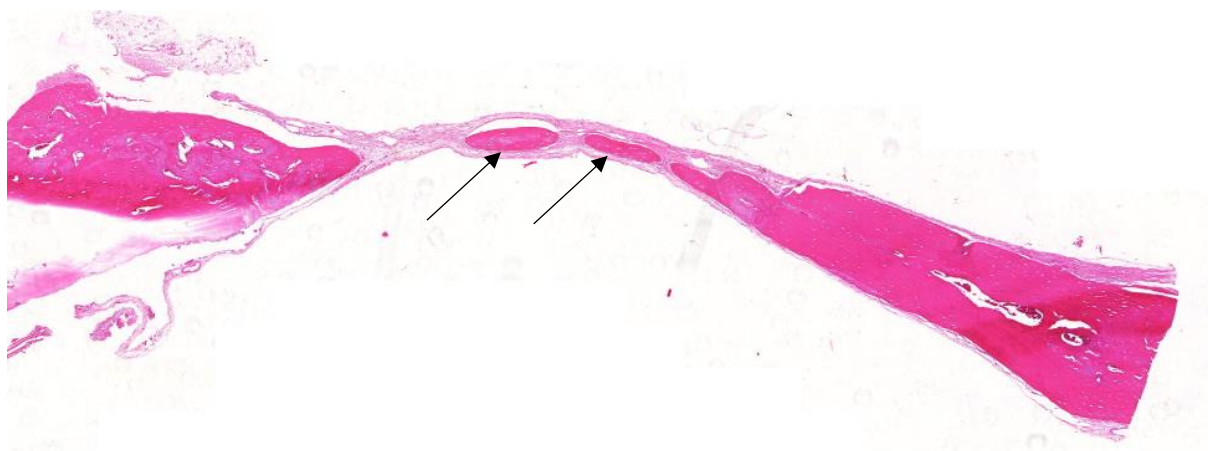
Variável	Grupo	Pos-Hoc ³ (Entre os grupos)	30 dias		120 dias		P-valor ¹ (30 dias x 120 dias)
			N	Média $\pm$ Desvio-padrão	N	Média $\pm$ Desvio-padrão	
Área óssea formada (mm ²)	G1	A	4	4,20 $\pm$ 2,54	4	4,66 $\pm$ 3,69	0,847
	G2	A	8	5,62 $\pm$ 2,04	8	8,63 $\pm$ 6,16	0,276
	G3	A	8	6,44 $\pm$ 5,43	8	5,68 $\pm$ 5,03	0,782
	G4	A	8	5,43 $\pm$ 3,69	8	6,12 $\pm$ 6,86	0,781
	G5	B	8	12,43 $\pm$ 4,32	8	11,59 $\pm$ 3,46	0,604
P-valor ² (Entre os grupos)			0,004*		0,140		
Área óssea formada (%)	G1	-	4	33,40% $\pm$ 20,19%	4	37,09% $\pm$ 29,40%	0,847
	G2	-	8	28,60% $\pm$ 10,41%	8	43,96% $\pm$ 31,39%	0,276
	G3	-	8	22,79% $\pm$ 19,19%	8	20,09% $\pm$ 17,79%	0,782
	G4	-	8	19,19% $\pm$ 13,05%	8	21,64% $\pm$ 24,28%	0,781
	G5	-	8	19,53% $\pm$ 6,79%	8	18,21% $\pm$ 5,44%	0,604
P-valor ² (Entre os grupos)			0,365		0,135		

1-Teste t de Student para amostras pareadas; 2 – ANOVA; 3 Pos-Hoc pelo teste de Tukey (letra iguais não diferem estatisticamente); * Estatisticamente significativa.

Análise Histológica

A análise histológica revelou formação óssea a partir das margens do defeito, com algumas amostras apresentando ilhas de formação óssea dentro do espaço do defeito. A neoformação óssea observada não manteve a espessura do osso original. Também se observou presença de tecido conjuntivo e fibras colágenas (Figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia de lâmina histológica. Ilhas de formação óssea. Magnificação de 2x

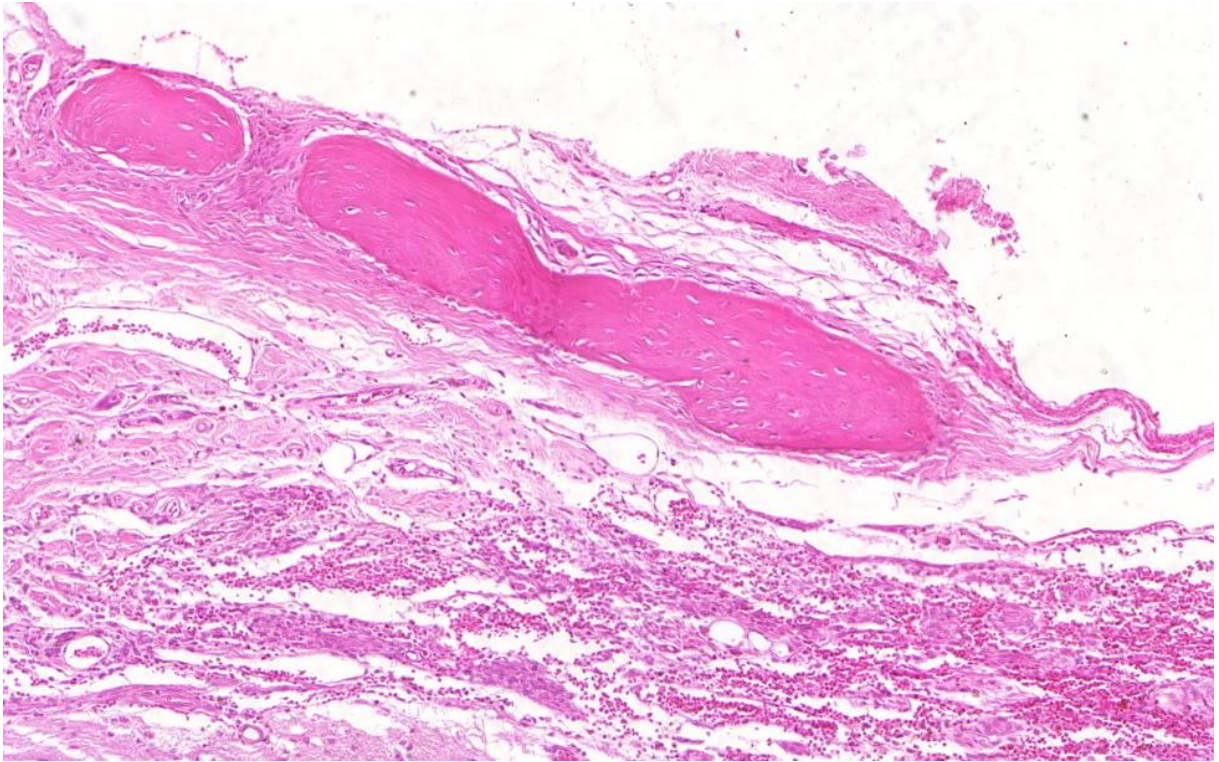


Observou-se ausência de infiltrado inflamatório na maioria das amostras analisadas, tanto no período de 120 dias (65,63%), como no período de observação de 30 dias (88,57%). Nas amostras que apresentaram infiltrado inflamatório (120d= 34,37% e 30d= 11,43%), todos eram de intensidade discreta e tipo crônico (discreta – até um terço do infiltrado inflamatório e crônico – pela presença de polimorfonucleares).

Quanto ao tipo de neoformação óssea evidenciou-se formação em ilhas e em trabéculas, com predominância de formação em ilha nos defeitos de 120 dias de observação (ilhas= 34,38%), enquanto que nos defeitos de 30 dias ocorreu o oposto, houve predominância de formação em trabéculas (trabéculas= 37,14%).

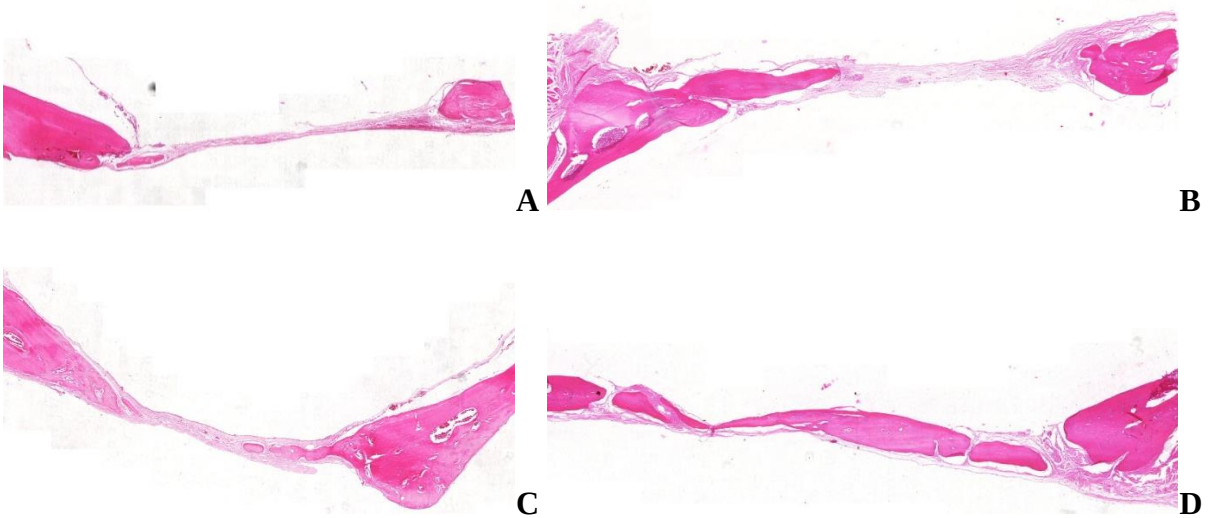
Quanto à densidade de tecido conjuntivo, encontrou-se amostras tanto de tecido conjuntivo fibroso denso, quanto tecido conjuntivo fibroso frouxo. No grupo de 120 dias houve uma distribuição entre tecido frouxo (65,63%) e tecido denso (34,37%); já o grupo de 30 dias apresentou apenas 1 amostra de tecido conjuntivo denso (2,86%) e todas as demais foram de tecido frouxo. A figura 6 mostra a presença de infiltrado inflamatório crônico, neoformação óssea em ilha e tecido conjuntivo fibroso denso, a lâmina se refere à amostra de defeito de 5mm, avaliada após 120 dias.

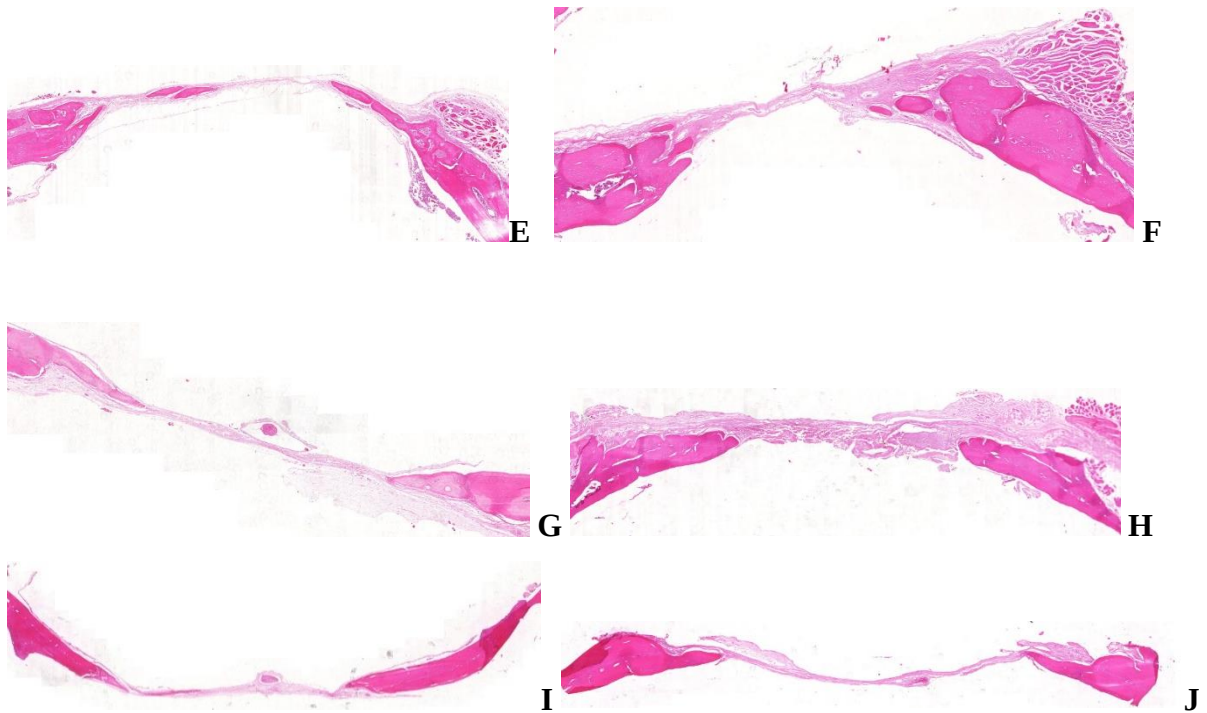
Figura 6 – Fotomicrografia de lâmina histológica. Magnificação de 10x



A figura 7 mostra um painel com diferentes fotomicrografias dos diversos grupos avaliados na presente pesquisa.

Figura 7 – Painel de fotomicrografias de lâminas histológicas. Magnificação de 2x. A- 4mm, 30 dias; B- 4mm, 120 dias; C- 5mm, 30d; D- 5mm, 120d; E- 6mm, lateral, 30d; F- 6mm, lateral, 120d; G- 6mm, central, 30d; H- 6mm, central, 120d; I- 9mm, 30d; J- 9mm, 120d.





Análise Histomorfométrica

Em relação à área aumentada (mm^2), no momento 30 dias apresentou diferença com significância estatística ($p=0,003$) e no Pos-hoc verificou-se que essa diferença foi do grupo 1 ($1,13 \pm 0,54 \text{ mm}^2$) com o grupo 3 ($3,41 \pm 1,30 \text{ mm}^2$) e do grupo 1 ($1,13 \pm 0,54 \text{ mm}^2$) com o grupo 5 ($3,51 \pm 0,68 \text{ mm}^2$). No período de 120 dias entre os grupos ($p>0,05$) não houve significância estatística. Na comparação entre os dois períodos de observação (120 e 30 dias) ($p>0,05$) não apresentou significância estatística. Com a área óssea formada (mm^2) apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p=0,019$) no momento 30 dias e essa diferença ocorreu apenas entre os grupos 1 ($0,33 \pm 0,43 \text{ mm}^2$) e grupo 3 ($0,90 \pm 0,34 \text{ mm}^2$), conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área aumentada e área óssea formada) dos dados histomorfométricos dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos

Variável	Grupo	Pos-Hoc ³ (Entre os grupos)	30 dias		120 dias		P-valor ¹ (30 dias x 120 dias)
			N	Média $\pm$ Desvio-padrão	N	Média $\pm$ Desvio-padrão	
Área aumentada (mm ²)	G1	A	4	1,13 $\pm$ 0,54	4	1,42 $\pm$ 0,69	0,564
	G2	AB	8	2,20 $\pm$ 0,91	8	2,40 $\pm$ 0,81	0,590
	G3	B	8	3,41 $\pm$ 1,30	8	4,73 $\pm$ 2,13	0,136
	G4	AB	8	2,59 $\pm$ 1,24	8	4,42 $\pm$ 3,93	0,211
	G5	B	8	3,51 $\pm$ 0,68	8	4,45 $\pm$ 1,39	0,032
P-valor ² (Entre os grupos)				0,003*		0,063	
Área óssea formada (mm ²)	G1	A	4	0,33 $\pm$ 0,43	4	0,32 $\pm$ 0,09	0,973
	G2	AB	8	0,51 $\pm$ 0,18	8	0,59 $\pm$ 0,31	0,580
	G3	B	8	0,90 $\pm$ 0,34	8	0,68 $\pm$ 0,31	0,161
	G4	AB	8	0,56 $\pm$ 0,38	8	0,57 $\pm$ 0,65	0,972
	G5	AB	8	0,48 $\pm$ 0,11	8	0,66 $\pm$ 0,36	0,220
P-valor ² (Entre os grupos)				0,019*		0,667	

1-Teste t de Student para amostras pareadas; 2 – ANOVA; 3 Pos-Hoc pelo teste de Tukey (letra iguais não diferem estatisticamente); * Estatisticamente significativa.

Segundo a tabela 5 entre os momentos 30 dias e 120 dias não houve diferença estatisticamente significativa, como também em cada momento entre os grupos em relação ao percentual de área óssea formada no defeito.

Tabela 5 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações (área óssea formada) dos dados histomorfométricos dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos

Variável	Grupo	Pos-Hoc ³ (Entre os grupos)	30 dias		120 dias		P-valor ¹ (30 dias x 120 dias)
			N	Média $\pm$ Desvio-padrão	N	Média $\pm$ Desvio-padrão	
Área óssea formada no defeito (%)	G1	-	4	15,96% $\pm$ 11,98%	4	17,82% $\pm$ 3,19%	0,718
	G2	-	8	17,06% $\pm$ 4,82%	8	25,11% $\pm$ 15,48%	0,237
	G3	-	8	18,21% $\pm$ 4,97%	8	18,59% $\pm$ 9,01%	0,919
	G4	-	8	13,33% $\pm$ 7,03%	8	12,06% $\pm$ 9,64%	0,795
	G5	-	8	10,60% $\pm$ 2,17%	8	13,28% $\pm$ 7,55%	0,420
P-valor ² (Entre os grupos)				0,117		0,121	

1-Teste t de Student para amostras pareadas; 2 – ANOVA; 3 Pos-Hoc pelo teste de Tukey (letra iguais não diferem estatisticamente); * Estatisticamente significativa.

Comparação entre métodos de avaliação

A tabela 6 compara os resultados do percentual da área óssea formada da maceração com o histomorfométrico e pode-se notar que a variabilidade (desvio-padrão) da maceração foi maior que o histomorfométrico, mas comparando as médias percentuais, apenas no momento 30 dias houve diferenças com significância estatística nos grupos 2 ($p=0,010$) e 5 ($p=0,011$) nos demais grupos não apresentou diferenças e no momento 120 dias não houve diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Tabela 6 – Distribuição dos valores médios de desvio-padrão das mensurações % área óssea formada de cada grupo e em cada momento comparando a maceração com o histomorfométrico

Variável	Grupo	Momento	Maceração		Histomorfométrico		P-valor ¹ (Maceração x Histomor- fométrico)
			N	Média ± Desvio- padrão	N	Média ± Desvio- padrão	
Área óssea formada (%)	G1	30 dias	4	33,40% ± 20,19%	4	15,96% ± 11,98%	0,342
	G2		8	28,60% ± 10,41%	8	17,06% ± 4,82%	0,010*
	G3		8	22,79% ± 19,19%	8	18,21% ± 4,97%	0,499
	G4		8	19,19% ± 13,05%	8	13,33% ± 7,03%	0,148
	G5		8	19,53% ± 6,79%	8	10,60% ± 2,17%	0,011*
	G1	120 dias	4	37,09% ± 29,40%	4	17,82% ± 3,19%	0,316
	G2		8	43,96% ± 31,39%	8	25,11% ± 15,48%	0,195
	G3		8	20,09% ± 17,79%	8	18,59% ± 9,01%	0,803
	G4		8	21,64% ± 24,28%	8	12,06% ± 9,64%	0,322
	G5		8	18,21% ± 5,44%	8	13,28% ± 7,55%	0,276

1-Teste t de Student para amostras pareadas; * Estatisticamente significativa.

Discussão

Embora os defeitos críticos em calvária de ratos estejam entre os mais comuns modelos pré-clínicos utilizados, ainda há controvérsia acerca do diâmetro de defeito que pode ser considerado crítico. Diferentes tamanhos de defeito têm sido reportados na literatura como críticos, sendo os defeitos de 5mm e de 8mm os mais comuns (Aalami et al., 2004; Tanuma et al., 2012; Vajgel et al., 2014; Chen et al., 2017; de Freitas-Silva et al., 2017; Escoda-Francolí et al., 2018).

A porcentagem de fechamento em defeitos críticos apresenta grande variabilidade na literatura, até quando se trata de defeitos com a mesma dimensão. Vajgel et al. (2014) em sua revisão sistemática reportaram as seguintes proporções de fechamento com 30 dias de avaliação: 5mm (2-35%); 6mm (10-74,10%); 9mm (4,93-30%). Outro estudo apresentou fechamentos variando de 28,10% a 32,30% em defeitos de 5mm (Escoda-Francolí et al., 2018). Aalami et al. (2004) reportaram que defeitos de 3mm, 4mm e 5mm fecharam menos que 5%. Apesar da variabilidade, os dados obtidos na presente pesquisa estão dentro da faixa de resultados disponíveis na literatura. Como não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tamanhos investigados neste estudo, qualquer das dimensões pode ser considerada como defeito crítico, pois nenhum defeito apresentou fechamento completo.

Outros fatores além do tamanho do defeito podem influenciar na quantidade de osso formada; como raça, idade, localização anatômica do defeito (Bosch et al. 1996, 1998), trauma

cirúrgico, técnica usada para criar o defeito (Cooper et al. 2010), métodos de avaliação e períodos de observação (Bosch et al. 1998).

A idade do animal afeta significativamente a reparação óssea (Donos, Dereka, Mardas, 2015), de modo que ratos mais jovens não devem ser usados como modelos experimentais devido ao seu potencial de reparo espontâneo em grandes defeitos ósseos (Bosch et al. 1998; Nyan et al. 2009). Pesquisas demonstraram que tanto a dura mater quanto osteoblastos da calvária derivados de ratos de 6 dias de idade têm potencial osteogênico maior que o observado in vitro nas células derivadas de ratos com 60 dias de idade (Greenwald et al., 2000; Cowan, Quarto, Warren, Salim, Longaker, 2003). Em outros estudos, também foram constatadas evidências radiográficas de ossificação mais elevada em animais jovens do que animais adultos, com diferenças estatisticamente significativas (Aalami et al., 2004). Diante de tais informações, foi feita a escolha de animais adultos para o presente estudo (3-4 meses).

Em relação à localização anatômica, tem sido sugerido que o reparo ósseo pode ser melhorado quando há envolvimento da sutura sagital, pois o coágulo sanguíneo do seio sagital poderia modificar a resposta primária de reparo ósseo (Bosch et al., 1996). No entanto, comparando a porcentagem média de neoformação óssea entre defeitos centrais e bilaterais com 5mm de diâmetro e acompanhamento de 1 e 3 meses, Vajgel et al (2014) em metanálise não encontraram diferença. Tal fato reforça o achado do presente estudo, que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre defeitos de 6mm de diâmetro realizados lateralmente à sutura sagital ou no centro dos ossos parietais, envolvendo a sutura sagital, embora os defeitos centrais tenham mostrado uma reparação óssea um pouco menor que os laterais.

A técnica cirúrgica e questões relacionadas ao operador também podem influenciar no padrão de reparação. Por exemplo, algum grau de necrose óssea pode ser observada nas margens do defeito se adequada irrigação não for empregada, prejudicando o reparo espontâneo da área lesada (Sawyer et al., 2009) ou quando a dura mater é atingida pela trefina durante a confecção do defeito (Greenwald et al., 2000). Contrariando esses achados, Cooper et al. (2010) não observaram diferenças no reparo ósseo quando a dura mater foi intencionalmente lesionada. O presente estudo observou rigorosamente essas duas questões, com intuito de proporcionar uma avaliação mais fidedigna.

Maiores formações ósseas em defeitos controle podem ser explicadas pelo uso de tela de titânio sobre o defeito, prevenindo o colapso de tecidos moles, que podem comprometer a formação óssea (Liu et al., 2016). Alguns estudos, que utilizaram tela de titânio, reportaram fechamento de 33-38% em defeitos de 8mm após 4 semanas (Stancoven et al., 2013; Pelaez et al., 2014); enquanto que defeitos do mesmo tamanho que foram deixados vazios apresentaram neoformação óssea limitada em intervalos de 4 e 8 semanas variando de 1 a 18% (Ahn et al. 2003, Pang et al. 2005, Jung et al. 2006, Lee et al. 2010). As telas também apresentam como vantagem auxiliar na demarcação do defeito original, facilitando as análises posteriores.

Avaliação da reparação óssea em calvária de ratos pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo avaliações histológicas e histomorfométricas (Escoda-Rancolí et al., 2018; Susin et al., 2018), maceração (Mardas et al. 2002; Donos et al. 2004, 2011;), microtomografia computadorizada (Okata et al., 2015; Al-Hezaimi et al., 2016) e técnicas radiográficas (Aalami et al., 2004; Pelaez et al., 2014).

Análise histológica é a técnica mais comumente utilizada para avaliar quantitativamente e qualitativamente a neoformação óssea em modelos de calota craniana de ratos, sendo considerada o padrão-ouro (Vajgel et al., 2014). Entretanto, apresenta como desvantagens ser um método destrutivo e que consome mais tempo (Shanbhag et al., 2016) e não tem capacidade de mensurar com acurácia as mudanças volumétricas de toda a amostra, devido a suas características bidimensionais (Li et al., 2010). Quando se objetiva analisar a microarquitetura tridimensional óssea é preferível complementar com outros métodos mais acurados, como estereometria (Gundersen et al., 1988) ou microtomografia computadorizada (Okata et al., 2015; Al-Hezaimi et al., 2016).

Embora o método da maceração permita avaliação volumétrica com estereoscópio, esse estudo apresentou uma avaliação visual das peças maceradas, através de fotos, o que permitiu apenas observar o fechamento do defeito, mas não a espessura desse fechamento. Mesmo pequenas películas ósseas fechando o defeito já era considerado fechamento ósseo, isso pode ter influenciado nas diferenças de porcentagem de fechamento entre as técnicas da maceração e de histomorfometria, muito embora essas diferenças só tenham apresentado significância estatística entre dois grupos no período de 30 dias. A maceração se mostra uma técnica simples e fácil de ser realizada.

Análises radiográficas apresentam algumas vantagens, como o baixo custo e rapidez na realização, porém o nível de acurácia para identificar mudanças na mineralização em defeitos em calvária de ratos que tem sido reportado é baixo (Pryor, Susin, Wikesjo, 2006; Lima, Calixto, Anbinder, 2011). Logo, análises radiográficas convencionais não devem ser utilizadas como único método de avaliação (Lima et al., 2011), não tendo sido, portanto, empregadas no presente estudo.

Em relação aos períodos de avaliação, a maior proporção de formação óssea total parece ter lugar com 4 semanas, diminuindo paulatinamente e cessando em 8 meses (Honma et al., 2008). Intervalos de observação de até 12 semanas podem ser usados para avaliar formação óssea (2 e 4 semanas) e para analisar maturação óssea e biodegradação dos biomateriais investigados (8 e 12 semanas) (Susin et al., 2018).

É importante observar que alguns estudos não apresentaram diferenças na porcentagem de neoformação óssea entre 1 e 2 meses de avaliação (Lyons et al., 2010; Stephan et al., 2010), bem como o presente estudo não demonstrou diferenças estatisticamente significativas nos dois períodos de observação adotados (1 e 4 meses).

A principal vantagem de trabalhar com defeitos críticos menores – como o defeito de 5mm – é que ele possibilita que tanto o sítio controle quanto o sítio experimental sejam realizados no mesmo animal, de forma padronizada, diminuindo vieses causados pela variabilidade entre diferentes animais, reduzindo a possibilidade de injúria ao seio sagital, que pode causar hemorragia (Bosch et al, 1998) e complicações neurológicas, além de permitir a redução do número de animais pesquisados (Vajgel et al., 2014). Por outro lado, quando biomateriais e medicações são aplicados nos defeitos bilaterais em associação com carreadores de baixa viscosidade, como géis ou líquidos, o defeito controle pode ser contaminado devido à proximidade entre os defeitos; conforme reportado por Escoda-Francolí et al. (2018). O presente estudo mostrou que é possível até a realização de dois defeitos de 6mm na calota craniana de ratos, sem envolver a sutura sagital, entretanto devido a não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois tamanhos de defeito, é preferível utilizar defeitos de 5mm, haja vista a vasta literatura usando esse tamanho, que permite a comparação dos resultados e para cumprir o item “refinamento” dos 3Rs. Defeitos maiores – como 9mm – só possibilitam a criação de um defeito único em calota craniana de ratos adultos, usualmente no centro entre os dois ossos parietais, envolvendo a sutura sagital. Deve-se avaliar os objetivos do estudo e sempre que possível empregar os defeitos menores e bilaterais.

Os achados do presente estudo permitem concluir que defeitos de 4mm, 5mm, 6mm e 9mm em calvária de ratos podem ser considerados críticos, pois não apresentaram fechamento completo. A localização do defeito, se lateral ou central, não influenciou no reparo ósseo. Períodos de avaliação de 1 mês são suficientes para avaliar o fechamento do defeito. Os métodos da maceração e histomorfométrico não apresentaram diferença estatística entre si, no período de observação de 120 dias.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados com o presente estudo.

Referências

- Aalami, O. O., Nacamuli, R. P., Lenton, K. A., Cowan, C. M., Fang, T. D., Fong, K. D., ... Longaker, M. T. (2004). Applications of a mouse model of calvarial healing: Differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 114(3), 713–720. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000131016.12754.30>
- Ahn, S. H., Kim, C. S., Suk, H. J., Lee, Y. J., Choi, S. H., Chai, J. K., Kim, C. K., Han, S. B. & Cho, K. S. (2003) Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *Journal of Periodontology* 74, 787–797. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.6.787>
- Al-Hezaimi, K., Ramalingam, S., Al-Askar, M., Arrejaie, A. S., Nooh, N., Jawad, F., ... Wang, C. Y. (2016). Real-time-guided bone regeneration around standardized critical size calvarial defects using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and collagen membrane with and without using tricalcium phosphate: An in vivo micro-computed tomographic and histologic experiment in rats. *International Journal of Oral Science*, 8, 7–15. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.34>
- Bosch, C., Melsen, B., Gibbons, R., & Vargervik, K. (1996). Human recombinant transforming growth factor- β 1 in healing of calvarial bone defects. *Journal of Craniofacial Surgery*, 7(4), 300–310. <https://doi.org/10.1097/00001665-199607000-00011>

- Bosch, C., Melsen, B., & Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 9(4), 310–316. <https://doi.org/10.1097/00001665-199807000-00004>
- Chen, C., Chang, N., Wu, Y., Fu, E., Shen, E., Feng, C., & Wen, Z. (2017). Bone Formation Using Cross-Linked Chitosan Scaffolds in Rat Calvarial Defects. *Implant Dentistry*, 1. <https://doi.org/10.1097/id.0000000000000670>
- Cooper, G. M., Mooney, M. P., Gosain, A. K., Campbell, P. G., Losee, J. E., & Huard, J. (2010). Testing the critical size in calvarial bone defects: Revisiting the concept of a critical-size defect. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(6), 1685–1692. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3>
- Corbella, S., Taschieri, S., Weinstein, R., & Del Fabbro, M. (2016, September 1). Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*. Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/clr.12702>
- Cowan, C. M., Quarto, N., Warren, S. M., Salim, A., & Longaker, M. T. (2003). Age-related changes in the biomolecular mechanisms of clvarial osteoblast biology affect fibroblast growth factor-2 signaling and osteogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32005–32013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304698200>
- Donos, N., Dereka, X., & Mardas, N. (2015). Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontology 2000*, 68(1), 99–121. <https://doi.org/10.1111/prd.12077>
- Donos, N., Graziani, F., Mardas, N. & Kostopoulos, L. (2011) The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects. *Clinical Oral Implants Research* 22: 1346–1353. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02120.x>
- Donos, N., Lang, N. P., Karoussis, I. K., Bosshardt, D., Tonetti, M., & Kostopoulos, L. (2004). Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clinical Oral Implants Research*, 15(1), 101-111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.00986.x>
- Escoda-Francolí, J., Sánchez-Garcés, M. Á, Gimeno-Sandig, Á, Muñoz-Guzón, F., Barbany-Cairó, J. R., Badiella-Busquets, L., & Gay-Escoda, C. (2018). Guided bone regeneration using

beta-tricalcium phosphate with and without fibronectin-An experimental study in rats. *Clinical Oral Implants Research*, 29(10), 1038-1049. <https://doi.org/10.1111/clr.13370>

de Freitas Silva, L. D., Carvalho Reis, E. N. R., Barbara, T. A., Bonardi, J. P., Garcia, I. R., Carvalho, P. S., & Ponzoni, D. (2017). Assessment of bone repair in critical-size defect in the calvarium of rats after the implantation of tricalcium phosphate beta (β -TCP). *Acta Histochemica*, 119(6), 624-631. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.003>

Fretwurst, T., Gad, L. M., Nelson, K., & Schmelzeisen, R. (2015, July 1). Dentoalveolar reconstruction: Modern approaches. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000167>

Gomes, P. S., & Fernandes, M. H. (2011, January). Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010085>

Gosain, A. K., Song, L., Yu, P., Mehrara, B. J., Maeda, C. Y., Gold, L. I., & Longaker, M. T. (2000). Osteogenesis in cranial defects: Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(2), 360–371. <https://doi.org/10.1097/00006534-200008000-00018>

Götz, C., Warnke, P. H., & Kolk, A. (2015). Current and future options of regeneration methods and reconstructive surgery of the facial skeleton. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 120(3), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.05.022>

Greenwald, J. A., Mehrara, B. J., Spector, J. A., Fagenholz, P. J., Saadeh, P. B., Steinbrech, D. S., ... Longaker, M. T. (2000). Immature versus mature dura mater: II. Differential expression of genes important to calvarial reossification. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(3), 630–638. <https://doi.org/10.1097/00006534-200009010-00016>

Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A. & West, M.J. (1988) Some new, simple and eficiente stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS:acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 96: 379–394.

Herberg, S., Susin, C., Pelaez, M., Howie, N., Moreno de Freitas, R., Lee, J., Cray J., Johnson, M., Elsalanty, M., Hamrick, M., Isales, C., Wikesjö, U. M., & Hill, W. D. (2014). Low-dose bone morphogenetic protein-2/ stromal cell-derived factor-1 β co-therapy induces bone in

critical size rat calvarial defects. *Tissue Engineering Part A*, 20(9–10), 1444–1453. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0442>

Hollinger, J. O., & Kleinschmidt, J. C. (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 1(1), 60–68. <https://doi.org/10.1097/00001665-199001000-00011>

Honma, T., Itagaki, T., Nakamura, M., Kamakura, S., Takahashi, I., Echigo, S., & Sasano, Y. (2008). Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Diseases*, 14(5), 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01401.x>

Jordan, H. V. (1971). Rodent model systems in periodontal disease research. *Journal of Dental Research*, 50(2), 236–242. <https://doi.org/10.1177/00220345710500021301>

Jung, U. W., Choi, S. Y., Pang, E. K., Kim, C. S., Choi, S. H. & Cho, K. S. (2006) The effect of varying the particle size of beta tricalcium phosphate carrier of recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defect. *Journal of Periodontology* 77, 765–772. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050268>

Lee, J. H., Kim, C. S., Choi, K. H., Jung, U. W., Yun, J. H., Choi, S. H. & Cho, K. S. (2010) The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. *Biomaterials* 31, 3512–3519. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.075>

Li, X., Yao, J., Wu, L., Jing, W., Tang, W., Lin, Y., Tian, W. & Liu, L. (2010) Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo. *Artificial Organs* 34: 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00795.x>

Lima, C.E., Calixto, J.C. & Anbinder, A.L. (2011) Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Brazilian Oral Research* 25: 42–48.

Liu, W., Kang, N., Dong, Y., Guo, Y., Zhao, D., Zhang, S., . . . Yuan, Q. (2016). Effect of Resorbable Collagen Plug on Bone Regeneration in Rat Critical-Size Defect Model. *Implant Dentistry*, 25(2), 163-170. <https://doi.org/10.1097/id.0000000000000396>

Lyons, F. G., Al-Munajjed, A. A., Kieran, S. M., Toner, M. E., Murphy, C. M., Duffy, G. P., & O'Brien, F. J. (2010). The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*, 31(35), 9232–9243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.056>

Mardas, N., Kostopoulos, L. & Karring, T. (2002) Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralised bone matrix and the impact on calvarial growth: na experimental study in the rat. *The Journal of Craniofacial Surgery* 13: 453–462. <https://doi.org/10.1097/00001665-200205000-00017>

Mardas, N., Stavropoulos, A., & Karring, T. (2008) Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen): an experimental study in rats. *Clinical Oral Implants Research*, 19(10),1010-1015. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01572.x>

Moreira, G., Alves, P., Esper, L., Sbrana, M., Dalben, G., Neppelenbroek, K., & de Almeida, A. (2018). Effect of low-level laser on the healing of bone defects filled with autogenous bone or bioactive glass: in vivo study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 33(1), 169–174. <https://doi.org/10.11607/jomi.5900>

Nkenke, E., & Neukam, F. (2014). Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: Morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol*, 7(2), 203–2017. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(17\)30293-9](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30293-9)

Nyan, M., Sato, D., Kihara, H., Machida, T., Ohya, K., & Kasugai, S. (2009). Effects of the combination with α -tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 20(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01639.x>

Okata, H., Nakamura, M., Henmi, A., Yamaguchi, S., Mikami, Y., Shimauchi, H., & Sasano, Y. (2015). Calcification during bone healing in a standardised rat calvarial defect assessed by micro-CT and SEM-EDX. *Oral Diseases*, 21(1), 74–82. <https://doi.org/10.1111/odi.12212>

Pang, E. K., Paik, J. W., Kim, S. K., Jung, U. W., Kim, C. S., Cho, K. S., Kim, C. K. & Choi, S. H. (2005) Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *Journal of Periodontology* 76, 1526–1533. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.9.1526>

- Patel, Z. S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J. A., Wong, M. E. K., & Mikos, A. G. (2008). Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 43(5), 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.019>
- Pelaez, M., Susin, C., Lee, J., Fiorini, T., Bisch, F. C., Dixon, D. R., . . . Wikesjö, U. M. (2014). Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/maturation in a rat critical-size calvarial defect model. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(8), 827–836. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12270>
- Pellegrini, G., Seol, Y. J., Gruber, R., & Giannobile, W. V. (2009). Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *Journal of Dental Research*, 88(12), 1065–1076. <https://doi.org/10.1177/0022034509349748>
- Pryor, M.E., Susin, C. & Wikesjo, U.M. (2006) Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *Journal of Clinical Periodontology* 33: 455–460. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.00921.x>
- Sawyer, A., Song, S., Susanto, E., Chuan, P., Lam, C., Woodruff, M., . . . Cool, S. (2009). The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL–TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*, 30(13), 2479–2488. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.055>
- Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 205, 299–308. <https://doi.org/10.1097/00003086-198604000-00036>
- Shanbhag, S., Pandis, N., Mustafa, K., Nyengaard, J. R., & Stavropoulos, A. (2017, October 1). Alveolar bone tissue engineering in critical-size defects of experimental animal models: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/term.2198>
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*, 7(10), 1918–1929. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>
- Stancoven, B. W., Lee, J., Dixon, D. R., Mcpherson, J., Bisch, F. C., Wikesjö, U. M., & Susin, C. (2012). Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *Journal of Periodontal Research*, 48(2), 243–251. <https://doi.org/10.1111/jre.12001>

- Stavropoulos, A., Sculean, A., Bosshardt, D. D., Buser, D., & Klinge, B. (2015). Preclinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000*, 68(1), 55–65. <https://doi.org/10.1111/prd.12065>
- Stephan, S. J., Tholpady, S. S., Gross, B., Petrie-Aronin, C. E., Botchway, E. A., Nair, L. S., ... Park, S. S. (2010). Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope*, 120(5), 895–901. <https://doi.org/10.1002/lary.20624>
- Susin, C., Lee, J., Fiorini, T., Koo, K. T., Schüpbach, P., Angst, P. D. M., ... Wikesjö, U. M. E. (2018). Screening of candidate biomaterials for alveolar augmentation using a critical-size rat calvaria defect model. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(7), 884–893. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12904>
- Tanuma, Y., Anada, T., Honda, Y., Kawai, T., Kamakura, S., Echigo, S., & Suzuki, O. (2012). Granule Size-Dependent Bone Regenerative Capacity of Octacalcium Phosphate in Collagen Matrix. *Tissue Engineering Part A*, 18(5–6), 546–557. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0349>
- Vajgel, A., Mardas, N., Farias, B. C., Petrie, A., Cimões, R., & Donos, N. (2014). A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research*, 25(8), 879–893. <https://doi.org/10.1111/clr.12194>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Procurando preencher a lacuna da falta de padronização na literatura quanto ao tamanho ideal de defeito crítico em calota craniana de ratos a presente pesquisa foi planejada e desenvolvida. Conclui-se, no presente estudo que defeitos de 4mm, 5mm, 6mm e 9mm em calvária de ratos podem ser considerados críticos, pois não apresentaram fechamento completo. A localização do defeito, se lateral ou central, não influenciou no reparo ósseo. Períodos de avaliação de 1 mês são suficientes para avaliar o fechamento do defeito. Os métodos da maceração e histomorfométrico não apresentaram diferença estatística entre si, no período de observação de 120 dias.

Os modelos pré-clínicos futuros devem ser padronizados e levar em consideração fatores além do tamanho do defeito (raça, idade, métodos de avaliação, etc), sempre seguindo o princípio dos 3Rs, devem também prover informação suficiente acerca de seus experimentos, de preferência seguindo as diretrizes internacionais, por exemplo o ARRIVE – Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, de forma que se possa comparar os resultados de diversos estudos realizados nesse campo.

REFERÊNCIAS

1. Götz C, Warnke PH, Kolk A. Current and future options of regeneration methods and reconstructive surgery of the facial skeleton. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Sep; 120(3):315-23. doi: 10.1016/j.oooo.2015.05.022.
2. Susin C, Lee J, Fiorini T, Koo K, Schüpbach P, Angst PDM et al. Screening of candidate biomaterials for alveolar augmentation using a critical-size rat calvaria defect model. *J Clin Periodontol*. 2018 Jul; 45(7):884-93. doi: 10.1111/jcpe.12904.2018.
3. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1983 Apr; 174:28-42.
4. Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser, D, Klinge, B. Preclinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000*. 2015 Jun; 68(1):55-65. doi: 10.1111/prd.12065.
5. Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res*. 2009 Dec; 88(12):1065-76. doi: 10.1177/0022034509349748.
6. Peric M, Domic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*. 2015 Jan; 70:73-86. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.010.
7. Li Y, Chen S-K, Li L, Qin L, Wang X-L, Lai Y-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Transl*. 2015 July; 3(3):95–104.
8. Jordan HV. Rodent model systems in periodontal disease research. *J Dent Res*. 1971 Mar-Apr; 50(2):236–42. doi: 10.1177/00220345710500021301.
9. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan; 45(1):14-24. doi: 10.1258/la.2010.010085.
10. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct; 7(10):1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113.
11. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee, JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jun; 125(6):1685-92. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.
12. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Aug; 106(2):360-71; discussion 372.

13. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimdões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Aug; 25(8):879–93. doi: 10.1111/clr.12194.
14. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr; (205):299-308.
15. Herberg S, Susin C, Pelaez M, Howie RN, Moreno de Freitas R, Lee J et al. Low-dose bone morphogenetic protein-2/ stromal cell-derived factor-1 β co-therapy induces bone in critical size rat calvarial defects. *Tissue Eng Part A.* 2014 May; 20(9-10):1444-53. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0442.
16. Moreira GS, Machado Alves PH, Esper LA, Sbrana MC, da Silva Dalben G, Neppelenbroek KH et al. Effect of Low-Level Laser on the Healing of Bone Defects Filled with Autogenous Bone or Bioactive Glass: In Vivo Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018 Jan/Feb; 33(1):169-74. doi: 10.11607/jomi.5900.
17. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990 Jan; 1(1):60-8.
18. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998 Jul; 9(4):310-6.
19. Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg.* 1996 Jul; 7(4):300–10.
20. Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen): an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct; 19(10):1010-5. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01572.x.
21. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008 Nov; 43(5):931-40. doi: 10.1016/j.bone.2008.06.019.
22. Rang HP, et al. *Rang & Dale Farmacologia.* 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
23. Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15(1):101-11. doi:10.1111/j.1600-0501.2004.00986.x.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 26 de novembro de 2015.

Ofício nº 119/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Renata Cimões Jovino Silveira**
Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Maxilo-Facial
Centro de Ciências Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.051218/2012-96

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Avaliação da reparação óssea espontânea em calvária de ratos para determinação do defeito crítico de acordo com o tamanho e a localização anatômica.”**

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: ratos heterogênicos Wistar; Sexo: machos; Idade: 60 dias; Peso: 220-250g; N° total de animais: 104; OBS: Esta é a 2ª via do ofício nº 627/13, emitido em 23 de setembro de 2013. Autorizamos a alteração de cronograma para que os experimentos sejam realizados até dezembro de 2017.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA PARA O ARTIGO CIENTÍFICO

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH WILEY

Author Guidelines

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

DATA PROTECTION

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

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

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



1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Acknowledgements: Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2013) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

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

Clinical Oral Implants Research requires authors of human observations studies in epidemiology to review and submit a STROBE statement. Authors who have completed the ARRIVE guidelines or STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist. Checklists should be included in the submission material under “Supplementary Files for Review”. Please indicate on the STROBE checklist the page number where the corresponding item can be located within the manuscript e.g Page 4.

Information on PRISMA - TRANSPARENT REPORTING of SYSTEMATIC REVIEWS and META-ANALYSES can be found on <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Default.aspx>

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

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

All prospective clinical trials which have a commencement date after the 31st January 2017 must be registered with a public trials registry.

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

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

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

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

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

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

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

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

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

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

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

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

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen

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

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

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

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

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

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

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

3.1. Getting Started

Launch your web browser and go to the journal's online Submission

Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

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

3.2. Submitting Your Manuscript

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

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Single Blind Review

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* will be reviewed by two experts in

the field. *Clinical Oral Implants Research* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

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

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found

at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. In vitro, in vivo, in situ and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

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

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

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

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

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

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

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

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

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

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the

findings and their limitations. Cite other relevant studies.

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

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

APA – American Psychological Association

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:[10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

In-text citations

If your source has two authors, always include both names in each in-text citation.

If your source has three, four, or five authors, include all names in the first in-text citation along with the date. In the following in text citations, only include the first author's name and follow it with et al.

Example:

1st in-text citation: (Gilley, Johnson, Witchell, 2015)

2nd and any other subsequent citations: (Gilley, et al.)

If your source has six or more authors, only include the first author's name in the first citation and follow it with et al. Include the year the source was published and the page numbers (if it is a direct quote).

Example:

1st in-text citation: (Jasper, et al., 2017)

2nd and any other subsequent citations: (Jasper, et al., 2017)

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably

fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

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

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

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is

accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

6.3 Early View

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

6.4 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including

6.5 Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

6.6 Video Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at www.wileyauthors.com/videoabstracts. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.