

**GABRIEL RAMALHO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA INTERFACE  
OSSO/IMPLANTE EM RATAS COM OSTEOPOROSE  
INDUZIDA TRATADAS COM RALOXIFENO OU  
ALENDRONATO –  
ANÁLISE HISTOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA,  
POR EPIFLUORESCÊNCIA E BIOMECÂNICA**

**Araçatuba – São Paulo**

**2014**

---

**GABRIEL RAMALHO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA INTERFACE  
OSSO/IMPLANTE EM RATAS COM OSTEOPOROSE  
INDUZIDA TRATADAS COM RALOXIFENO OU  
ALENDRONATO –  
ANÁLISE HISTOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA,  
POR EPIFLUORESCÊNCIA E BIOMECÂNICA**

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

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Ass. Dr<sup>a</sup> Roberta Okamoto

**Coorientador:** Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo

**Araçatuba – São Paulo**

**2014**

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

R165a Ramalho-Ferreira Gabriel.  
Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com osteoporose induzida tratadas com raloxifeno ou alendronato : análise histométrica, imunoistoquímica, por epifluorescência e biomecânica / Gabriel Ramalho-Ferreira. - Araçatuba, 2014  
122 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto  
Coorientador: Prof. Roelf Justino Cruz Rizzolo

1. Alendronato 2. Raloxifeno 3. Osteoporose I. T.

Black D7  
CDD 617.64



DEDICATÓRIA

---

## Dedicatória

**A Deus**, que na pessoa de seu Filho **Jesus Cristo** me presenteou com a vida eterna, e pela ação do **Espírito Santo**, que me convence diariamente a ser um homem melhor, a mudar e rever minhas condutas, levando-me à pensar e valorizar as coisas atemporais. Que eu possa sempre ter ouvidos para te ouvir, e um coração disposto ao arrependimento e concordância contigo. A ti **Senhor**, seja toda honra e toda glória até o fim dos meus dias! Muito obrigado pelas ricas bênçãos que me concedes, e por me ensinar que nem sempre o que eu quero é o melhor para mim e para os que me rodeiam.

**Aos meus pais (Paulo Martins Ferreira e Marianne de Azevedo Ramalho Ferreira)**, por serem um alicerce na minha vida, que me sustentou até eu chegar aqui. Sem vocês realmente teria sido muito difícil, sei que sou um privilegiado por ter tido as oportunidades que tive. Espero que ainda possamos viver muitos anos juntos, com muito amor, paz, confiança e solidariedade entre nós. Amo vocês e desejo do fundo do meu coração que vocês tenham abençoados anos de vida, com muita saúde para desfrutar de nosso maior presente de Deus que é a vida.

**Ao meu irmão Felipe e minha cunhada Letícia**, por formarem um belo casal. Sou grato a Deus pelo irmão que você é, bem como por nossa família ter aumentado com uma mulher tão dedicada e amável como a sua. Que o amor de vocês possa crescer cada vez mais, e que tenham um coração sempre disposto a perdoar para continuar a caminhada juntos. Um grande beijo! Que Deus os abençoe e guarde sempre.

---



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

## *Agradecimentos Especiais*

**À minha Orientadora Prof<sup>a</sup> Ass. Dr<sup>a</sup> Dra Roberta Okamoto,** pelas oportunidades que me deu e por ter aberto o caminho para aprender coisas novas. Fico muito feliz em te ver como professora da UNESP, pois durante o mestrado a senhora ainda não havia tido esta oportunidade. Isso é a fidelidade de Deus se cumprindo na sua vida, a colheita de todas as boas sementes que lançou. Tenho certeza de que os alunos estão sendo brindados com um fantástico ser humano, e uma valiosa professora. Que Deus continue a te abençoar!

**Ao Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior,** pela confiança em mim depositada e por nos tratar como uma extensão de sua família, emprestando-nos seus conhecimentos, bem como suas ferramentas para trabalharmos. Qualidade esta difícil de ser encontrada nesse tempo individualista em que vivemos. Desejo que seja próspero em tudo o que fizer, e que aproveite os frutos de seu trabalho com seu bem mais precioso, sua família. Conte comigo no que precisar. Deus o abençoe!

**Ao meu Coorientador Prof. Adj. Roelf Justino Cruz Rizzolo,** por suas contribuições valiosas para a realização deste trabalho. Abraço.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),** pela concessão da Bolsa de doutorado e auxílio regular em pesquisa (processos 2012/15748-8 e 2012/15912-2), indispensáveis para a realização desta pesquisa.

---



**AGRADECIMENTOS**



---

## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** na pessoa da Diretora **Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia** pela oportunidade de me graduar como Mestre e Doutor na mais tradicional Pós-graduação de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do país.

À **Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata**, pelo esforço e busca incessante da excelência, fazendo de nossa Pós-graduação uma referência.

**Aos Professores da Cirurgia Tetuo Okamoto, Michel Saad Neto, Osvaldo Magro Filho, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Àvila Campos**, por participarem da minha formação partilhando suas experiências e conhecimento. Deus os abençoe sempre e que continuem formando bons alunos!

**Aos Professores da Clínica Integrada Celso Koogi Sonoda, Sonia Regina Panzarini Barioni e Wilson Roberto Poi**, pelos ensinamentos da vida, da ciência e convivência pacífica.

**Ao professor Cláudio Maldonado Pastori**, por ser um profissional que admiro dentro de nossa especialidade. E pelas oportunidades que ofereceu. Deus abençoe você e família sempre!

**Ao “Léo” (Leonardo Perez Faverani)**, por ser alguém que mesmo crescendo bastante não se esquece de onde veio, valoriza aos que o rodeiam por meio de seu

---

---

encorajamento e elogios, e que não deixa o coração se encher de vaidade. Uma das virtudes suas é o fato de se doar aos outros e “abraçar” os problemas dos outros como se fossem seus. O que mostra seu grande desprendimento e altruísmo. Sem você este trabalho não seria possível, sem sua insistência provavelmente não teria feito a pós-graduação. Mas dou graças a Deus por ter colocado você em meu caminho para me abençoar e abrir minha visão. Ao ser brindado com sua amizade, ganhei também um irmão, alguém que posso contar nos bons e maus momentos. Deus te abençoe, guarde, proteja, e guie, agora como Professor universitário. Tenho certeza de que será luz na vida de muitas pessoas. Um grande abraço!

**Ao mestrando Tarik Polo, e às alunas de iniciação científica Fernanda, Danila, Jaqueline e Karen** pela inestimável ajuda na pesquisa e competência em tudo que fizeram.

**Aos colegas de curso da Pós-graduação em Cirurgia: André Fabris, Sabrina Ferreira, Lamis Nogueira, Igor Benetti, Gustavo Augusto Grossi de Oliveira, Rafael Santiago e Júlio de Oliveira,** pela oportunidade de aprendizado mútuo e convivência respeitosa. Um abraço e felicidades a todos!

**Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP,** pela ajuda e carinho com que nos tratam, e em especial ao **Gilmar** pelas valiosas orientações na parte laboratorial. Abraços!

**Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.**

**Aos pacientes,** que nos guiam em nossa busca por excelência.

---

## Epígrafe

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

*Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;*

*Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;*

*Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;*

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;*

*Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;*

*Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;*

*Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.*

**Eclesiastes 3: 1-8**



## LISTAS E SUMÁRIO

---

## *Lista de Abreviaturas*

OVX =	Ratas submetidas à ovariectomia
OVX RAL =	Ratas submetidas à ovariectomia, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato, e tratadas com raloxifeno
OVX ALE =	Ratas submetidas à ovariectomia, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato, e tratadas com alendronato de sódio
OVX ST =	Ratas submetidas à ovariectomia, alimentadas com dieta balanceada e sem tratamento para a osteoporose
SHAM DN =	Ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia e alimentadas com dieta balanceada
ELCOI =	Extensão linear de contato osso/implante
RAL =	Cloridrato de raloxifeno
ALE =	Alendronato de sódio
p =	Nível crítico da estatística (p <0,05 ou p >0,05)
SERMs =	moduladores seletivos dos receptores de estrógeno
N =	Número total de animais utilizados na pesquisa
Ca =	Cálcio
P =	Fósforo
mg =	miligramas (unidade de medida)
ml =	mililitros (unidade de medida)
kg =	quilogramas (unidade de medida)
PVPI =	Polivinil Pirrolidona Iodo
cm =	centímetros (unidade de medida)
mm =	milímetros (unidade de medida)

---

---

rpm =	rotações por minuto
HE =	Hematoxilina e eosina
N.cm =	Newton por centímetro (unidade de medida)
vs =	versus (comparação)
n =	Número de animais por grupo experimental
$\mu\text{m}^2$ =	micrometros quadrados (área)
$\mu\text{m}$ =	micrometros (unidade de medida)
pH =	potencial hidrogeniônico
TRAP =	fosfatase ácida resistente ao tartarato
OPG =	Osteoprotegerina
OC =	Osteocalcina
RANKL =	ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligante
BMUs =	Unidades Multicelulares Básicas

---

---

## *Lista de Figuras – Capítulo 1*

Figura 1 - Aspecto clínico da fresagem realizada na tíbia das ratas antes da instalação do implante (A). Instalação do implante com chave digital (B). Implante instalado na tíbia do animal (C). 46

Figura 2 – Imagem da região periimplantar obtida através da microscopia confocal, padronizada para o cálculo de ELCOI (perímetro), representada pelas linhas azuis. Considerou-se na análise ELCOI as linhas fluorescentes verdes (calceína) e vermelhas (alizarina) na interface osso/implante na região de terceira e quarta espiras do implante. 47

Figura 3 - Cortes histológicos mostrando as espiras dos implantes usinados dos grupos experimentais SHAM DN (A), OVX ST (B), OVX ALE (C), e OVX RAL (D) groups. Note o osso neoformado próximo às espiras do implante, especialmente no grupo SHAM DN. Importante notar a quantidade considerável de osso medular, repleto de tecido adiposo, nos grupos OVX ST e OVX ALE 48

Figura 4 - Cortes histológicos mostrando as espiras dos implantes com superfície texturizada dos grupos experimentais SHAM DN (A), OVX ST (B), OVX ALE (C), e OVX RAL (D) groups. Note o osso neoformado próximo às espiras do implante, especialmente no grupo SHAM DN. Similarmente aos implantes usinados, observa-se a quantidade considerável de osso medular, repleto de tecido adiposo, nos grupos OVX ST e OVX ALE 49

---

---

Figura 5 - Gráfico representativo dos resultados de torque reverso na comparação entre a instalação de implantes de superfície usinada e implantes de superfície texturizada nos diferentes grupos experimentais 50

Figura 6 - Gráfico representativo dos resultados de ELCOI na comparação entre a instalação de implantes de superfície usinada e implantes de superfície texturizada nos diferentes grupos experimentais. 51



---

## *Lista de Figuras – Capítulo 2*

Figura 1 - Imagens do osso periimplantar obtidas pela microscopia confocal. (A): área óssea marcada pela calceína (verde); (B): área óssea marcada pela alizarina (vermelho) e (C): reconstrução de ambas as marcações dos fluorocromos (calceína e alizarina). 81

Figura 2 - Marcação das linhas fluorescentes na matriz de cálcio pela calceína (verde) e alizarina (vermelho), evidenciando a dinâmica do osso periimplantar dos grupos experimentais: (A) – SHAM; (B) – OVX; (C) – ALE e (D) – RAL. 85

Figura 3 - Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL) pelas expressões de calceína e alizarina. \* $p < 0,05$  (comparações intragrupos com significância estatística). 87

Figura 4 - Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL) pelas expressões de calceína e alizarina. \* $p < 0,05$  (comparações intragrupos com significância estatística). 87

Figura 5 – Imunomarcações de osteoprotegerina (OPG) aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (1), OVX (2), ALE (2) e RAL (2); 42 dias: SHAM (1), OVX (1), ALE (2) e RAL (2)). 91

Figura 6 – Imunomarcações de RANKL aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (2-3), OVX (3), ALE (2) e RAL (2); 42 dias: SHAM (2-3), OVX (2), ALE (2) e RAL (2)). 92

---

---

Figura 7 – Imunomarcações de TRAP aos 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (SHAM (2), OVX (3), ALE (1) e RAL (2)). 93

Figura 8 – Imunomarcações de osteocalcina (OC) aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (2), OVX (2), ALE (2) e RAL (1); 42 dias: SHAM (2), OVX (2), ALE (1) e RAL (2)). 94

---

## *Sumário*

<b>Resumo Geral</b>	20
<b>Abstract Geral</b>	21
<b>1. Capítulo 1 – Raloxifeno melhora o reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas</b>	22
<b>Resumo</b>	23
<b>Abstract</b>	24
<b>1.1 Introdução</b>	25
<b>1.2 Materiais e métodos</b>	27
<b>1.3 Resultados</b>	34
<b>1.4 Discussão</b>	36
<b>1.5 Conclusões</b>	40
<b>1.6 Referências</b>	41
<b>1.7 Tabelas</b>	46
<b>1.8 Figuras</b>	48
<b>1.9 Anexo A (Comitê de Ética no uso de animais - para os capítulos 1 e 2)</b>	55
<b>1.10 Anexo B (Normas do periódico IJOMS)</b>	56

---

---

## *Sumário – Capítulo 2*

<b>2. Capítulo 2 – Dinâmica do processo de reparo ósseo periimplantar durante o tratamento com alendronato de sódio ou raloxifeno em ratas osteoporóticas</b>	<b>72</b>
<b>Resumo</b>	<b>74</b>
<b>Abstract</b>	<b>76</b>
<b>2.1 Introdução</b>	<b>78</b>
<b>2.2 Materiais e métodos</b>	<b>80</b>
<b>2.3 Resultados</b>	<b>87</b>
<b>2.4 Discussão</b>	<b>98</b>
<b>2.5 Referências</b>	<b>103</b>
<b>2.6 Anexo C (Normas do periódico Clinical Oral Implants Research)</b>	<b>110</b>

---

## Resumo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com osteoporose induzida. As ratas submetidas à ovariectomia bilateral foram alimentadas com uma dieta pobre em cálcio. Dois grupos receberam tratamento medicamentoso (raloxifeno [OVX RAL] ou alendronato [OVX ALE]) e outro grupo não recebeu nenhuma medicação (OVX ST). O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia e foi alimentado com uma dieta normal (SHAM DN). Cada animal recebeu um implante em cada tíbia. Os animais foram eutanasiados após 14 ou 42 dias. Foram realizadas as análises biomecânica (torque reverso), extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) e dinâmica óssea periimplantar pela proporção dos fluorocromos calceína/alizarina, aplicando-se a análise de variância ANOVA e o pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A imunistoquímica marcou a precipitação de osteoprotegerina (OPG), RANKL, TRAP e osteocalcina (OC). O medicamento RAL melhorou o reparo ósseo periimplantar, em que o grupo ALE foi semelhante ao grupo OVX ST. Não houve diferenças estatisticamente significativas no torque reverso ( $p = 0,861$ ), na precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) e na ELCOI entre os grupos OVX RAL e grupo controle – SHAM DN ( $p > 0,05$ ). As imunomarcações de OPG e RANKL foram similares para os grupos RAL e SHAM; houve moderada expressão de OC aos 14 dias. A TRAP foi marcada intensamente aos 42 dias para o grupo OVX. Portanto, o raloxifeno melhorou o reparo ósseo periimplantar de ratas osteoporóticas, sugerindo a sua indicação no tratamento da osteoporose.

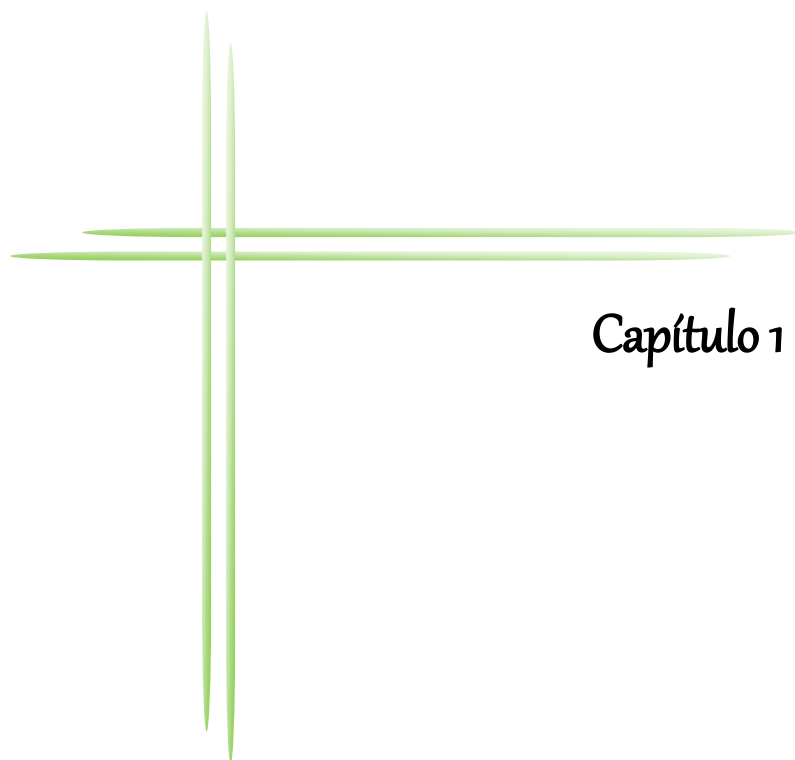
Palavras-chaves: alendronato, raloxifeno, osteoporose.

## Abstract Geral

The aim of this study was to evaluate the bone healing in bone/implant interface in rats with induced osteoporosis. The rats underwent bilateral ovariectomy were fed a diet low in calcium. Two groups received drug treatment (raloxifene [OVX RAL] or alendronate [OVX ALE]) and the other group received no medication (OVX NT). The control group underwent sham surgery and was fed a normal diet (SHAM ND). Each animal received an implant on the tibia. The animals were euthanized after 14 or 42 days. The biomechanical analysis (reverse torque), linear extension contact bone / implant (BIC) and bone dynamics periimplantar by the proportion of fluorochrome calcein/alizarin, applying the ANOVA and Tukey's post-test ( $p < 0.05$ ). Immunohistochemistry marked precipitation of osteoprotegerin (OPG), RANKL, TRAP and osteocalcin (OC). The RAL improved drug peri-implant bone repair, wherein the ALE OVX group was similar to the ST group. There were no statistically significant differences in reverse torque ( $p = 0.861$ ), precipitation of fluorochromes (calcein/alizarin) and BIC between OVX RAL and control groups - SHAM ND ( $p > 0.05$ ). The immunostaining of OPG and RANKL were similar to RAL and SHAM groups; there was moderate OC expression at 14 days. TRAP was marked intensely at 42 days for the OVX group. Therefore, raloxifene improved peri-implant bone repair of osteoporotic rats, suggesting its indication in the treatment of osteoporosis.

Keywords: alendronate, raloxifene, osteoporosis.

---



## Capítulo 1

# Raloxifeno melhora o reparo ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas \*

*\*Este artigo foi enviado para o periódico International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*

---

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com osteoporose induzida. As ratas submetidas à ovariectomia bilateral (OVX), foram alimentadas com uma dieta pobre em cálcio e fósforo. Dois grupos receberam tratamento medicamentoso (raloxifeno [OVX RAL] ou alendronato [OVX ALE]) e outro grupo não recebeu nenhuma medicação (OVX ST). O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia e foi alimentado com uma dieta normal (SHAM DN). Cada animal recebeu um implante em cada tíbia (na tíbia direita, implantes com superfície usinada, e na tíbia esquerda, implantes com texturização da superfície). Todos os animais foram eutanasiados após 42 dias. Para os dados da biomecânica e de extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) a análise de variância ANOVA e o pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram empregados. Os medicamentos (RAL e ALE) melhoraram o reparo ósseo periimplantar; no entanto, o grupo ALE foi semelhante ao grupo OVX ST. A texturização da superfície promoveu maior corticalização na interface osso/implante, mas com as mesmas características que o implante usinado, com osso maduro e neoformação óssea em laminações concêntricas. Não houve diferenças estatisticamente significativas no torque reverso ( $p = 0,861$ ) e ELCOI entre os grupos OVX RAL e grupo controle – SHAM DN ( $p = 0,745$ ). Portanto, o tratamento com raloxifeno foi associado à melhores resultados nas análises biomecânicas, de ELCOI e histológicas no tratamento da osteoporose induzida em rata.

Palavras-chaves: alendronato, raloxifeno, osteoporose.

---



**Abstract**

This study aimed to evaluate bone healing at the bone/implant interface in rats with induced osteoporosis. The rats underwent bilateral ovariectomy (OVX) and were fed a low calcium and phosphate diet. Two groups received drug treatment (raloxifene [OVX RAL] or alendronate [OVX ALE]) and another group received no medication (OVX NT). The control group underwent SHAM surgery and was fed a normal diet. Each animal received 1 implant in each tibia (right tibia implants with a machined surface and left tibia implants with surface etching). All animals were euthanized after 42 days. ANOVA with Tukey post-tests were applied to the biomechanics (reverse torque) and bone implant contact (BIC) data ( $p < 0.05$ ). RAL and ALE improved peri-implant bone healing; however, the ALE group was similar to the OVX NT group. Surface treatment promoted higher corticalization at the bone/implant interface, but with the same characteristics as the machined implant, as mature bone and bone neoformation in concentric laminations. There were no statistically significant differences in reverse torque ( $p = 0.861$ ) and BIC between the OVX RAL and SHAM groups ( $p=0,745$ ). Therefore, raloxifene treatment was associated with better biomechanical, BIC and histological findings in the context of treatment of induced osteoporosis in rats.

Key-words: alendronate, raloxifene, osteoporosis.

---

## 1.1 Introdução

Um dos fatores determinantes para a adequada osseointegração dos implantes dentários é a qualidade do tecido ósseo, tendo em vista que as características da micro-arquitetura óssea influenciam na habilidade do osso em suportar a transmissão e distribuição de forças fisiológicas (Isidor 2006, Tabata, et al. 2011). Neste contexto, quando o osso adquire uma estrutura cortical e/ou trabecular com menor densidade, a interface osso/implante é comprometida (Drage, et al. 2007, Shapurian, et al. 2006).

A diminuição da densidade óssea corporal é observada em dois terços das mulheres, como consequência da deficiência de estrógeno após a menopausa (Aubin & Bonnellye 2000). Assim, a deficiência estrogênica associada ao envelhecimento da população pode ocasionar a osteoporose (Aubin & Bonnellye 2000, Kribbs 1990, Manolagas & Jilka 1995). Esta perda óssea decorrente do envelhecimento é devida à diminuição da absorção intestinal do cálcio da dieta, resultando na perda óssea principalmente cortical (Teofilo, et al. 2003, Teofilo, et al. 2004).

Este processo ainda é motivo de bastante discussão na literatura, no tocante ao tratamento reabilitador com os implantes osseointegráveis. Yamazaki et al (Yamazaki, et al. 1999), Ozawa et al (Ozawa, et al. 2002) e Dvorak et al (Dvorak, et al. 2012) analisaram a porcentagem de contato entre tecido ósseo e implantes instalados na tíbia de ratas Wistar ovariectomizadas. Os autores observaram que a redução da massa óssea nas ratas osteoporóticas promoveu menor área de contato entre o osso e o implante, o que pode ocasionar menor habilidade no suporte das próteses.

Dentre os tratamentos da osteoporose, a reposição hormonal ainda é o mais utilizado, porém com várias contra-indicações e efeitos colaterais (Burg, et al. 2006). Outros fármacos têm sido utilizados, incluindo os bifosfonatos (Atanes-Bonome, et al.

---

2014, Munoz-Torres, et al. 2009) e os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs) (Barrett-Connor, et al. 2002, Luvizuto, et al. 2010, Luvizuto, et al. 2010) como terapias alternativas promissoras para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

A texturização da superfície dos implantes dentários através das técnicas de adição e subtração têm melhorado as respostas biológicas na osteogênese periimplantar, principalmente em áreas de menor densidade, tal como ocorre na osteoporose (Buser, et al. 2004, Tavares, et al. 2007, Wennerberg & Albrektsson 2009, Wennerberg & Albrektsson 2011, Xavier, et al. 2003). Isso porque a texturização da superfície dos implantes dentários ocasiona aumento das porosidades e da rugosidade superficial, promovendo que as células da linhagem osteoblástica atinjam a região periimplantar de forma mais eficiente e acelerada (Buser, Broggini, Wieland, Schenk, Denzer, Cochran, Hoffmann, Lussi & Steinemann 2004, Tavares, de Oliveira, Nanci, Hawthorne, Rosa & Xavier 2007).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biomecânico e histométrico de implantes, com e sem texturização da superfície, os quais foram instalados nas tíbias das ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato para a indução de osteoporose, e os eventos do reparo ósseo na interface osso/implante. Além disso, dois grupos de ratas foram tratados com alendronato ou raloxifeno (SERM), com o intuito de verificar se estes tratamentos melhoram o processo de reparo ósseo periimplantar, podendo ser indicados na reabilitação com implantes dentários.

A hipótese apresentada é que os tratamentos medicamentosos (OVX RAL e OVX ALE) melhorariam o processo reparacional periimplantar e ocasionariam maior torque

---

reverso e ELCOI na comparação com o grupo OVX ST. Além disso, lançamos a hipótese de que a texturização da superfície promoveria melhora nos resultados histológicos, de ELCOI e biomecânicos.

## 1.2 Materiais e Métodos

### *Animais*

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob o protocolo 2012-01096. Para esta pesquisa foram utilizadas ratas (N=72) (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso médio de 200 gramas, as quais foram divididas em 3 grupos de acordo com a análise (Grupo I – análise histológica, Grupo II – análise histométrica e grupo III – análise biomecânica por meio do torque reverso). Dentro destes grupos as ratas foram divididas em quatro subgrupos: ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia, somente com exposição dos ovários, e alimentadas com dieta balanceada - SHAM DN; ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta pobre em cálcio e fósforo, sem tratamento medicamentoso para osteoporose - OVX ST; ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fósforo e tratadas com alendronato de sódio - OVX ALE e ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fósforo e tratadas com raloxifeno - OVX RAL. A eutanásia de todos os animais foi realizada aos 42 dias após a instalação dos implantes.

Inicialmente os animais de todos os grupos, com seus respectivos subgrupos foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*, até o momento em que foram divididos de acordo com a osteoporose induzida e o tratamento medicamentoso (SHAM DN, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL).

---

Após a realização das cirurgias SHAM e das cirurgias de ovariectomia, os animais do subgrupo SHAM com dieta balanceada (SHAM DN) continuaram sendo alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*, enquanto os demais animais dos subgrupos de ratas ovariectomizadas foram alimentados com ração contendo 0.1% Ca e 0.5%P (RHOSTER Ind. Com., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

### ***Experimental Design***

#### ***1) Estudo do ciclo estral***

O ciclo estral foi realizado diariamente de acordo com a técnica sugerida por Evans e Long (Evans & Long 1922), em que as ratas foram colocadas em gaiolas individuais para o estudo diário do ciclo estral. Decorridos 2 a 3 ciclos regulares, as ratas foram utilizadas para os experimentos.

#### ***2) Ovariectomia bilateral***

As ratas dos grupos OVX ST, OVX ALE e OVX RAL foram sedadas com Vetaset (Cloridrato de Quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) e receberam também o relaxante muscular Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda), a seguir, foram realizadas incisões em ambos os flancos, com a exposição dos ovários e remoção cirúrgica dos mesmos. As ratas do grupo SHAM DN passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos ovários sem sua remoção.

#### ***3) Tratamento Medicamentoso***

##### ***OVX ALE (Alendronato de Sódio)***

---

Oito dias após a ovariectomia as ratas foram submetidas a tratamento com alendronato sódico por 30 dias através da gavagem de 0,1mg/Kg/dia (da Paz, et al. 2001) dissolvido em solução aquosa. Esta medicação permaneceu até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 72 dias de administração.

#### ***OVX RAL (Raloxifeno)***

Oito dias após a ovariectomia as ratas foram submetidas a tratamento com raloxifeno por 30 dias através da gavagem de 1mg/kg/dia (Luvizuto, Dias, Queiroz, Okamoto, Garcia, Okamoto & Dornelles 2010) dissolvido em solução aquosa. Da mesma forma que a medicação anterior, esta permaneceu até a eutanásia dos animais.

#### ***4) Cirurgia para instalação dos implantes nas tíbias***

Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de anestésico e relaxante muscular por meio da administração de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brazil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brazil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda, antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Foi realizada incisão de aproximadamente 1 cm, divulsão dos tecidos moles em espessura total até a exposição das metáfises tibiais direita e esquerda.

---

Na tíbia direita de cada rata foi instalado um implante de titânio grau 4 com superfície usinada (Implalife Biotecnologia, Jales, São Paulo, Brazil) e na tíbia esquerda, um implante de titânio grau 4 com superfície texturizada por duplo ataque ácido comercialmente disponível (Implalife Biotecnologia, Jales, São Paulo, Brazil). Todos os implantes apresentavam 2.0 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento e módulo de rebordo quadrado. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A instalação foi realizada com chave digital quadrada de forma manual, com travamento bicortical do implante (Figuras 1A, 1B e 1C).

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brazil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brazil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose e Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

Aos 14 dias após a instalação dos implantes, em 24 animais foi administrado o fluorocromo calceína pela via intramuscular, na dosagem de 20 mg/kg para cada animal. 20 dias após, o fluorocromo vermelho de alizarina foi administrado (20 mg/kg). Com a infiltração dos fluorocromos, a avaliação da ELCOI foi realizada por microscopia

---

confocal. As biópsias destes animais foram reservadas para o processamento de tecido calcificado, a fim de obter dados da análise histométrica do contato osso/implante.

## **5) Análises**

### ***GRUPO I – Análise histológica***

Processamento laboratorial para obtenção das lâminas histológicas

A eutanásia dos animais foi realizada após 42 dias da instalação dos implantes através de sobredosagem anestésica. Após a eutanásia dos animais, as metáfises tibiais esquerda e direita das ratas do grupo I foram removidas e reduzidas. A seguir, foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brazil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas.

### **Preparo das peças para análise histológica**

Após a lavagem das peças, as mesmas foram descalcificadas em EDTA (18%) por 6 semanas, e com isso foi possível realizar a cuidadosa remoção dos implantes pela rotação anti-horária. A seguir, utilizando uma sequência crescente de alcoóis as peças foram desidratadas. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina a fim de que cortes com 5 µm de espessura no sentido longitudinal fossem obtidos e montados em lâminas. As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE).

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

---



## ***GROUP II – Análise histométrica***

### **Preparação dos espécimes para análise histométrica**

As outras tíbias, após fixação em formaldeído por 48h também foram lavadas em água durante 24h e em seguida, desidratadas em ordem crescente de álcoois para que fossem infiltradas com resina fotopolimerizável (Technovit 7200VLC, Advanced Technologies exakt, Norderstedt, Alemanha). Após a polimerização da resina, os espécimes foram submetidos ao corte da serra de semi-precisão (Exakt Tecnologias Avançadas, Norderstedt, Alemanha) e reduzidas a uma espessura média de 80 micrômetros em polidora automática (Exakt Tecnologias Avançadas, Norderstedt, Alemanha) com lixas de diferentes graumaturas. As lâminas foram montadas com as peças estabilizadas com óleo mineral.

### **Microscopia de escaneamento a laser Confocal**

Cortes longitudinais da interface osso / implante correspondentes à terceira, quarta e quinta espiras dos implantes instalados nas tíbias do lado direito e esquerdo foram obtidas pelo microscópio Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (aumento original 100) (Figura 2). As imagens obtidas pela microscopia confocal foram reconstruídas e, assim o osso periimplantar mostrou a sobreposição dos dois fluorocromos (calceína e alizarina).

### **Análise histométrica - ELCOI**

O cálculo, em micrômetros, da extensão linear do contato osso/implante contato (ELCOI) da interface periimplantar nas regiões da terceira e quarta espiras dos implantes, foi padronizado para todos os grupos. Utilizou-se o programa de análise de imagens - Imagem J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá) para esta finalidade. Portanto, somente as linhas fluorescentes verdes

---

(calceína) e vermelhas (alizarina), que foram precipitadas na interface periimplantar, foram mensuradas.

### ***GRUPO III -Ensaio Biomecânico***

Antes da eutanásia dos animais deste grupo, também aos 42 dias após a instalação dos implantes, os animais foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brazil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brazil). As metáfises tibiais direita e esquerda foram reabertas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Uma chave quadrada foi adaptada ao torquímetro digital (Torque Meter - Instrutherm®, São Paulo-SP, Brasil) e este ao módulo de rebordo do implante.

Foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetros<sup>2</sup> (N.cm<sup>2</sup>).

### ***Análise estatística***

Os dados obtidos pelo torque reverso e ELCOI foram submetidos ao teste estatístico de homocedasticidade (Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,05$ ), os quais mostraram distribuição normal pelo programa Sigmaplot 12.5 Exact Graphs and Data Analysis (San Jose, California, USA). A análise de variância a 2 fatores (medicamento x superfície) foi realizada e para os dados que mostraram significância estatística, o teste Tukey foi aplicado. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

---

### 1.3 Resultados

#### *Análise Histológica*

A análise histológica aos 42 dias após a instalação dos implantes de superfície usinada mostrou que o reparo ósseo periimplantar no grupo SHAM DN apresentou maior corticalização do tecido ósseo na interface osso/implante, de modo a envolver as espiras dos implantes, com osso maturo, através de neoformação de osso em laminações concêntricas (Figura 3A). O grupo OVX ST, teve neoformação óssea com corticalização na interface somente nas primeiras espiras dos implantes na região cervical dos mesmos. Na porção medular, uma pequena neoformação óssea foi observada com grande quantidade de tecido adiposo (Figura 3B).

No grupo OVX ALE houve uma melhora no reparo ósseo (Figura 3C), mas de forma bastante semelhante ao grupo OVX ST, ainda com o reparo atrasado em especial na região medular. O tratamento com raloxifeno (OVX RAL) mostrou melhora na maturação óssea periimplantar (Figura 3D), próximo dos resultados histológicos do SHAM DN.

Os implantes com superfície texturizada melhoraram a corticalização na interface osso/implante nos grupos OVX ST e OVX ALE, quando comparados aos implantes usinados, porém no tecido medular ainda havia grande quantidade de tecido adiposo. Já os grupos OVX RAL e SHAM DN foram semelhantes, mostrando neoformação de osso maduro em toda a interface osso/implante (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D).

---

### *Torque Reverso*

Foi aplicado o teste ANOVA a dois fatores (medicamento x superfície), apresentando diferenças estatisticamente significantes nas variáveis superfície ( $p=0,02$ ) e medicamentos ( $p<0,001$ ) comparadas isoladamente. A comparação entre texturização da superfície *versus* medicamentos não houve diferença estatística ( $p=0,560$ ) (Tabela 1).

Como pós-teste foi aplicado o teste Tukey, em que foi identificado maior torque para a superfície texturizada dos implantes em comparação a superfície usinada ( $p=0,020$ , Tukey). Para o fator medicamento, foi observado maior torque com diferenças estatísticas entre os grupos SHAM-DN vs. OVX-ST ( $p<0,001$ ), SHAM-DN vs. OVX-ALE ( $p<0,001$ ), com maior torque para SHAM-DN em ambas as comparações; OVX-RAL vs. OVX-ST ( $p<0,001$ ), OVX-RAL vs. OVX-ALE ( $p<0,001$ ), com maior torque para OVX-RAL e OVX-ALE vs. OVX-ST ( $p<0,01$ ), com maior torque para OVX-ALE. Somente entre SHAM-DN vs. OVX-RAL não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,861$ ) (Tabela 2 e Figura 5).

### **ELCOI**

A análise de variância a dois fatores mostrou significância estatística somente no fator de variação medicamento utilizado na comparação entre os grupos de tratamento da osteoporose (OVX ALE e OVX RAL) e os Grupos controles (SHAM e OVX ST) ( $p < 0,001$ ). As comparações isoladas da variável texturização da superfície dos implantes e/ou superfície vs medicamento não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ), mesmo que para todos os grupos houve uma tendência do aumento do BIC nos implantes com texturização da superfície (Tabela 3).

---

Os maiores valores de ELCOI foram observados nos grupos SHAM e OVX RAL, sem diferenças estatísticas entre os dois grupos ( $p = 0,745$ , teste Tukey). Os menores valores de ELCOI foram encontrados nos grupos OVX ALE e OVX ST e, na comparação entre eles também não houve relevância estatística ( $p = 0,934$ , teste Tukey). As demais interações mostraram diferenças estatisticamente significantes, com maiores valores de ELCOI para SHAM DN, OVX RAL, seguidas por OVX ALE e OVX ST ( $p < 0,001$ , teste Tukey) (Tabela 4 e Figura 6).

#### **1.4 Discussão**

As hipóteses dos autores nesta pesquisa de que os tratamentos medicamentosos (OVX RAL e OVX ALE) melhorariam os parâmetros avaliados em relação às ratas do grupo OVX ST, e de que a texturização da superfície promoveria melhores resultados histológicos e biomecânicos, foram parcialmente aceitas. Isso porque em relação aos resultados de torque reverso, os grupos OVX ALE, OVX RAL e SHAM DN obtiveram maior torque em relação ao OVX ST ( $P < 0,01$ ). Porém na comparação com o grupo SHAM DN, os grupos OVX ST e OVX ALE apresentaram menor torque reverso ( $p < 0,01$ ), ou seja, o alendronato não promoveu melhora a ponto de ter desempenho semelhante ao das ratas SHAM DN. Enquanto que o raloxifeno (OVX RAL) não mostrou diferença estatística quando comparado com o grupo SHAM DN ( $p = 0,861$ ). Os implantes com texturização da superfície foram estatisticamente superiores aos implantes usinados para todos os grupos ( $p = 0,020$ ) na análise de torque reverso. Esses resultados biomecânicos foram suportados pelas imagens histológicas (Figuras 3 e 4). Analisando os resultados de ELCOI comparando os medicamentos utilizados, os dados confirmam as outras análises realizadas, exceto para a texturização da

---

superfície, que não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Sendo assim, ficou evidente que o raloxifeno conseguiu melhorar o reparo ósseo periimplantar no tratamento da osteoporose induzida em ratas. A semelhança histológica com o grupo SHAM DN, associado aos valores biomecânicos e ELCOI, sugere que esta medicação além de tratar a diminuição da densidade óssea causada pela osteoporose induzida, provavelmente possibilita adequada osseointegração no tratamento reabilitador com os implantes dentários. Tendo em vista que somente após o carregamento, obtem-se a osseointegração (Albrektson 1989, Branemark, et al. 1977, Ericsson, et al. 2000, Ravald, et al. 2012), estudos futuros devem ser realizados com o intuito de avaliar se essas medicações são capazes de suportar cargas, através de micromovimentações aplicadas transcutaneamente sobre os implantes, em diferentes momentos do reparo ósseo, como realizado por Wazen et al (Wazen, et al. 2013).

Apesar da literatura atual não identificar diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com osteoporose reabilitados com implantes dentários, em relação à taxa de falha deste tratamento, há uma forte correlação entre a osteoporose e a diminuição da taxa de sobrevivência, principalmente na mandíbula quando comparado com maxila, ricamente vascularizada. É importante salientar que o objetivo do presente estudo foi o avaliar o efeito de medicações utilizadas no tratamento da osteoporose no reparo ósseo periimplantar. Assim, será possível estabelecer um protocolo clínico no tratamento desta alteração sistêmica, melhorando o processo de reparo ósseo.

---

Estudos previamente publicados (Luvizuto, Dias, Queiroz, Okamoto, Garcia, Okamoto & Dornelles 2010, Luvizuto, et al. 2011) observaram melhor dinâmica do processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas quando tratadas com raloxifeno aos 42 dias, com melhores respostas histomofométricas de porcentagem de osso neoformado. Mesmo que esses resultados foram obtidos em alvéolos em reparação pós-exodôntica, corroboram com os do presente trabalho, sustentando a assertiva da indicação do raloxifeno no tratamento da osteoporose, especialmente em indivíduos que se submeterão ao tratamento com implantes osseointegráveis. A habilidade dos moduladores seletivos de receptores de estrógeno para ativar os osteoblastos foi confirmada em estudos anteriores (Luvizuto, Dias, Queiroz, Okamoto, Garcia, Okamoto & Dornelles 2010, Luvizuto, Queiroz, Dias, Okamoto, Dornelles, Garcia & Okamoto 2010). Este é provavelmente o principal fator que explica os resultados na reparação óssea alveolar e periimplantar com este medicamento.

A ação anti-reabsortiva dos bifosfonatos orais, através da ligação à hidroxiapatita, que inibe a ação dos osteoclastos e também promove a apoptose dos osteoclastos (Giro, et al. 2011) é eficiente no tratamento da osteoporose, entretanto ainda é incerto no que diz respeito à instalação de implantes dentários em pacientes osteoporóticos. Além do risco da osteonecrose dos maxilares (Marx, et al. 2007, Ruggiero, et al. 2009, Sigua-Rodriguez, et al. 2014), ainda que os resultados histométricos observados por Giro et al (Giro, Coelho, Pereira, Jorgetti, Marcantonio & Orrico 2011), foram semelhantes ao grupo controle (SHAM DN), essa dúvida ainda permanece. Portanto, corroborado pelo presente estudo, ressalta-se a necessidade de outras investigações *in vivo*, através da avaliação dessas situações, com os implantes

---

sendo submetidos ao carregamento (Wazen, Currey, Guo, Brunski, Helms & Nanci 2013).

Em relação ao modelo animal, Glosel et al (Glosel, et al. 2010) relataram que o órgão americano Food and Drug Administration considera a ovariectomia (OVX) bilateral em ratas após um período de 3 meses, como o modelo ideal para mimetizar a osteoporose pós-menopausa. Neste contexto, a associação da OVX com a dieta pobre em cálcio e fosfato, relatada pela primeira vez por Teófilo et al (Teófilo, Azevedo, Petenusci, Mazaro & Lamano-Carvalho 2003, Teófilo, Brentegani & Lamano-Carvalho 2004), mostrou maior efetividade na simulação da osteoporose induzida em ratas, apresentando redução da massa óssea duas vezes maior da na maxila em relação à tibia num período de apenas 5 semanas, sem a necessidade de esperar 3 meses após a OVX para o início dos experimentos a serem analisados. Sendo assim, como suportado pelos resultados do presente trabalho, a associação da OVX com a dieta pobre em cálcio e fosfato deve ser considerada para os estudos.

Uma limitação do estudo em animais é a extrapolação para os parâmetros clínicos. A seleção da tibia das ratas para a avaliação do reparo ósseo é justificada por sua aceitação na literatura como um modelo experimental valioso para o estudo da osseointegração na osteoporose (Glosel, Kuchler, Watzek & Gruber 2010).

Ainda Glosel et al (Glosel, Kuchler, Watzek & Gruber 2010) observaram que as alterações histométricas através dos valores de ELCOI ocorreram somente no tecido medular das ratas osteoporóticas em comparação as ratas do grupo controle (SHAM DN). O que foi suportado pela análise histológica deste estudo, onde de forma mais marcante nos grupos OVX ST e OVX ALE, na região medular a neoformação óssea da interface osso/implante foi atrasada, com grande quantidade de tecido adiposo e

---



pouca corticalização nessa interface, importante para o processo de reparo ósseo periimplantar. Além disso, os resultados da análise de ELCOI apresentaram maiores valores no grupo OVX RAL, quando comparado com os grupos OVX ALE e OVX ST. É importante notar que esse grupo teve valores semelhantes ao grupo SHAM DN, sugerindo que o raloxifeno reverteu a osteoporose induzida em ratos.

A literatura é congruente em afirmar que a texturização da superfície dos implantes dentários promove melhores respostas biológicas, principalmente nas regiões de menor densidade, como a região posterior de maxila, assim como nas alterações do metabolismo ósseo, como ocorre na osteoporose (Buser, Broggini, Wieland, Schenk, Denzer, Cochran, Hoffmann, Lussi & Steinemann 2004, Tavares, de Oliveira, Nanci, Hawthorne, Rosa & Xavier 2007, Wennerberg & Albrektsson 2009, Wennerberg & Albrektsson 2011, Xavier, Carvalho, Beloti & Rosa 2003). Este estudo comprovou esta assertiva da literatura, onde os resultados histológicos e biomecânicos mostraram superioridade da texturização da superfície dos implantes através do duplo ataque ácido, quando comparado aos implantes de superfície usinada. Sendo assim, a texturização da superfície dos implantes deve ser realizada, principalmente, nas situações avaliadas neste estudo. Mesmo não havendo diferença estatística na análise histométrica (ELCOI) ( $p > 0,05$ ), o implante com superfície texturizada em comparação com os implantes usinados, mostrou uma tendência de aumento da ELCOI, corroborando com as outras análises realizadas.

## **1.5 Conclusões**

Diante dos limites deste estudo in vivo, foi possível concluir que:

1) Raloxifeno foi o medicamento que apresentou melhores resultados histológicos, de extensão linear de contato osso/implante e biomecânicos para o tratamento da osteoporose induzida em ratas;

2) Os implantes com texturização da superfície promoveram maior resistência para o torque reverso aplicado na interface osso/implante.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste estudo (processo número 2012/15748-8 e 2012/15912-2).

### **1.6 Referências**

1. Isidor F. Influence of forces on peri-implant bone. Clin Oral Implants Res 2006 Oct; 17 Suppl 2:8-18. PubMed PMID:. 16968378 Epub 2006/09/14. eng.
2. Shapurian T, Damoulis PD, Reiser GM, Griffin TJ, Rand WM. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Mar-Apr, 21 (2) :290-7. PubMed PMID:. 16634501 Epub 2006/04/26. eng.
- 3 Aubin JE, E. Bonnelye osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Medscape Womens Health. 2000 Mar; 5 (2): 5. PubMed PMID:. 10792853 Epub 2000/05/03. eng.
4. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in the normal and osteoporotic women. J Prosthet Dent. 1990 Feb, 63 (2) :218-22. PubMed PMID:. Epub 2304026 02/01/1990. eng.

5. Teofilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats intra-alveolar grafting of bioactive glass Following. Arch Oral Biol. 2004 Sep, 49 (9) :755-62. PubMed PMID:. 15275863 Epub 2004/07/28. eng.
  6. Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999 Apr, 87 (4) :411-8. PubMed PMID:. Epub 10225622 05/04/1999. eng.
  7. Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD, et al. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyzes. Bone. 2002 Jan, 30 (1) :137-43. PubMed PMID:. Epub 11792576 17/01/2002. eng.
  8. Dvorak G, Fugl A, G Watzek, Tangl S, Pokorny R, Gruber R. Impact of dietary vitamin D on osseointegration in the ovariectomized rat. Clin Oral Implants Res 2012 Nov; 23 (11) :1308-13. PubMed PMID:. 22151621 Epub 2011/12/14. eng.
  9. Burg MA, Fraser K, Gui S, Grant K, Kosch SG, Nierenberg B, et al. Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings Following the Women's Health Initiative findings. J Am Board Fam Med 2006 Mar-Apr, 19 (2) :122-31. PubMed PMID:. Epub 16513900 04/03/2006. eng.
  10. Atanes Bonome-P, Atanes Bonome-A, Rios-Lage P, Atanes-Sandoval AD. [Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw]. SEMERGEN. 2014 Apr, 40 (3) :143-8. PubMed PMID:. Epub 24001573 09/05/2013. Osteonecrosis of the jaws associated with them el tratamiento con bisphosphonates. spa.
  11. Munoz-Torres M, Reyes-Garcia R, Mezquita-Raya P, Fernandez-Garcia D, Alonso G, Luna Jde D, et al. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in
-

postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas*. 2009 Nov 20; 64 (3) :188-92. PubMed PMID:. 19819089 Epub 2009/10/13. eng.

12. Luvizuto ER, Queiroz TP, Day SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia RI, Jr., et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG During the alveolar healing process in ovariectomized female rats treated with estrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. . England 55: 2009 Elsevier Ltd; 2010. P. 52-9.

13. Luvizuto ER, Dias MS, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia RI, Jr., Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling During the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 46 United States:.. Elsevier Inc 2009; 2010. P. 1021-9.

14. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004 Jul, 83 (7) :529-33. PubMed PMID:. 15218041 Epub 2004/06/26. eng.

15. Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne CA, Rose AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined titanium implant surface with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res* 18. Denmark2007. p. 452-8.

16. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4. Denmark2009. p. 172-84.

17. Wennerberg A, Albrektsson T. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil*. 2011 Apr, 38 (4) :286-94. PubMed PMID:. 20969613 Epub 2010/10/26. eng.

18. Evans HM, Long JA. Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Previous hypophyseal

---

Substance. Proc Natl Acad Sci U S A. 1922 Mar; 8 (3) :38-9. PubMed PMID: 16576618  
PubMed Central PMCID:. PMC1084981. Epub 03/01/1922. eng.

19. Da Paz LH, Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. Braz J Med Biol Res 34. Brazil2001. p. 1015-22.

20. Albrektson. The Branemark osseointegrated implant. . Chicago: Quintessence; 1989. 262 p.

21. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 1977; 16:1-132. PubMed PMID:. 356184 Epub 01/01/1977. eng.

22. Ericsson I, Randow K, Nilner K, Peterson A. Early functional loading of Branemark dental implants: 5-year clinical follow-up study. Clin Implant Dent Relat Res 2000; 2 (2) :70-7. PubMed PMID:. Epub 11359266 19/05/2001. eng.

23. Ravald C, Dahlgren S, Teiwik A, Grondahl K. Long-term evaluation of Astra Tech and Branemark implants in Patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years. Clin Oral Implants Res 2012 Jul 4 PubMed PMID:.. 22,762,251 Epub 2012/07/06.

Eng

24. Wazen RM, Currey JA, Guo H, Brunski JB, Helms JA, Nanci A. Micromotion-induced strain fields influence early stages of repair at bone-implant interfaces. Acta Biomater. 2013 Apr, 9 (5): 6663-74. PubMed PMID: 23337705 PubMed Central PMCID:. Pmc3622828. Epub 23/01/2013. eng.

25. Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. Plos One. 2013, 5 (8): e71955.

---

26. Busenlechner D, Furhauser R, Hassh R, Watzek G, Mailathe G, Pommer B. Long-term implant success at the Academy for Oral Implantology: 8-year follow-up and risk factor analysis. *J Periodontal Implant Sci.* 2014, 44 (3): 102-8.
  27. Luvizuto ER, Days SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis During the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct, 56 (10) :984-90. PubMed PMID:. 21536255 Epub 2011/05/04. eng.
  28. Giro G, PG Coelho, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E, Jr., SR Orrico. The effect of estrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2011 Mar, 22 (3) :259-64. PubMed PMID:. 20946210 Epub 2010/10/16. eng.
  29. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate osteonecrosis of the jaw-related - 2009 update. *Aust Endod J.* 2009 Dec; 35 (3) :119-30. PubMed PMID:. 19961450 Epub 2009/12/08. eng.
  30. Glosel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 May-Jun, 25 (3) :516-24. PubMed PMID:. 20556250 Epub 2010/06/18. eng.
-

## 1.7 Tabelas

Tabela 1 – Teste ANOVA a dois fatores (superfície x medicamento) para torque reverso

<b>Fator de variação</b>	<b>*p</b>
Superfície	0,020
Medicamento	<0,001
Superfície x Medicamento	0,560

\*valores de  $P < 0,05$  denotam significância estatística

Tabela 2 – Teste Tukey para os grupos experimentais de osteoporose (SHAM DN, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL) na análise biomecânica (torque reverso)

<b>Comparação (Grupos experimentais)</b>	<b>*p</b>
Sham-DN vs. OVX-NT	$P < 0,001$
Sham-DN vs. OVX-ALE	$P < 0,001$
Sham-DN vs. OVX-RAL	$P = 0,861$
OVX-RAL vs. OVX-NT	$P < 0,001$
OVX-RAL vs. OVX-ALE	$P < 0,001$
OVX-ALE vs. OVX-NT	$P < 0,001$

\*valores de  $P < 0,05$  denotam significância estatística

Tabela 3 - Teste ANOVA a dois fatores (medicamento x superfície) para ELCOI

<b>Fator de variação</b>	<b>*p</b>
Superfície	0,261
Medicamento	<0,001
Superfície x Medicamento	0,858

\*valores de  $P < 0,05$  denotam significância estatística

Tabela 4 - Test Tukey para os grupos experimentais de osteoporose (SHAM DN, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL) nos dados de ELCOI

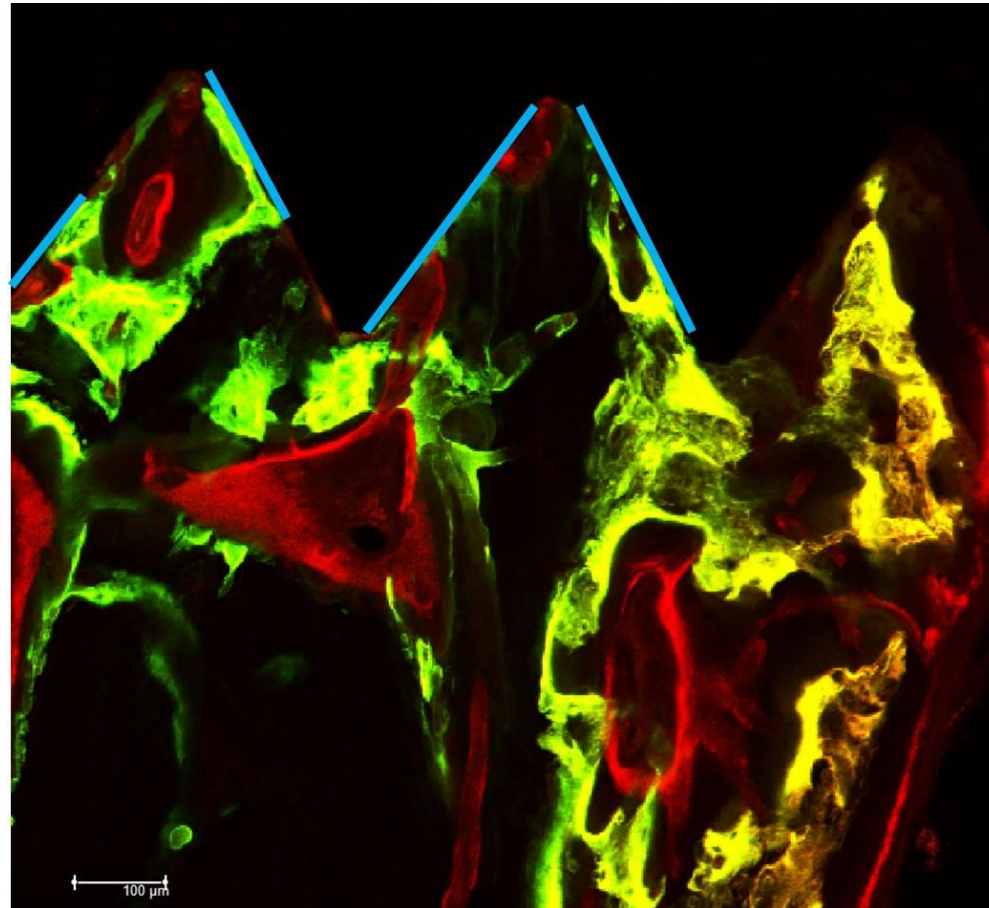
<b>Comparação (Grupos experimentais)</b>	<b>*p</b>
Sham-DN vs. OVX-NT	$P < 0,001$
Sham-DN vs. OVX-ALE	$P < 0,001$
Sham-DN vs. OVX-RAL	$P = 0,745$
OVX-RAL vs. OVX-NT	$P < 0,001$
OVX-RAL vs. OVX-ALE	$P < 0,001$
OVX-ALE vs. OVX-NT	0,934

\*valores de  $P < 0,05$  denotam significância estatística

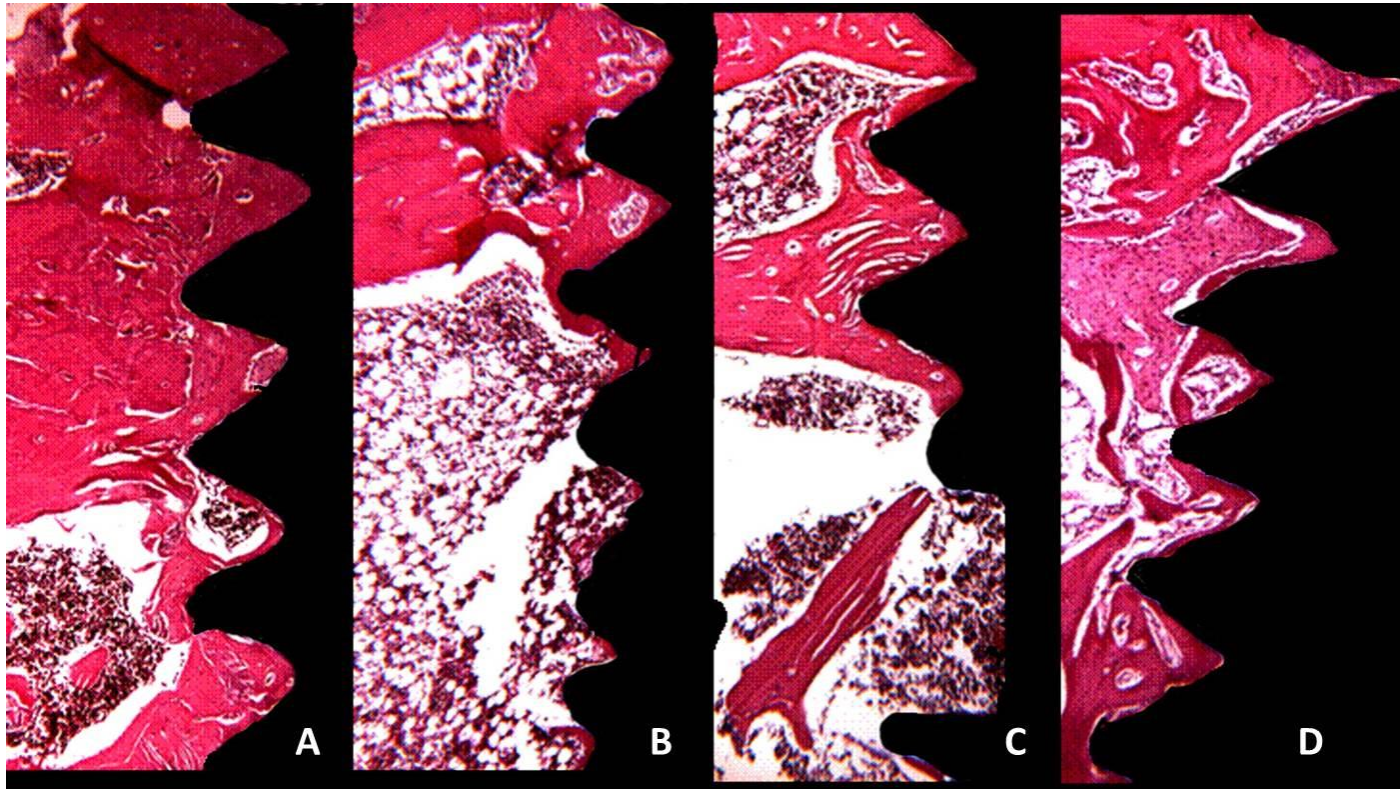


**1.8 Figuras**

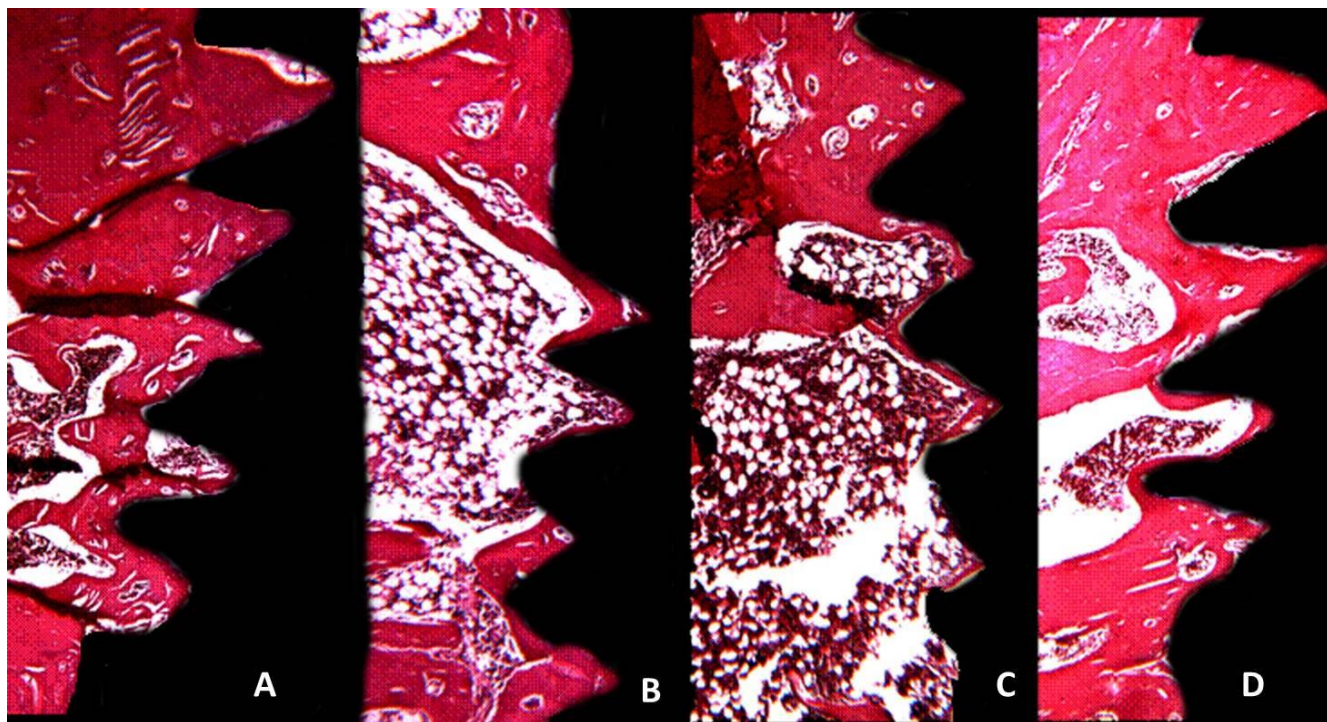
**Figura 1** – Aspecto clínico da fresagem realizada na tíbia das ratas antes da instalação do implante (A). Instalação do implante com chave digital (B). Implante instalado na tíbia do animal (C).



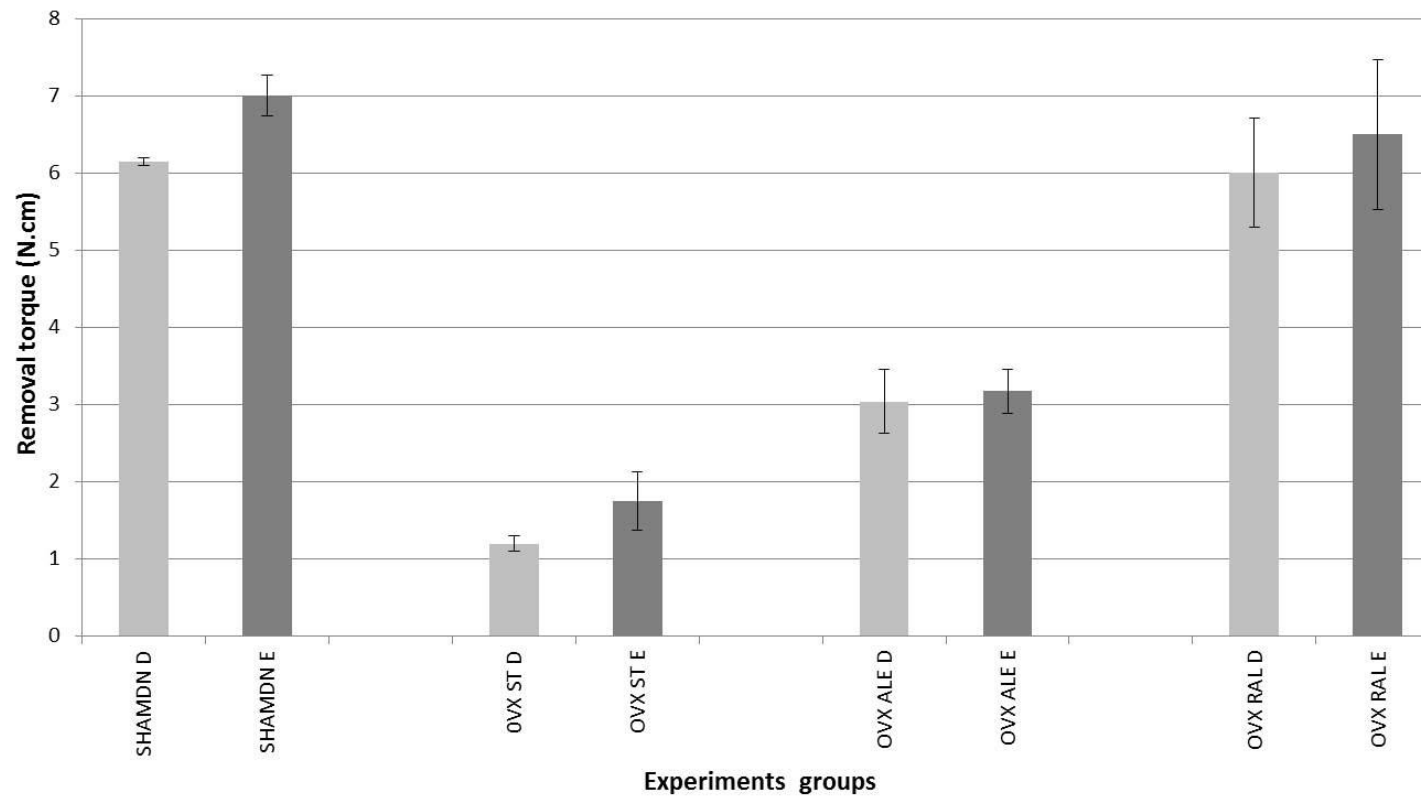
**Figura 2** – Imagem da região periimplantar obtida através da microscopia confocal, padronizada para o cálculo de ELCOI, representada pela soma das linhas azuis. Considerou-se na análise ELCOI as linhas fluorescentes verdes (calceína) e vermelhas (alizarina) na interface osso/implante na região de terceira e quarta espiras do implante.



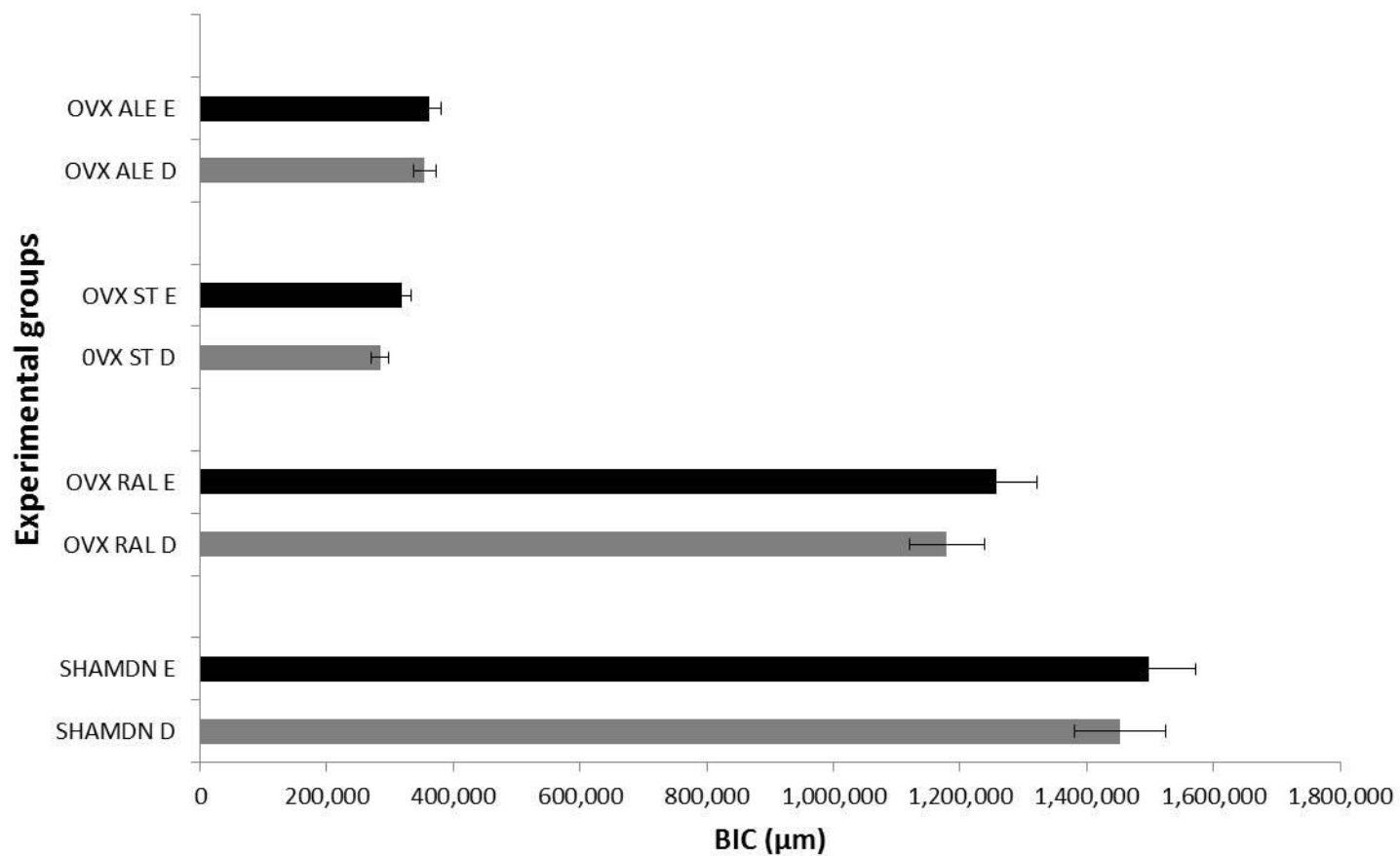
**Figura 3** – Cortes histológicos mostrando o tecido ósseo envolvendo as espiras dos implantes usinados dos grupos experimentais SHAM DN (A), OVX ST (B), OVX ALE (C), e OVX RAL (D). Note o osso neoformado junto à superfície do implante, especialmente no grupo SHAM DN. Importante notar a quantidade considerável de osso medular, repleto de tecido adiposo, nos grupos OVX ST e OVX ALE.



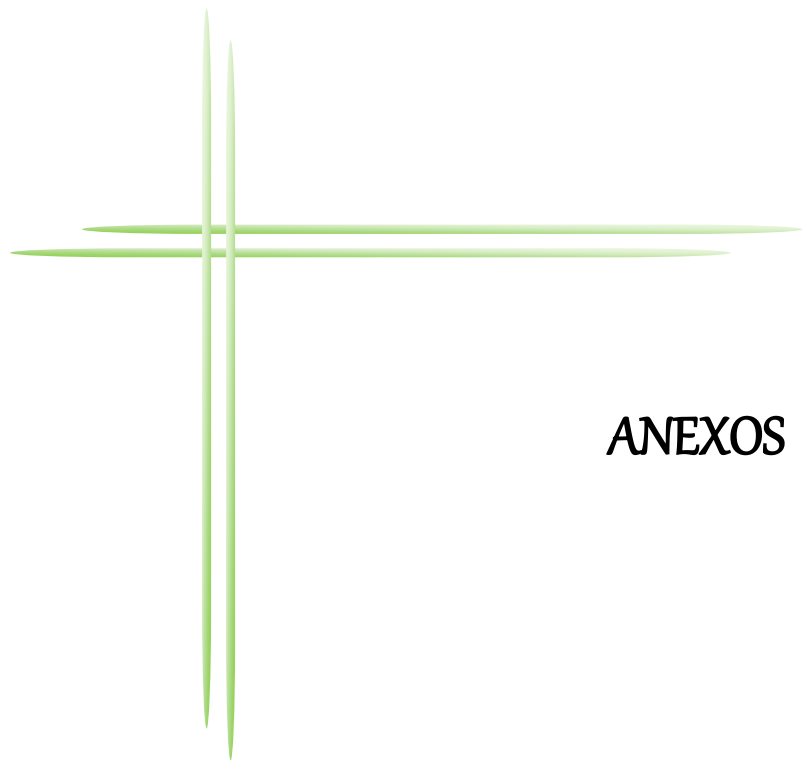
**Figura 4** – Cortes histológicos mostrando o tecido ósseo envolvendo as espiras dos implantes com superfície texturizada dos grupos experimentais SHAM DN (A), OVX ST (B), OVX ALE (C), e OVX RAL (D). Note o osso neoformado próximo junto às espiras do implante, especialmente no grupo SHAM DN. De modo similar aos implantes usinados, observa-se a quantidade considerável de osso medular, repleto de tecido adiposo, em especial nos grupos OVX ST e OVX ALE.



**Figura 5** – Gráfico representativo dos resultados de torque reverso na comparação entre a instalação de implantes de superfície usinada e implantes de superfície texturizada nos diferentes grupos experimentais.



**Figura 6** – Gráfico representativo dos resultados de ELCOI na comparação entre a instalação de implantes de superfície usinada e implantes de superfície texturizada nos diferentes grupos experimentais.



**ANEXOS**

## 1.9 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba



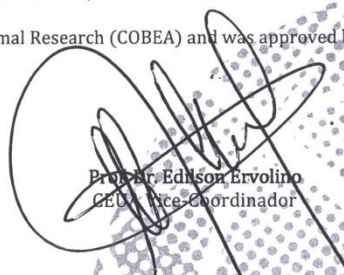
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com osteoporose induzida tratadas com raloxifeno ou alendronato - Análise histométrica, imunoistoquímica, por epifluorescência e biomecânica" sob responsabilidade da Pesquisadora ROBERTA OKAMOTO e colaboração de Gabriel Ramalho Ferreira, Leonardo Perez Faverani, André Luis da Silva Fabris e Tetuo Okamoto está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo 2012-01096.

### CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of bone healing in the bone/implant interface in rats with induced osteoporosis treated with raloxifene or alendronate - Histometric, immunohistochemical, epifluorescence and biomechanical analysis", protocol number 2012-01096, under responsibility of ROBERTA OKAMOTO and with collaboration of Gabriel Ramalho Ferreira, Leonardo Perez Faverani, André Luis da Silva Fabris and Tetuo Okamoto agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino  
CEUA - Vice-Coordenador

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

## 1.10 Anexo B- Normas para publicação do periódico IJOMS



## IJOMS

### Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

### Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at External link <http://ees.elsevier.com/ijoms> A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com). Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office ([ijoms@elsevier.com](mailto:ijoms@elsevier.com)) and the corresponding author will be by e-mail.

### Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial

---

and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

#### Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload the declarations page (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest, and to indicate whether ethical approval and patient consent were sought. Lastly you must confirm that all authors have agreed to the submission.

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

#### Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data

(2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content

(3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

---

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (pdf version or word version) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

#### Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

#### Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

#### Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the

---

decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

#### Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at External link <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: External link <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### Ethics

Any manuscript concerned with human subjects, medical records, or human tissue that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles stated in the Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and as amended most recently by the 64th World Medical Assembly, Fontaleza, Brazil, October 2013.

The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval

---

for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

#### Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

#### Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit External link <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note, Elsevier

---

neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions External link [http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions).

#### Article Types

The following contributions will be accepted for publication. Please take careful note of the maximum length where applicable. Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

---

## Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be: • focused

- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
- Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within 3 months; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

## Presentation of Manuscripts

### General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

### Format

Observational or Case Cohort Studies, as well as Case Series must be presented in conformance with STROBE guidelines: External link [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org)

Randomized Controlled Trials must be presented in conformance with CONSORT guidelines: External link [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org)

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be presented according to PRISMA guidelines: External link [www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org)

---

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page: •

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

#### Title page

The title page should give the following information: • title of the article

- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words.

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

#### Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

#### Text

---



Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

#### Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- ; Should be written in the present tense

#### Materials and Methods

- Give the full details, limit references • Should be written in the past tense •  
 Include exact technical specifications, quantities and generic names • Limit the number of subheadings, and use the same in the results section • Mention statistical method • Do not include results in this section

#### Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

#### Discussion

- Discuss - do not recapitulate results • Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data • Show how results



- agree/contrast with previous work •
- Discuss the implications of your findings •
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA,  $F=2.34$ ;  $df=3,46$ ;  $P<0.001$ ). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK).

The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the

---

person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

## References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen<sup>14</sup> showed..."; "each technique has advantages and disadvantages<sup>5-13</sup>." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al<sup>37</sup> identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see [www.nlm.nih.gov.uk](http://www.nlm.nih.gov.uk)) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

---

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. *Fundamentals of oral surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: *Fluorine chemistry*. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. External link <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

## Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

## Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.

---

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

#### Funding body agreements and policies

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

#### Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within 48 hours. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from External link <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at

---

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

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

#### Offprints

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

#### Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: External link <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions

---

arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

#### Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
  2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
  3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
  4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
  5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
  6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
  7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
  8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.
-





## Capítulo 2

# *Dinâmica do processo de reparo ósseo periimplantar durante o tratamento com alendronato de sódio ou raloxifeno em ratas osteoporóticas \*\**

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

---

**Título:** Dinâmica do processo de reparo ósseo periimplantar durante o tratamento com alendronato de sódio ou raloxifeno em ratas osteoporóticas

**Autores:** Gabriel Ramalho-Ferreira DDS, MSc<sup>a</sup>, Leonardo Perez Faverani DDS, MSc, PhD<sup>a</sup>; Tárik Ocon Braga Polo DDS, MSc<sup>a</sup>, Tetuo Okamoto DDS, MSc, PhD<sup>b</sup> e Roberta Okamoto DDS, MSc, PhD<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Univ Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Univ Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência:**

Leonardo Perez Faverani

Rua Jose Bonifacio, 1193 / Cep: 16015-050

Telefone: (+55) 18 3636-3270

Email: leobucomaxilo@gmail.com

---

## Resumo

**Objetivos:** Avaliar a taxa de remodelação do tecido ósseo durante o processo de reparo periimplantar em ratas osteoporóticas tratadas com medicamentos da classe dos bifosfonatos e moduladores de receptores de estrógeno.

**Materiais e Métodos:** 72 ratas foram divididas em 2 grupos segundo às análises propostas (imunoistoquímica e fluorocromos), e 4 sub-grupos (n = 6) em função da osteoporose induzida e das medicações utilizadas: OVX, ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato; SHAM - ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia e alimentadas com dieta balanceada; ALE - ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato e tratadas com alendronato e, RAL - ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato e tratadas com raloxifeno. Oito dias após a ovariectomia e cirurgias SHAM iniciou-se o tratamento com raloxifeno (RAL) ou alendronato (ALE) em dois dos sub-grupos. Após 30 dias da administração das medicações, foi instalado um implante de superfície texturizada com duplo ataque ácido em cada tíbia das ratas. Para a imunomarcção de osteoprotegerina (OPG), RANKL, TRAP e osteocalcina (OC), 24 ratas foram submetidas à eutanásia aos 14 e 42 dias após a instalação dos implantes. As demais 24 ratas, aos 52 dias após a ovariectomia, receberam pela via intramuscular 20 mg/kg de calceína e no 80º dia, 20 mg /kg de vermelho de alizarina. A eutanásia foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes. As peças para imunoistoquímica foram incluídas em parafina e para a microscopia confocal, em resina fotopolimerizável. Foi calculada a área de osso marcada pelos fluorocromos (calceína e alizarina), nos diferentes grupos experimentais por meio

---

do programa Image J. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA 2 fatores e para os dados com significância estatística, foi aplicado o teste Tukey, com  $p < 0,05$ .

**Resultados:** A dinâmica óssea periimplantar foi superior estatisticamente nos grupos SHAM e RAL em comparação aos demais grupos, em que ambos apresentaram maior área óssea periimplantar para o vermelho de alizarina e menor para a calceína ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos SHAM e RAL, bem como nas interações entre ALE e OVX ( $p > 0,05$ ) para as expressões dos fluorocromos. As imunomarcações de OPG e RANKL foram similares para os grupos RAL e SHAM; houve moderada expressão de OC precocemente (14 dias). A TRAP foi marcada intensamente aos 42 dias para o grupo OVX e para o grupo ALE, foi marcada levemente aos 42 dias.

**Conclusões:** Raloxifeno melhorou a dinâmica óssea periimplantar de ratas osteoporóticas, indicando-se sua utilização no tratamento da osteoporose.

**Palavras-chave:** osteoporose, implantes dentários, alendronato, raloxifeno, microscopia.

---

## Abstract

**Objectives:** To evaluate the bone remodeling rate during the peri-implant healing process in osteoporotic rats treated with drugs of the class of bisphosphonates and selective estrogen receptor modulators.

**Materials and Methods:** 72 rats were divided into 2 groups according to the proposed analysis (immunohistochemistry and fluorochromes), and 4 sub groups (n = 6) depending on the induced osteoporosis and medications used: OVX, and ovariectomized rats fed with low-calcium and phosphate diet; SHAM - rats subjected to sham surgery and fed with a balanced diet; ALE - ovariectomized rats fed diet low in calcium and phosphate and treated with alendronate and RAL - ovariectomized rats fed with a diet low in calcium and phosphate and treated with raloxifene. Eight days after ovariectomy and sham surgeries treatment with raloxifene (RAL) or alendronate (ALE) began in two sub groups. After 30 days of administration of medications, a surface treated implant with double acid attack was installed on each tibia of rats. For immunostaining of osteoprotegerin (OPG), RANKL, TRAP and osteocalcin (OC), 24 rats were euthanized at 14 and 42 days after implant placement. The other 24 rats at day 52 after ovariectomy, received intramuscularly 20 mg / kg calcein on the 80th day and 20 mg / kg of alizarin red. The animals were sacrificed at 60 days after implant placement. The pieces to immunohistochemistry were embedded in paraffin, and to confocal microscopy in photopolymerizable resin. The bone area marked by fluorochromes (calcein and alizarin) was calculated, in the different experimental groups through the program Image J. The data were submitted to ANOVA 2 factors and to the statistically significant data, the Tukey test was applied, with  $p < 0.05$ .

---

**Results:** The peri-implant bone dynamics was statistically higher in SHAM and RAL groups compared to the other groups, in which both showed higher peri-implant bone area for alizarin red and lowest for calcein ( $p < 0.05$ ). There was no difference between SHAM and RAL groups as well as the interactions between ALE and OVX ( $p > 0.05$ ) for the expressions of fluorochromes. The immunostaining of OPG and RANKL were similar to RAL and SHAM groups; OC expression was moderate early (14 days). TRAP was marked intensely at 42 days for the OVX group, and the ALE group was lightly marked at 42 days.

**Conclusions:** Raloxifene improved dynamic peri-implant bone osteoporotic rats, indicating its use in the treatment of osteoporosis.

**Keywords:** osteoporosis, dental implants, alendronate, raloxifene, microscopy.

---

## 2.1 Introdução

O uso de implantes dentários para a reabilitação dos pacientes parcial ou totalmente edêntulos promoveu substancial melhora na qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que a mastigação é um fator fundamental para o correto funcionamento do sistema estomatognático (Menassa, et al. 2014, Yao, et al. 2014).

O aumento da expectativa de vida da população promoveu o crescimento da procura de pacientes idosos ao atendimento odontológico (Maihofer 2014). A senilidade associada às alterações hormonais, a desnutrição, a desidratação, bem como as doenças sistêmicas que interferem no metabolismo ósseo podem aumentar a falha do tratamento com implantes osseointegráveis (Busenlechner, et al. 2014, Chen, et al. 2013). Dentre as alterações sistêmicas observadas, a osteoporose é considerada um problema de saúde pública em nível mundial (Fujiwara, et al. 2014). Conceitualmente, é caracterizada pela diminuição da massa óssea e deteriorização microestrutural do tecido ósseo (Prestwood & Kenny 1998). A incidência da osteoporose aumenta com a idade e é maior nas mulheres quando comparado com os homens, devido à deficiência de estrógeno no período pós-menopausa (Yoshimura, et al. 2009).

Estudos clínicos prospectivos e ensaios clínicos randomizados evidenciaram menor taxa de sobrevivência dos implantes dentários nos pacientes com osteoporose, com predileção pela mandíbula, tendo em vista que o arranjo estrutural do tecido ósseo da maxila permite uma alta taxa de vascularização frente a uma menor densidade óssea, favorecendo a osseointegração nessas situações (Busenlechner, Furhauser, Haas, Watzek, Mailath & Pommer 2014, Chen, Liu, Xu, Qu & Lu 2013). Entretanto, os estudos não

---

apresentam um consenso a este respeito e ainda não existe um protocolo de tratamento padronizado para os pacientes com osteoporose e irão ser reabilitados com os implantes dentários.

Atualmente a terapia anti-osteoporose tem sido realizada com medicações que reduzem a taxa de reabsorção, principalmente os bifosfonatos administrados pela via oral com destaque para o alendronato de sódio (Giro, Coelho, Pereira, Jorgetti, Marcantonio & Orrico 2011). Outra classe de medicamentos consiste nos moduladores seletivos dos receptores de estrógeno, sendo o cloridrato de raloxifeno, o único medicamento deste grupo aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos da América para o tratamento da osteoporose. Sua atuação ocorre de maneira seletiva aos receptores de estrógeno presentes também nos osteoblastos, regulando o mecanismo de reabsorção em nível hormonal (Glosel, Kuchler, Watzek & Gruber 2010). O efeito da osteoporose sobre a dinâmica do tecido ósseo é um aspecto de grande relevância para o sucesso na resposta de osseointegração após a instalação dos implantes. A ação destas medicações, interferindo especialmente nas respostas de reabsorção do tecido ósseo pode interferir de forma positiva na dinâmica óssea periimplantar de pacientes portadores desta interferência sistêmica.

Com o intuito de acelerar o processo de reparo ósseo na interface osso/implante, além de favorecer a adesão de células da linhagem osteoblástica, em especial em ossos com menor densidade, como ocorre na osteoporose, a engenharia tecidual desenvolveu modificações na topografia dos implantes dentários, por meio de diversas técnicas de adição ou subtração físico-químicas (Albrektsson & Wennerberg 2004, Buser, Brogгинi,

---



Wieland, Schenk, Denzer, Cochran, Hoffmann, Lussi & Steinemann 2004, Ivanoff, et al. 2001, Tavares, de Oliveira, Nanci, Hawthorne, Rosa & Xavier 2007, Wennerberg & Albrektsson 2009, Wennerberg & Albrektsson 2011, Xavier, Carvalho, Beloti & Rosa 2003). Sendo assim, a utilização de implantes com superfícies texturizadas tornou-se mandatória (Albrektsson & Wennerberg 2004, Wennerberg & Albrektsson 2011).

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os mecanismos da dinâmica óssea periimplantar de ratas osteoporóticas, tratadas com alendronato de sódio, raloxifeno, submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia (SHAM), ou osteoporóticas sem tratamento medicamentoso. Foi hipotetizado que os medicamentos utilizados para o tratamento da osteoporose (alendronato e raloxifeno) melhorariam o processo de dinâmica óssea periimplantar em comparação as ratas osteoporóticas não tratadas.

## **2.2 Materiais e Métodos**

### *Desenho Experimental*

Setenta e duas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com idade entre 50 à 60 dias e 200g de peso, foram utilizadas neste estudo após a aprovação no comitê de ética em animais (2012-01096). Os animais foram divididos em quatro sub-grupos, como descritos a seguir: OVX, ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato; SHAM - ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia e alimentadas com dieta balanceada; ALE - ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato e tratadas com alendronato de sódio e, RAL - ratas ovariectomizadas, alimentadas com dieta pobre em cálcio e fosfato e tratadas com raloxifeno.

---

Durante oito dias as ratas foram submetidas ao estudo do ciclo estral para a observação da regularidade do ciclo (Evans & Long 1922). O dia zero foi considerado quando da realização das ovariectomias (RAL, ALE e OVX) e cirurgias fictícias de ovariectomia (SHAM). A partir deste dia, os grupos SHAM continuaram sendo alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum*, enquanto os demais grupos (OVX, RAL e ALE) foram alimentados com ração contendo 0.1% Ca e 0.5%P (RHOSTER Ind. Com., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

As medicações utilizadas no tratamento da osteoporose (RAL e ALE) foram administradas diariamente por gavagem, na dose de 1mg/kg/dia para o raloxifeno (Luvizuto, Dias, Queiroz, Okamoto, Garcia, Okamoto & Dornelles 2010) e 0,1mg/Kg/dia para o alendronato de sódio (da Paz, de Falco, Teng, dos Reis, Pereira & Jorgetti 2001), ambas dissolvidas em solução aquosa. Estas medicações foram administradas por 30 dias e neste momento foi realizada a cirurgia para instalação dos implantes nas tíbias das ratas. Porém as medicações continuaram a serem administradas até a eutanásia dos animais.

Oito horas antes da instalação dos implantes, as ratas foram mantidas em jejum. A sedação foi realizada por meio da combinação quetamina (50mg/kg) pela via intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brazil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brazil). A tricotomia e antissepsia foram realizadas na região medial da tíbia direita

---

e esquerda. Foi realizada incisão de aproximadamente 1,5 cm e divulsão dos tecidos moles em espessura total até a exposição das metáfises tibiais direita e esquerda.

Um implante de titânio comercialmente puro apresentando superfície texturizada por duplo ataque ácido (Implalife Biotecnologia, Jales, São Paulo, Brazil) foi instalado em ambas as tíbias (direita e esquerda) dos animais. Os implantes possuíam dimensões de 2.0 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento e módulo de rebordo quadrado. A fresagem foi realizada unicamente com fresa espiral de 1,4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A instalação foi realizada com chave digital quadrada, manualmente e travamento bicortical.

O fechamento da ferida foi realizado por planos, em que no plano profundo foi suturado com fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brazil) e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brazil), no plano mais externo. No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose e Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

A eutanásia dos animais aconteceu de acordo com os períodos das análises realizadas. Para a análise imunoistoquímica com cortes descalcificados, 24 ratas (n=6) foram eutanasiadas aos 14 dias após a instalação dos implantes e 24 ratas (n=6) aos 42 dias após o mesmo procedimento.

---

As demais 24 ratas (n=6) pertencentes à análise histométrica da dinâmica óssea periimplantar, receberam pela via intramuscular 20 mg/kg do fluorocromo calceína aos 14 dias após a instalação dos implantes. Passados mais 28 dias (42 dias após a instalação dos implantes), foi administrado vermelho de alizarina, na dose de 20 mg/kg para cada animal. A eutanásia destes animais foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes (18 dias após a administração da alizarina).

#### *Processamento das peças para histometria*

As tíbias das ratas que foram submetidas à eutanásia aos 60 dias após a instalação dos implantes, foram designadas para o processamento das peças sem descalcificação. Para tanto, inicialmente as tíbias foram fixadas em paraformaldeído por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e desidratadas em ordem crescente de álcoois. Prosseguiu-se com a infiltração com resina fotopolimerizável (Technovit 7200VLC, Advanced Technologies exakt, Norderstedt, Alemanha) e a partir deste momento, os espécimes foram submetidos ao corte de semi-precisão em serra (Exakt Tecnologias Avançadas, Norderstedt, Alemanha) e reduzidas a uma espessura média de 80 micrômetros em polidora automática (Exakt Tecnologias Avançadas, Norderstedt, Alemanha) com lixas. As lâminas foram montadas com as peças estabilizadas com óleo mineral.

#### *Microscopia Confocal*

Foram obtidos cortes longitudinais na região de interface osso/implante correspondentes à terceira, quarta e quinta espiras dos implantes. Estes cortes foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (aumento original 100). Sendo assim, a

---

microscopia confocal obteve imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados (Figuras 1A, 1B e 1C).

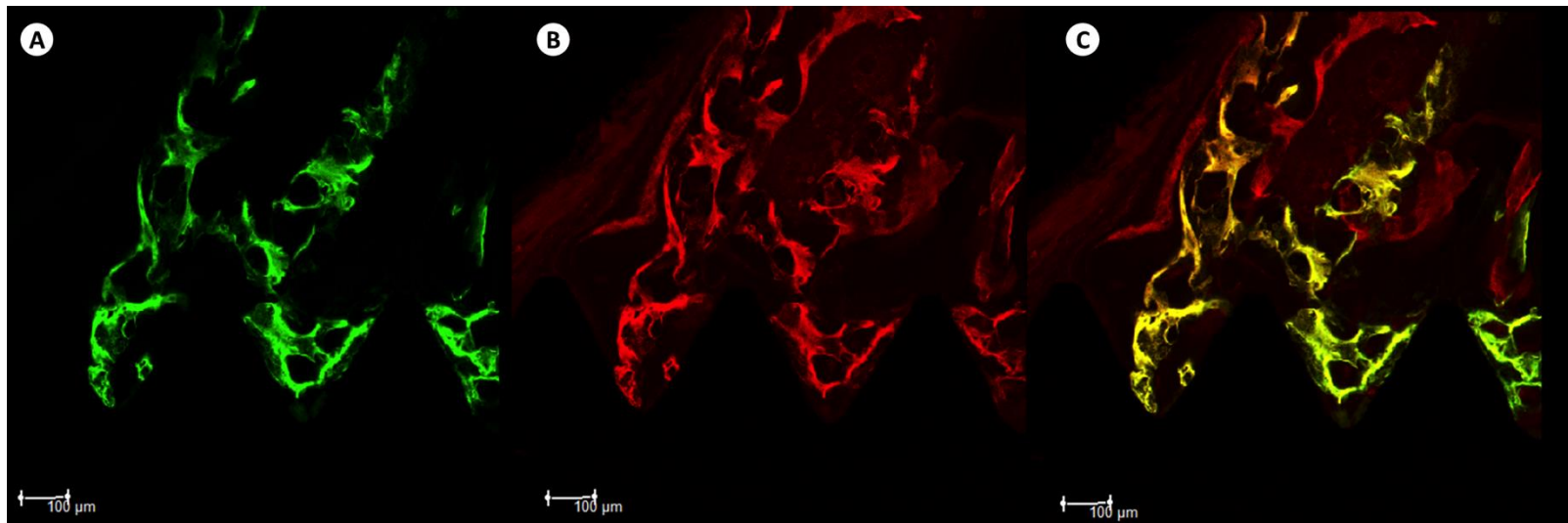


Figura 1 – Imagens do osso periimplantar obtidas pela microscopia confocal. (A): área óssea marcada pela calceína (verde); (B): área óssea marcada pela alizarina (vermelho) e (C): reconstrução de ambas as marcações dos fluorocromos (calceína e alizarina).

### *Dinâmica óssea periimplantar*

Para o cálculo da área em  $\mu\text{m}^2$  dos fluorocromos na região das espiras dos implantes, as imagens obtidas pela microscopia confocal foram transportadas para o programa analisador de imagens (Image J, Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, ON, Canadá). Por meio da ferramenta “free hands”, a cor fluorescente verde (calceína) foi selecionada e com a ferramenta “measure”, o programa forneceu a área correspondente em  $\mu\text{m}^2$ . Posteriormente, a cor vermelha fluorescente (alizarina) foi também mensurada e assim, foi possível compreender a dinâmica óssea periimplantar em cada situação testada. Para todas as imagens, foi padronizada a quarta espira do implante (espira do meio) para o cálculo da área dos fluorocromos.

### *Análise estatística*

Os resultados da mensuração da área dos fluorocromos na região periimplantar foram submetidos ao teste estatístico no programa Sigmaplot 12.5 Exact Graphs and Data Analysis (San Jose, California, USA). Aplicou-se o teste ANOVA a 2 fatores (grupos de osteoporose vs fluorocromos) e, para as interações com significância estatística, realizou-se o pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 0,05.

### *Processamento das peças para imunoistoquímica*

Após a eutanásia das ratas, as tíbias direita e esquerda foram removidas e imediatamente fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brazil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. O próximo passo foi a descalcificação em solução de EDTA a 18% por 6 semanas, para então realizar a remoção cuidadosa dos implantes por meio da

---

rotação anti-horária. Em seguida foi feita a desidratação numa sequência crescente de alcoóis. A diafanização foi feita com o xilol, a fim de se realizar a inclusão das peças em parafina. O corte das mesmas foi em micrótopo na espessura de 5  $\mu\text{m}$  e os cortes montados em lâminas.

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

Para a realização das imunomarcações foi utilizada a técnica indireta com o método de detecção por imunoperoxidase. Os bloqueios de reações inespecíficas foram realizados através da inativação da peroxidase endógena, através de peróxido de hidrogênio (Merck) 3%, a albumina bovina (Sigma) 1% e o leite em pó desnatado a 20%. As lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) na presença de calor úmido. Os anticorpos primários utilizados foram contra TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), OPG (osteoprotegerina), RANKL (ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligante), osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Estas proteínas foram escolhidas com o intuito de analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL), e mineralização (osteocalcina).

Como anticorpo secundário foi utilizado o biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology, Rockford, IL USA), o amplificador será a Streptavidina e Biotina (Dako, Glostrup, Denmark) e a diaminobenzidina (Dako, Glostrup, Denmark) como

---

cromógeno. Ao término da reação imunoistoquímica, foi realizada a contra-coloração pela hematoxilina de Harris.

As marcações foram avaliadas através de análise qualitativa ordinal, onde diferentes “escores” foram atribuídos (Luvizuto, Dias, Okamoto, Dornelles & Okamoto 2011) de acordo com a presença de células imunomarcadas na região do processo de reparo ósseo periimplantar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) e os escores atribuídos representaram: marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo que o aumento na graduação dos escores ocorreu de acordo com o aumento da área contendo células positivamente marcadas pela diaminobenzidina. O analisador foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. O controle negativo foi realizado substituindo o anticorpo primário pelo soro da espécie hospedeira do anticorpo primário. As reações imunoistoquímicas foram realizadas aos 14 e 42 dias, nos períodos de eutanásia das ratas, exceto para a TRAP, a qual foi realizada somente aos 42 dias.

## **2.3 Resultados**

### *Dinâmica óssea periimplantar*

A representação do *turnover* ósseo periimplantar pode ser observada nas figuras 2A, 2B, 2C e 2D. A precipitação de cálcio na matriz orgânica evidenciou a marcação da fluorescência, tanto pela calceína (coloração esverdeada), quanto pela alizarina (coloração vermelha). As linhas fluorescentes verdes mostram expressão de osso antigo, enquanto as linhas vermelhas de osso novo.

---



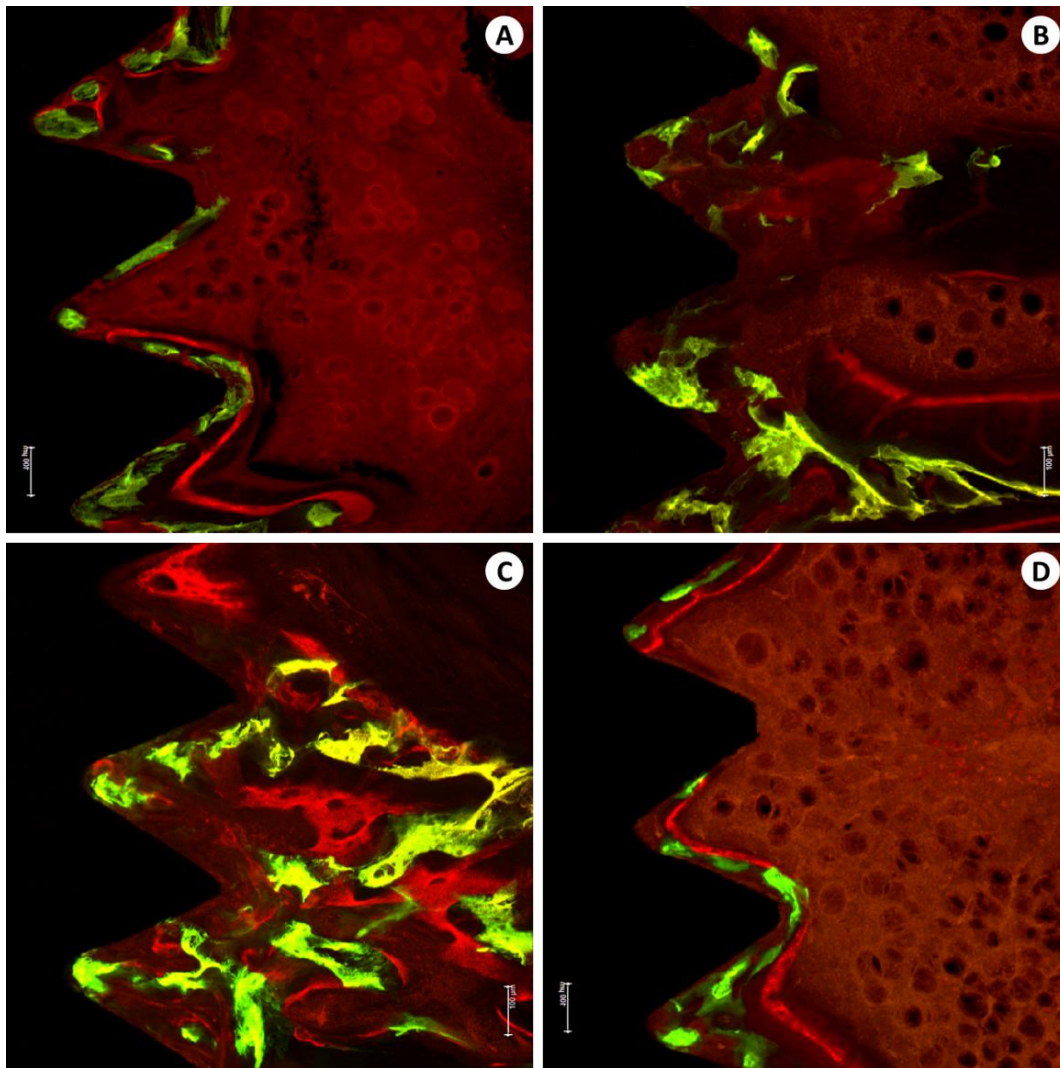


Figura 2 – Marcação das linhas fluorescentes na matriz de cálcio pela calceína (verde) e alizarina (vermelho), evidenciando a dinâmica do osso periimplantar dos grupos experimentais: (A) – SHAM; (B) – OVX; (C) – ALE e (D) – RAL.

A quantificação da taxa de calceína/alizarina (osso antigo/osso novo), por meio do teste estatístico ANOVA a 2 fatores, evidenciou que todas as interações entre os grupos de osteoporose vs fluorocromos mostraram significância estatística (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de p nas interações osteoporose vs fluorocromos pelo teste ANOVA

<b>Fator de Variação</b>	<b>Valores de p</b>
<b>Grupos de osteoporose</b>	0,002
<b>Fluorocromos (vermelho de alizarina ou calceína)</b>	<0,001
<b>Osteoporose vs fluorocromos</b>	<0,001

A análise intragrupos mostrou diferença estatisticamente significante entre as expressões de calceína e alizarina ( $p < 0,001$ , Teste Tukey), sempre com menores valores para a calceína e maiores valores para o vermelho de alizarina (Figura 3).

A maior taxa de renovação óssea periimplantar foi observada nos grupos SHAM e RAL, os quais apresentaram altos valores de alizarina em detrimento da calceína. Estes grupos não evidenciaram diferenças estatísticas, tanto para a calceína ( $p = 0,376$ , Teste Tukey) como para a alizarina ( $p = 0,728$ , Teste Tukey). As interações entre os grupos OVX e ALE também não mostraram significância estatística (calceína –  $p = 0,445$ ; alizarina –  $p = 3,673$ , Teste Tukey), possuindo as menores taxas de renovação óssea. As demais comparações (OVX vs RAL, RAL vs ALE, SHAM vs OVX e SHAM vs ALE) apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ , Teste Tukey) (Figura 4).

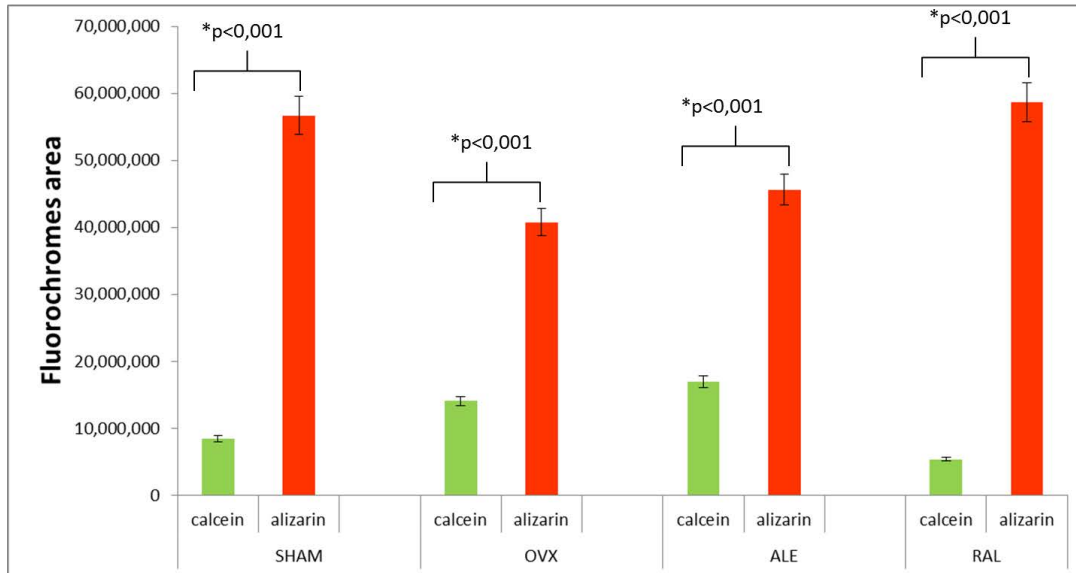


Figura 3 – Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL) pelas expressões de calceína e alizarina. \* $p < 0,05$  (comparações intragrupos com significância estatística).

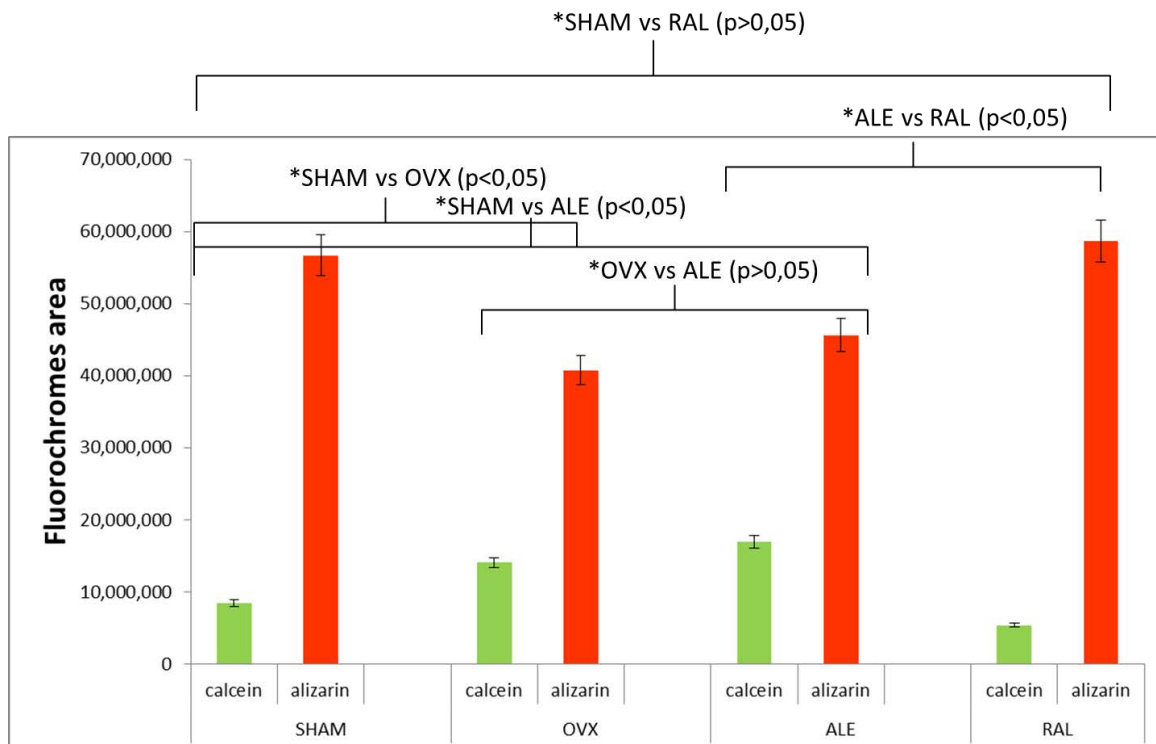


Figura 4 – Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL) pelas expressões de calceína e alizarina. \* $p < 0,05$  (comparações intragrupos com significância estatística).

### *Resultados da Imunomarcção (análise imunoistoquímica)*

Os escores das imunomarcções podem ser visualizados na tabela 2. A análise das imunomarcções mostrou a presença das proteínas estudadas no tecido ósseo formado junto aos implantes instalados. Foi avaliada a presença da osteoprotegerina (OPG) (Figura 5) e RANKL (Figura 6), com o intuito de caracterizar a taxa de remodelação do tecido ósseo, a osteocalcina, caracterizando a taxa de mineralização e a maturidade do tecido ósseo formado e a TRAP, avaliada apenas no período de 42 dias, caracterizando a presença de osteoclastos em atividade de reabsorção do tecido ósseo analisado (Figura 7).

A OPG e RANKL fazem parte da família dos novos membros do fator de necrose tumoral e participam da sinalização das respostas celulares envolvidas na remodelação óssea. A expressão da OPG em comparação a RANKL podem evidenciar uma resposta tecidual tendendo para formação óssea (predomínio da OPG), reabsorção óssea (predomínio da RANKL) ou o equilíbrio na taxa de remodelação óssea (taxas iguais de OPG e RANKL).

Nos grupos experimentais estudados observou-se que a marcação positiva para OPG, apresentou o escore leve (1) aos 14 e 42 dias no grupo SHAM. Já a RANKL neste mesmo grupo apresentou escore moderado a intenso (2 a 3), tanto aos 14 como aos 42 dias. Nos grupos ALE e RAL, tanto para OPG quanto para RANKL apresentaram-se com escore moderado (2). Tanto OPG quanto RANKL apresentaram células da linhagem osteoblástica marcadas positivamente. Discreta marcação positiva para a OPG foi observada também na matriz extracelular do tecido ósseo, considerando a dinâmica desta proteína classificada como um receptor solúvel e que após a sua síntese pelos

---

osteoblastos atravessa a membrana plasmática atuando no ambiente extracelular (Simonet, et al. 1997) (Figuras 5 e 6).

A osteocalcina é a principal proteína não colágena da matriz extracelular do tecido ósseo, caracterizando a etapa da mineralização do tecido ósseo, bem como o seu estágio de maturidade. Nos grupos estudados, mostrou-se com escore moderado (2) aos 14 e 42 dias no grupo SHAM. No grupo OVX também mostrou-se moderada (2). Já no grupo ALE apresentou-se moderada aos 14 dias e leve aos 42 dias. O raloxifeno mostrou um padrão de resposta inversa, apresentando-se leve aos 14 e moderado aos 42 dias. A marcação da osteocalcina mostrou-se presente nas células da linhagem osteoblástica, bem como precipitada na matriz extracelular do tecido ósseo (Figura 8).

A TRAP é uma enzima que caracteriza os osteoclastos em atividade de reabsorção no tecido ósseo. Aos 42 dias, a TRAP mostrou-se moderada (2) no grupo SHAM e intensa no grupo OVX (3). No grupo Ale foi observada marcação leve para TRAP (1) e no grupo RAL, semelhante ao grupo SHAM, foi observada marcação moderada (2) (Figura 7).

---

Tabela 2 – Escores das imunomarcações das proteínas OPG, RANKL, OC e TRAP para os grupos experimentais (SHAM, OVX, ALE e RAL) aos 14 e 42 dias.

Grupos/Período de análise	Escore das proteínas imunomarcadas			
	OPG	RANKL	OC	TRAP
SHAM 14dias	1	2-3	2	-
SHAM 42dias	1	2-3	2	2
OVX 14dias	2	3	2	-
OVX 42dias	1	2	2	3
ALE 14dias	2	2	2	-
ALE 42dias	2	2	1	1
RAL 14dias	2	2	1	-
RAL 42dias	2	2	2	2

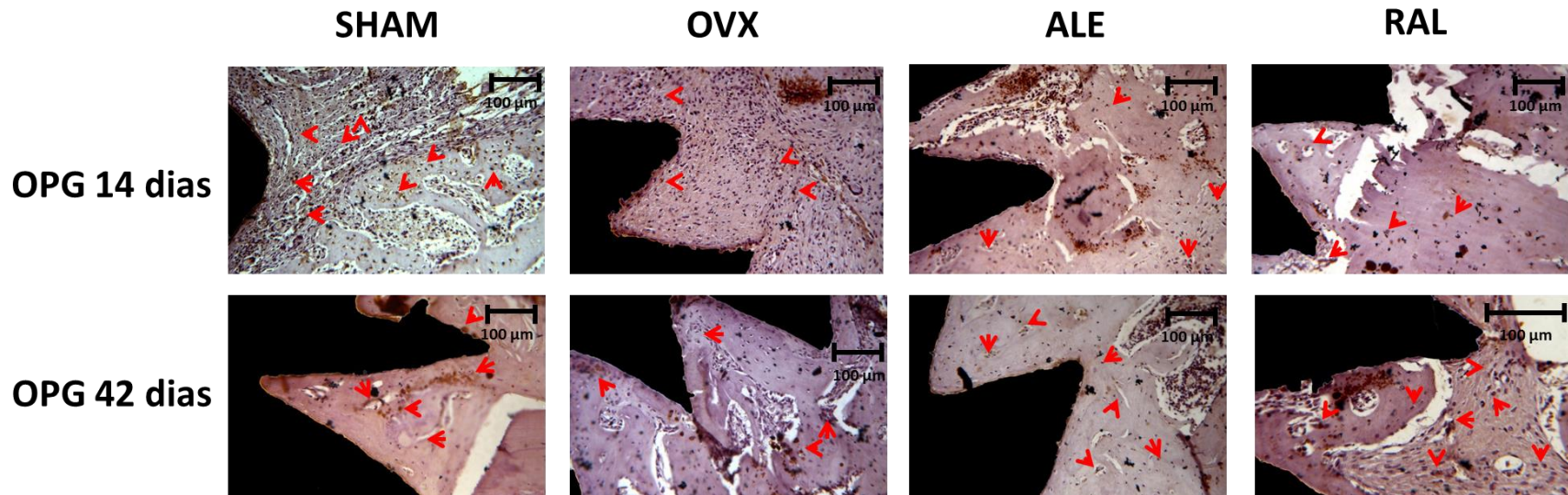


Figura 5 – Imunomarcações de osteoprotegerina (OPG) aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (1), OVX (2), ALE (2) e RAL (2)); 42 dias: SHAM (1), OVX (1), ALE (2) e RAL (2)).

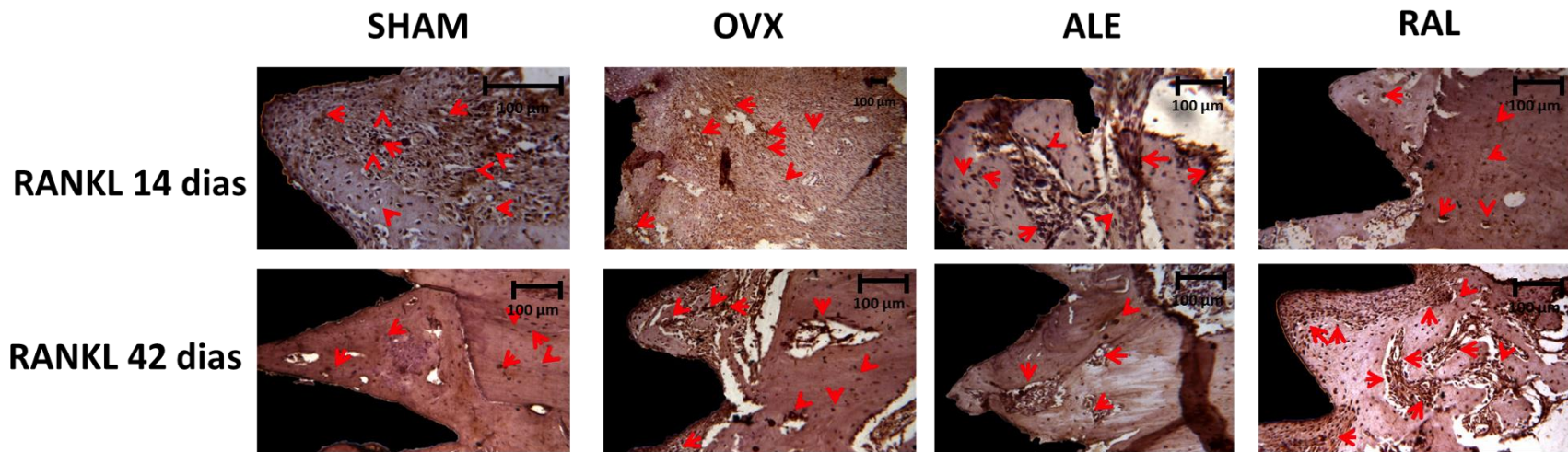


Figura 6 – Imunomarcações de RANKL aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (2-3), OVX (3), ALE (2) e RAL (2); 42 dias: SHAM (2-3), OVX (2), ALE (2) e RAL (2)).



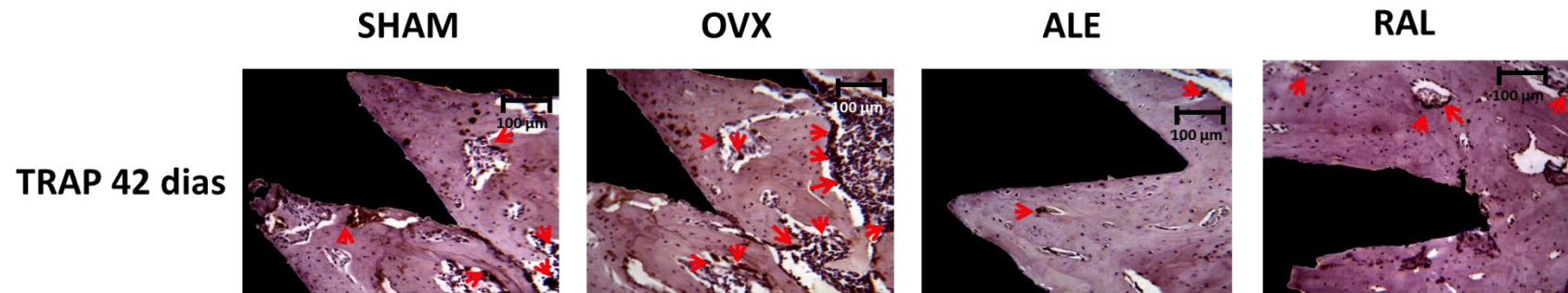


Figura 7 – Imunomarcações de TRAP aos 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (SHAM (2), OVX (3), ALE (1) e RAL (2)).

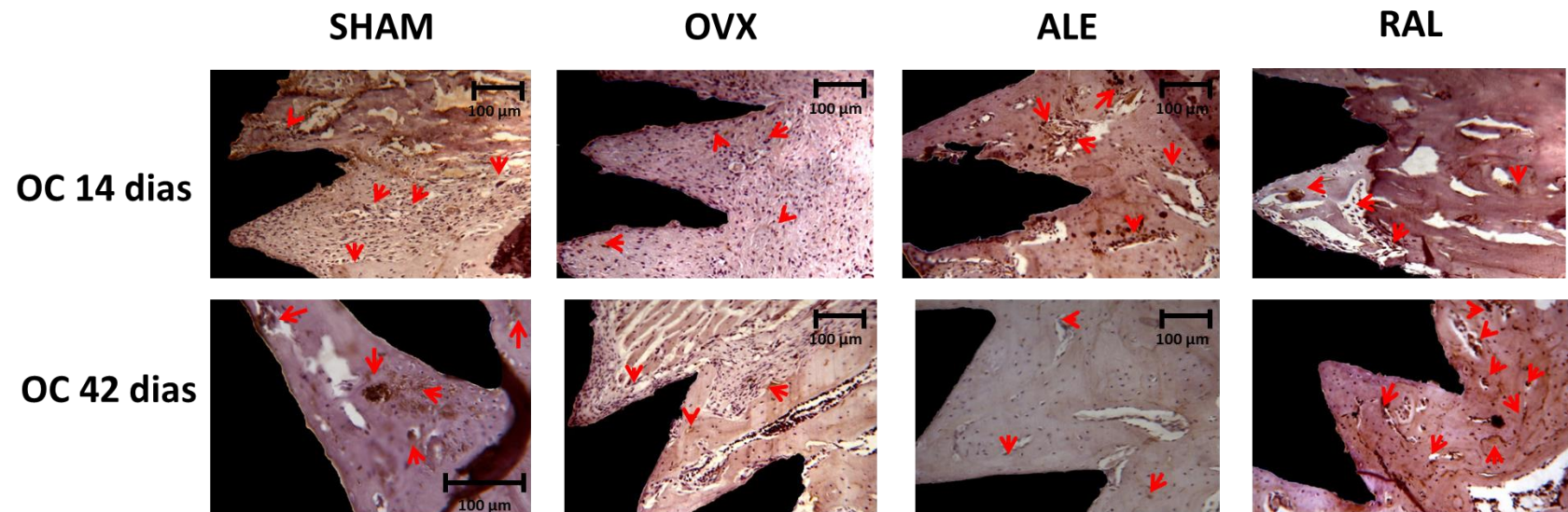


Figura 8 – Imunomarcações de osteocalcina (OC) aos 14 e 42 dias dos grupos de osteoporose (SHAM, OVX, ALE e RAL). Setas indicando a intensidade da marcação (14 dias: SHAM (2), OVX (2), ALE (2) e RAL (1); 42 dias: SHAM (2), OVX (2), ALE (1) e RAL (2)).

---

## 2.4 Discussão

A hipótese dos autores que tanto o alendronato de sódio como o raloxifeno iriam melhorar a dinâmica óssea periimplantar em ratas osteoporóticas foi parcialmente aceita. Isso porque o *turnover* ósseo das ratas tratadas com raloxifeno (RAL) superior às ratas osteoporóticas não tratadas ( $p < 0,05$ , teste Tukey) e, foi similar quando comparado às ratas SHAM ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, o alendronato não foi capaz de reverter a osteoporose induzida no que diz respeito à taxa de remodelação óssea, tendo em vista que apresentou resultados sem diferenças estatísticas quando comparados às ratas osteoporóticas não tratadas (OVX) ( $p > 0,05$ ).

Ficou evidente que o raloxifeno foi capaz de reverter a osteoporose induzida. A ação seletiva nos receptores de estrógeno promoveu uma ativação das Unidades Multicelulares Básicas (BMUs), permitindo que o processo de reabsorção acontecesse, mas fosse compensado pela formação de novo osso, o que pôde ser observado pela redução significativa da presença da calceína (que representa o osso antigo) e o aumento significativo da alizarina ( $p < 0,05$ ), que representa o novo osso formado, mostrando que o *turnover* ósseo ocorreu de maneira satisfatória. Esta resposta também foi observada nas ratas SHAM, mostrando que a resposta do metabolismo ósseo observada após a administração de raloxifeno foi semelhante às respostas esperadas em condições de homeostasia. Estes resultados também foram confirmados pelas imunomarcações das proteínas de forma bastante similar entre estes grupos (SHAM e RAL), tanto nos parâmetros de formação de tecido ósseo (OPG, OC) e maturação óssea (OC), quanto nos parâmetros de reabsorção (RANKL e TRAP).

---

---

Apesar da remodelação do tecido ósseo mostrar-se equilibrada, por meio das expressões de OPG e RANKL nos grupos SHAM e RAL, vale destacar que a OPG é uma proteína solúvel (Simonet, Lacey, Dunstan, Kelley, Chang, Luthy, Nguyen, Wooden, Bennett, Boone, Shimamoto, DeRose, Elliott, Colombero, Tan, Trail, Sullivan, Davy, Bucay, Renshaw-Gegg, Hughes, Hill, Pattison, Campbell, Sander, Van, Tarpley, Derby, Lee & Boyle 1997), o que a torna bastante difícil de ser expressa durante as reações de imunoistoquímica. Portanto, foi observado predomínio da RANKL em relação à OPG. Desta feita, o fato desta proteína apresentar maior escore em função do alendronato e raloxifeno, esclarece que as medicações utilizadas tem algum efeito sobre a disponibilização desta proteína para o meio extracelular e mesmo para a sua síntese na maquinaria intracelular. Já em relação ao aumento expressivo da RANKL e TRAP para o grupo OVX, reafirma a maior osteoclastogênese nesta desordem sistêmica (Luvizuto, Queiroz, Dias, Okamoto, Dornelles, Garcia & Okamoto 2010).

Investigações clínicas, *in vivo* e *in vitro* analisaram o efeito do raloxifeno no sistema imunológico e em marcadores bioquímicos de remodelação óssea, mostrando que esta medicação não afetou negativamente o sistema imune, ativou a via Wnt e foi capaz de aumentar o nível sérico de OPG em humanos (Bodine 2008, Bodine & Komm 2006, Chen, et al. 2007, Galli, et al. 2012, Issack, et al. 2008, Pineda, et al. 2012, Rogers, et al. 2007, Thorfve, et al. 2014). Estes estudos corroboram com os resultados do presente estudo no que se refere ao papel deste medicamento como anti-reabsortivo e na melhora da taxa de remodelação do tecido ósseo periimplantar em ratas osteoporóticas. Vale destacar que o raloxifeno promove a ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, importante cascata sinalizadora que

---

---

culmina com a diferenciação osteoblástica e formação óssea, além disso, foi provado que a  $\beta$ -catenina induz a expressão de OPG auxiliando na remodelação e maturação óssea (Issack, Helfet & Lane 2008, Pineda, Hermenegildo, Tarin, Cano & Garcia-Perez 2012).

Análises histomorfométricas e imunoistoquímicas (expressão de osteocalcina) do reparo alveolar de ratas ovariectomizadas e tratadas com raloxifeno também mostraram superioridade do raloxifeno em comparação aos grupos controles (OVX e SHAM) e em ratas tratadas com reposição de estrógeno (Luvizuto, Dias, Queiroz, Okamoto, Garcia, Okamoto & Dornelles 2010, Luvizuto, Dias, Okamoto, Dornelles & Okamoto 2011), o que também está de acordo com a dinâmica óssea periimplantar deste estudo. A imunomarcagem de osteocalcina por mais que tenha se mostrado presente em todos os períodos analisados e em todos os grupos experimentais, foi expressa precocemente (14 dias) nos grupos SHAM, ALE e RAL. Manteve sua imunomarcagem somente nos grupos SHAM e RAL e, levemente expressa no grupo OVX, corroborando com os estudos anteriormente citados e da superioridade do raloxifeno em relação aos demais grupos.

Em relação ao tratamento da osteoporose induzida com o alendronato de sódio, foi possível observar sua potente ação anti-reabsortiva, por meio da maior expressão de calceína quando comparada aos grupos SHAM e RAL ( $p < 0,05$ ), indicando maior quantidade de osso antigo. E houve menor renovação óssea neste grupo (ALE) e de forma semelhante ao grupo OVX. Este achado mostra que este medicamento além da ação anti-osteoclastogênese, diminui o *turnover* ósseo, o qual implica provavelmente na falha de implantes no longo prazo. Portanto, estudos futuros deverão avaliar esta situação com os implantes sendo submetidos ao carregamento imediato, por meio da indução

---

---

transcutânea de micromovimentos aos implantes instalados em tíbias de ratas (Wazen, Currey, Guo, Brunski, Helms & Nanci 2013).

Outro fator bastante importante a ser ressaltado com os resultados do grupo ALE é a provável explicação da relação do alendronato com a osteonecrose dos maxilares (Petropoulos, et al. 2014, Ruggiero, Dodson, Assael, Landesberg, Marx & Mehrotra 2009). Isso porque durante toda a vida, o esqueleto humano está constantemente em processo de remodelação óssea, tanto pelas alterações sistêmicas, hormonais ou pelos traumas fisiológicos ou reparacionais (Okada & Tanaka 2014). Os autores deste trabalho acreditam que no caso do osso periimplantar, em razão dos microtraumas que ocorrem no longo prazo, pela própria carga oclusal e pela diminuição significativa do balanço reabsorção/neoformação óssea observada com o alendronato, a osteonecrose torna-se mais propensa de ocorrer, independente do período do tratamento reabilitador, antes ou após a instalação dos implantes. Sendo assim, muito provavelmente esta medicação deverá ser desautorizada para o tratamento de pacientes osteoporóticos.

A literatura relaciona maior taxa de falha dos implantes dentários nos pacientes com osteoporose, quando comparada aos pacientes sem alterações na densidade óssea, porém não há diferenças estatisticamente significantes (Busenlechner, Furhauser, Haas, Watzek, Mailath & Pommer 2014, Chen, Liu, Xu, Qu & Lu 2013). Entretanto, os estudos clínicos avaliaram uma porcentagem pequena de pacientes com osteoporose, o que provavelmente pode ter influenciado neste resultado. Estudos futuros deverão acompanhar maior número destes pacientes, inclusive com as medicações utilizadas para

---

---

o tratamento da osteoporose, tais como o raloxifeno, para o estabelecimento de um tratamento padronizado a estes pacientes.

Portanto, conclui-se que:

1 - o raloxifeno melhorou a dinâmica óssea periimplantar de ratas osteoporóticas, indicando-se sua utilização no tratamento da osteoporose.

2 - o alendronato não ocasionou uma dinâmica óssea interessante, pela tendência de diminuir a renovação do tecido ósseo, confirmado pela maior quantidade de calceína e baixa expressão de TRAP.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP (2012/15748-8 e 2012/15912-2), pela concessão de bolsa de doutorado ao autor Ramalho-Ferreira, G; e de um auxílio regular em pesquisa. Ao Centro Integrado de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da senhora Márcia Sirlene Zardin Graeff, pela facilitação na obtenção das imagens por meio da microscopia confocal. E ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, nas pessoas do Prof. Dr. Elcio Marcantonio Júnior e da técnica de laboratório Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda, pela facilitação no processamento laboratorial das peças no EXAKT.

---

---

## 2.5 Referências

Albrektson (1989) The branemark osseointegrated implant. , Chicago: Quintessence.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2004) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* **17**: 536-543.

Atanes-Bonome, P., Atanes-Bonome, A., Rios-Lage, P. & Atanes-Sandoval, A. D. (2014) [bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw]. *Semergen* **40**: 143-148.

Aubin, J. E. & Bonnelye, E. (2000) Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape Womens Health* **5**: 5.

Barrett-Connor, E., Grady, D., Sashegyi, A., Anderson, P. W., Cox, D. A., Hozzowski, K., Rautaharju, P. & Harper, K. D. (2002) Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: Four-year results from the more (multiple outcomes of raloxifene evaluation) randomized trial. *Jama* **287**: 847-857.

Bodine, P. V. (2008) Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Res* **18**: 248-253.

Bodine, P. V. & Komm, B. S. (2006) Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* **7**: 33-39.

Branemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O. & Ohman, A. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* **16**: 1-132.

Burg, M. A., Fraser, K., Gui, S., Grant, K., Kosch, S. G., Nierenberg, B., Oyama, O., Pomm, H., Sibille, K., Spruill, T. & Swartz, V. (2006) Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings following the women's health initiative findings. *J Am Board Fam Med* **19**: 122-131.

---



---

Busenlechner, D., Furhauser, R., Haas, R., Watzek, G., Mailath, G. & Pommer, B. (2014) Long-term implant success at the academy for oral implantology: 8-year follow-up and risk factor analysis. *J Periodontal Implant Sci* **44**: 102-108.

Buser, D., Brogini, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S. G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified sla titanium surface. *J Dent Res* **83**: 529-533.

Chen, H., Liu, N., Xu, X., Qu, X. & Lu, E. (2013) Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: A meta-analysis. *PLoS One* **8**: e71955.

Chen, Y., Whetstone, H. C., Lin, A. C., Nadesan, P., Wei, Q., Poon, R. & Alman, B. A. (2007) Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: Implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* **4**: e249.

da Paz, L. H., de Falco, V., Teng, N. C., dos Reis, L. M., Pereira, R. M. & Jorgetti, V. (2001) Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats *Braz j med biol res*, 1015-1022. Brazil.

Drage, N. A., Palmer, R. M., Blake, G., Wilson, R., Crane, F. & Fogelman, I. (2007) A comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. *Clin Oral Implants Res* **18**: 496-500.

Dvorak, G., Fugl, A., Watzek, G., Tangl, S., Pokorny, P. & Gruber, R. (2012) Impact of dietary vitamin d on osseointegration in the ovariectomized rat. *Clin Oral Implants Res* **23**: 1308-1313.

Ericsson, I., Randow, K., Nilner, K. & Peterson, A. (2000) Early functional loading of branemark dental implants: 5-year clinical follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* **2**: 70-77.

Evans, H. M. & Long, J. A. (1922) Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **8**: 38-39.

---

---

Fujiwara, S., Hamaya, E., Sato, M., Graham-Clarke, P., Flynn, J. A. & Burge, R. (2014) Systematic review of raloxifene in postmenopausal Japanese women with osteoporosis or low bone mass (osteopenia) *Clin Interv Aging*, 1879-1893.

Galli, C., Piemontese, M., Lumetti, S., Manfredi, E., Macaluso, G. M. & Passeri, G. (2012) The importance of wnt pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. *Eur Cell Mater* **24**: 46-59.

Giro, G., Coelho, P. G., Pereira, R. M., Jorgetti, V., Marcantonio, E., Jr. & Orrico, S. R. (2011) The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res* **22**: 259-264.

Glozel, B., Kuchler, U., Watzek, G. & Gruber, R. (2010) Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* **25**: 516-524.

Isidor, F. (2006) Influence of forces on peri-implant bone. *Clin Oral Implants Res* **17 Suppl 2**: 8-18.

Issack, P. S., Helfet, D. L. & Lane, J. M. (2008) Role of wnt signaling in bone remodeling and repair. *Hss j* **4**: 66-70.

Ivanoff, C. J., Hallgren, C., Widmark, G., Sennerby, L. & Wennerberg, A. (2001) Histologic evaluation of the bone integration of tio(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* **12**: 128-134.

Kribbs, P. J. (1990) Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent* **63**: 218-222.

Luvizuto, E. R., Dias, S. M., Queiroz, T. P., Okamoto, T., Garcia, I. R., Jr., Okamoto, R. & Dornelles, R. C. (2010) Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene *Bone*, 1021-1029. United States: 2009 Elsevier Inc.

Luvizuto, E. R., Dias, S. S., Okamoto, T., Dornelles, R. C. & Okamoto, R. (2011) Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol* **56**: 984-990.

---

---

Luvizuto, E. R., Queiroz, T. P., Dias, S. M., Okamoto, T., Dornelles, R. C., Garcia, I. R., Jr. & Okamoto, R. (2010) Histomorphometric analysis and immunolocalization of rankl and opg during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol* **55**: 52-59.

Maihofer, M. (2014) Over-treatment of elderly patients. *J Mich Dent Assoc* **96**: 24, 74.

Manolagas, S. C. & Jilka, R. L. (1995) Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* **332**: 305-311.

Marx, R. E., Cillo, J. E., Jr. & Ulloa, J. J. (2007) Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: Risk factors, prediction of risk using serum ctx testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* **65**: 2397-2410.

Menassa, M., de Grandmont, P., Audy, N., Durand, R., Rompre, P. & Emami, E. (2014) Patients' expectations, satisfaction, and quality of life with immediate loading protocol. *Clin Oral Implants Res.*

Munoz-Torres, M., Reyes-Garcia, R., Mezquita-Raya, P., Fernandez-Garcia, D., Alonso, G., Luna Jde, D., Ruiz-Requena, M. E. & Escobar-Jimenez, F. (2009) Serum cathepsin k as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas* **64**: 188-192.

Okada, Y. & Tanaka, Y. (2014) [updates on lifestyle-related diseases and bone metabolism. Bisphosphonates for lifestyle-related disease]. *Clin Calcium* **24**: 1689-1694.

Ozawa, S., Ogawa, T., Iida, K., Sukotjo, C., Hasegawa, H., Nishimura, R. D. & Nishimura, I. (2002) Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: Histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone* **30**: 137-143.

Petropoulos, V. C., Balshi, T. J., Wolfinger, G. J. & Balshi, S. F. (2014) Treatment of a patient with implant failure and jaw osteonecrosis: Successful retreatment using implants. *J Oral Implantol.*

---

---

Pineda, B., Hermenegildo, C., Tarin, J. J., Cano, A. & Garcia-Perez, M. A. (2012) Effects of administration of hormone therapy or raloxifene on the immune system and on biochemical markers of bone remodeling. *Menopause* **19**: 319-327.

Prestwood, K. M. & Kenny, A. M. (1998) Osteoporosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment in older adults. *Clin Geriatr Med* **14**: 577-599.

Ravald, N., Dahlgren, S., Teiwik, A. & Grondahl, K. (2012) Long-term evaluation of astra tech and branemark implants in patients treated with full-arch bridges. Results after 12-15 years. *Clin Oral Implants Res*.

Rogers, A., Clowes, J. A., Pereda, C. A. & Eastell, R. (2007) Different effects of raloxifene and estrogen on interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist production using in vitro and ex vivo studies. *Bone* **40**: 105-110.

Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Assael, L. A., Landesberg, R., Marx, R. E. & Mehrotra, B. (2009) American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J* **35**: 119-130.

Shapurian, T., Damoulis, P. D., Reiser, G. M., Griffin, T. J. & Rand, W. M. (2006) Quantitative evaluation of bone density using the hounsfield index. *Int J Oral Maxillofac Implants* **21**: 290-297.

Sigua-Rodriguez, E. A., da Costa Ribeiro, R., de Brito, A. C., Alvarez-Pinzon, N. & de Albergaria-Barbosa, J. R. (2014) Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A review of the literature. *Int J Dent* **2014**: 192320.

Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W. J. (1997)

---

---

Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309-319.

Tabata, L. F., Rocha, E. P., Barao, V. A. & Assuncao, W. G. (2011) Platform switching: Biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* **26**: 482-491.

Tavares, M. G., de Oliveira, P. T., Nanci, A., Hawthorne, A. C., Rosa, A. L. & Xavier, S. P. (2007) Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with h<sub>2</sub>so<sub>4</sub>/h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis *Clin oral implants res*, 452-458. Denmark.

Teofilo, J. M., Azevedo, A. C., Petenusci, S. O., Mazaro, R. & Lamano-Carvalho, T. L. (2003) Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats *Pesqui odontol bras*, 302-306. Brazil.

Teofilo, J. M., Brentegani, L. G. & Lamano-Carvalho, T. L. (2004) Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol* **49**: 755-762.

Thorfve, A., Lindahl, C., Xia, W., Igawa, K., Lindahl, A., Thomsen, P., Palmquist, A. & Tengvall, P. (2014) Hydroxyapatite coating affects the wnt signaling pathway during peri-implant healing in vivo. *Acta Biomater* **10**: 1451-1462.

Wazen, R. M., Currey, J. A., Guo, H., Brunski, J. B., Helms, J. A. & Nanci, A. (2013) Micromotion-induced strain fields influence early stages of repair at bone-implant interfaces. *Acta Biomater* **9**: 6663-6674.

Wennerberg, A. & Albrektsson, T. (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res* **20 Suppl 4**: 172-184.

Wennerberg, A. & Albrektsson, T. (2011) Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil* **38**: 286-294.

---

---

Xavier, S. P., Carvalho, P. S., Beloti, M. M. & Rosa, A. L. (2003) Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments *J dent*, 173-180. England.

Yamazaki, M., Shirota, T., Tokugawa, Y., Motohashi, M., Ohno, K., Michi, K. & Yamaguchi, A. (1999) Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **87**: 411-418.

Yao, J., Tang, H., Gao, X. L., McGrath, C. & Mattheos, N. (2014) Patients' expectations to dental implant: A systematic review of the literature. *Health Qual Life Outcomes* **12**: 153.

Yoshimura, N., Muraki, S., Oka, H., Mabuchi, A., En-Yo, Y., Yoshida, M., Saika, A., Yoshida, H., Suzuki, T., Yamamoto, S., Ishibashi, H., Kawaguchi, H., Nakamura, K. & Akune, T. (2009) Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in japanese men and women: The research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* **27**: 620-628.

---

---

## 2.6 Anexo C- Normas para publicação do periódico “Clinical Oral Implants Research”

### Author Guidelines

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

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Clinical Oral Implants Research, Author Services, Wiley-Blackwell’s Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

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

### 1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

---

---

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

## 2. ETHICAL GUIDELINES

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

### 2.1. Authorship and Acknowledgements

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

*Clinical Oral Implants Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the

---



---

article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

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

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

## 2.2. Ethical Approvals

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

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

## 2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

---

---

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

#### 2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

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

#### 2.5 Appeal of Decision

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

#### 2.6 Permissions

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

#### 2.7 Copyright Assignment

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

---

---

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](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](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

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

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

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

## 2.8 OnlineOpen

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

---

---

deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

[http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)

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

[https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

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

### 3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: [coir@zmk.unibe.ch](mailto:coir@zmk.unibe.ch)

#### 3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
  - If you are creating a new account.
    - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
    - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
    - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
-

- 
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
  - Log-in and select Corresponding Author Center.

### 3.2. Submitting Your Manuscript

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

### 3.3. Manuscript Files Accepted

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

### 3.4. Blinded Review

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

### 3.5. Suggest a Reviewer

---

---

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

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

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

### 3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

### 3.8. Manuscript Status

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

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

---

---

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

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

### 5.2. Format

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

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

---

---

are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

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

## 5.2. Structure

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

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

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

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

---



---

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

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

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

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

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

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

### 5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

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

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

---

---

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

(i) for journal references:

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

(ii) for book references:

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

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

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

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

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

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

Examples:

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

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

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

#### 5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

---

---

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; 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](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

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

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

#### 6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

#### 6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to

---

---

register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including.

---