

Fabio Pantani

Avaliação do padrão de reparação óssea ao redor de implantes submersos.

Estudo experimental em cães

Araçatuba – 2011

Fabio Pantani

Avaliação do padrão de reparação óssea ao redor de implantes submersos.

Estudo experimental em cães

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, para obtenção do Grau de “Doutor em Odontologia” – Área de Concentração Implantodontia.

Orientador: Prof.Adj. Idelmo Rangel G.Junior.

Co-orientador: Daniele Botticelli

Araçatuba - 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Pantani, Fabio.
P197a Avaliação do padrão de reparação óssea ao redor de
implantes submersos. Estudo experimental em cães /
Fabio Pantani. - Araçatuba : [s.n.], 2011
79 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior
Co-orientador: Daniele Botticelli

1. Experimentação animal 2. Implantes dentários
3. Regeneração óssea 4. Cães

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Spartaco** e **Paola** , minhas raízes,

Aos meus irmãos **Leonardo** e **Paolo**, os galhos (ramos) desta mesma árvore,

Aos meus filhos **Marco** e **Francesca**, meus frutos,

A **Teresa** minha companheira.

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** não só pela minha orientação, mas também por ter sido um amigo que permitiu que eu alcançasse esse objetivo.

Ao Prof. Dr. **Daniele Botticelli**, meu amigo e companheiro, com quem compartilhei as alegrias e dificuldades encontradas durante a realização desta etapa da minha vida. Agradeço pela paciência demonstrada durante esses anos.

Ao Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi** e sua esposa **Isabel Cristina Poi**, pessoas especiais das quais tenho orgulho de considerá-los amigos.

Aos meus avós, “in memoriam”.

A minha tia **Cesarina** e a todos os meus parentes.

A **Claudio e Romano**, “in memoriam”, dois amigos inesquecíveis.

A **Walter Spezi**, amigo especial e meu primeiro mestre em odontologia.

A **Antonio Renzi** e **Gianfranco Cesaretti**, meus amigos e mestres em prótese e ortodontia.

Aos amigos do curso de doutorado em Implantodontia: **Alessandro Scala**, **Enzo de Santis**, **Fabio Rossi**, **Gabriele Baffone** e **Marco Caneva**, amigos com os quais compartilhei momentos inesquecíveis.

Ao Prof.Dr. **Roberto Almeida de Azevedo**, meu primeiro mestre em cirurgia, amigo fraterno, com o qual comecei a minha aventura odontológica no Brasil.

Aos professores **Bráulio Carneiro Junior** e **André Sampaio Souza**, grandes amigos e colaboradores nos meus cursos de implantodontia.

Ao Prof. Dr. **Ulisses Tavares da Silva Neto** grande amigo e mestre de cirurgia e implantodontia.

A **Luigi Ciccarelli** parceiro, amigo fraterno e insubstituível a quem dedico o meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP**, sob direção do Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e vice direção da Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pires Soubhia, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos **COORDENADORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Dra. Maria José Hitomi Nagata** e **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**.

Ao Prof.Dr.**Américo de Oliveira** pela cortesia e ajuda no trabalho de pesquisa.

A Prof^a Dr^a. **Natasha Magro Ernica** pela grande atenção com que corrigiu este trabalho.

A Prof^a Dr^a.**Jéssica Lemos Gulinelli** pelo carinho com que elaborou as considerações para aprimorar meu trabalho.

Ao Prof. Dr. **Luiz Antonio Salata** por sua colaboração no processamento histológico.

A **Claudia Mizue Kanno** e Prof. Dr.**Roberta Okamoto** pela colaboração nas pesquisas experimentais.

Ao Prof.Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** pela oportunidade, empenho, receptividade e orientações prestadas durante esse período.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA BIBLIOTECA**: Cláudio, Fernando, Ivone, Junior, Izamar, Luzia, Cláudia e Maria Cláudia pela disponibilidade e carinho.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA PÓS-GRADUAÇÃO**: Diogo, Marina e Valéria, pela paciência, disponibilidade, alegria e admirável interesse em nos ajudar sempre.

A meu tio **Cesare Bronzetti** por sua colaboração que nos permitiu a realização de nossas pesquisas experimentais em animais.

A **Flávia Priscila Pereira** nossa amiga e colaboradora insubstituível.

A todos os **colegas do mestrado e doutorado** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.

Aos **estagiários** do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.

Ao **Camilo, Odair e João** por seu trabalho nas etapas experimentais desta pesquisa.

Aos Prof(s). Dr(s).da Disciplina de Clínica Integrada da FOA-UNESP: **Wilson Roberto Poi, Sônia Regina Panzarini Barioni, Celso Koogi Sonoda, Daniela Atili Brandini, Denise Pedrini Ostini, José Carlos Monteiro de Castro** pela amizade, harmonia de trabalho compartilhando conhecimentos e filosofias.

Aos Prof(s). Dr(s).da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da FOA-UNESP: **Alessandra Marcondes Aranega, Michel Saad Neto, Osvaldo Magro Filho, Ana Paula Farnezi Bassi, Daniela Ponzoni.**

À funcionária **Cleide Lemes da Silva** pelo carinho e alegria.

Ao **Carlos**, por sua cortesia e serviços prestados.

Ao veterinário **Murilo Rodrigues**, por sua ajuda profissional e paciência.

Aos animais que sublimaram a própria vida por um bem maior.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Epígrafe

*“Nel mezzo del cammin di nostra vita
Mi ritrovai per una selva oscura
Che La diritta via era smarrita...”*

*Dante Alighieri
Divina commedia
Inferno canto I*

*“A l'alta fantasia qui mancò possa;
Ma già volgeva il mio disio e 'l velle,
sì come rota ch'igualmente è mossa
l'amor che move il sole e l'altre stelle.”*

*Dante Alighieri
Divina commedia
Paradiso canto 33*

RESUMO

Resumo

PANTANI, F. Avaliação do padrão de reparação óssea ao redor de implantes submersos: estudo experimental em cães [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2011.

Objetivo: estudar as fases iniciais da regeneração óssea de implantes instalados sobre a crista óssea alveolar desdentada. **Material e Métodos:** Em 12 cães labradores, foram extraídos bilateralmente todos os pré-molares inferiores e primeiros molares. Após 3 meses de regeneração, foi realizada a incisão sobre o rebordo alveolar desdentado do lado direito da mandíbula e descolamento do retalhos de espessura total. Foram instalados dois implantes e finalizado com a suturas dos retalhos para permitir a regeneração totalmente submersa. Posteriormente, foram realizados os mesmos procedimentos experimentais no lado esquerdo da mandíbula. Os sacrifícios dos animais foram planejados de forma a obter biópsias com pós-operatórios de 5, 10, 20 e 30 dias. Um implante de cada lado da mandíbula foi processado laboratorialmente para cortes histológicos em tecido mineralizado (inclusão em resina) e outro para cortes histológicos em tecido desmineralizado (inclusão em parafina). **Resultados:** Foi observada apenas uma reação celular importante ao redor do implante no compartimento da medula óssea. Observou-se a formação de matriz óssea provisória e, posteriormente, osso esponjoso ao redor e em contato com o implante. O contato osso-implante melhorou durante os períodos de regeneração avaliados. **Conclusão:** Com este estudo pode-se mostrar que a preparação do sítio cirúrgico e a instalação do implante produziram reação

celular evidente no osso circunjacente. No compartimento da medula óssea, a aposição de matriz óssea provisória e formação de osso esponjoso ocorreram seqüencialmente durante o primeiro mês de pós- operatório. Na região em que o osso apresentou contato com a superfície do implante, os processos de remodelação óssea (reabsorção e aposição óssea) ocorreram através da intervenção das BMUs (Bone Multicellular Units)

Palavras-chave: estudo animal, reparo ósseo, implantes orais, histometria.

ABSTRACT

Abstract

PANTANI, F. Bone healing pattern around submerged implants: an experimental study in dogs. [Thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2011.

Objective: the purpose of the present study was to evaluate the early phases of bone response to implants installed in edentulous alveolar bony crest. **Material &**

Method: In 12 Labrador dogs, all mandibular premolars and first molars were extracted bilaterally. After 3 months of healing, full-thickness flaps were elevated in the edentulous region of the right side of the mandible. Two implants were installed and the flaps were sutured to allow a fully-submerged healing. The experimental procedures were subsequently performed in the left side of the mandible. The timing of the experiments and sacrifices were planned in such a way to obtain biopsies representing the healing after 5, 10, 20, 30 days. One implant from each side of the mandible was processed for ground sections and the other for paraffin sections. **Results:** only an important cellular reaction was observed around the implant in the bone marrow compartment. Provisional matrix and, subsequently, woven bone were formed around and in contact with the implant. Bone-to-implant contact improve duign the healing period.

Conclusions: In conclusion, the present experiment showed that site preparation and implant placement produced an evident cellular reaction within the surrounding bone. In the bone marrow compartment, provisional matrix apposition and woven bone formation occurred sequentially during the first month of healing. Where mineralized bone was in contact with the implant

surface, bone remodeling processes (bone resorption and apposition) occurred through the intervention of BMUs (Bone Multicellular Units)

Key Words: animal study, bone healing, oral implants, histometry.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Situação clínica após a instalação do implante.....	54
Figura 2: Pontos de referência para avaliação histométrica IS =ombro do implante; B = ponto de contato-osso-implante mais coronáriu; C =topo dacrista óssea.....	54
Figura 3: Regeneração aos 5 dias.Infiltrado celular ao redor do implante, localizado na região de osso medular. Aumento original (12X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....	55
Figura 4: Regeneração aos 5 dias. (A) identificação de resíduos de coágulo e partículas de osso. Células inflamatórias, bem como células semelhantes a fibroblastos estavam presentes. (B) Após 5 dias de cocatrização, foi encontrada uma formação inicial de tecido ósseo inicial, circundada por uma matriz provisória de tecido conjuntivo.....	56
Figura 5: Regeneração aos 10 dias.O infiltrado celular ao redor do implante apresenta-se gradualmente substituído por osso recém-formado. Aumento original (12X).Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....	57
Figura 6: Regeneração aos 10 dias. (A) ostens Primário, delimitado pelo tecido ósseo, revestido por osteoblastos que se localizam em íntimo contato com a superfície do implante. (B) evidência do tecido ósseo em contato com a	

superfície do implante. Aumento Original (200X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....58

Figura 7: Regeneração aos 20 dias. Infiltrado celular ao redor do implante quase que completamente substituído por osso esponjoso, circundando as roscas do implante. Aumento original (X12). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....59

Figura 8: Regeneração aos 20 dias. (A) Na porção cortical do local do implante, observou-se a neoformação óssea a partir do osso remanescente, junto à superfície do implante. (B) A região da medula óssea continha osso esponjoso, envolvendo áreas ocupadas por uma medula óssea primitiva. Aumento original (X100). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....60

Figura 9: Regeneração aos 30 dias. Roscas do implante circundadas por osso neoformado na fase de remodelação. Aumento original (X120). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....61

Figura 10: Regeneração aos 30 dias. (A) A zona cortical mostrou um alto contato de osso neoformado à superfície do implante. (B) Na região da medula óssea foi encontrado um elevado grau de contato com o implante. Aumento original (X100). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.....62

Figura 11: Regeneração aos 5 dias. (A) o osso esponjoso foi observado, algumas vezes ligado à superfície do implante. Lacunas de Howship no processo de reabsorção do osso remanescente. Ampliação original 200X. (B) Resíduos de partículas de osso, incluídos em uma matriz de tecido conjuntivo que continha algumas células inflamatórias bem como vasos e células pré-

fibroblásticas. Aumento original (X400) (C)Osteons primitivos primários formando nesta fase. Aumento original (X400). Hematoxilina e eosina (H.E).....63

Figura 12: Regeneração aos 10 dias. (A) Osso imaturo que aparenta estar integrado a superfície do implante e uma grande quantidade de osso medular, observados neste período. Aumento original 40X. (B) Maior aumento da área indicada em (A) Aumento original (X200). Hematoxilina e eosina (H.E).....64

Figura 13: Regeneração aos 20 dias (A) Neoformação óssea aderida à superfície do implante e observação de osso medular imaturo. Aumento original(40X). (B) Maior aumento na área indicada em (A). Aumento original (X100). Hematoxilina e eosina (H.E).....65

Figura 14: Regeneração aos 30 dias. (A) Osso maduro observado no contato com a superfície. Uma maior osso medular. Foi observado uma maior quantidade de osso medular neste período de observação. Aumento original (200X). (B) Um número elevado de BMUs e osso neoformado. Ampliação original (200X). Hematoxilina e eosina (H.E)66

Figura 15: Gráfico representando a distância entre o ombro do implante (IS) e o contato osso-implante mais coronal (B) faces vestibular e lingual. As diferenças entre os vários tempos de regeneração não foram estatisticamente significativa.....67

Figura 16: Gráfico representando a distância entre o ombro do implante(IS) e a crista óssea(C) faces vestibular e lingual. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de regeneração.....68

Figura 17: Porcentagem de contato osso-implante nos diversos tempos de análise. Apenas entre 5 e 30 dias houve diferenças estatisticamente significativa69

Tabela 1 Mensurações histomorfométricas após os diferentes períodos de regeneração.....70

LISTA DE SIGLAS

B - contato osso-implante na região mais coronal do implante

BIC – Contato osso-implante

BMUs - Bone Multicellular Units (unidade osteo remodeladora)

C - topo da crista óssea adjacente

IS - ombro do implante cilíndrico

OC - contorno externo da crista óssea alveolar

PMNs - polimorfonucleares

S - superfície do implante na face vestibular na parte superior das roscas

LISTA DE SÍMBOLOS

%- por cento

μm – micrômetro

kg – quilograma

mg – miligrama

ml - mililitro

mm - milímetros

mm^2 – milímetros quadrados

SUMÁRIO

Resumo	14
Abstract	17
1. Introdução	27
2. Material e métodos	32
3. Resultados	37
4. Discussão	42
5. Conclusão	49
6. Referências	51
7. Figuras	54
8. Anexos	72

INTRODUÇÃO

Introdução

A osseointegração de implantes instalados na crista óssea alveolar é essencial para permitir a instalação de próteses dentárias funcionais que substituam os elementos dentários perdidos (Adell et al. 1981).

Foi demonstrado que a superfície do implante desempenha um papel importante, especialmente durante as fases iniciais do processo da osseointegração (Albrektsson et al. 2008). Estudos demonstram que as superfícies rugosas apresentam um maior potencial de regeneração em comparação às superfícies lisas ou polidas (Wennerberg&Albrektsson 2009).

Em um estudo recente (Lang et al. 2011), foram colhidas biópsias de voluntários humanos contendo implante e seus tecidos duros circunjacentes em diferentes períodos pós operatórios. Foi observado que a porcentagem de osso neoformado em contato com a superfície do implante aumentou com o tempo, iniciando-se logo após a primeira semana (<10%) e atingindo o grau máximo após a sexta semana (60%).

As fases iniciais da osseointegração foram descritas em experimentos com cães (Berglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004, Buser et al. 2004), os quais apresentavam implantes com defeitos ósseos peri-implantares. Observou-se que os defeitos foram preenchidos por coágulo, seguido pela formação de um tecido neoformado reparacional (tecido de granulação) composto por células polimorfonucleares. Posteriormente, foram encontrados fibroblastos envolvidos por uma matriz provisória de tecido conjuntivo formando um

arcabouço para a formação do tecido ósseo esponjoso. Após uma semana, o osso recém-formado apresentou-se em íntimo contato com a superfície rugosa dos implantes, aumentando os níveis de osseointegração com o passar do tempo até o final do experimento (12 semanas). Por outro lado, quando o osso remanescente apresentou-se inicialmente em contato com a superfície do implante, primeiramente ocorreu o processo de reabsorção para posteriormente ocorrer a neoformação óssea junto à superfície remodelada.

É evidente que o processo de osseointegração já foi intensamente estudado, no entanto, são escassos os relatos sobre os fenômenos biológicos que ocorrem no tecido ósseo ao redor dos implantes.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo desse experimento foi estudar as fases iniciais do reparo ósseo para a osseointegração em implantes instalados no osso alveolar.

MATERIAL E

MÉTODO

Material e Métodos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética e experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, São Paulo, Brasil.

Procedimentos clínicos

Para este estudo foram utilizados doze cães Labradores (com peso variando de 25 a 28 kg e idade média de 2 anos). Previamente aos procedimentos cirúrgicos os animais foram pré-anestesiados com Acepran[®] (0,05 mg / Kg Univet-Vetnil, São Paulo, Brasil), sedados com Zoletil[®] 10 mg / Kg (Virbac,UA) e Xilazina[®] (1 mg / Kg Cristália, São Paulo, Brasil), complementado com Ketamina[®], (1/4 da dose de 10 mg / Kg, Cristália, São Paulo, Brasil). Durante toda a cirurgia, os animais foram mantidos com infusão intravenosa de solução salina estéril.

Após antissepsia e anestesia local, foi realizada a extração de todos os pré-molares inferiores e primeiros molares. Três meses após as exodontias, realizou-se uma incisão sobre a crista alveolar na região de pré-molar à molar do lado direito da mandíbula. O retalho mucoperiosteal de espessura total foi descolado, expondo o tecido ósseo do rebordo alveolar, onde foram preparados dois sítios experimentais. A preparação cirúrgica dos sítios foi realizada de acordo com as especificações do sistema de implantes adotado (Suedew & Martina, Due Carrare, Padova, Itália). Foram usadas a sequência de fresas indicada pelo fabricante para preparar a área receptora, sendo a fresa de 2,8 mm diâmetro a última a ser usada. Foram instalados implantes cilíndrico de 10 mm de comprimento e 3,3 mm de largura (Premium[™], Suedew & Martina), posicionando o ombro do implante ao mesmo nível da crista óssea alveolar

vestibular. O retalho foi reposicionado e suturado para permitir a regeneração totalmente submersa.

Em todos os cães, também foram realizados os mesmos procedimentos experimentais no lado esquerdo da mandíbula. O momento da segunda cirurgia (lado esquerdo) e dos sacrifícios foram planejados de forma a se obter biópsias que representassem os períodos de regeneração de 5, 10, 20 e 30 dias.

Após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam suplemento vitamínico (Potenay ®, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, Brasil), drogas anti-inflamatória/analgésica (Banamine ®, Schering-Plough Animal Health, Campinas, Brasil) e antibiótico (Pentabiótico ®, Fort Dodge Saúde animal, Campinas, Brasil).

Os animais foram mantidos em canis localizados no biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, com livre acesso à água e ração canina equilibrada e umedecida. Foram realizadas as inspeções diárias das feridas com o intuito de observar possíveis sinais clínicos de alguma complicação pós-operatória, assim como para a realização da área cirúrgica. Os animais foram eutanasiados com overdose de Tiopental ® (CristáliaLtd., Campinas, Brasil).

Preparo histológico

Após a eutanásia dos animais, foram obtidas as peças que consistiam de blocos ósseos individuais contendo o implante e os tecidos moles circunjacentes. Estes blocos foram fixados em solução de formaldeído 4%. A amostra mais distal de cada lado da mandíbula foi usada para cortes histológicos em tecido mineralizado (resina) e a amostra mesial foi usada para cortes histológicos em tecido desmineralizado (parafina).

As amostras selecionadas para este artigo foram desidratadas em uma série de soluções de etanol e finalmente incluídas em resina (LR White® hard grade, London ResinCompanyLtd, Berkshire, Reino Unido). Os blocos foram cortados no sentido vestibulo-lingual, seguindo o longo eixo dos implantes, usando uma lâmina de corte de diamante instalada em uma máquina de alta precisão (Microslice 2™, Ultratec, Santa Ana, CA, USA). Foi obtido um corte da região central que foi polido manualmente e reduzido a uma espessura de aproximadamente 30 µm de espessura. As lâminas histológicas foram coradas com Azul de Stevenel e vermelho de alizarina as quais foram analisadas em microscópio de luz padrão para análise histomorfométrica.

As amostras selecionadas para cortes em tecido desmineralizado foram descalcificadas em EDTA, após o término dessa etapa os implantes foram separados dos tecidos adjacentes. Foram realizados secções paralelo ao longo eixo do implante, obtendo-se duas partes, uma vestibular e outra lingual. As peças foram desidratadas em uma sequência de álcool e incluídas em parafinas para obtenção de cortes de 5 µm, que foram coradas em hematoxilina e eosina (H.E.) para análise histológica, da porção central de cada parte seccionada.

Análise histológica

Com auxílio de um microscópio de luz padrão Nikon Eclipse 50i (Nikon Corporation, Tokio, Japão) com objetiva de 100X, e conectado a uma câmera fotográfica digital (Digital Sight DS-2Mv, Nikon) e a um computador, as seguintes marcações foram identificadas para os cortes histológicos em tecido mineralizado

(Fig.2): ombro do implante cilíndrico (IS), contato osso-implante na região mais coronal do implante (B), topo da crista óssea adjacente (C), superfície do implante na face vestibular, na parte superior das roscas (S), contorno externo da crista óssea alveolar (OC).

Foram realizadas as seguintes medidas (Fig. 2): distância vertical entre IS e C (IS-C) e entre IS e B (IS-B); quantidade de contato osso-implante (% BIC) entre B e a margem mais apical do implante.

A dimensão do infiltrado celular/ osso neoformado ao redor dos implantes também foi medida em seis sítios: dois de cada lado do implante (no meio e no terços apicais) e dois no ápice (nas margens). Foram calculadas as médias das seis medidas.

A porcentagem de osso mineralizado na área da superfície do implante (S) à linha paralela, à distância de aproximadamente de 1 mm da superfície, também foi determinada entre a base do pescoço do implante até o final da última rosca da superfície lateral. Foi sobreposta uma grade (densidade 50 μm) sobre esta área tecidual (ampliação 200x) para as mensurações nos pontos determinados. Esta avaliação foi executada nos cortes parafinados também. Foram calculadas as média entres as duas medidas da porcentagem de osso mineralizado para cada animal e depois para cada período de reparo

Análise estatística

Para cada variável, foram calculadas as médias, desvio-padrão a 25%, 50% (mediana) e 75 %. As variáveis primárias foram IS-B e %BIC e mineralização. Foram analisadas as diferenças entre os períodos de regeneração usando o Wilcoxon

signedrank test utilizando o PASW Statistics 18 (SPSS Inc. Chicago IL, EUA), com nível de significância fixado em $\alpha \leq 0,05$.

RESULTADOS

Resultados

Todos os implantes instalados para cortes histológicos em resina apresentaram-se osseointegrados, para todos os períodos avaliados. Um implante do período de 5 dias pós-operatórios para cortes em parafina não se integrou ao tecido ósseo e foi excluído da análise, obtendo-se um n=5.

Avaliação histológica dos cortes em resina

Aos 5 dias pós-operatórios (Figs. 3,4) observou-se uma resposta celular composta por eritrócitos, alguns polimorfonucleares (PMNs) e uma grande quantidade de células semelhantes a fibroblastos ao redor do corpo dos implantes. Este infiltrado celular ocupou apenas os espaços medulares enquanto que o compartimento de tecido ósseo mineralizado apresentou-se praticamente desprovido dessas células. Já nesta fase foi possível visualizar osso recém-formado e remanescente de tecido ósseo, especialmente ao redor da porção apical do implante. Aos 10 dias pós-operatórios (Fig. 5,6) o infiltrado celular ainda estava presente, ocupando um espaço de dimensões inferiores ao período anterior. Observou-se uma resposta celular composta predominantemente de uma matriz provisória, ocupada por células semelhantes a fibroblastos. No entanto, uma maior quantidade de tecido ósseo estava presente parcialmente ligado à superfície do implante, formando osteons primários revestidos por osteoblastos. Aos 20 dias pós-operatórios (Fig. 7,8), a maior parte da área composta por infiltrado celular observada no período anterior já se apresentava substituída por osso neoformado, observando-se então uma menor área de infiltrado inflamatório em comparação com os períodos analisados anteriormente. Aos 30 dias

pós-operatórios (Fig. 9,10), o osso neoformado apresentava-se mais denso. Em alguns espécimes, o osso que circundava o implante apresentou-se mais maduro.

Medidas histológicas dos cortes em resina (Tabela 1).

As distâncias IS-B e IS-C (Figs. 15,16) foram semelhantes nos períodos avaliados. A porcentagem de contato osso-implante foi de $21,0 \pm 6,7\%$ ao 5 dias pós-operatórios (Fig. 17). Esta porcentagem aumentou com o tempo, atingindo o valor de $47,5 \pm 9,5\%$ aos 30 dias pós-operatórios. Uma tendência semelhante foi encontrada para o grau de mineralização ao redor dos implantes. Verificou-se um valor de $38,0 \pm 16,5\%$ e $61,0 \pm 10,6\%$ aos 5 e 30 dias pós-operatórios, respectivamente. As diferenças foram estatisticamente significativas para a %BIC e o grau de mineralização entre os períodos de 5 e 30 dias pós-operatórios.

A extensão do infiltrado inflamatório / osso neoformado no compartimento da medula óssea foi ligeiramente decrescente do quinto ao trigésimo dia pós-operatório.

Avaliação e medidas histológicas em cortes parafinados

5 dias (Fig.11)

Após cinco dias da instalação dos implantes, a área analisada compreendida entre as 3 roscas, foi ocupada por uma determinada quantidade de tecido esponjoso (crescimento ósseo = 29%), em continuidade com o osso pré-existente, em parte ligado à superfície do implante (% BIC de tecido ósseo = 7,5%). A proporção de crescimento ósseo entre os segmentos das roscas foi menor que aquela presente na zona externa das mesmas. O osso neoformado em contato com a superfície do implante apresentou-

se revestido por osteoblastos. Em contato direto com a superfície do implante desprovida de tecido ósseo, observou-se um tecido conjuntivo denso juntamente com algumas células inflamatórias (PMNs) e vários eritrócitos. Nesta fase foi possível observar detritos de osso. Nas áreas corticais onde o osso foi danificado pela preparação do leito receptor para a instalação do implante, foi encontrada uma quantidade elevada de BMUs.

A área no espaço medular ao redor dos implantes foi ocupada por células semelhantes a fibroblasto e vasos sanguíneos. No entanto, foram encontrados também eritrócitos e poucos PMNs.

10 dias (Fig.12)

Neste período analisado, a neoformação óssea foi a característica mais evidente. Observou-se grande quantidade de osteoblastos e matriz osteóide. Alta porcentagem de tecido ósseo esponjoso, tanto justaposto à superfície do implante (44.9%) quanto entre as roscas (43%), apresentaram-se semelhantes ao período anterior. Menor porcentagem de tecido conjuntivo denso (33.4%) assim como menor presença de BMUs foram encontrados comparados ao período de 5 dias pós-operatórios. Também ficou evidenciado uma formação inicial de medula óssea primitiva (5,6%). Nesta fase foram encontrados poucos PMNs e nenhum eritrócito.

20 dias (Fig. 13)

Observou-se uma menor porcentagem de tecido conjuntivo (19,6%) assim como um aumento da quantidade de tecido ósseo medular (12,6%). Nesta fase, foi observada maior quantidade de osso medular em comparação ao período anterior: a %BIC de tecido ósseo = 46%; crescimento ósseo = 59,4%. Evidenciou-se uma menor quantidade de BMUs comparada aos períodos anteriores.

30 dias (Fig. 14)

Neste período, as porcentagens de tecido esponjoso em contato com a superfície do implante e de crescimento ósseo foram comparáveis ao período de 20 dias pós-operatórios, enquanto que a porcentagem de tecido ósseo medular apresentou-se aumentada. A comparação entre o crescimento ósseo e a quantidade de osso medular na área das roscas mostrou que houve maior quantidade de tecido ósseo nas proximidades da superfície do implante do que na zona externa. Nesta fase foi observada uma maior quantidade de BMUs, mostrando que os processos de remodelação óssea estiveram presentes, especialmente localizados nas áreas corticais, onde havia osso pré-existente, e na área envolvendo o tecido ósseo neoformado.

Análise estatística

Os valores IS-B não foram estatisticamente significativos nos períodos analisados. Os valores de BIC% apresentaram diferenças significativas nos períodos de 5 e 30 dias. As variações nos valores de mineralização apresentaram significância nos períodos de 5 e 30 dias.

DISCUSSÃO

Discussão

Este experimento foi realizado para estudar as fases iniciais da reparação óssea de implantes instalados sobre a crista óssea alveolar.

Entre as roscas dos implantes, foi observado aos 5 dias um tecido de granulação imaturo composto por células semelhantes a fibroblastos e poucas células polimorfonucleares (PMNs). Durante a cronologia deste experimento, este tecido de granulação imaturo foi gradativamente sendo substituído por tecido ósseo neoformado, que se apresentou melhor organizado aos 30 dias pós-operatórios. Estes resultados estão de acordo com os relatos de outro estudo experimental (Berglundh et al. 2003), em que foram instalados em cães, implantes com superfície rugosa contendo uma cavidade em sua estruturas e as biópsias foram coletadas em diferentes períodos cicatriciais. No referido estudo foi observado que após 2 horas, a cavidade foi preenchida por coágulo e após 4 dias de reparo, foi observada a substituição por um tecido conjuntivo jovem reparacional (tecido de granulação) vascularizado e constituído predominantemente por células semelhantes a fibroblastos e poucos PMNs, localizados principalmente nas proximidades da superfície do implante. Aos 7 dias pós-operatórios, a cavidade apresentou-se preenchida por tecido ósseo medular primário, formado a partir do osso medular pré-existente. Já nesta fase, foi encontrado osso recém-formado junto à superfície do implante. O contato osso-implante aumentou ao longo do tempo, até 4 semanas pós-operatórias.

No estudo experimental citado acima, foi realizada uma cavidade sobre a superfície do implante no intuito de estudar o processo de regeneração óssea. No

presente estudo não foi confeccionada tal cavidade, no entanto, foi observado um padrão semelhante de reparo ósseo no compartimento da medula óssea. Aos 5 dias pós-operatórios já foi possível observar uma reação celular perceptível com PMNs e eritrócitos. Nesta fase reparacional, evidenciou-se um grande número de células semelhantes a fibroblastos, incluídas em uma matriz de tecido conjuntivo contendo alguns vasos e osteons primários revestido por osteoblastos. À semelhança do estudo de Berglundh et al. (2003), após 5 dias já foi observado tecido ósseo neoformado, o que demonstra a capacidade do tecido medular dar origem a um íntimo contato com a superfície modificada do implante, já nas fases iniciais avaliadas. De forma semelhante ao estudo apresentado acima, também no presente estudo a quantidade do contato osso-implante aumentou ao longo do tempo (após 5 dias menor que 20% e 50% após 1 mês pós-operatório).

Este achado também está de acordo com outro estudo realizado em humanos (Lang et al. 2011) em que biópsias foram realizadas em diferentes períodos do processo de reparo. Na região retro-molar de 49 pacientes voluntários, foram instalados implantes de 4 mm de comprimento e 2,8mm de diâmetro com duas superfícies rugosas diferentes (SLA e SLActive, Straumann, Basel, Switzerland). Foi usada uma trefina de 5,8 mm de comprimento e 4,9 mm de diâmetro para remover as biópsias nos períodos de 1, 2,4 e 6 semanas pós-operatórias, juntamente com 1mm de tecido duro circunjacente aos implante. As amostras foram processadas histologicamente e avaliadas. Após uma semana, o contato osso-implante foi de 6% em ambas as superfícies testadas. Após duas semanas, a % de BIC foi de aproximadamente 12-15%, mostrando um aumento da quantidade em comparação ao

período de 1 semana. Quatro semanas depois, uma quantidade maior da % de BIC foi encontrada: aproximadamente 32% e 48% nas superfícies SLA e SLActive, respectivamente.

No presente estudo evidenciou-se uma grande reação celular ao redor do corpo do implante ocupando uma região com uma média de extensão de 1,2 mm do valor do corpo do implante. Após 5 dias, esta região foi ocupada por tecido conjuntivo jovem reparacional (tecido de granulação) composto por eritrócitos, PMNs e células semelhante a fibroblastos. Pequena quantidade de tecido ósseo já estava presente nesta fase de reparo, coberto por osteoblastos, e parte em contato com a superfície do implante. Aos 10 dias pós-operatórios, esta região ainda era ocupada por tecido de granulação. No entanto, uma grande quantidade de tecido ósseo foi encontrada na área em que antes havia reação celular. A extensão desta região diminuiu ao longo do tempo, de 1,2 mm para 0,9 mm, ao mesmo tempo em que as características do tecido se alteraram. A quantidade de células diminuiu, juntamente com as quantidades em porcentagem de osso esponjoso e de medula óssea primitiva aumentaram.

Um padrão semelhante de reparo foi descrito em outro estudo experimental (Cardaropoli et al. 2003). Em 9 cães, foi realizado o tratamento endodôntico da raiz mesial dos quartos pré-molares. O dente foi hemi-seccionado e a raiz distal removida. Os sacrifícios dos animais foram planejados de tal forma que dois sítios estivessem disponíveis para análise histomorfométrica em cada um dos períodos pós-operatórios que incluíram do primeiro até o 180º dia pós-operatórios. Aos 3 dias pós-operatórios, os alvéolos pós-exodônticos se apresentaram ocupados por coágulo, composto por eritrócitos e plaquetas envoltas em uma rede de fibrina. Aos 7 dias pós-operatórios, um

tecido de granulação rico em vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas invadiram a área previamente ocupada pelo coágulo, originando-se do ápice e das paredes laterais do alvéolo. Células inflamatórias ocupavam a porção coronária deste alvéolo. Duas semanas após, a matriz provisória próxima às paredes dos alvéolos passou a ser ocupado por osso esponjoso mais uma vez formado a partir das paredes laterais e do ápice do alvéolo. Em contrapartida, a porção central do alvéolo apresentou-se ocupada por uma matriz provisória densa de tecido conjuntivo que, após um mês apresentou-se completamente preenchido por tecido ósseo neoformado.

No espaço ocupado pelo osso medular houve aposição óssea sobre a superfície do implante. Neste momento não se pode afirmar se este osso neoformado originou-se do tecido ósseo mineralizado pré-existente ou da medula óssea.

Dois teorias foram descritas para a neoformação óssea em implantes (Davies et al. 1998): a osteogênese de contato e à distância. A primeira descreve a formação de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante enquanto a outra é quando a neoformação óssea é depositada no osso pré-existente e eventualmente atingirá a superfície do implante. No presente experimento o tecido ósseo pode ter se formado a partir do osso pré-existente já em contato com o implante. No entanto, não foi possível concluir isto com este estudo nos períodos analisados. Os estudos sobre este assunto são controversos, há os que afirmam a ocorrência da osteogênese de contato (Berglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004) outros que especularam sobre a possibilidade da existência (Botticelli et al. 2003, Rossi et al. 2011) e aqueles que não conseguiram demonstrar esse fenômeno (Lioubavina et al. 2006).

O fato do tecido ósseo poder ser originado a partir do tecido ósseo pré-existente também foi demonstrado em um experimento em macacos (Scala et al. 2010, 2011). Neste estudo realizou-se o levantamento do seio maxilar bilateralmente elevando a membrana sinusal sem o uso de qualquer biomaterial de preenchimento com a instalação simultânea de um implante. As cirurgias e os sacrifícios foram planejados de tal forma que se obtivessem biópsias para avaliação histológica aos 5, 10, 20 e 30 dias pós-operatórios. Concluiu-se que, embora a mucosa sinusal tenha o potencial osteogênico (Gruber et al. 2004, Scrouji et al. 2009), o osso recém-formado só foi formado a partir do tecido ósseo pré-existente, excluindo a participação da membrana sinusal neste processo, pelo menos nas fases iniciais de regeneração.

No presente estudo experimental, foi encontrado um alto número de BMUs, especialmente nos períodos iniciais do processo de reparo. Estas unidades, através dos processos de reabsorção / aposição óssea, exercem um papel importante no processo da remodelação do osso pré-existente assim como na neoformação óssea. O osso pré-existente em contato com a superfície do implante será gradualmente reabsorvido pelas BMUs e substituído por tecido ósseo neoformado.

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

O presente experimento mostrou que a preparação cirúrgica do local e a instalação do implante produziram uma reação celular evidente no osso circunjacente ao implante. No espaço ocupado pelo osso medular, a aposição de matriz provisória e a formação de osso ocorreram seqüencialmente durante o primeiro mês de regeneração. Na região em que o tecido ósseo estava em contato com a superfície do implante, os processos de remodelação óssea (reabsorção óssea e aposição) ocorreram através da intervenção das BMUs.

Agradecimentos

Este estudo recebeu auxílio financeiro da Suedew& Martina SRL, DueCarrare, Padova, Itália e da ARDEC, Odontológica Ariminum SRL, Rimini, Italia.

Ao Prof Dr. Luiz Antonio Salata e Sebastião Bianco (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil) pelo processamento histológico.

Os autores declaram que não há conflito de interesses referentes aos materiais utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

Referências

Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research***15**: 381–392

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. (1981) A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery***10**:387-416.

Albrektsson T. (2008) Hard tissue implant interface. *Australian Dental Journal***53** Suppl 1: 34-38.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Albouy, J.-P. & Lindhe, J. (2007) Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implant Research***18**: 147–152.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. A model study in the dog. *Clinical Oral Implants Research***14**: 251–262.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research***14**: 251-262.

*Segundo as normas do periódico “*Clinical Oral Implants Research*” (Anexo B)

Botticelli, D., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2004) Hard tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* **31**: 820-828.

Botticelli, D., Berglundh, T., & Lindhe, J. (2005) Bone regeneration at implants with turned or rough surface in combination with submerged and non-submerged protocols. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 448-455.

Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D. & Lindhe, J. (2003a) Appositional bone formation in marginal defects at implants. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 1-9.

Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D. & Lindhe, J. (2003b) The jumping distance revisited. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 35-42.

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. *Journal of Dental Research* **83**: 529-533.

Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H. & Stich H. (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research* **25**: 889-902.

Cardaropoli, G., Araújo, M. & Lindhe, J. (2003) Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 809-818.

Davies, J.E. (1998) Mechanisms integration. *International Prosthodontics* **11**: 391-401.

Gruber, R., Kandler, B., Fuerst, G., Fisher, M.B. & Watzek, G. (2004) Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 575-580.

Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N. & Bosshardt, D.D. (2011) Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 349-356.

Lioubavina-Hack, N., Lang, N.P. & Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implant Research* **17**: 244-250.

Rossi, F., Botticelli, D., Pantani, F., Pereira, F.P., Salata, L.A. & Lang, N.P. (2011) Bone healing pattern in surgically created circumferential defects around submerged implants: an experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02170.x. [Epub ahead of print]

Scala A, Botticelli D, Faeda RS, Garcia Rangel I Jr, Américo de Oliveira J, Lang NP. (2011) Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: an experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2011 **13**. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02227.x. [Epub ahead of print]

Scala A, Botticelli D, Rangel IG Jr, de Oliveira JA, Okamoto R, Lang NP. (2010) Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: a histological study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Dec;21(12):1320-1326.

Figuras

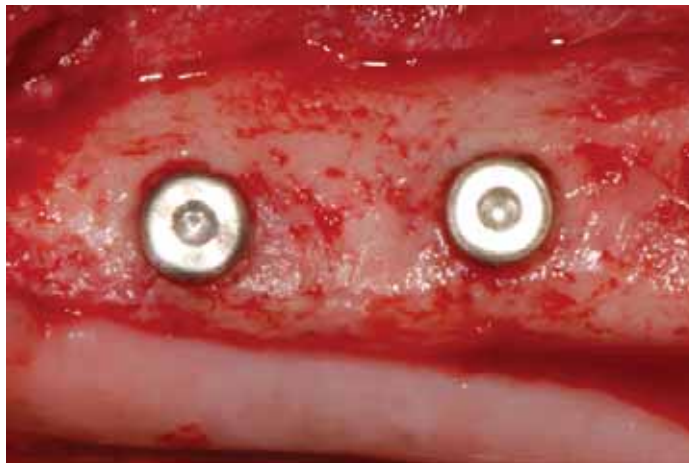


Fig.1 Situação clínica após a instalação do implante.

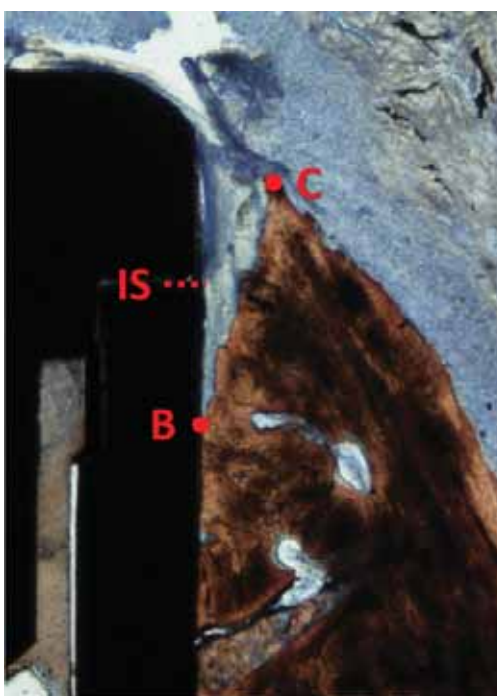


Fig.2 Pontos de referência para avaliação histométrica IS =ombro do implante; B = ponto de contato-osso-implante mais coronário; C =topo da crista óssea.

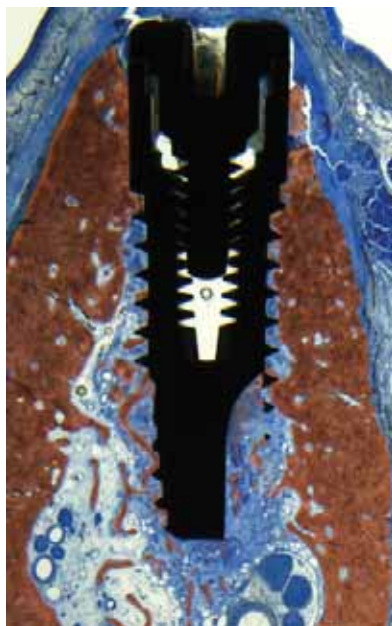


Fig.3 Regeneração aos 5 dias. Infiltrado celular ao redor do implante, localizado na região de osso medular. Aumento original (12X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

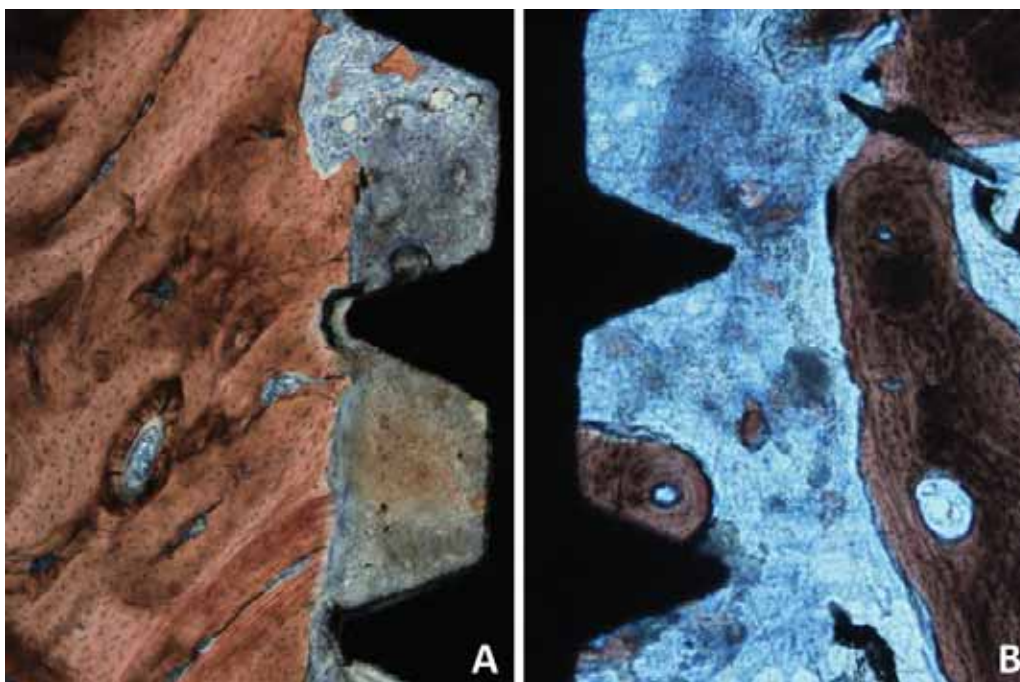


Fig. 4 Regeneração aos 5 dias. (A) identificação de resíduos de coágulo e partículas de osso. Células inflamatórias, bem como células semelhantes a fibroblastos estavam presentes. (B) Após 5 dias de regeneração, foi encontrada uma formação inicial de tecido ósseo inicial, circundada por uma matriz provisória de tecido conjuntivo. Aumento original (100X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.



Fig.5 Regeneração aos 10 dias.O infiltrado celular ao redor do implante apresenta-se gradualmente substituído por osso recém-formado. Aumento original (12X).Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

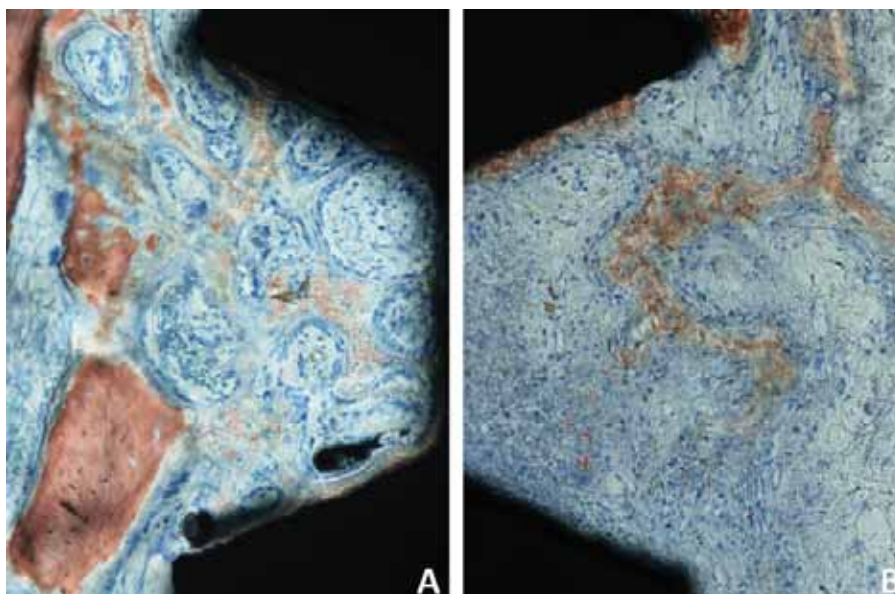


Fig.6 Regeneração aos 10 dias. (A) ostens primário, delimitado pelo tecido ósseo, revestido por osteoblastos que se localizam em íntimo contato com a superfície do implante. (B) evidência do tecido ósseo em contato com a superfície do implante. Aumento Original (200X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.



Fig.7 Regeneração aos 20 dias. Infiltrado celular ao redor do implante quase que completamente substituído por osso esponjoso, circundando as roscas do implante. Aumento original (12X). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

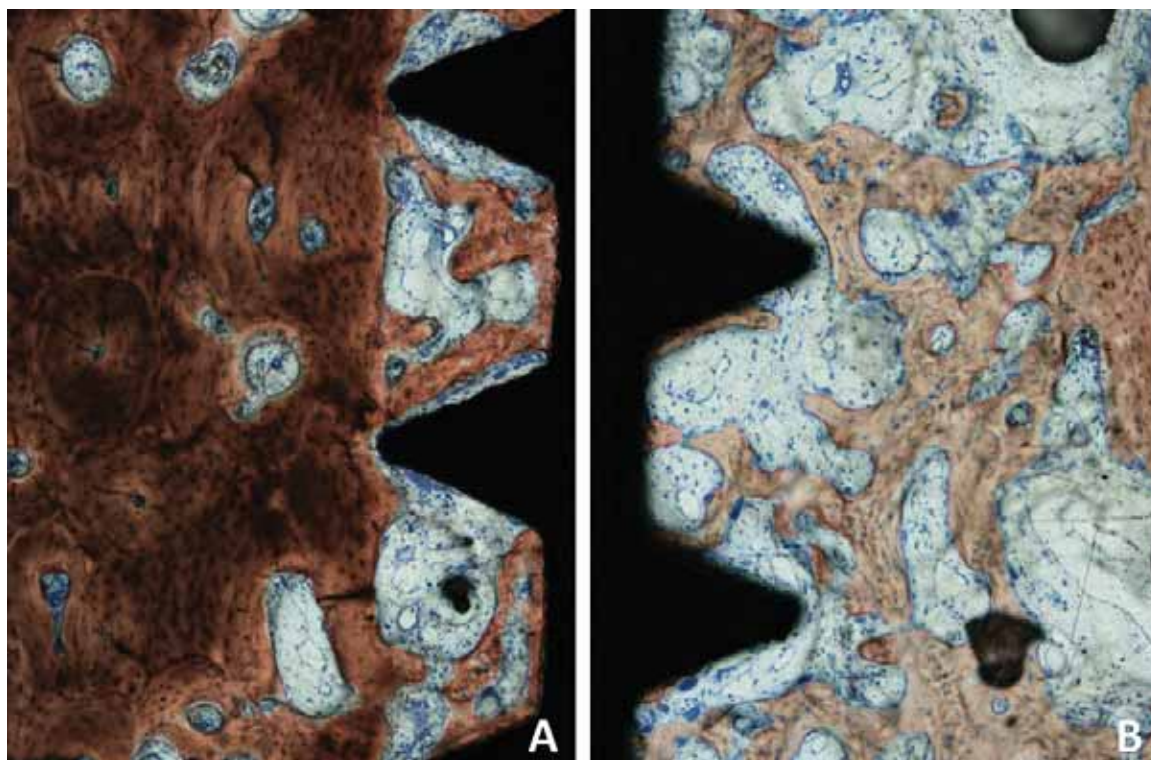


Fig.8 Regeneração aos 20 dias. (A)Na porção cortical do local do implante, observou-se a neoformação óssea a partir do osso remanescente, junto à superfície do implante. (B) A região da medula óssea continha osso esponjoso, envolvendo áreas ocupadas por uma medula óssea primitiva. Aumento original (X100). Azul de Stevanil e vermelho de alizarina.

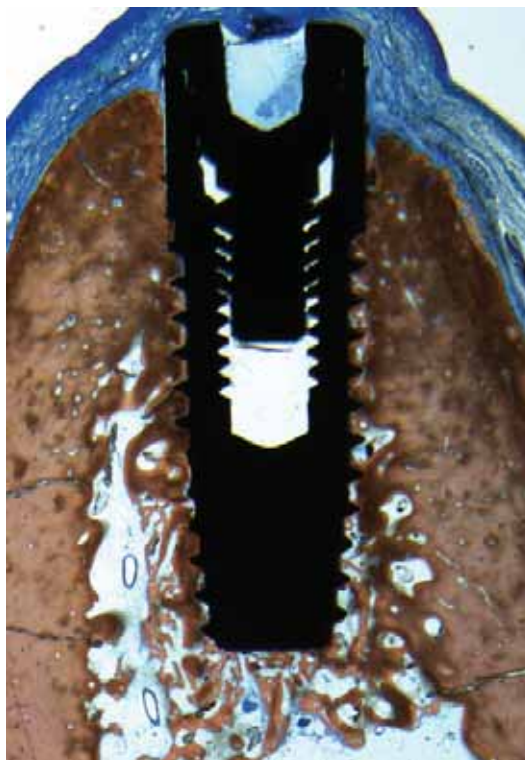


Fig.9 Regeneração aos 30 dias. Roscas do implante circundadas por osso neoformado na fase de remodelação. Aumento original (X120). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

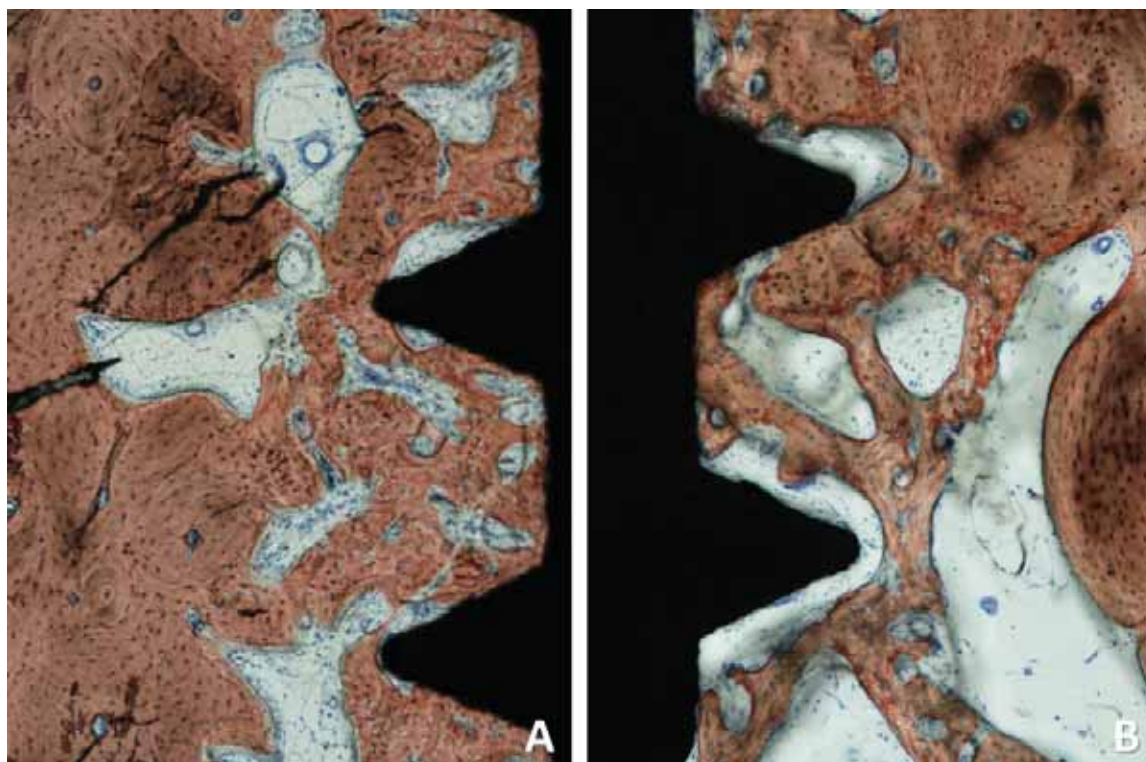


Fig.10 Regeneração aos 30 dias. (A) A zona cortical mostrou um alto contato de osso neoformado à superfície do implante. (B) Na região da medula óssea foi encontrado um elevado grau de contato com o implante. Aumento original (X100). Azul de Stevanel e vermelho de alizarina.

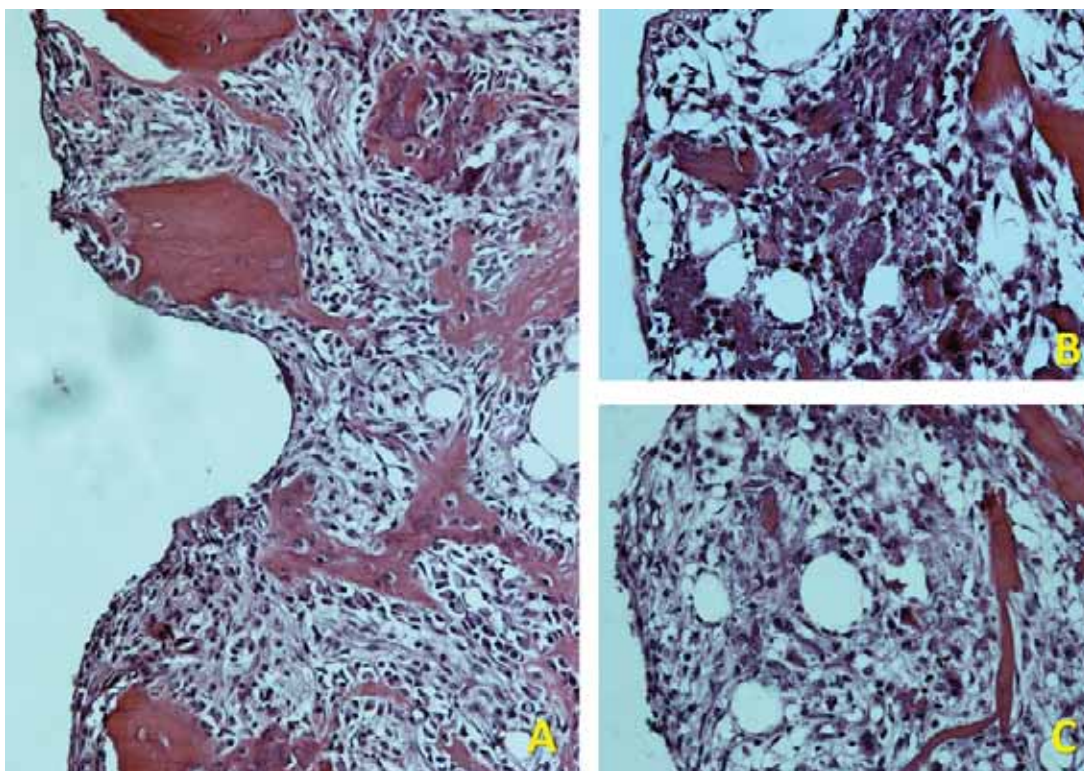


Fig.11 Regeneração aos 5 dias. (A) o osso esponjoso foi observado, algumas vezes ligado à superfície do implante. Lacunas de Howship no processo de reabsorção do osso remanescente. Ampliação original 200X. (B) Resíduos de partículas de osso, incluídos em uma matriz de tecido conjuntivo que continha algumas células inflamatórias bem como vasos e células pré-fibroblásticas. Aumento original (X400) (C) Osteons primitivos primários formando nesta fase. Aumento original (X400). Hematoxilina e eosina (H.E).

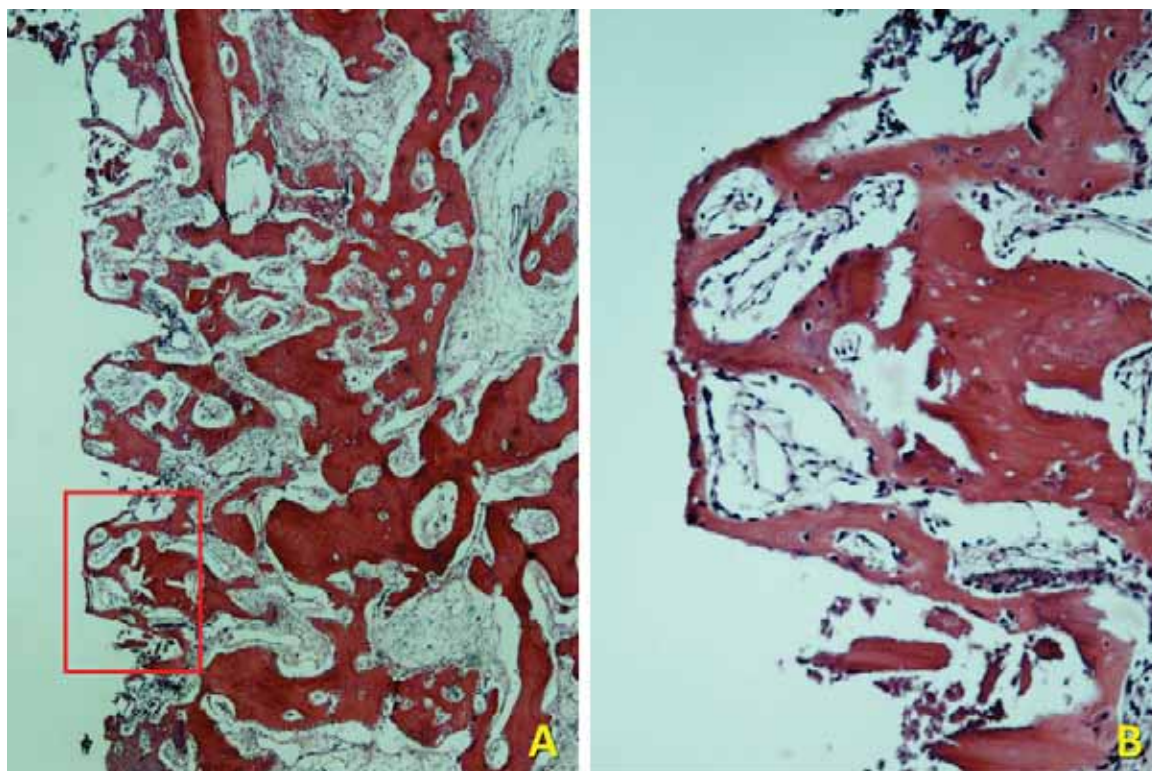


Fig.12 Regeneração aos 10 dias. (A) Osso imaturo que aparenta estar integrado a superfície do implante e uma grande quantidade de osso medular, observados neste período. Aumento original 40X. (B) Maior aumento da área indicada em (A) Aumento original (X200). Hematoxilina e eosina (H.E)

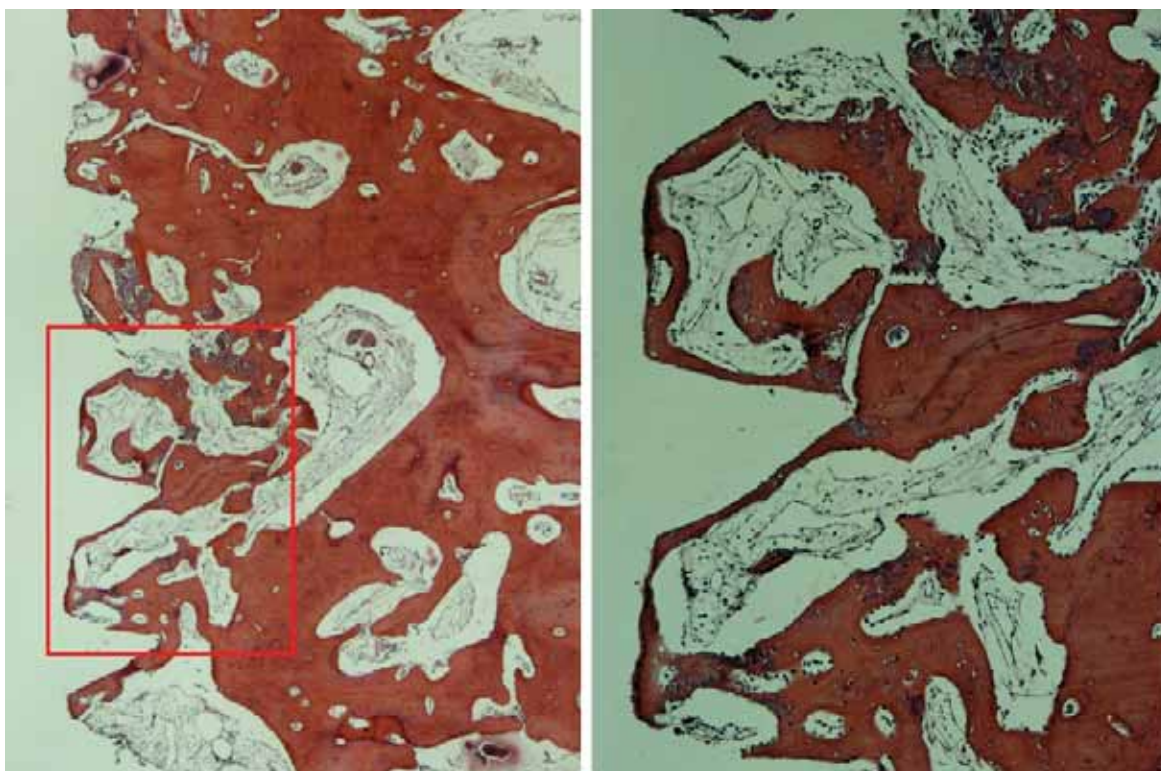


Fig. 13 Regeneração aos 20 dias (A) Neoformação óssea aderida à superfície do implante e observação de osso medular imaturo. Aumento original (40X). (B) Maior aumento na área indicada em (A). Aumento original (X100). Hematoxilina e eosina (H.E).

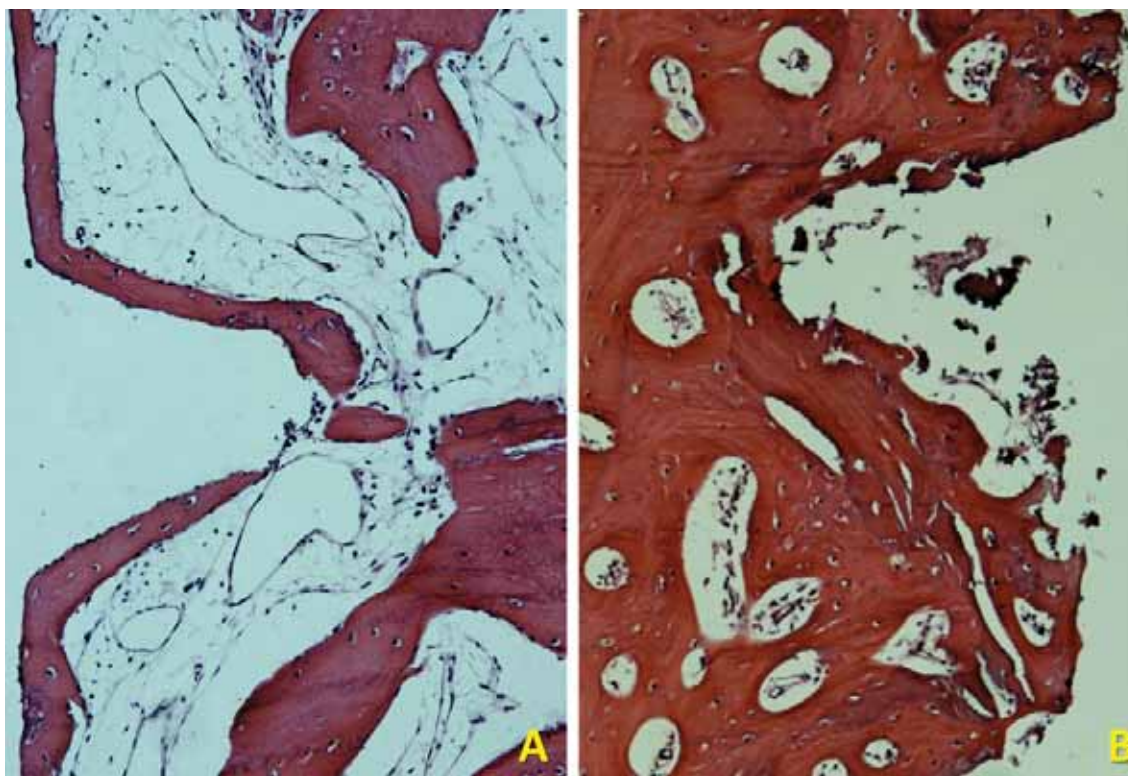


Fig. 14 Regeneração aos 30 dias. (A) Osso maduro observado no contato com a superfície. Foi observado uma maior quantidade de osso medular neste período de observação. Aumento original (200X). (B) Um número elevado de BMUs e osso neoformado. Ampliação original (200X). Hematoxilina e eosina (H.E).

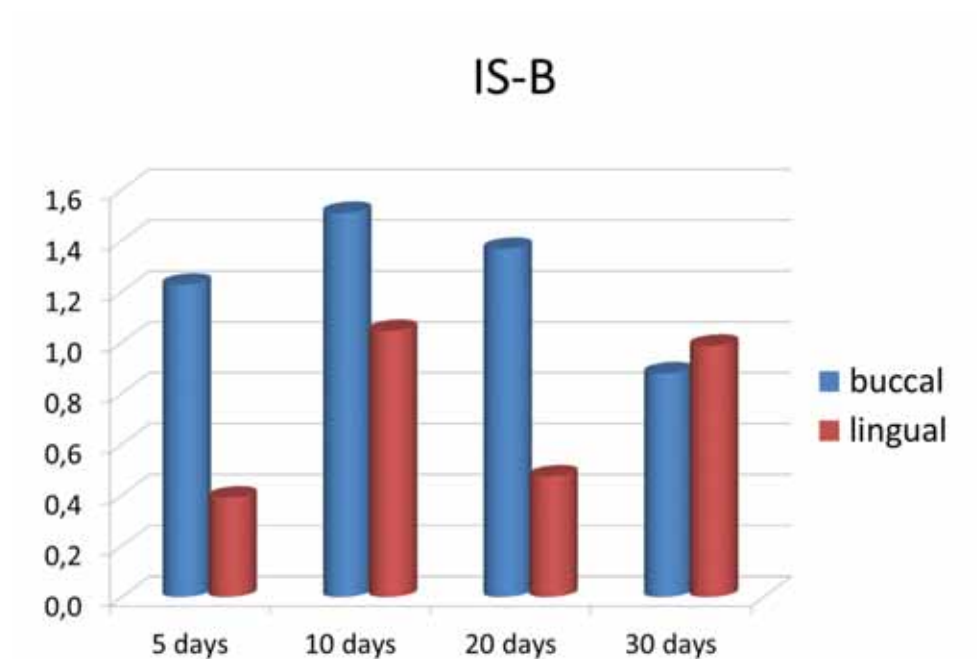


Fig. 15 Gráfico representando a distância entre o ombro do implante (IS) e o contato osso-implante mais coronal (B) faces vestibular e lingual. As diferenças entre os vários tempos de regeneração não foram estatisticamente significativa.

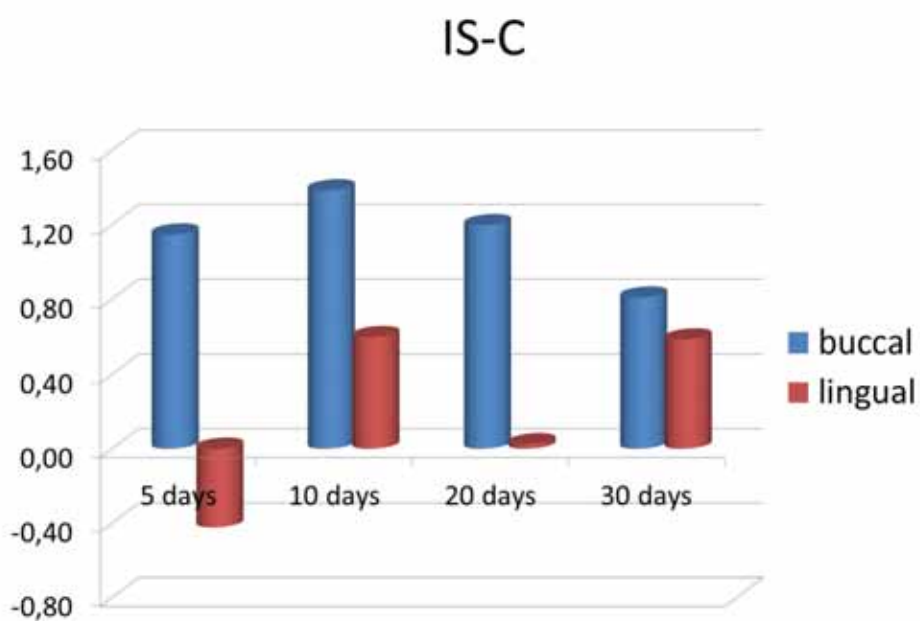


Fig.16 Gráfico representando a distância entre o ombro do implante (IS) e a crista óssea(C) faces vestibular e lingual. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de regeneração.

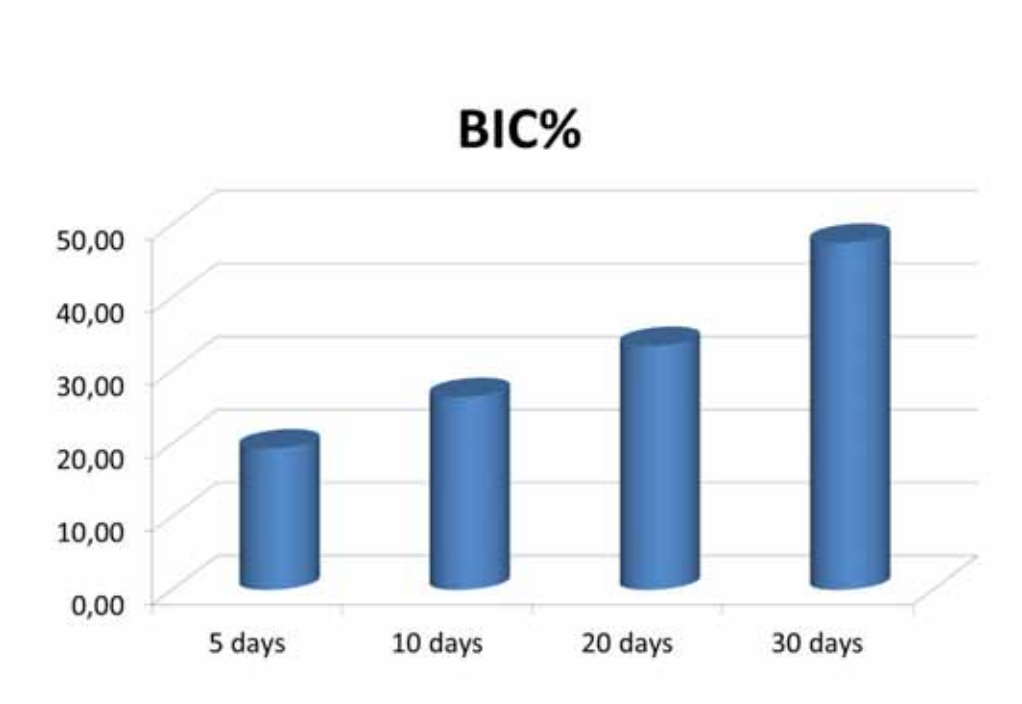


Fig.17 Porcentagem de contato osso-implante nos diversos tempos de análise. Apenas entre 5 e 30 dias houve diferenças estatisticamente significativa.

Tabela 1. Mensurações histomorfométrica após os diferentes períodos de regeneração. As médias e desvios-padrão (SD). IS-B = Distância do ombro do implante (IS) término da osseointegração coronal (B), MC = distância vertical de IS para crista óssea alveolar (C). b = Bucal, l = Lingual, BIC = contato osso-implante. * Valores estatisticamente significativos $p \leq 0,05$

	IS-B em mm		IS - C em mm		BIC %	Mineralização %	Infiltrado/ Extensão de neoformação óssea em mm
	b	l	b	l			
5 days	1.19 (0.44)	0.25 (0.28)	1.06 (0.49)	-0.44 (0.71)	21.0 (6.7)*	38.0 (16.5)*	1.24 (0.51)
10 days	1.51 (0.96)	1.04 (0.50)	1.38 (0.97)	0.59 (0.45)	26.4 (6.1)	47.4 (13.3)	1.16 (0.33)
20 days	1.40 (0.53)	0.61 (0.53)	1.28 (0.63)	0.04 (0.41)	31.8 (9.9)	54.7 (9.2)	1.02 (0.20)
30 days	0.88 (0.47)	0.99 (0.68)	0.81 (0.41)	0.58 (0.58)	47.5 (9.5)*	61.0 (10.6)*	0.98 (0.21)

ANEXOS

Anexo A



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"ADAPTAÇÃO DE TECIDOS MOLES AO REDOR DE IMPLANTES. ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES"** sob responsabilidade do **Prof. Adj Idelmo Rangel Garcia Junior** e colaboração de **Profa. Dra. Roberta Okamoto, Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e Gabriele Raffone** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 002014-2010

Aracatuba, 14 de Março de 2010

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA-FOA/UNESP

Anexo B

Clinical Oral Implants Research

[Official publication of the European Association for Osseointegration](#)

Edited by:

Niklaus P. Lang

Print ISSN: 0905-7161

Online ISSN: 1600-0501

Frequency: Monthly

Current Volume: 22 / 2011

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Engineering, Biomedical: 13 / 59; Dentistry, Oral Surgery & Medicine: 6 / 64

Impact Factor: 2.812

Top [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](#).

Relevant Document: [Copyright Transfer Agreement](#)

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

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

1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

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

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to

reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement must be sent before any manuscript can be published. Authors must send the completed Copyright Transfer Agreement upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Copyright Transfer Agreement at submission. Please return your completed form to:

Production Editor
Wiley Services Singapore Pte Ltd
1 Fusionopolis Walk, #07-01
Solaris South Tower, Singapore 138628

Alternatively a scanned version of the form can be emailed to clr@oxon.blackwellpublishing.com or faxed to +65 6643 8599. For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

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

3.1. Getting Started

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

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

3.2. Submitting Your Manuscript

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

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) 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. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

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

5.2. Format

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

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s

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

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

5.2. Structure

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

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

Abstract: should not 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 exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

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

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

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

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

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

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

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

6.2 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