

**PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA**

**Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no  
reparo ósseo periimplantar em ratos  
submetidos à orquiectomia**

**Araçatuba – São Paulo**

**2017**

**PEDRO HENRIQUE SILVA GOMES FERREIRA**

**Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no  
reparo ósseo periimplantar em ratos  
submetidos à orquiectomia**

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

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

**Coorientador:** Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

**Araçatuba – São Paulo**

**2017**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F383e Ferreira, Pedro Henrique Silva Gomes.  
Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia / Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira. – Araçatuba, 2017  
63 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto  
Coorientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Osteoporose 2. Teriparatida 3. Homens 4. Implantes dentários I. T.

Black D7  
CDD 617.64

GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique Silva. **Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
13	11		Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do micro tomógrafo computadorizado ( <b>processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011</b> ).

# **DEDICATÓRIA**

# Dedicatória

Eu dedico esta conquista as pessoas mais importantes da minha vida, os quais foram a base de tudo que me formei, aqueles que fundamentam a minha história: **a minha família**.

A **meu pai e minha mãe (Belino Gomes Ferreira e Alcione Silva Gomes Ferreira)**, por me amar e criar buscando oferecer sempre o melhor. Se hoje cheguei até aqui, devo a eles, pois se privaram de muitas coisas para me dar uma vida digna e garantir meu futuro, passando por problema sem olhar para trás, para assim ver concretizado o sonho de mais um de seus filhos. Vocês são meus pilares juntos aos meus irmãos. Sem esse apoio, auxílio e amor este trabalho não seria possível. Amo-te meus heróis, Pai e Mãe.

Aos meus irmãos **Belino Gomes Ferreira Junior e Anna Paula Silva Gomes Ferreira**, pela cumplicidade, apoio e companheirismo por toda a minha trajetória, pela proteção e cuidado que tiveram comigo. Vocês que foram além de irmãos meus melhores amigos, confidentes e porto seguro, para vocês, assim como para nossos pais, eu sempre estarei aqui de prontidão para o que precisarem. Obrigado por tornar mais fácil e feliz minha passagem por esta vida. Amo vocês...

**AGRADECIMENTOS  
ESPECIAIS**

# Agradecimentos Especiais

A **Deus**, que no momento oportuno entrou com sua providência na minha vida. Transmitiu paz, e me fez rever algumas prioridades me transformando em uma pessoa melhor e mais humana, alimentou e fez possível a concretização de mais um sonho, guiando-me em todos os meus caminhos. Creio que a cada procedimento realizado por minhas mãos, a dele sempre estará junto as minhas.

**A minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Adj. Roberta Okamoto**, à qual sou eternamente grato pela oportunidade da convivência, e também por ser a peça fundamental em meu mestrado, orientando não só como ser um cirurgião pesquisador, mantendo sempre um padrão de qualidade que só a senhora tem, mas também, orientando em meu crescimento como pessoa. Mostrando em algumas conversas e conselhos como seguir. Se eu conseguir absorver uma pequena parte da experiência que a vida lhe trouxe professora, sei que serei um grande homem e um grande pesquisador. Obrigado pelo apoio, compreensão, auxílio, disponibilidade, carinho e acolhimento. Serei eternamente grato, pois tudo nessa vida pode ser levado de nós, mas o conhecimento que a senhora me proporciona, ninguém nunca tirará.

**Ao Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior**. Serenidade, humildade e paciência são características marcantes do senhor, o que te faz um ser humano especial. Aprendo com o senhor sempre, nos procedimentos cirúrgicos, em uma conversa, em um olhar, em um silêncio. Muito obrigado por confiar em mim a ponto de representar o seu nome em um curso, essa



experiência que me proporcionou, a qual foi uma das primeiras experiências de docência, ficou marcada e com toda certeza ficará gravada para sempre em minha memória. Por toda a minha vida serei grato pelas oportunidades que o senhor me deu. Sempre vou aprender com o senhor, me tornando a cada dia um melhor cirurgião e melhor pessoa. Muito Obrigado!

**Ao meu coorientador e amigo, Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani,** primeiramente por me incentivar ao ingresso no Mestrado nesta casa a FOA - UNESP, a qual hoje tenho como minha casa. Por me fazer sentir a necessidade de ir mais além e me superar cada vez mais. Por me mostrar o caminho das coisas que almejo sem críticas, mas sempre me aconselhando, e por ser esta pessoa “coração” que faz as coisas sempre pensando no bem do próximo e que brilha o olhar ao fazê-las. Você é um orgulho para todos seus amigos e não só isso, um orgulho também para a Odontologia e Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Obrigado pelos ensinamentos, diários, oportunidades, amizade, auxílio, disponibilidade e carinho de sempre.

**Ao meu Eterno Amigo e Professor: Prof. Titular Clóvis Marzola,** primeiramente pelo apoio durante o período de transição da Residência em Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial e o Mestrado, pelas noites em que passou revisando os primeiros artigos que escrevi e pelo auxílio nas primeiras publicações, o senhor sempre dizia: “O que vocês fazem das 00:00 às 6:00?”, o restante das pessoas eu não sei, mas no último ano de residência nesse horário produzimos bastante publicações. Além disso, por seu exemplo de dedicação à Cirurgia, pelas vitórias conquistadas em um tempo de transição dentro da nossa especialidade em que foi necessária muita garra, força de

vontade e amor pelo que faz. Inspirando-nos a não ser somente ótimos cirurgiões, mas também pessoas melhores. Transmitindo os conhecimentos adquiridos numa longa e vitoriosa carreira. Como seu eterno aluno e admirador da sua história, agradeço imensamente por ser um de meus mentores. Muito obrigado!

**Ao Professor Dr Paulo Roberto Botacin**, por sua amizade, disponibilidade, pelos ensinamentos e oportunidades. Algumas coisas podem parecer banais, mas a oportunidade que o senhor, junto com a minha orientadora, **Prof<sup>a</sup> Roberta Okamoto**, me deram de ministrar uma aula para a graduação, ficará para sempre na minha memória. Muito obrigado!

**A Professora Mariza Matsumoto**, pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos. O fácil convívio com a senhora faz as coisas fluírem tranquilamente. Muito Obrigado Professora.

**Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, pela disponibilidade, dedicação, por ser verdadeira em tudo que faz e sempre pensar no próximo. Muito Obrigado por tudo, sou um grande admirador da senhora. **Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Francisley Ávila Campos**. Meu muito obrigado por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados no departamento. Vocês têm a minha admiração.

**Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Professor Wilson Roberto Poi**, pelo maior exemplo do “Ser Professor”. Muito obrigado

por fazer parte da minha formação e me fazer descobrir o professor que está em mim.

**A minha Namorada Danila de Oliveira**, pelo companheirismo e cumplicidade em tudo que faço, pelo amor e amizade, e em tudo que posso estar ao meu lado. Muito Obrigado por sempre estar ao meu lado nos melhores e piores momentos que tive nessa etapa. Tudo que passamos e que conquistamos é pensando em um futuro melhor para que possamos aproveitar mais a vida. Muito Obrigado por existir em minha vida, Te amo!

**Ao meu amigo do peito Fernando Isquierdo de Souza**, de fato em palavras fica difícil descrever a admiração e carinho que tenho por você, meu amigo. Sempre ao meu lado, sempre me escutando e, muitas vezes, a pessoa quem me aconselha. Saiba que sou um grande admirador do seu trabalho e do seu caráter, muito obrigado por fazer parte da minha história!

**Ao meu amigo de longas datas Erik Neiva**, que sempre teve ao meu lado desde o início da minha introdução à cirurgia, durante a Residência em CTBMF na cidade de Bauru. Você que mais do que um amigo é um irmão, que muito me ensina com os conselhos e apoio. Mesmo que a vida reserve caminhos diferentes para nosso futuro, você sempre terá as portas abertas em minha vida e na minha casa. Muito obrigado meu irmão.

**Ao querido amigo André Luis da Silva Fabris**, humildade, simplicidade, e companheirismo são palavras que te define meu amigo. Obrigado pelo apoio e auxílio que sempre pude contar.

**Aos amigos Luis Fernando Azambuja Alcalde e Jefferson Moura Vieira**, pela cumplicidade e companheirismo de longas datas, obrigado por

tornar a residencia em CTBMF que passamos juntos mais agradável e agora, pelo acolhimento sempre em Bauru! Contem sempre comigo.

**As Alunas de iniciação Científica da nossa equipe, Danila de Oliveira, Leticia Pitol, Jaqueline Hassumi, Fernanda Yogui, Ana Claudia Ervolino, Elisa Furquim e Paula Frigerio**, pela disponibilidade, amizade, auxilio, boa vontade e por ter tornado toda a parte da execução do trabalho mais fácil e agradável, meu muito obrigado.

**Aos alunos da graduação**, pela oportunidade em compartilharmos informações e aprendizado, auxiliando no meu desenvolvimento para Docência.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante os primeiros meses do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do Mestrado.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 2015/04649-7) e pelo auxílio regular em pesquisa concedido à nossa equipe em nome da minha orientadora Prof<sup>a</sup> Roberta Okamoto (# 2015/14688-0), indispensável para a realização deste estudo.

**Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP**, pela viabilização das análises por microscopia confocal a laser.

# **AGRADECIMENTOS**

# **Agradecimentos**

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor **Professor Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de realização do curso de Mestrado. A cada dia admiro mais esta universidade e agradeço ainda as oportunidades que esta casa me forneceu e continua fornecendo.

À **coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”** na pessoa do **Prof. Adj. André Luís Fraga Briso**.

**Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

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

**Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Paulo e Marco)**. Muito obrigado pelo carinho e respeito.

**Aos colegas da pós-graduação de Odontologia**, da área de Prótese; Periodontia; Ortodontia; da Periodontia; da Clínica Integrada; da Dentística; da Estomatologia e Odontopediatria. Meu muito Obrigado

**Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial** **Ciro Duailibe, Sabrina Ferreira, Juliana Zorzi, Fabio Roberto, Ana Paula Simões, Jonathan Ribeiro, Járede Carvalho, Carulina Moraes, Heldo Cesar, Julierme Ferreira, Júlio Cesar**

**Oliveira, Willian Moraes, Mônica Palacio, Carolina Danieletto, André Oliva, João Paulo Bonardi, Gustavo Momesso, Leonardo Freitas, Fábio Batista, Eduardo Dias Ribeiro, Sormani Queiroz, Willian Ricardo, Ciro Dualibe, Ricardo Mureb, Gabriel Mulinari, Tarik Polo, Cristian Statkiewicz, Igor Putini, Valthierre Nunes e Maria del Pilar.** Todos vocês têm minha admiração, amizade e carinho. Muito obrigado por cada conhecimento compartilhado, ajuda e momentos incríveis que passamos. Levo vocês no meu coração.

**Aos pacientes,** pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente.

# Epígrafe

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

**Charles Chaplin**



# **LISTAS E SUMÁRIO**

# ***Lista de Figuras***

**Figura 1** – **A:** Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B:** Incisão; **C e D:** Exposição de ambos escrotos; **E:** Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F:** Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G:** Sutura; **H:** Ambos escrotos removidos (Orquiectomia). 48

**Figura 2** – **A:** Antissepsia com PVPI em ambas tíbias após tricotomia; **B:** Acesso a metáfise tibial; **C e D:** Fresagem com broca de 1,3mm de diâmetro e leito; **E:** Implante de 1,5 x 3,5mm; **F:** Instalação do implante; **G:** Implante instalado em nível ósseo; **H:** Sutura. 48

**Figura 3** – 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 na sobreposição da calceína e alizarina na interface osso/implante na região entre a terceira e quinta espiras do implante. 49

**Figura 4** – Imagem da região periimplantar obtida através da microscopia confocal, padronizada para o cálculo de AON, representada pelas linhas circundantes azuis. Considerou-se na análise AON as linhas fluorescentes na sobreposição da calceína e alizarina na interface osso/implante na região entre a terceira e quarta espiras do implante. 50

**Figura 5** – Quantificação do volume ósseo. Volume equiparados do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ. 50

- Figura 6** – Quantificação do percentual de volume ósseo. Percentuais aproximados do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ. 51
- Figura 7** – Quantificação da espessura das trabéculas. Valores similares do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ ( $p>0,05$ ). 51
- Figura 8** – Quantificação da separação entre as trabéculas. Valores maiores para SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ, com estatística significativa na comparação entre SHAM e ORQ. 52
- Figura 9** – Quantificação do número de trabéculas. Valor maior para ORQ e menor para SHAM e ORQTERI ( $p>0,05$ ). 52
- Figura 10** – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para o grupo ORQ e menos poroso para SHAM e ORQTERI ( $p>0,05$ ). 53
- Figura 11** – Marcação das linhas fluorescentes na matriz de cálcio pela calceína (verde) e alizarina (vermelho) sobrepostas, evidenciando a dinâmica do osso periimplantar dos grupos experimentais: (A) – SHAM; (B) – ORQ e (C) – ORQTERI. 53
- Figura 12** – Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, pelas expressões de calceína e alizarina. (comparações intergrupos). 54
- Figura 13** – Taxa de aposição mineral por dia ( $\mu\text{m}$ ) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, avaliada linearmente. 54
- Figura 14** – Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) ( $\mu\text{m}$ ) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, avaliação do perímetro. 55

**Figura 15** – Área de osso neoformada (AON) em  $\mu\text{m}^2$  dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI.

# ***Lista de Tabelas***

**Tabela 1** – Grupos experimentais de acordo com o tratamento com Teripatida

# ***Lista de Abreviaturas***

**PTH** - Paratormônio

**Micro CT** - Microtomografia Computadorizada

**BV** - Volume ósseo

**BV/TV** - Percentual de volume ósseo

**Tb.Th** - Espessura trabecular

**Tb.N** - Número de trabéculas

**Tb.Sp** - Separação entre as trabéculas

**Po-tot** - Percentual de porosidade total

**n°** - Número

**g** - Grama

**mm** - Milímetro

**Rpm** - Rotações por minuto

**µg/kg/dia** - Micrograma por quilograma por dia

**N** - Newton

**ml** - Mililitro

**Kv** - Quilovolt

**µA** - Microampére

**Al** - Alumínio

**Cu** - Cobre

**mm<sup>3</sup>** - Milímetros cúbicos

**vs** - versus

**µm** - Micrômetro

**µm<sup>2</sup>** - Micrômetro quadrado

# ***Sumário***

<b>1. Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Resumo</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Abstract</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Introdução</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Materiais e métodos</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Resultados</b>	<b>35</b>
<b>1.6 Discussão</b>	<b>37</b>
<b>1.7 Referências</b>	<b>42</b>
<b>1.8 Anexo A - Comitê de ética</b>	<b>57</b>
<b>1.9 Anexo B - Normas para publicação (COIR)</b>	<b>48</b>

**Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo  
periimplantar em ratos submetidos à  
orquiectomia**

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



## **Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia**

### **1.1 Resumo**

**Objetivos:** Avaliar a morfometria e dinâmica óssea periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia, tratados com teriparatida.

**Materiais e Métodos:** 18 ratos foram divididos em 3 grupos: SHAM - cirurgia fictícia, ORQ - orquiectomia, e ORQTERI - orquiectomia bilateral, tratados com teriparatida. Cada animal recebeu um implante na metáfise tibial. Aos 14 e 42 dias de pós-operatório, foram administrados os fluorocromos calceína e alizarina, respectivamente. A eutanásia ocorreu ao 60 dias após a instalação dos implantes. As peças foram analisadas na microtomografia computadorizada (microCT) para avaliação dos parâmetros de volume e percentual de volume ósseo (BV, BV/TV), espessura do trabeculado (Tb.Th), número e separação de trabéculas (Tb.N, Tb.Sp) e percentual de porosidade total, (Po-tot). Para microscopia confocal a laser, a mensuração da área dos fluorocromos, da taxa diária de aposição mineral (MAR), da extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) e área de osso neoformado (AON), foi realizada no programa Image J. Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis e paramétricos pelo teste ANOVA 1 ou 2 fatores. Como pós-teste, os testes de Holm-Sidak, ou Tukey foram aplicados, com nível de significância a 5%.

**Resultados:** Para os parâmetros BV, BV/TV, Tb.Th, o grupo ORQTERI apresentou os maiores valores em relação aos demais grupos e, para Po-tot, os menores valores foram para o grupo ORQTERI (ORQ:  $p < 0,05$  e SHAM:  $p > 0,05$ ). Para Tb.Sp o grupo SHAM apresentou o melhor resultado (ORQ:  $p < 0,05$  e ORQTERI:  $p > 0,05$ ), e Tb.N, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos resultados intragrupos ( $p > 0,05$ ). Para MAR e avaliação dos fluorocromos, ORQTERI mostrou melhor turnover ósseo periimplantar (ORQ:  $p < 0,05$ ), para ELCOI e AON, o grupo SHAM apresentou os maiores resultados (ORQ:  $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** O tratamento com Teriparatida melhora a dinâmica óssea, além de aumentar o volume e a qualidade do osso periimplantar.

**Palavras-chave:** Osteoporose, Teriparatida, Homens, Implantes Dentários.

## **Effect of teriparatide (PTH 1-34) on peri-implantar bone repair in orchietomized rats**

### **1.2 Abstract**

**Objectives:** To evaluate morphometry and peri-implant bone dynamics in rats submitted to orchietomy, treated with teriparatide.

**Materials and Methods:** 18 rats were divided into 3 groups: SHAM - fictitious surgery, ORQ - orchietomy, and ORQTERI - bilateral orchietomy, treated with teriparatide. Each animal received an implant in the tibial metaphysis. At the 14 and 42 postoperative days, calcein and alizarin were administered, respectively. Euthanasia occurred 60 days after implant installation. The pieces were analyzed by computerized microtomography (microCT) for evaluation of volume and percentage of bone volume (BV, BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number and separation of trabeculae (Tb.N, Tb.Sp) and percentage of total porosity, (Po-tot). For laser confocal microscopy, the area of the fluorochromes, the mineral apposition rate (MAR), the linear bone implant contact (ELCOI) and the newly formed bone area (AON) were measured in Image J. The nonparametric data were compared by the Kruskal-Wallis test and parametric by the ANOVA 1 or 2 factor test. As a post-test, the Holm-Sidak or Tukey tests were applied, with significance level at 5%.

**Results:** For the parameters BV, BV/TV, Tb.Th, the ORQTERI group presented the highest values in relation to the other groups and, for Po-tot, the lowest values were for the ORQTERI group (ORQ:  $p < 0.05$  and SHAM:  $p > 0.05$ ). For

Tb.Sp the SHAM group presented the best result (ORQ:  $p < 0.05$  and ORQTERI:  $p > 0.05$ ), and Tb.N, there was no statistically significant difference in the comparison of intragroup results ( $p > 0.05$ ). For MAR and fluorochemical evaluation, ORQTERI showed better peri-implantar bone turnover (ORQ:  $p < 0.05$ ), for ELCOI and AON, the SHAM group presented the highest results (ORQ:  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Treatment with Teriparatide improves bone dynamics, in addition to increasing the volume and quality of peri-implant bone.

**Key-words:** Osteoporosis, Teriparatide, Men, Dental Implants

### 1.3 Introdução

Dentre as causas da osteopenia no gênero masculino, além do avanço da idade, o hipogonadismo também tem se destacado, resultando em alta taxa de remodelação e aceleração na perda óssea (Mittan et al., 2002, Kaufman et al., 2014 e Hagino, 2016). Há também indícios que aromatização de testosterona em estradiol desempenha papel importante na regulação da homeostase dos ossos em homens. Efeitos do estrogênio são necessários para manutenção eficaz da remodelação óssea, havendo evidências de que os níveis de estradiol livre ou biodisponíveis podem ser necessários para limitar perda óssea relacionada com idade em homens (Gennari et al., 2004, Kaufman et al., 2014 e Hagino, 2016). Outros fatores descritos na literatura são a insuficiência de vitamina D, diminuição da absorção de cálcio por dieta pobre ou até mesmo senilidade (Kaufman et al., 2008, Kaufman et al., 2014 e Veldurthy et al., 2016).

Algumas substâncias medicamentosas têm sua indicação para controle da osteoporose menos grave, como agentes que promovem anti-reabsorção óssea (denosumabe, raloxifeno ou bifosfonatos) (Giusti et al., 2014 e Amugongo et al., 2014). Entretanto, para osteoporose mais grave, medicamentos como a teriparatida (Forteo, Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, EUA), também chamado PTHrh (1-34), um análogo ao paratormônio é um dos mais indicados, por ser um agente anabolizante do tecido ósseo que aumenta a densidade mineral óssea diretamente por ativar os osteoblastos, e indiretamente por aumentar reabsorção tubular renal de cálcio e sua absorção intestinal, estimulando formação de osso novo e aumento da massa óssea,

bem como sua densidade mineral (Amugongo et al., 2014; Niimi et al., 2015 e Farahmand et al., 2016). Este medicamento é uma opção eficaz para tratamento de osteoporose em homens (Niimi et al., 2015 e Farahmand et al., 2016).

Uma questão importante consiste em buscar melhor entendimento sobre como produzir tecido mineralizado de boa qualidade para suportar forças mecânicas decorrentes de reabilitação com prótese sobre implante (Von Wowern e Kollerup 1992; Shibata et al., 2015). A qualidade do tecido ósseo é fator determinante para adequada integração do implante dentário, considerando 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 e Ramalho-Ferreira et al., 2015). Neste contexto, quando osso adquire estrutura cortical e/ou trabecular com menor densidade, a resposta de osseointegração é comprometida (Drage et al. 2007 e Ramalho-Ferreira et al., 2015).

Sendo assim, a proposta deste trabalho foi verificar o comportamento da medicação que promove aumento da densidade óssea, avaliando assim, a morfometria e dinâmica óssea periimplantar em ratos submetidos à orquiectomia, tratados com teriparatida.

#### **1.4 Materiais e métodos**

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº

2015-00238) (**Anexo A**), 18 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos de aproximadamente 500g foram utilizados neste trabalho, divididos em três grupos experimentais (SHAM, ORQ, e ORQTERI) (**Tabela 1**), conforme a cirurgia de indução da osteoporose e tratamento medicamentoso a que foram submetidos.

### ***Orquiectomia bilateral***

Para a indução da osteoporose animal, os animais dos grupos ORQ e ORQTERI foram anestesiados com Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda, Osasco, SP, Brazil) e Vetaset (Cloridrato de Quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brazil) e, a seguir, foram realizadas incisões em ambos os sacos escrotais, com a exposição dos testículos. Com a pinça hemostática, o funículo espermático foi apresentado, com concomitante individualização e laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular, e então seccionados. O testículo foi removido e a ferida cirúrgica suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). (**Figura 1A, B, C, D, E, F, G, H**) Este procedimento foi validado por Seifi et al. em 2015, após comprovação de diminuição de testosterona endógena pelo teste Elisa. Os animais do grupo SHAM, foram submetidos a cirurgia fictícia, somente com exposição dos testículos sem a remoção dos mesmos, para compartilhar do mesmo estresse que os demais grupos.

### ***Tratamento Medicamentoso***

A partir do dia da cirurgia de orquiectomia e cirurgia fictícia, os grupos SHAM, ORQ e ORQTERI mantiveram dieta convencional e água *ad libitum*. Passados 30 dias, iniciou-se então o tratamento medicamentoso. O grupo

ORQTERI foi submetido ao tratamento medicamentoso por meio de aplicação subcutânea diária com Teriparatida (Forteo - Eli Lilly, Indianápolis, Indiana, EUA) (0,5 µg/kg/dia) e, SHAM e ORQ submetidos e aplicação subcutânea de solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), mantendo assim o mesmo estresse.

### ***Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias***

Após 30 dias do tratamento medicamentoso, os 18 ratos foram submetidos à instalação dos implantes nas tíbias. Foram instalados 18 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 1,5 mm e altura de 3,5 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3 mm 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), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0 mm, com travamento e estabilidade inicial. **(Figuras 2A, B, C, D, E, F, G, H)**

Cada animal recebeu um implante na metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4-0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio multifilamentar (seda 4-0, Ethicon,



Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Após 14 dias da instalação dos implantes foi administrado pela via intramuscular 20mg/kg do fluorocromo calceína (Luvizuto et al., 2011; Ramalho-Ferreira et al., 2015). Passados mais 28 dias (42 dias após a instalação dos implantes), foi administrado o fluorocromo vermelho de alizarina, na dose de 20 mg/kg para cada animal (Luvizuto et al., 2011; Ramalho-Ferreira et al., 2015). A eutanásia destes animais foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes (18 dias após a administração da alizarina).

#### ***Análise Microtomográfica (Micro-Ct)***

Após a eutanásia dos animais, as tíbias dos 3 grupos experimentais (SHAM, ORQ e ORQTERI) foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram deixadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica.

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 32min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de

interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas, sendo observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliada a região entre a 3ª e 5ª espira dos implantes em 100 slices contados da sua porção mais central (Gloesel et al., 2010), sendo assim definidos, o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N) e porosidade total (Po-tot), (Bouxsein et al., 2010) para então realizar a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

### ***Microscopia confocal a laser***

Após a análise microtomográfica realizada, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilize apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit e

fotopolimerizada, seguida pelo protocolo para processamento e corte do Exakt (Cutting System, Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha).

O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte (Exakt Cutting System, Apparatebau, Gmbh, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 80 µm de espessura.

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 (original aumentar 100) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Obtendo assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados, para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).

As imagens foram transportadas para o programa computacional analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Através da ferramenta “free hands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) foi mensurada.

Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta straight foram traçadas 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 28,

que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados (Dempster et al., 2013).

### ***Histometria***

Para calcular a extensão linear do contato osso/implante contato (ELCOI), o perímetro em micrômetros da interface periimplantar na região entre a terceira e quinta espiras dos implantes, foi padronizado para todos os grupos (**Figura 3**). E o cálculo da área de osso neoformada (AON) foi realizada na região correspondentes entre a terceira e quarta espira (**Figura 4**). 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.

### ***Análise estatística***

Para a análise estatística foi utilizado o software Sigma Plot 12.3 (San Jose, CA, EUA). A análise da homocedasticidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos do micro-CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N) e porosidade total (Po-tot), foi utilizado o teste ANOVA 1 fator e pós-teste Holm-Sidak. Para os parâmetros não paramétricos relacionados a MAR e AON, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Tukey. Para os dados paramétricos, relacionados a área de fluorocromos foi aplicado o teste ANOVA 2 fatores, e

para os valores de ELCOI, o teste ANOVA 1 fator foi empregado. Estes dois últimos, quando identificada significância estatística, o pós teste Tukey foi aplicado. Adotou-se o nível de significância de  $p < 0,05$  para todos os teste.

## 1.5 Resultados

### ***Análise Microtomográfica (Micro-Ct)***

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente a medida do volume ósseo (BV) foi observado no grupo SHAM o valor médio de  $0,0422\text{mm}^3$ , no grupo ORQ foi  $0,0366\text{mm}^3$  e ORQTERI  $0,0429\text{mm}^3$ , em que o volume se apresentou semelhante ao grupo SHAM, porém com diferença estatisticamente significante entre em comparação ao ORQ ( $p < 0,05$ , Holm-Sidak). **(Figura 5)**. Quando avaliado a porcentagem de volume óssea (BV/TV) o grupo ORQ (35,05%) se mostrou inferior ao grupo SHAM (40,4%) e ORQTERI (41,06%), ( $p < 0,05$ , Holm-Sidak) **(Figura 6)**.

Referente ao trabeculado ósseo periimplantar, a espessura trabecular (Tb.Th) mostrou resultados aproximados entre os grupos SHAM (0,0878mm) e ORQTERI (0,0853mm), os quais apresentaram resultados melhores em comparação ao grupo ORQ (0,0562mm) ( $p < 0,05$ , Holm-Sidak) **(Figura 7)**. Seguindo este mesmo padrão, a separação entre as trabéculas (Tb.Sp) apresentou-se aproximado os valores médios do grupo SHAM (0,129mm) e ORQTERI (0,122mm), com diminuição para o grupo ORQ (0,105mm), com estatística significante na comparação entre o grupo SHAM e ORQ ( $p = 0,028$ ,

Holm-Sidak) (**Figura 8**). Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido uma média de 4,742 para SHAM com valor próximo ao ORQTERI de 4,888, e aumento no número para o grupo ORQ, com 6,451 ( $p=0,057$ , ANOVA) (**Figura 9**).

Em relação a porosidade da área periimplantar avaliada através da porcentagem de porosidade total (Po(tot)), os valores foram 59,582% (SHAM), 64,990% (ORQ) e 58,922% (ORQTERI) mostrando então menor percentual de porosidade nos grupos SHAM e ORQTERI, sendo estatisticamente significativa a comparação entre ORQTERI e ORQ ( $p<0,05$ , Holm-Sidak) (**Figura 10**).

### ***Microscopia confocal a laser***

A representação do turnover ósseo periimplantar pode ser observada nas **figuras 11 A, B e C**. 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.

A avaliação intragrupos para a precipitação dos fluorocromos (calceína vs alizarina), mostrou similaridade nos três grupos experimentais (ANOVA,  $p>0,05$ ). Entretanto, foi possível notar que tanto para o grupo SHAM como para ORQTERI, houve uma tendência de maior precipitação para o vermelho de alizarina em detrimento da calceína. Em contrapartida, houve uma tendência de menor precipitação de alizarina e maior para calceína no grupo ORQ. (**Figura 12**)

Para a avaliação intergrupos, ficou evidente o maior turnover ósseo (precipitação dos fluorocromos) nos grupos SHAM e ORQTERI (teste de Tukey,  $p > 0,05$ ), em comparação ao grupo ORQ (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). **(Figura 12)**

Em relação a taxa de aposição mineral (MAR) por dia de avaliação do reparo ósseo, os maiores valores foram encontrados no grupo ORQTERI com deposição mineral de  $1,62 \mu\text{m}/\text{dia}$  ( $\pm 0,64$ ) e os menores no grupo ORQ com  $0,31 \mu\text{m}/\text{dia}$  ( $\pm 0,13$ ) (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ), **(Figura 13)**

Para a extensão linear de contato osso/implante (ELCOI), o grupo ORQ ( $78,05$ ;  $\pm 57,95$ ) apresentou os menores valores de perímetro (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) e os maiores valores foram encontrados nos grupos SHAM ( $361,47$ ;  $\pm 173,03$ ) e ORQTERI ( $356,58$ ;  $\pm 110,45$ ). **(Figura 14)**

Para a área de osso neoformada (AON), os maiores valores foram observados nos grupos SHAM e ORQTERI, com valores médios de  $8069,52 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 5937,04$ ) e  $7335,42 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 3931,78$ ) (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) e os menores valores para o grupo ORQ com área média de  $970,78 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 823,08$ ). **(Figura 15)**

## 1.6 Discussão

Avaliação morfométrica, por meio da microtomografia computadorizada mostrou melhora do efeito da suplementação com teriparatida, resultando em tecido ósseo de melhor qualidade produzido ao redor dos implantes instalados

na condição sistêmica causada pela orquiectomia. Parâmetros considerados importantes para determinação da quantidade e qualidade do tecido ósseo (Bouxsein et al., 2010), são volume ósseo, porcentagem do volume ósseo, espessura das trabéculas, número e separação das trabéculas e porcentagem de porosidade total. Assim, em se tratando dos parâmetros clínicos para planejamento dos implantes dentários, além das características tomográficas para análise do volume ósseo favorável no posicionamento tridimensional dos implantes, características do osso trabecular é fundamental para determinação da macrogeometria, da conexão protética e do tipo de texturização dos implantes.

O maior volume de tecido ósseo formado encontrado para o grupo ORQTERI, vai de encontro aos valores referentes aos parâmetros de percentual de volume ósseo, tendo assim, de fato, resultados que mostram maior quantidade de osso formado para este grupo. Porém, avaliação da qualidade do tecido ósseo também deve ser realizada. Para tanto, parâmetros de espessura do trabeculado, número e espaçamento das trabéculas e a porosidade total foram avaliados. Osso com maior espessura trabecular, menor número e espaço entre as trabéculas, bem como menor porcentagem de porosidade total, é caracterizado por apresentar melhor qualidade (Bouxsein et al., 2010). Este padrão de tecido ósseo foi encontrando no grupo ORQTERI, seguido pelo grupo SHAM, em que os valores médios se aproximavam muito, mostrando assim, um padrão de osso para grupo ORQTERI muito semelhante ao SHAM, já o grupo ORQ apresentou menores resultados referentes à qualidade óssea dentre os grupos avaliados.



Esta semelhança entre o grupo SHAM e ORQTERI, se repete na dinâmica óssea, observada através das avaliações dos fluorocromos (calceína e alizarina), MAR, ELCOI e AON. Quando comparado ao grupo ORQ, foi possível avaliar relevância dos resultados de SHAM para ELCOI e AON ( $p < 0,05$ ) e, ao grupo ORQTERI na avaliação entre quantidade de osso novo/velho formado (através da calceína e alizarina) e na MAR ( $p < 0,05$ ).

Ficou evidente que Teriparatida foi capaz de reverter o efeito da quantidade e qualidade óssea observada no reparo ósseo periimplantar dos animais orquiectomizados. Como esperado, sua atuação direta no anabolismo ósseo, bem como de forma indireta no aumento da absorção intestinal de cálcio (Amugongo et al., 2014; Niimi et al., 2015 e Farahmand et al., 2016), promove maior formação óssea. Foi possível notar em todos parâmetros avaliados, inclusive com alterações estatisticamente significantes, quando comparado principalmente ao grupo ORQ. Vale ressaltar que este grupo mostrou resultados com padrão de qualidade óssea reduzida, com características de tecido ósseo com maior porosidade e trabéculas mais finas e com menor volume, além de turnover reduzido (menores valores de calceína e alizarina), e menores valores de ELCOI e AON. Estes achados histométricos e morfométricos, confirmam e validam o modelo experimental de osteopenia/osteoporose, como proposto neste estudo, por meio da orquiectomia em ratos.

Em relação aos resultados da dinâmica do tecido ósseo, por meio dos valores da área de fluorocromos e da taxa de aposição mineral, ficou evidente na avaliação intergrupos que o procedimento de orquiectomia promoveu diminuição significativa do turnover celular. Ao passo que o grupo teste

(ORQTERI) assemelhou-se aos animais saudáveis (SHAM). A precipitação de cálcio na matriz extracelular, representada pela fluorescência dos fluorocromos em dois momentos do reparo ósseo periimplantar (14 e 42 dias de pós-operatório), mostrou desequilíbrio na comparação entre os grupos experimentais, com maior ênfase para o grupo ORQ.

Neste contexto, clinicamente, quadros de osteoporose ou osteopenia, que apresentam diminuição na massa e densidade do tecido ósseo, podem causar diminuição da estabilidade primária no momento da instalação dos implantes osseointegráveis nos maxilares e, por conseguinte, pode aumentar taxa de falha dos mesmos. (Von Wowern e Kollerup, 1992; Shapurian et al., 2006 e Drage et al. 2007; Lirani-Galvão e Lazaretti-Castro, 2010). Portanto, terapias medicamentosas com Teriparatida, cujo efeito farmacológico podem resultar em aumento na quantidade, qualidade e no turnover do tecido ósseo, devem ser estudadas. Estudos clínicos futuros devem ser delineados com intenção de analisar nos pacientes que fazem esta terapia, aumento da estabilidade, taxa de sobrevivência e sucesso do tratamento reabilitador dos implantes osseointegráveis.

Dois estudos clínicos (Finkelstein et al., 2003; Finkelstein et al., 2006) realizados em pacientes do gênero masculino e com osteoporose instalada, avaliaram efeito de medicações anabólicas e anti-reabsortivas, como a Teriparatida, o alendronato de sódio e combinação destas duas, na prevenção de fraturas vertebrais e ossos longos. Concluiu-se que teriparatida administrada de forma isolada é mais eficaz no tratamento da osteoporose, uma vez que apresentou maiores valores de densidade óssea mineral. Já a

utilização simultânea de um bisfosfonato e teriparatida apresentou piores resultados, pois o alendronato de sódio parece neutralizar a ação anabólica da Teriparatida no tecido ósseo (Finkelstein et al., 2003; Finkelstein et al., 2006).

Osteoporose ainda é motivo de muita discussão na literatura no tocante ao tratamento reabilitador com implantes osseointegráveis. Estudos analisaram a porcentagem de contato entre tecido ósseo e implantes instalados na tíbia de ratas Wistar osteoporóticas (Yamazaki et al. 1999, Ozawa et al. 2002 e Ramalho-Ferreira et al. 2015). Os autores observaram que redução da massa óssea nas ratas osteoporóticas promoveu menor área de contato entre osso e implante, podendo ocasionar menor estabilidade no suporte das próteses.

Como principal causa da osteoporose nas mulheres é aumento da reabsorção óssea, o tratamento deve ser realizado com drogas anti-reabsortivas, através de administração de alendronato de sódio ou raloxifeno (Drake et al., 2012; Cosman, 2014 e Ramalho-Ferreira et al. 2015). Porém no gênero masculino a osteopenia é causada pela redução da formação óssea, o que justifica o estudo de drogas anabolizantes ou seja, que estimulam a formação óssea, tal como a teriparatida (Cosman, 2014; Niimi et al., 2015 e Farahmand et al., 2016).

A terapia com Teriparatida é uma alternativa que deve ser levada em consideração e deve ser estudada, para casos que se faz necessário reabilitações bucais implantossuportadas, em pacientes do gênero masculino com osteoporose. Sendo assim, resultados encorajadores deste trabalho devem ser levados em consideração para realização de novos estudos com

enfoque clínico, avaliando viabilidade de associação destes medicamentos para tratamentos previamente e durante terapia com implantes dentários.

Diante dos resultados obtidos por este estudo, foi possível concluir que o tratamento com Teriparatida em ratos orquiectomizados melhorou a dinâmica óssea, além de aumentar volume e melhorar qualidade do osso periimplantar.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer à FAPESP (# 2015/04649-7), pela concessão de bolsa Mestrado ao primeiro autor (Gomes-Ferreira, PHS) e pelo auxílio regular em pesquisa concedido à orientadora do trabalho (Okamoto, R) (# 2015/14688-0). 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. Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, pela viabilização das análises por microscopia confocal a laser. E a empresa Neodent, pelo fornecimento dos implantes utilizados para confecção deste trabalho.

### **1.7 Referências**

Amugongo SK, Yao W, Jia J, Dai W, Lay YA, Jiang L, Harvey D, Zimmermann EA, Schaible E, Dave N, Ritchie RO, Kimmel DB & Lane NE (2014). Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone

(1-34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone*. 67:257-68.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, & Müller R (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 25(7):1468-86.

Cosman F (2014). Anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: combination and sequential approaches. *Curr Osteoporos Rep*. 12(4):385-95.

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 28(1):2-17.

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

Drake MT & Khosla S (2012). Male osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 41(3):629–641.

Farahmand P, Spiegel R & Ringe JD (2016). [Male osteoporosis]. *Z Rheumatol*. 75(5):459-65.

Finkelstein JS, Hayes A, Hunzelman JL, Wyland JJ, Lee H & Neer RM (2003). The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. *N Engl J Med* 349:1216e26.

Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SM, Wyland JJ, Lee H, de la Paz AV, Gibson K & Neer RM (2006). Effect of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *J Clin Endocrinol Metab* 91(8):2882-7.

Gennari L, Nuti R & Bilezikian JP (2004). Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5898e6590.

Giusti A & Bianchi G (2014). Treatment of primary osteoporosis in men. *Clin Interv Aging* 30;10:105-115

Glösel 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(3):516-24.

Hagino H (2016). [Diagnosis of Male Osteoporosis]. *Clin Calcium*. 26(7): 995-1001.

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

Kaufman JM & Goemaere S (2008). Osteoporosis in men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:787e812.

Kaufman JM, Lapauw B & Goemaere S (2014). Current and future treatments of osteoporosis in men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 28(6):871-84.

Lirani-Galvão AP & Lazaretti-Castro M (2010). Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54 (2): 171-8.

Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R (2011). The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 32(15):3855-61.

Mittan D, Lee S, Miller E, Perez RC, Basler JW & Bruder JM (2002). Bone loss following hypogonadism in men with prostate cancer treated with GnRH analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3656e66.

Niimi R, Kono T, Nishihara A, Hasegawa M, Matsumine A, Kono T & Sudo A (2015). Analysis of daily teriparatide treatment for osteoporosis in men. *Osteoporos Int* 26(4):1303-9

Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD, & Nishimura I (2002). Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*. 30(1):137-43.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr & Okamoto R: (2015). Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 44(6):798-805.

Seifi M, Ezzati B, Saedi S & Hedayati M (2015). The Effect of Ovariectomy and Orchiectomy on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Wistar Rats. *J Dent (Shiraz)*. 16(4):302-9.

Shapurian T, Damoulis P, Reiser GM, Griffin TJ & Rand WM (2006). Quantitative evaluation of bone density using Hounsfield Index. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21:290-297.

Shibata Y, Tanimoto Y, Maruyama N, Nagakura M. (2015) A review of improved fixation methods for dental implants. Part II: biomechanical integrity at bone-implant interface. *J Prosthodont Res.* 59(2):84-95.

Tabata LF, Rocha EP, Barao VA & Assuncao WG (2011). Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 26:482-491.

Veldurthy V, Wei R, Oz L, Dhawan P, Jeon YH & Christakos S (2016). Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res.* 18(4):16041.

Von Wowern N & Kollerup G (1992). Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J Prosthet Dent.* 67(5):656-60.

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(4):411-8.



## Tabelas

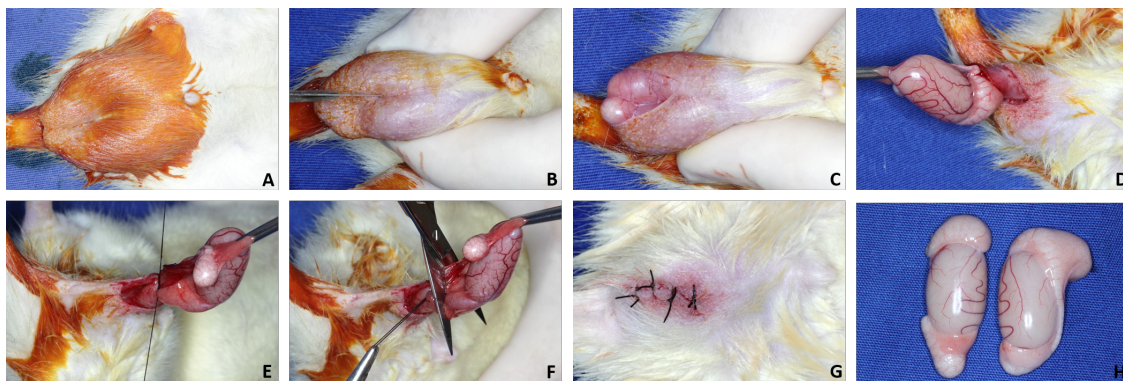
**Tabela 1** – Grupos experimentais de acordo com o tratamento com Teripatida.

**SHAM (n= 6)**, ratos submetidos à cirurgia fictícia e não receberam tratamento medicamentoso.

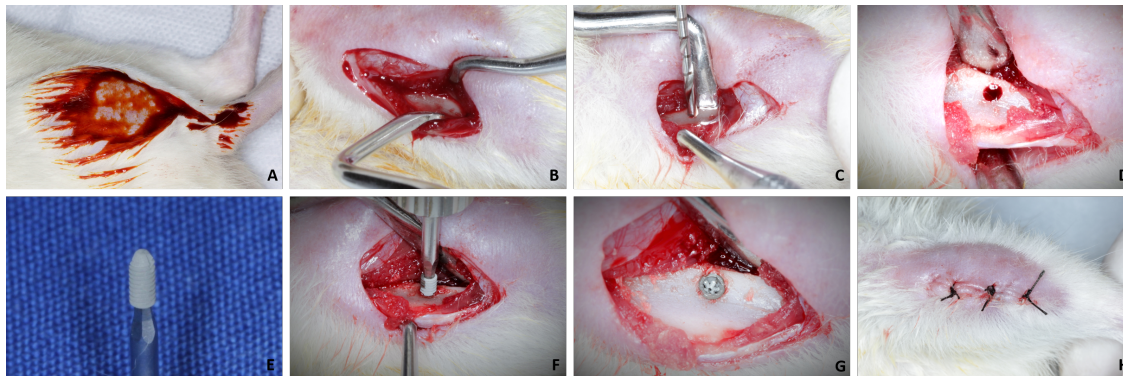
**ORQ (n=6)**, ratos submetidos à orquiectomia que não receberam tratamento medicamentoso

**ORQTERI (n=6)**, ratos submetidos à orquiectomia que receberam teriparatida (dose 0,5 µg/kg/dia).

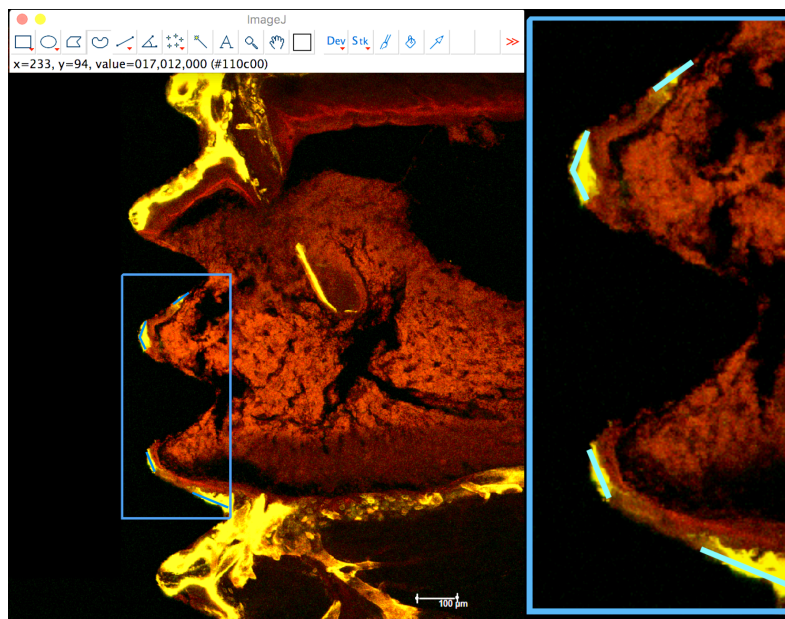
## Figuras



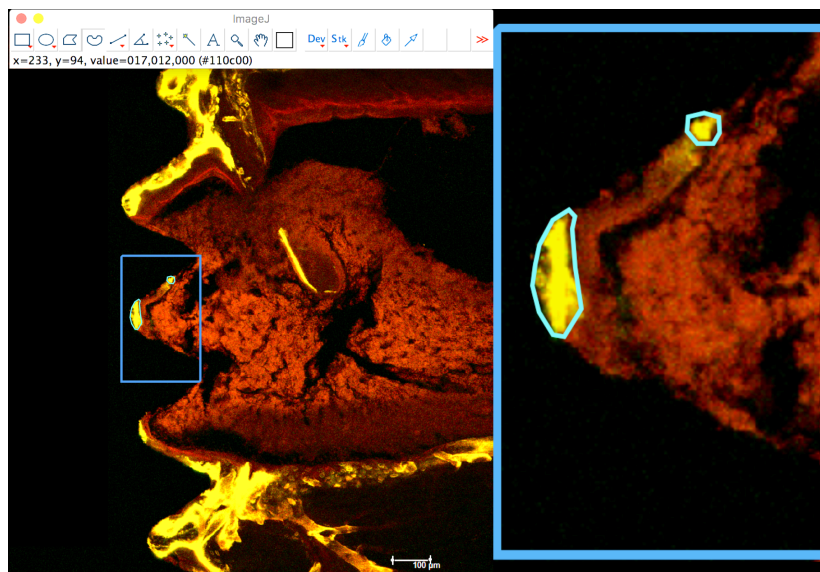
**Figura 1** – **A:** Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B:** Incisão; **C e D:** Exposição de ambos escrotos; **E:** Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F:** Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G:** Sutura; **H:** Ambos escrotos removidos (Orquiectomia).



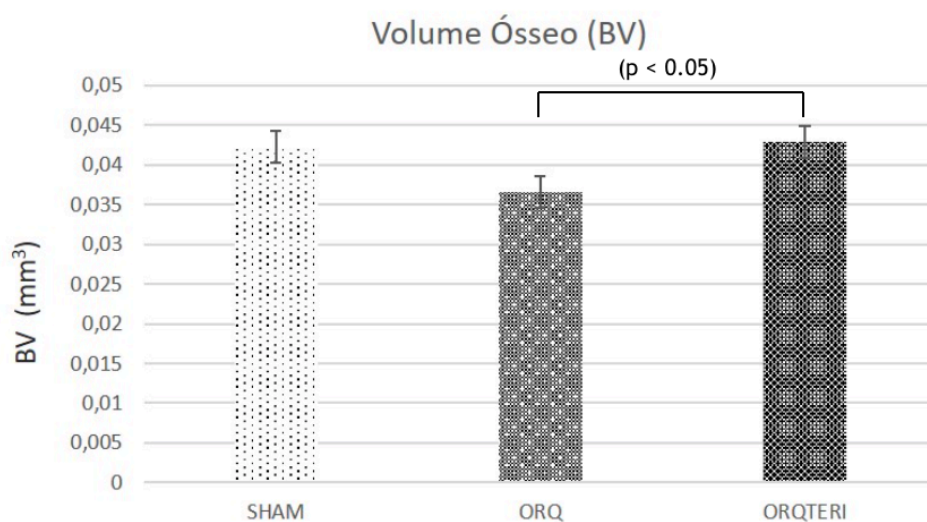
**Figura 2** – **A:** Antissepsia com PVPI em ambas tíbias após tricotomia; **B:** Acesso a metáfise tibial; **C e D:** Fresagem com broca de 1,3mm de diâmetro e leito; **E:** Implante de 1,5 x 3,5mm; **F:** Instalação do implante; **G:** Implante instalado em nível ósseo; **H:** Sutura.



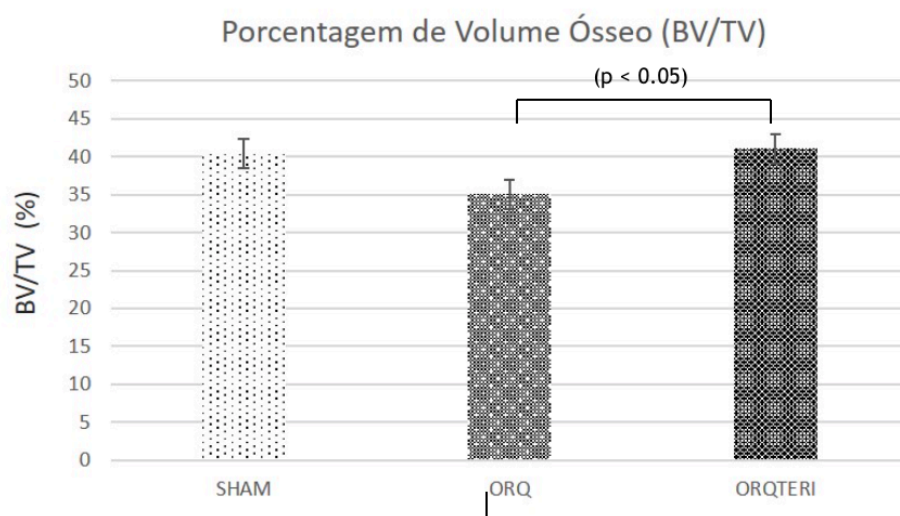
**Figura 3** – Imagem da região periimplantar obtida através da microscopia confocal, padronizada para o cálculo de ELCOI (perímetro), representada pelas linhas azuis. Considerou-se na análise ELCOI as linhas fluorescentes na sobreposição da calceína e alizarina na interface osso/implante na região entre a terceira e quinta espiras do implante.



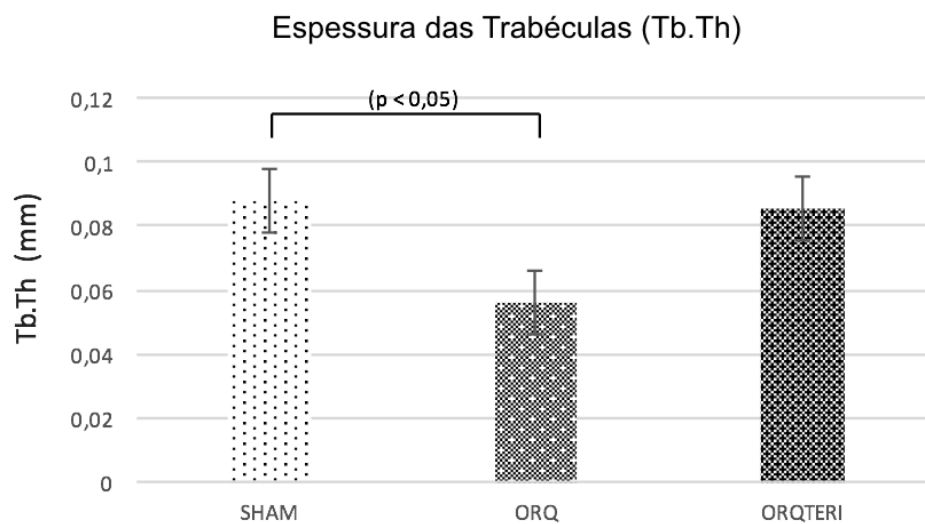
**Figura 4** – Imagem da região periimplantar obtida através da microscopia confocal, padronizada para o cálculo de AON, representada pelas linhas circundantes azuis. Considerou-se na análise AON as linhas fluorescentes na sobreposição da calceína e alizarina na interface osso/implante na região entre a terceira e quarta espiras do implante.



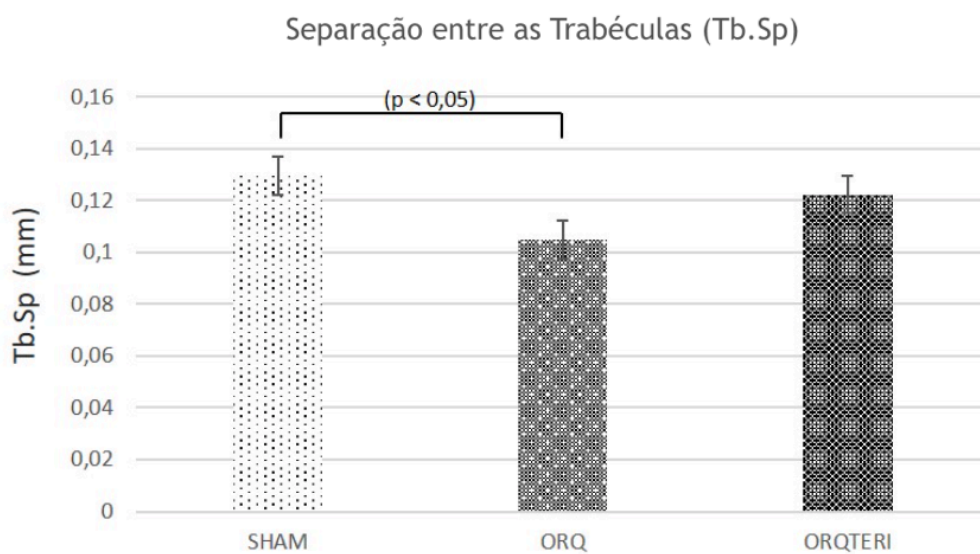
**Figura 5** – Quantificação do volume ósseo. Volume equiparados do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ.



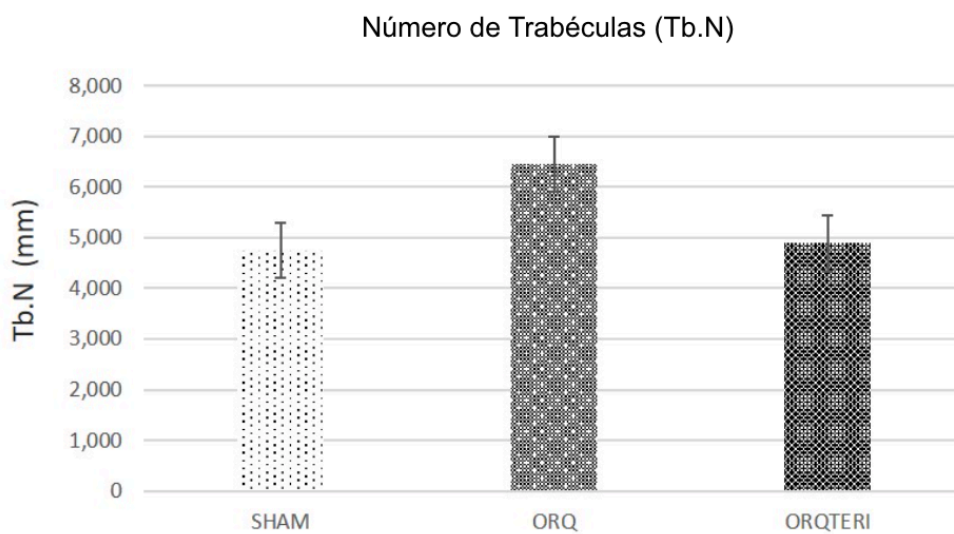
**Figura 6** – Quantificação do percentual de volume ósseo. Percentuais aproximados do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ.



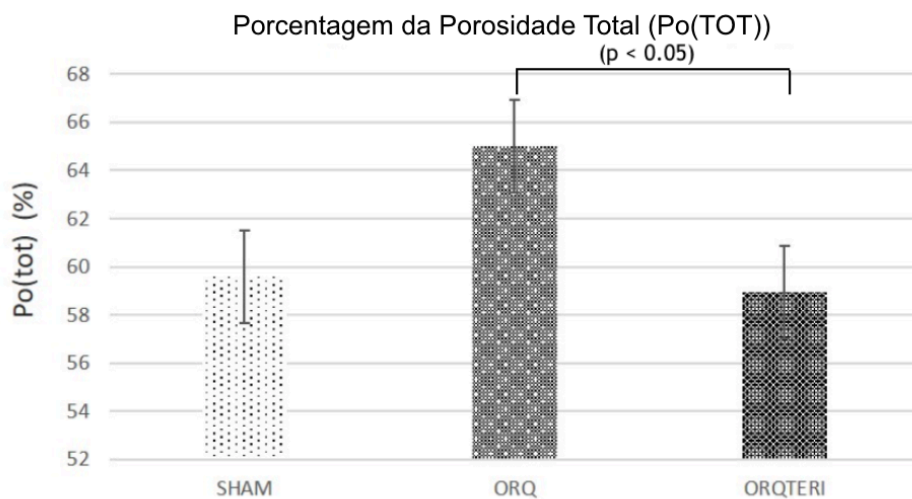
**Figura 7** – Quantificação da espessura das trabéculas. Valores similares do SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ ( $p > 0,05$ ).



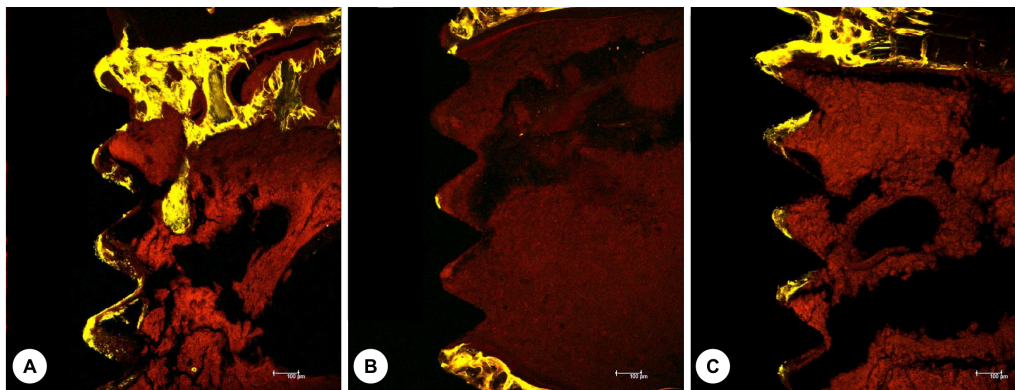
**Figura 8** – Quantificação da separação entre as trabéculas. Valores maiores para SHAM e ORQTERI e menor para o grupo ORQ, com estatística significativa na comparação entre SHAM e ORQ.



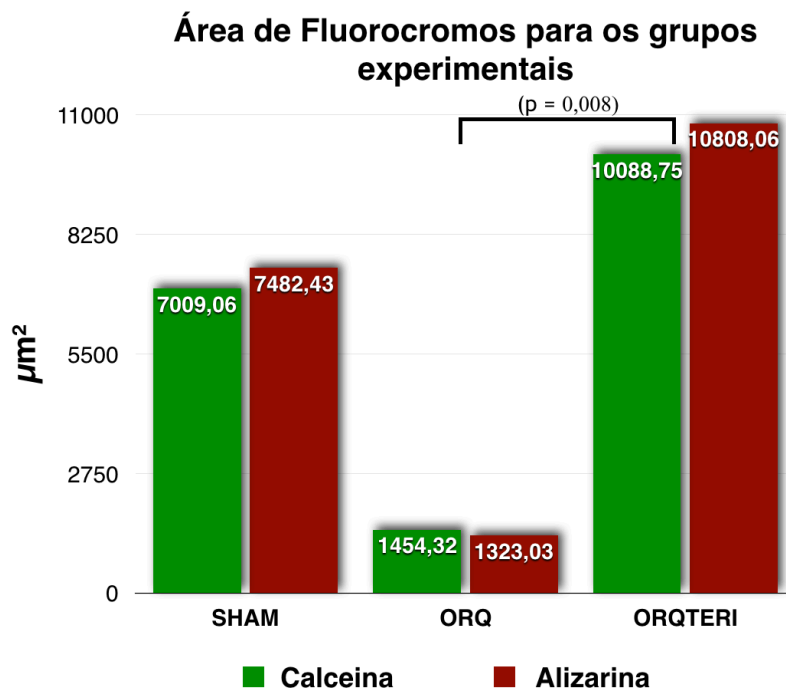
**Figura 9** – Quantificação do número de trabéculas. Valor maior para ORQ e menor para SHAM e ORQTERI ( $p > 0,05$ ).



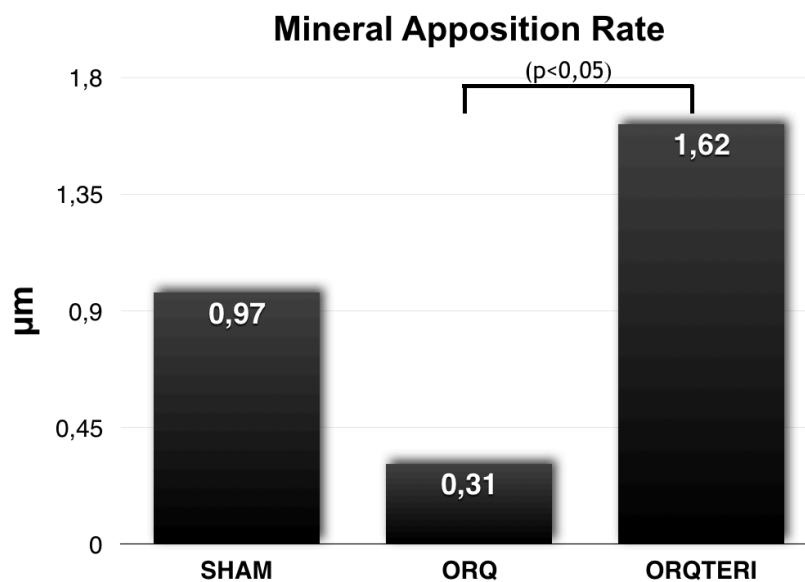
**Figura 10** – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para o grupo ORQ e menos poroso para SHAM e ORQTERI ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11** – Marcação das linhas fluorescentes na matriz de cálcio pela calceína (verde) e alizarina (vermelho) sobrepostas, evidenciando a dinâmica do osso periimplantar dos grupos experimentais: (A) – SHAM; (B) – ORQ e (C) – ORQTERI.

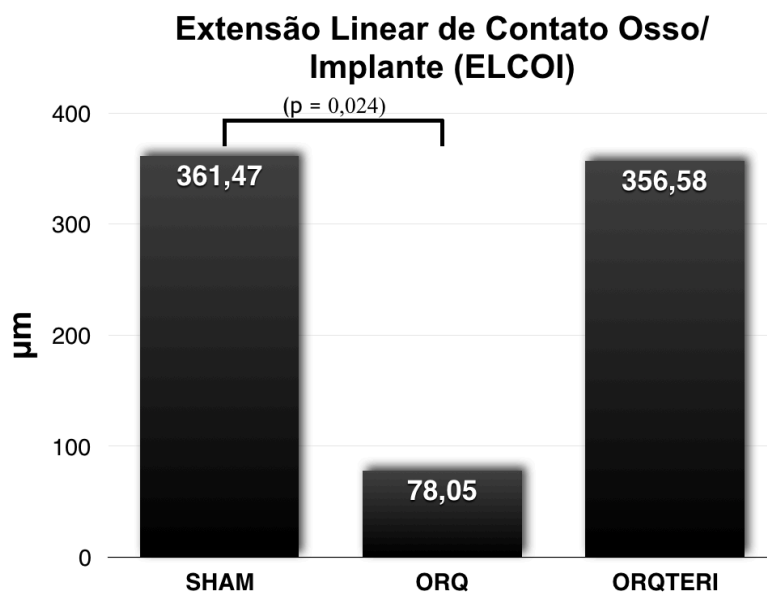


**Figura 12** – Área óssea periimplantar ( $\mu\text{m}^2$ ) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, pelas expressões de calceína e alizarina. (comparações intergrupos).

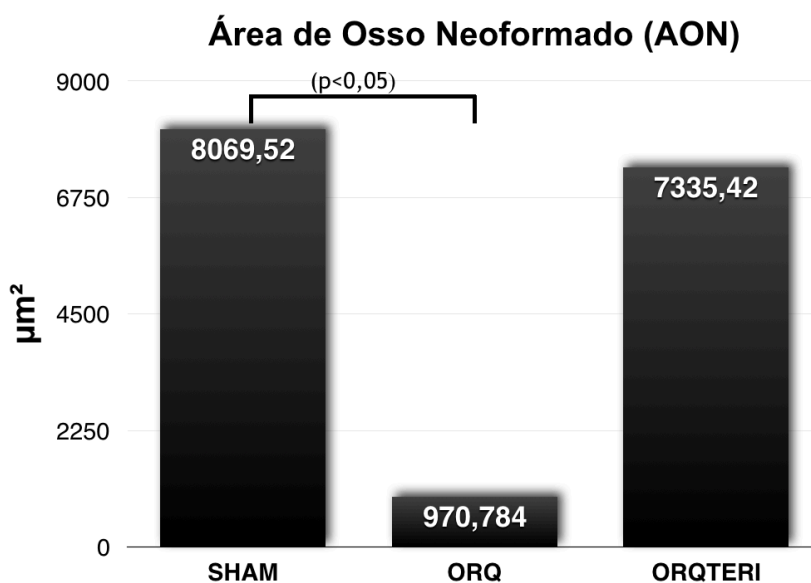


**Figura 13** – Taxa de aposição mineral por dia ( $\mu\text{m}$ ) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, avaliada linearmente.







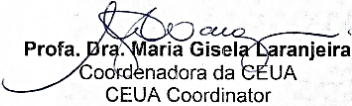
**Figura 14** – Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) (µm) dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI, avaliação do perímetro.



**Figura 15** – Área de osso neoformada (AON) em µm<sup>2</sup> dos grupos SHAM, ORQ e ORQTERI.

**ANEXO**

## 1.8 Anexo A - Comitê de ética

	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"</b>	
CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA		
<b>CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais</b> <b>CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals</b>		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da teriparatida (PTH 1-34) no reparo ósseo periimplantar em ratos osteoporóticos. Análises histométrica, imunoistoquímica, microtomográfica, biomecânica, por microscopia confocal a laser e PCR em tempo real", Processo FOA nº 2015-00238, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de março de 2015.</p>		
<b>VALIDADE DESTES CERTIFICADO:</b> 02 de Abril de 2016. <b>DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:</b> até 02 de Maio de 2016.		
<b>CERTIFICATE</b>		
<p>We certify that the study entitled "Effect of teriparatide (PTH 1-34) in the peri-implant bone healing in osteoporotic rats. Histometric, immunohistochemistry, microtomographic, biomechanical, confocal laser microscopy and real-time PCR analysis", Protocol FOA nº 2015-00238, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 25, 2015.</p>		
<b>VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:</b> April 02, 2016. <b>DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:</b> May 02, 2016.		
 <b>Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira</b> Coordenadora da CEUA CEUA Coordinator		
<hr/> <small>CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais            Faculdade de Odontologia de Araçatuba            Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba            Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP            Fone (18) 3636-3234      Email CEUA: ceua@foa.unesp.br</small>		

## **1.9 Anexo B - Normas para publicação do periódico Clinical Oral Implants Research**

### Author Guidelines

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

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

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

### 1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the

## Anexo

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

## Anexo

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

## Anexo

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/>, <http://clinicaltrials.gov/>, <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

## Anexo

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>.



## Anexo

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

## Anexo

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

## Anexo

- 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

## Anexo

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](mailto: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

## Anexo

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).

## Anexo

### 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.

## Anexo

**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.

## Anexo

**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.



## Anexo

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](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

## Anexo

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

## Anexo

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

## Anexo

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.