



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**  
**Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba**  
**Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada**

**Pâmela Letícia dos Santos**

Influência da técnica cirúrgica guiada para  
implantes sobre o aquecimento ósseo, a  
viabilidade celular imediata e a deformação  
de fresas após osteotomia para implantes.

**Araçatuba, SP**

**2011**

**Pâmela Letícia dos Santos**

Influência da técnica cirúrgica guiada para implantes sobre o aquecimento ósseo, a viabilidade celular imediata e a deformação de fresas após osteotomia para implantes.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba-UNESP para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia” – Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

**Orientador:** Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior

**Araçatuba, SP**

**2011**

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Santos, Pâmela Letícia dos.

S237a      Influência da técnica cirúrgica guiada para implantes sobre o aquecimento ósseo, a viabilidade celular imediata e a deformação de fresas após osteotomia para implantes./ Pâmela Letícia dos Santos. – Araçatuba : [s.n.], 2011  
62 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2011  
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Implante dentário endoósseo 2. Osteotomia 3. Sobrevivência celular 4. Microscopia eletrônica de varredura

Black D7  
CDD 617.64

# *DEDICATÓRIA*

*Dedico esta Dissertação...*

*À Deus,*

que em Sua infinita bondade, me concedeu tantas alegrias, me deu força para superar todos os obstáculos que me apareceram, que me confortava nos momentos de angústia e que me deu saúde para enfrentar mais uma etapa da minha vida.

*À minha mãe, Marilda Correa Leite,*

“Se fosse fácil falar de você, a mais bela palavra não vai descrever você!”

Você que com um infinito amor de mãe acreditou desde o princípio que esse sonho poderia ser concretizado. Não poupando esforços para me dar suporte nos momentos difíceis longe de casa, e que, apesar da distância, sempre estava plenamente presente em todos os momentos me dando força, escutando as dificuldades, me encorajando a continuar e a lutar pelos meus objetivos.



### *Ao meu pai, Ademir dos Santos*

algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Agradeço o apoio, incentivo e toda participação durante o transcorrer desta jornada.

### *Aos meus irmãos Lítvia e Felipe,*

pelo companheirismo e amizade acima de tudo, pelo incentivo que sempre me deram em seguir em frente buscando meus ideais, enfim, por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos ao longo de nossas vidas e que, com toda certeza, voltaremos a vivenciar num futuro próximo.

### *Ao Aroldo,*

pelo carinho, amor, companheirismo, confiança, paciência e compreensão. Pelas horas e horas de ausência minha, pela distância que sempre tentávamos minimizar quando a saudade apertava, pela alegria e simpatia que sempre estiveram presentes em todos os momentos maravilhosos em que nos encontrávamos. Enfim, por tudo que você me transmitiu durante todo esse tempo em que estivemos juntos e que com certeza se continuará ao longo de nossas vidas.

# *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...*

## *Aos meus familiares*

Vó Lurdes, Tia Lurdinha, Lucas, Tia Cidinha, Tio Dirceu, Fernanda, Tio Renato, Ana, Tio Clodo, que em Araraquara torciam e oravam pelos meus estudos longe de casa. Ao meu falecido Tio Gilberto, que muitas vezes se empenhava e se orgulhava comigo, pela contribuição que teve em minha formação.

## *Ao meu orientador, Prof. Dr. Idélmo Rangel Garcia Júnior,*

agradeço profundamente por ter me aceito como sua orientada, pela presença real e orientação segura durante todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho e pela paciência nos momentos difíceis. Admiro-lhe pela sua competência, humildade, humanidade e maneira de conduzir as diversas situações profissionais e pessoais. Mais que um grande professor você se tornou para mim um exemplo. Muito obrigada pelas oportunidades cedidas e pelos ensinamentos transmitidos.

*À Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz*

Existem pessoas que temos que agradecer eternamente, você é uma dessas pessoas. Amiga que muito me ajudou durante toda a minha formação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, sempre incentivando ao estudo e a pesquisa nessa especialidade. Além de todo reconhecimento pela sua ajuda e seus ensinamentos, agradeço pela nossa amizade, companheirismo e trabalho conjunto. Me orgulho muito da nossa amizade, e te digo com toda certeza, não me imagino concluindo mais essa etapa da minha vida sem a sua ajuda. Muito obrigada!

*Ao Prof. Celso Sonoda,*

pela convivência e ensinamentos nesses dois anos. Pela tranquilidade e dignidade com que nos trata, assim como pacientes, funcionários e alunos de graduação. Com certeza um exemplo a ser seguido.

*Ao Prof. Dr. Rogério Margonar*

professor que sempre me incentivou na pesquisa. Além de todo reconhecimento pela sua ajuda e seus ensinamentos, agradeço pela nossa amizade e oportunidades que você sempre me proporcionou. Muito obrigado por tudo!

*Ao Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho (Dinho),*

pelo exemplo de professor, chefe e pessoa. Sempre vou me lembrar como um exemplo alegria de viver e fé.

*Ao Prof. Dr. Michael Saad Neto,*

em todos os momentos em que prontamente me recebeu, concedendo-me valiosos conhecimentos e sábias palavras. O senhor é um grande exemplo de dedicação e mestre que todo o aluno um dia gostaria de ser.

*À Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega,*

pela dedicação ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, pela garra, pelo carinho com que sempre nos acolhe, pelo incentivo e pela disponibilidade em ajudar sempre!

*À Profa. Dra Daniela Ponzoni,*

que com muito primor contribuiu com a minha formação. Agradeço de coração por cada orientação, seja profissional ou mesmo pessoal que vocês me deram nesse período.

*Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi,*

com quem aprendi e despertei a filosofia de “*ser professor*” . Um exemplo que sempre me lembrarei e citarei quando me referir a um verdadeiro docente. Muito obrigado por tudo!

*À Profa. Dra. Roberta Okamoto*

que com sua extrema competência contribuiu com a concretização dessa dissertação. Agradeço pela disponibilidade em sempre me ajudar e pelo aprendizado que me proporcionou nos laboratórios de cirurgia e imunoistoquímica. A professora é um exemplo de serenidade, humildade e dedicação ao ensino e pesquisa.

*Ao Prof. Dr. José Scarso Filho*

que desde a época de minha graduação na Faculdade de Odontologia de Araraquara me apoiou e me deu oportunidades na área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Incentivou-me a trilhar caminhos da pesquisa e me deu força para buscar meus ideais dentro dessa especialidade.

*À Profa. Dra. Daniela Michellini*

que desde a época que morávamos juntas me apoiava. Dani, você é um exemplo a ser seguido, pela dedicação, perseverança, humanidade e honestidade. Muito obrigada!!

*Ao Prof. Dr. Kina e à Profa. Dra. Eunice*

que tive o prazer de conhecer e são pessoas extremamente competentes no que fazem e que trazem consigo a humildade de continuar sempre buscando o aprendizado. Vocês são grandes exemplos.

*À Cleidinha e à Dirce*

que me acolheram com tanto carinho e afeto na cidade de Araçatuba, me fazendo lembrar o que é uma família. MUITÍSSIMO obrigada!!!!

*À Elisa Sartori,*

minha parceira de mestrado, agradeço pela amizade, companheirismo, paciência e dedicação. Obrigada pela ajuda constante nesses dois anos de pós-graduação, pelos preciosos conhecimentos transmitidos e por confiar em mim e me apoiar incondicionalmente.

*À Thaís Yumi Umeda Suzuki,*

grande amiga, pela amizade, carinho, acolhida, pela paciência em me ouvir, pela preocupação constante comigo e por compartilhar inúmeros momentos alegres e tristes da minha vida, sempre me apoiando e acreditando em mim. Você é exemplo de dedicação e amor a tudo o que faz!

*Ao Abrahão, Rodolpho e Igor*

Amigos que me aproximei em Araçatuba, e com eles desfrutei de bons momentos durante o Mestrado. Além de profissionais especiais e competentes, guardam consigo a alegria de viver e de alegrar as pessoas com quem convivem. Vocês são pessoas especiais para mim e espero guardar nossa amizade por muitos anos. Muito obrigado por tudo.

*Ao Francisley Ávila Souza,*

profissional extremamente competente e correto no que faz. Pela amizade que nós construímos no decorrer desses três anos que se passaram, e que vai perdurar por muito tempo ainda. Muito obrigado!

*À Jéssica Lemos Gulinelli,*

pessoa formidável, sempre gentil e alegre que conheci em Araçatuba e foi uma grande companheira nesses anos de pós-graduação. Agradeço muito pelas orientações e pelos momentos que tivemos juntas em Araçatuba.

*À Ana Paula de Souza Faloni,*

pela pessoa maravilhosa que você é e disponibilidade em me ajudar nesse trabalho. Muito obrigada!

*Ao Francisco, a Judite, Andressa, ao André e à Carla*

desde que os conheci eles se tornaram minha segunda família. Sempre me apoiando nos momentos difíceis e me dando força para seguir em frente e realizar meus sonhos.



# *AGRADECIMENTOS...*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP*

que contribuiu de grande forma para minha formação profissional com a sua estrutura física, laboratórios, clínicas, salas de aula e centros cirúrgicos experimentais, onde pude complementar minha formação na área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, tanto na clínica como principalmente no ensino e na pesquisa.

*Aos amigos de Pós-Graduação Nicolas Homsy, Marta, Marcos Heidi, Albanir, Heloísa, Cassiano, Fernando, Jonatas e Pedro*

que me receberam no meu 1º ano de mestrado, e me passaram todos os detalhes do serviço em que estava iniciando. Obrigado pela paciência e pelas orientações.

*Aos amigos do Mestrado,*

Derly, Carla, Lídia, Amália, Daniel e Joel, pela amizade que estamos construindo, pelos aulas agradáveis que passamos juntos, enfim, por todo o trabalho que desenvolvemos juntos na pós-graduação. Tenho certeza que

essa amizade que está apenas começando ainda vai nos proporcionar bons frutos.

*Aos colegas do Mestrado,*

Ellen, Lamis, Leonardo e Gabriel. Agradeço pelos momentos agradáveis que tivemos juntos durante esses anos.

*Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,*

Bernadete, Gilmar, Paulo, Antonia, Odair, que com tanto carinho me receberam. Pelo trabalho extremamente competente que desempenharam para que essa dissertação fosse concretizada. A vocês o meu carinho e eterna admiração.

*Aos estagiários da Cirurgia,*

Fernanda, Caru, Carol, Gustavo, Tarik e Sarah, pela convivência que tivemos e pela ajuda que vocês me deram durante esse período. Sou muito grata a todos vocês.

*Aos amigos da Prótese*

Juliana, Érica e Bruno, que tive a oportunidade de conhecer e desfrutar de bons momentos durante esses dois anos em Araçatuba, não só pessoais como também profissionais. Agradeço pela nossa amizade!

*À Aline, Camila, Isabel, Michele, Patrícia e Paula,*

pela paciência, disponibilidade, alegria e admirável interesse em nos ajudar sempre. Parabéns pela competência de vocês!

*À Conexão Sistema de Próteses,*

por doar o material necessário para a realização desse estudo.

# EPÍGRAFE

*"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,  
mas lutamos para que o melhor fosse feito..."*

*Não somos o que deveríamos ser,  
não somos o que iremos ser...*

*Mas, graças a Deus, não somos o que éramos".*

*Martin Luther King*

Santos PL. Influência da técnica cirúrgica guiada para implantes sobre o aquecimento ósseo, a viabilidade celular imediata e a deformação de fresas após osteotomia para implantes. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

### **Resumo geral**

O propósito deste trabalho foi avaliar o efeito da osteotomia para implantes, seguindo o protocolo de cirurgia guiada comparando-o com a clássica, sobre o aquecimento tecidual, bem como verificar o desgaste das fresas por microscopia eletrônica de varredura e a viabilidade celular imediata. Para isso foram utilizadas tíbias de 20 coelhos, divididos em 2 grupos – GRUPO CONTROLE (GC) e GRUPO GUIADA (GG) - os quais foram divididos em 5 subgrupos (G): G0, G1, G2, G3, G4, que corresponderam às fresas sem uso e as utilizadas 10, 20, 30 e 40 vezes, respectivamente. Cada animal recebeu 10 seqüências de osteotomias, sendo 5 de cada grupo, aleatoriamente em cada tíbia, na velocidade de 1600 r.p.m, e por meio de irrigação externa. A oscilação térmica tecidual durante cada fresagem foi quantificada por meio de termopares. As brocas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a quantificação da deformação das fresas foi realizada por meio do software ImageLab 2000. As áreas osteotomizadas foram coletadas, processadas para inclusão em parafina, e submetidas ao processamento imunoistoquímico para a expressão das proteínas osteoprotegerina (OPG), Receptor Ativador do Fator Nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL), osteocalcina (OC) e caspase 3(cas 3). Os dados obtidos por meio da análise térmica foram submetidos ao teste de Mann-Whitney ( $p=0,05$ ), já os valores de deformação das brocas foram submetidos ao teste t. O aquecimento ósseo no GG foi estatisticamente maior do que no GC. Na análise por meio do MEV, não houve

diferença estatística entre os grupos, mas verificou-se que a deformação foi progressiva de acordo com a maior utilização das fresas. Na análise da viabilidade celular, não houve diferença estatística na comparação de OPG, RANKL e cas-3 entre os grupos. Já na comparação da OC, houve diferença significativa entre GG e GC. De acordo com a metodologia aplicada foi possível concluir que a técnica de fresagem pela cirurgia guiada promoveu maior aquecimento ósseo, porém ambas técnicas não atingiram o limiar de temperatura que causa necrose imediata. A deformação das fresas é diretamente proporcional ao número de reutilizações das mesmas, em ambos os grupos. Além disso, houve maior tendência de deformação das fresas do GG, principalmente na 40ª osteotomia. Na análise imuno-histoquímica foi possível concluir que o GC teve maior viabilidade celular que o GG.

Palavras-chave: implantes dentários, aquecimento ósseo, proteínas ósseas, fresagem, osteoprotegerina, osteocalcina, caspase-3.

Santos PL. Influence of guide surgery technique for implants osseous heat generation, immediate bone-cell viability and the wear drills after implants osteotomies for implants. [dissertation]. Araçatuba: UNESP – Sao Paulo State University; 2010.

### **General abstract**

The purpose of this study was to evaluate the effect of osteotomy for implants, following the protocol guided surgery comparing it with the classical, tissue heating, check the wear of the drills by scanning electron microscopy, and cell viability. For such purpose, the tibia of 20 rabbits were divided into 2 groups - Control Group (CG) and GUIDED GROUP (GG) - which were divided into five subgroups (G): G0, G1, G2, G3, G4, which corresponded to the cutters without used and used 10, 20, 30 and 40 times respectively. Each animal received 10 sequences osteotomies, 5 in each group randomly in each tibia at a speed of 1600 rpm, and through external irrigation. The tissue thermal oscillation during each milling was measured using thermocouples. The drills were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), and quantification of the deformation of the cutters was performed using the software ImageLab2000. Osteotomized areas were collected, processed for paraffin, and subjected to immunohistochemical processing for the protein expression of osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B (RANKL), osteocalcin (OC) and caspase 3 (cas 3). The data obtained by thermal analysis were tested using the Mann-Whitney test ( $p = 0.05$ ), the strain values of the drills were tested using parametric t-test. Results in the heating bone in the GG was statistically higher than in CG. In the analysis by means of SEM, it was found that deformation was progressive in accordance with the increased use of milling drills. In the analysis of cell viability, no statistical difference when comparing each protein, OPG, RANKL and CASPASE-3, between groups. In the

comparison between the OC and GG GC, there was a statistically significant difference. According to the methodology it was concluded that the technique of milling by keyhole surgery caused more warming and more bone deformation of the cutter when compared with the classical technique during the preparation of the receptor site of dental implants. Both techniques have not reached the threshold temperature that causes immediate necrosis. In immunohistochemical analysis we concluded that the GC had higher cell viability than the GG.

Key Words: dental implants; heat generation; bone proteins; drilling; osteoprotegerin, osteocalcin, caspase-3.



# LISTA DE FIGURAS

**Capítulo 1:** Avaliação do aquecimento ósseo após osteotomia para implantes: técnica clássica e guiada.

<b>Figuras</b>		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1</b>	Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.	63
<b>Figura 2</b>	Termômetro digital Salvterm utilizado para mensurar a temperatura.	63
<b>Figura 3</b>	Registro da temperatura prévia a fresagem.	64
<b>Figura 4</b>	Fresagem inicial do GC, com fresa tipo lança sob irrigação abundante de solução salina a 0,9%.	64
<b>Figura 5</b>	Fresagem sequencial para implante do GC, com a fresa helicoidal	65
<b>Figura 6</b>	Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.	65
<b>Figura 7</b>	Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança.	66
<b>Figura 8</b>	Fresagem sequencial para implante do GG, as fresas helicoidais.	66
<b>Figura 9</b>	Comparação da oscilação térmica relacionada ao tipo de fresa entre o GC e GG.	67
<b>Figura 10</b>	Comparação do aquecimento ósseo em relação ao número de fresagens entre o GC e o GG.	68

## Capítulo 2: Avaliação da deformação das fresas após osteotomia para implantes: técnica cirúrgica clássica e guiada.

<b>Figuras</b>		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1</b>	Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.	94
<b>Figura 2</b>	Fresagem inicial do GC, com fresa tipo lança sob irrigação abundante de solução salina a 0,9%.	94
<b>Figura 3</b>	Fresagem sequencial para implante do GC, com as fresas helicoidal	95
<b>Figura 4</b>	Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.	95
<b>Figura 5</b>	Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança sob irrigação abundante de solução salina a 0,9%.	96
<b>Figura 6</b>	Fresagem sequencial para implante do GG, a fresa helicoidal.	96
<b>Figura 7</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ilustrando deformação da ponta ativa da fresa lança, com áreas de derretimento do metal.	97
<b>Figura 8</b>	MEV mostrando a condensação de metal desgarrado na ponta ativa da fresa helicoidal.	97
<b>Figura 9</b>	MEV evidenciando defeitos em formato de cavidade (subtração de metal) na ponta ativa das fresas.	98
<b>Figura 10</b>	Template construído a partir da fresa lança inicial para auxiliar na quantificação das perdas de substância em fresas do tipo lança	98
<b>Figura 11</b>	MEV da fresa do tipo lança sobreposta no template (em vermelho) para evidenciar perda de substância na ponta ativa da fresa.	99
<b>Figura 12</b>	Quantificação das deformações das fresas no software Imagelab 2000 através da ferramenta <i>selecionar região</i> .	99

- Figura 13** Quantificação das áreas deformadas em pixels no software 100  
Imagelab 2000 através da ferramenta *planilha de cálculos*
- Figura 14** Média de deformação das fresas, em porcentagem, relacionada com 100  
o número de reutilizações.

### Capítulo 3: Cirurgia guiada para implantes: Qual a influência dessa nova técnica para a viabilidade celular imediata?

<b>Figuras</b>		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1</b>	Fresagem sequencial para implante do GC, com as fresa helicoidal	139
<b>Figura 2</b>	Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.	139
<b>Figura 3</b>	Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança.	140
<b>Figura 4</b>	Fresagem sequencial para implante do GG, as fresas helicoidais.	140
<b>Figura 5</b>	Método de detecção da imunoperoxidase, utilizando-se o complexo Streptavidina-biotina para a amplificação do sinal da reação e a Diaminobenzidina (DAB) para coloração.	141
<b>Figura 6</b>	Gráfico comparando o balanço entre a expressão de OPG após reutilização das fresas no GC e no GG.	141
<b>Figura 7</b>	Expressão de OPG no GC4 (Aumento de 200x). Marcação acastanhada nos citoplasmas celulares (setas azuis).	142
<b>Figura 8</b>	Expressão de OPG no GG4 (Aumento de 200x). Marcação acastanhada nos citoplasmas celulares (setas azuis).	142
<b>Figura 9</b>	Gráfico comparando o balanço entre a expressão de RANKL após reutilização das fresas em GC e GG.	143
<b>Figura 10</b>	Expressão de RANKL no GC4 (Aumento de 200x). Observar marcação no citoplasma dos osteócitos.	143
<b>Figura 11</b>	Expressão de RANKL no GG4 (Aumento de 200x). Observar marcação no citoplasma dos osteócitos.	144
<b>Figura 12</b>	Gráfico comparando o balanço entre a expressão de OC após reutilização das fresas em GC e GG.	144
<b>Figura 13</b>	Expressão de OC no GC4. Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.	145

<b>Figura 14</b>	Expressão de OC no GG4. Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo	145
<b>Figura 15</b>	Gráfico comparando o balanço entre a expressão de cas-3 após reutilização das fresas em GC e GG.	146
<b>Figura 16</b>	Expressão de cas3 no GC3 (aumento de 200x). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.	146
<b>Figura 17</b>	Expressão de cas3 no GG1 (aumento de 200x). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.	147
<b>Figura 18</b>	Gráfico comparando a razão RANKL:OPG em relação as reutilizações das fresas.	148

# LISTA DE TABELAS

**Capítulo 3:** Cirurgia guiada para implantes: Qual a influência dessa nova técnica para a viabilidade celular imediata?

<b>Tabela 1</b>	Média da expressão das proteínas RANKL, OPG, OC, cas-3 no GC, analisados por meio da imuno-histoquímica.	150
<b>Tabela 2</b>	Média da expressão das proteínas RANKL, OPG, OC, cas-3 no GG, analisados pela imuno-histoquímica.	150
<b>Tabela 3</b>	Razão entre RANKL: OPG	150

# LISTA DE ABREVIATURAS

CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
R.P.M	Rotações por minuto
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
G.C	Grupo controle
G.G	Grupo Guiada
µm	Micrometro
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
PBS	Tampão fosfato salina
HE	Hematoxilina e eosina
OPG	Osteoprotegerina
OC	Osteocalcina
RANKL	Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear κB
TNF	Fator de Necrose Tumoral
cas 3	Caspase 3

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução Geral</b>	30
<b>2. Capítulo 1: Avaliação do aquecimento ósseo após osteotomia para implantes: técnica clássica e guiada</b>	36
<b>2.1 Resumo</b>	37
<b>2.2 Abstract</b>	39
<b>2.3 Introdução</b>	41
<b>2.4 Proposição</b>	44
<b>2.5 Material e Método</b>	46
<b>2.6 Resultado</b>	51
<b>2.7 Discussão</b>	52
<b>2.8 Conclusão</b>	55
<b>2.9 Referências</b>	57
<b>3. Capítulo 2: Avaliação da deformação das fresas após osteotomia para implantes: técnica cirúrgica clássica e guiada.</b>	69
<b>3.1 Resumo</b>	70
<b>3.2 Abstract</b>	72
<b>3.3 Introdução</b>	74
<b>3.4 Proposição</b>	77
<b>3.5 Material e Método</b>	79
<b>3.6 Resultado</b>	82
<b>3.7 Discussão</b>	84
<b>3.8 Conclusão</b>	88



<b>3.9 Referências</b>	90
<b>4. Capítulo 3: Cirurgia guiada para implantes: Qual a influência dessa nova técnica para a viabilidade celular imediata?</b>	101
<b>4.1 Resumo</b>	102
<b>4.2 Abstract</b>	104
<b>4.3 Introdução</b>	107
<b>4.4 Proposição</b>	111
<b>4.5 Material e Método</b>	113
<b>4.6 Resultado</b>	118
<b>4.7 Discussão</b>	122
<b>4.8 Conclusão</b>	127
<b>4.9 Referências</b>	129
<b>Anexos</b>	151

# *1. INTRODUÇÃO GERAL*

## 1. Introdução geral<sup>1</sup>

A reposição de elementos dentais perdidos ocorre desde as civilizações antigas com o intuito de reabilitar as regiões edêntulas. Vários materiais foram utilizados para repor os dentes, sendo os principais: o marfim, o osso esculpido, dentes naturais extraídos e porcelanas. Na década de 30, os materiais metálicos mais utilizados foram os implantes justa-ósseos, os agulhados e os laminados, que se incluem no conceito de ósseofibrointegração<sup>1</sup>.

No entanto, somente anos depois, utilizando câmeras de titânio em tíbias de coelhos, foi que Branemark definiu o conceito de osseointegração, como a união firme e duradoura entre o implante e a estrutura óssea, não permitindo movimentações<sup>2</sup>.

Com o advento da Implantodontia a qualidade de vida de milhares de pacientes ampliou-se nas duas últimas décadas. A previsibilidade da osseointegração atinge altos índices em tempos atuais<sup>3-4</sup>.

Essa modalidade de tratamento preconiza o planejamento protético reverso para garantir o sucesso da reabilitação com próteses implantossuportadas. O planejamento prévio do posicionamento dos implantes garante estética e função protética adequadas, fatores importantes e difíceis de serem definidos apenas com os exames por imagem em duas dimensões<sup>5-8</sup>.

Os avanços tecnológicos e a preocupação em oferecer um tratamento que garanta a satisfação do paciente direcionaram os estudos para novas técnicas de instalação de implantes. O uso da tomografia computadorizada no diagnóstico e planejamento virtual das reabilitações implantossuportadas tornou-se uma realidade e

---

<sup>1</sup> As referências estão de acordo com as normas de Vancouver e encontram-se no Anexo B

favoreceu o desenvolvimento de novas técnicas com previsibilidade protética, alta precisão e menor morbidade cirúrgica na reabilitação de áreas edêntulas<sup>9</sup>.

A técnica da cirurgia guiada por computador garantiu o planejamento e a simulação virtual do tratamento cirúrgico-reabilitador pelo profissional, oferecendo a vantagem de prever as dificuldades e limitações do caso e a possibilidade de minimizar possíveis erros<sup>10-11</sup>. Esta técnica cirúrgica baseia-se em dados fornecidos por tomografia computadorizada. Cortes tomográficos com 0,4mm de espessura da região de interesse são inseridos no programa, que auxiliará no planejamento cirúrgico-protético, quanto ao posicionamento adequado dos implantes, identificando na tela do computador todas as características anatômicas da região em que será realizado o procedimento<sup>12</sup>.

Em seguida, um guia em acrílico é confeccionado, obtido pela esterolitografia, o qual contém cilindros metálicos que servirão, no momento da cirurgia, de suporte para os guias de brocas (anilhas) que orientam a correta posição e inclinação nas perfurações. O diâmetro dos guias corresponde ao diâmetro das brocas, garantindo, assim, a precisão do sistema. Para sua melhor estabilidade, o guia é fixado por pinos de ancoragem (pinos âncora), para não permitir a desocclusão e para que se inicie a adequada instalação dos implantes, seguindo o planejamento previamente realizado no computador<sup>13</sup>.

O sucesso da osseointegração, dentre outros fatores, depende da reparação primária do sítio de instalação dos implantes<sup>14</sup>. Portanto, a adequada preparação do leito receptor, bem como a presença de um tecido ósseo saudável são precursores críticos nesse processo de reparo<sup>15</sup>.

O trauma térmico local ao agir sobre um tecido pode causar a desnaturação de proteínas, isto é, a proteína perde sua conformação nativa pela ação de um agente desestabilizador. O ponto em que o tecido é danificado varia de acordo com sua

constituição protéica, sendo que o dano pode ser reversível, quando a injúria não ocasiona morte celular, ou irreversível, quando ocorre a morte das células do tecido<sup>16</sup>.

Assim sendo, o calor friccional gerado durante a preparação cirúrgica de tecidos mineralizados produz certo grau de necrose ao redor das células, cuja extensão varia exponencialmente com a magnitude da temperatura alcançada, a pressão durante a osteotomia, o tamanho e forma da fresa, sua capacidade de corte, a fresagem contínua ou intermitente, gradativa ou de passo único, a técnica de irrigação empregada, a velocidade de perfuração, a duração da injúria térmica e finalmente com a densidade óssea<sup>17-19</sup>.

Em 1968, Branemark<sup>20</sup> descreveu as várias zonas de tecidos lesados que ocorrem após o trauma térmico: a primeira zona consiste no tecido permanentemente necrótico; a segunda zona mostra dano tecidual temporário, mas com severas manifestações de problemas microcirculatórios; a terceira zona consiste em anormalidades leves na microcirculação e na estrutura e função do tecido.

Eriksson e Albrektsson (1983, 1984)<sup>21-22</sup> destacaram que o tecido ósseo é mais susceptível à injúria térmica do que previamente se acreditava e que o limiar de temperatura para a sobrevivência tecidual durante a osteotomia é de 47°C, mantendo um tempo de fresagem abaixo de 1 minuto. Dessa forma, o uso repetido de fresas durante o preparo para a instalação dos implantes pode aumentar seu desgaste, reduzindo a eficiência de corte, com conseqüente aumento do calor friccional<sup>23</sup>. Entretanto, devido à escassez de informações sobre a longevidade das fresas dos sistemas de implantes, a decisão do cirurgião-dentista para a substituição das fresas permanece empírica, o que pode comprometer térmica e mecanicamente o preparo do leito receptor e o conseqüente reparo ósseo.

O primeiro passo do processo de reparo ósseo é mais dependente de elementos celulares e vasculares do tecido do que de fatores relacionados às fresas<sup>19</sup>. Nesse contexto destaca-se a presença de proteínas da matriz óssea, que são conhecidas por exercerem um importante papel no aumento da atividade celular ao redor de implantes e conseqüente osseointegração<sup>24-25</sup>.

Dentre essas proteínas destacamos a osteoprotegerina (OPG), que é secretada por osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T. Esta proteína é considerada reguladora da formação e atividade de osteoclastos e sua presença está envolvida com a inibição da reabsorção óssea<sup>26-28</sup>.

Outra proteína que se destaca na dinâmica tecidual óssea é o ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL), constituinte da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Alguns tipos celulares expressam esta proteína, incluindo osteoblastos<sup>29-30</sup>. Considerando que OPG e RANKL tem funções opostas, a análise da expressão relativa das mesmas permite avaliar a tendência ao estímulo ou inibição da formação e da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, influência a remodelação óssea<sup>31-32</sup>.

A osteocalcina (OC) é expressa por osteoblastos e na matriz óssea liga-se à hidroxiapatita<sup>33-34</sup>. Sugere-se que sua atuação ocorra nos estágios iniciais do reparo ósseo<sup>35</sup>.

As caspases são um grupo de proteases essenciais na apoptose. A caspase-3 (cas-3) é uma caspase executora que se relaciona com a clivagem de proteínas do citoesqueleto celular<sup>36</sup>, e é ativada nos osteoblastos em apoptose, portanto, podem demonstrar a viabilidade das células da linhagem osteoblástica<sup>37</sup>. É importante ressaltar a existência de uma ligação entre a apoptose de osteócitos e o recrutamento de osteoclastos para a remodelação óssea<sup>38-39</sup>.

Tendo em vista a função prejudicial que o aquecimento ósseo promove no processo de reparo tecidual e a conseqüente osseointegração dos implantes, a sobreutilização de fresas pode exercer uma influência negativa sobre a temperatura produzida no tecido ósseo, principalmente se houver dificuldade de acesso para a solução irrigadora, como pode ocorrer na técnica guiada, devido à presença do guia cirúrgico com anilhas metálicas.

Portanto, o propósito deste trabalho foi avaliar o efeito da osteotomia para implantes, seguindo o protocolo de cirurgia guiada e comparando-o com o clássico, sobre o aquecimento tecidual e sobre a viabilidade celular óssea imediata, bem como verificar o desgaste das fresas por microscopia eletrônica de varredura.

## 2. *CAPÍTULO 1:*

*“AVALIAÇÃO DO AQUECIMENTO ÓSSEO APÓS  
OSTEOTOMIA PARA IMPLANTES: TÉCNICA  
CLÁSSICA E GUIADA.”*

(Periódico: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Anexo C)



## *2.1 RESUMO*

## 2.1 Resumo

**Objetivo:** O propósito deste trabalho foi avaliar o aquecimento do tecido ósseo após osteotomias para implantes, comparando a técnica de fresagem guiada com a técnica de cirurgia clássica e a influência da reutilização das fresas sobre esse aquecimento.

**Material e Método:** Foram utilizadas tíbias de 20 coelhos, divididos em 2 grupos – GRUPO CONTROLE (GC) e GRUPO GUIADA (GG) - os quais foram divididos em 5 subgrupos (G): G0, G1, G2, G3, G4, que corresponderam às fresas sem uso e utilizadas, 10, 20, 30 e 40 vezes, respectivamente. Cada animal recebeu 10 seqüências de osteotomias, sendo 5 de cada grupo, aleatoriamente em cada tíbia, na velocidade de 1600 r.p.m e sob irrigação externa. A oscilação térmica tecidual durante cada fresagem foi quantificada por meio de termopares. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney ( $p=0,05$ ).

**Resultados:** O aquecimento ósseo no GG foi estatisticamente maior do que no GC.

**Conclusão:** A técnica de fresagem pela cirurgia guiada promoveu maior aquecimento ósseo quando comparada com a técnica clássica durante o preparo do leito receptor dos implantes dentários, sob irrigação externa. O aumento de temperatura do tecido foi diretamente proporcional ao número de reutilizações das fresas. As técnicas não atingiram o limiar de temperatura que causa necrose óssea imediata.

**Palavras-chave:** implantes dentários, osteotomia, aquecimento, cirurgia guiada.

## *2.2 ABSTRACT*

## 2.2 Abstract

**Purpose:** The purpose of this study was to evaluate bone tissue heating after implant osteotomy, comparing the classic drilling technique with the guided surgery technique and assessing the influence of reutilization of surgical drills on this heating. **Material and method:** Tibias of 20 rabbits were used in this research. The animals were divided into a guided surgery group (GG) and a control group (CG), which were then divided into subgroups (G): G1, G2, G3, and G4, corresponding with the number of times the drills were used; 10, 20, 30 and 40 times respectively. Each animal received 10 osteotomy sequences, 5 in each tibia, randomly, at a speed of 1600 rpm under external irrigation. The thermic oscillation of the bone tissue during drilling was quantified with thermocouples. The obtained data were submitted to the Mann-Whitney test ( $p=0.05$ ). **Results:** Bone heating in the GG was statistically higher than in the CG. **Conclusions:** During preparation of the receptor bed of dental implants, the guided surgery technique led to higher bone heating than the classic drilling technique. The increase in tissue temperature was directly proportional to the number of reuses of the drills. Neither technique reaches the temperature threshold where immediate necrosis occurs.

**Keywords:** dental implants; drilling; heat generation; guide surgery;

## *2.3 INTRODUÇÃO*

## 2.3 Introdução

O tratamento reabilitador bucal, por meio da utilização de implantes dentários osseointegráveis, preconiza o planejamento prévio do posicionamento dos implantes para favorecer a estética e a função do sistema estomatognático<sup>1-4</sup>. Para isso, modelos de estudo e exames imageológicos são realizados com o objetivo de se obter maior precisão na reabilitação<sup>5</sup>. Contudo, o relacionamento dos elementos dentais encerados no modelo de gesso com o tecido ósseo, a posição final dos implantes resultando em uma prótese não estética, a biomecânica desfavorável e o desconforto pós-operatório para o paciente, são fatores limitantes nos procedimentos convencionais<sup>6-9</sup>.

Avanços tecnológicos com a finalidade de suprir as limitações supracitadas, reduzindo o tempo de tratamento e o grau de morbidade para o paciente são objetivos da técnica de cirurgia guiada com guias prototipados<sup>10,11</sup>.

A técnica cirúrgica guiada por computador baseia-se em dados fornecidos por imagens de tomografia computadorizada. Cortes tomográficos da região de interesse são inseridos no software, o qual auxiliará no planejamento cirúrgico-protético quanto ao posicionamento adequado dos implantes<sup>12</sup>. É possível ainda, por meio de uma gama de ferramentas operacionais, realizar rotações em 3D, variações nos ângulos de observação, selecionar o comprimento, diâmetro, inclinação e tipo de fixação a ser utilizada, bem como a altura do pilar de conexão e emergência de seu parafuso na futura prótese<sup>13</sup>.

Outras vantagens desta técnica incluem a preservação do volume de tecido ósseo ao redor dos implantes, a redução do tempo cirúrgico, do sangramento, do edema e da dor pós-operatória<sup>4,14</sup>.

O sucesso da osseointegração, dentre outros fatores, depende da reparação óssea primária no sítio de instalação dos implantes<sup>15</sup>. Portanto, a adequada preparação do leito receptor, bem como a presença de um tecido ósseo saudável são precursores críticos nesse processo de reparo<sup>16,17</sup>.

O calor friccional gerado durante a preparação cirúrgica de tecidos mineralizados produz certo grau de necrose ao redor das células, cuja extensão varia exponencialmente com a magnitude da temperatura alcançada, a pressão durante a osteotomia, o tamanho e forma da fresa, sua capacidade de corte, a frequência contínua ou intermitente, fresagem gradativa ou de passo único, a técnica de irrigação empregada, a velocidade de perfuração, a espessura da cortical óssea, a duração da injúria térmica e finalmente a densidade óssea<sup>17-20</sup>.

Tendo em vista a função prejudicial que o aquecimento ósseo promove sobre o processo de reparo ósseo com conseqüências na osseointegração dos implantes, a sobreutilização de fresas durante a osteotomia pode exercer uma influência positiva sobre o aumento da temperatura produzida no atrito fresa/tecido ósseo. Além disso, na técnica de cirurgia guiada, devido à utilização de anilhas para guiar a fresagem, pode haver uma limitação na irrigação direta da ponta ativa da fresa.

## *2.4 PROPOSIÇÃO*



## **2.4Proposição**

O propósito deste trabalho foi avaliar o aquecimento tecidual ósseo após osteotomias para implantes, comparando a técnica de fresagem guiada com a técnica de cirurgia clássica e a influência da reutilização das fresas sobre esse aquecimento.

## *2.5 MATERIAL E MÉTODO*

## 2.5 Material e Métodos

Foram utilizados 20 coelhos machos brancos (*Oryctolagus cuniculus*, Nova Zelândia) com peso corporal entre 3 a 4 Kg. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo número 2010-004687).

Para a realização do trabalho dividiu-se os animais em 2 grupos: GRUPO CONTROLE (GC), correspondente à fresagem clássica para implantes e o GRUPO GUIADA (GG), correspondente à fresagem simulando a técnica de cirurgia guiada. Ambos grupos foram subdivididos em 5 grupos (G), onde o G0 correspondeu às fresas sem uso, G1 correspondeu às fresas utilizadas para 10 perfurações, G2 às fresas utilizadas para 20 perfurações, G3 às fresas utilizadas para 30 perfurações e G4 às fresas utilizadas para 40 perfurações.

### CIRURGIA

Os animais foram anestesiados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil).

Após a anestesia, foi realizada uma incisão na porção medial das tíbias direita e esquerda de cada coelho, seguida de divulsão do tecido mole e descolamento do periósteo para a realização das osteotomias (Figuras 01 e 03). Posteriormente, um motor elétrico com velocidade de 1600 r.p.m. conectado a um contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo, Santa Catarina, Brasil) foi utilizado na confecção dos defeitos ósseos.

Cada animal recebeu 5 seqüências de osteotomias, de cada grupo (GC e GG), aleatoriamente em cada tíbia. O preparo dos leitos receptores do GC foi iniciado com uma fresa lança para delimitar a localização das perfurações e romper a cortical óssea. Em seguida, foram utilizadas as fresas helicoidais de 2.0mm, 2.8mm, 3.0mm e de 3.15mm (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, São Paulo, Brasil), seqüencialmente, na profundidade constante de 4 mm (Figuras 04 e 05), e irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9%. (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Portanto, somente a cortical superior foi fresada, o que corresponde ao osso do tipo I<sup>21</sup>.

No preparo do GG, foi realizada a incisão, descolamento e a seqüência de fresagem de forma semelhante ao GC. No entanto para realizar o GG foi confeccionado um guia cirúrgico de resina acrílica, obtido do molde de uma tíbia de coelho. O guia foi posicionado e usado em toda preparação do leito receptor para simular a técnica de cirurgia guiada (Figura 06). Durante toda a preparação do leito receptor utilizou-se um guia cirúrgico posicionado simulando o procedimento de cirurgia guiada. (Figuras 07 e 08) Concomitante as fresagens foi realizada a irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9%. (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil)

A pressão exercida sobre o tecido ósseo durante as osteotomias não foi mensurada, entretanto toda a preparação foi executada com o cuidado de exercer pouca pressão e de realizar perfuração intermitente, permitindo o escape do osso despreendido e o livre acesso para a solução irrigadora.

A eutanásia foi realizada no pós-operatório imediato por meio sobredosagem anestésica.

## **ANÁLISE DO AQUECIMENTO ÓSSEO**

A quantificação térmica foi realizada com o auxílio de um termômetro digital (Salvterm 700C, sensor tipo J; Salgas Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil), que registrou a temperatura da superfície óssea previamente à cada fresagem (Temperatura Inicial) e que foi introduzido nos orifícios das osteotomias estudadas imediatamente após cada fresagem (Temperatura Final)( Figura 02 e 03). Dessa forma, a variação máxima desses valores foi notificada (Temperatura Final – Temperatura Inicial).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Baseado nos dados obtidos foi realizada a análise estatística por meio do teste não paramétrico, Mann-Whitney, através dos valores de significância de 5%, utilizando a análise térmica na correlação entre as fresagens do grupo controle e guiada.

## *2.6 RESULTADOS*

## 2.6 Resultados

Na análise térmica, a média da temperatura óssea inicial para as fresagens foi de 26,1 e 28°C, respectivamente em GC e GG. A temperatura máxima atingida no GC e no GG foi de, respectivamente, 30,5° e 34,6°C, e a oscilação máxima foi de 5,1° C e 5,8°C à partir da temperatura inicial.

Na comparação de cada grupo isoladamente, não houve correlação estatisticamente significativa entre a reutilização das fresas e o tipo de fresa com o aumento da temperatura (Figura 09).

No entanto, observou-se que a média das oscilações de temperatura durante o uso da fresa lança foi de 2,8°C e 4,1°C, enquanto que nas fresas helicoidais foi de 0,81°C e 3,15°C., respectivamente nos GC e GG.

Na comparação entre GC e GG houve diferença estatisticamente significativa na oscilação térmica das fresas lança e helicoidais, sendo que, no GG, o aquecimento ósseo foi aproximadamente 3 vezes maior do que no GC. Em relação ao número de reutilizações foi possível observar que há um maior aquecimento térmico quanto maior o número de utilizações das fresa, em ambos grupos (Figura 10).

## *2.7 DISCUSSÃO*



## 2.7 Discussão

Uma variedade de animais tem sido utilizados para a realização de estudos sobre o aquecimento ósseo e sua conseqüente influência na viabilidade do leito osteotomizado para implantes, como coelhos, suínos e bovinos<sup>22-24</sup>. Entretanto, nem sempre é possível comparar os resultados desses estudos, porque os modelos experimentais e as análises utilizadas foram diferentes, bem como os tipos e formas dos instrumentos. Nesse estudo, optou-se pela utilização de tíbias de coelhos, nas quais realizou osteotomia da cortical superior<sup>25</sup>, seguindo o protocolo de cirurgia clássica e guiada, padronizando dessa forma, o tipo e a espessura do tecido ósseo.

Durante o preparo do leito receptor forma-se uma zona necrótica mesmo em procedimentos cirúrgicos menos traumáticos. Esta zona interfere na osseointegração e está relacionada a alguns fatores, sendo os destacados nesse trabalho o tipo de técnica cirúrgica e o aquecimento tecidual ósseo<sup>17-20</sup>.

Inúmeros estudos avaliaram o aquecimento ósseo gerado pela técnica clássica de osteotomia para implantes<sup>24-26</sup>, porém a literatura é bem escassa em estudos que avaliam o aquecimento ósseo em técnicas que simulam o protocolo de cirurgia guiada<sup>17</sup>.

Nesse estudo avaliou-se o aquecimento ósseo gerado pela técnica clássica comparando-o com a técnica guiada, e verificou-se que a segunda técnica gerou um aquecimento ósseo significativamente maior do que a primeira. Estes resultados podem estar relacionados com a utilização das anilhas metálicas na técnica guiada, as quais fazem troca de calor com a fresa, mantendo dessa forma ambas aquecidas<sup>17</sup>. Além disso, nessa técnica a irrigação direta é deficiente devido ao guia acrílico com a presença de anéis e anilhas metálicas, contribuindo o aumento de temperatura observado<sup>17</sup>.

Chacon et al. (2006)<sup>24</sup> avaliaram o efeito da reutilização de fresas para implantes na alteração de temperatura durante as osteotomias clássicas e concluíram que a reutilização das fresas provocava maior aquecimento ósseo. Em contrapartida, Ercoli et al. (2004)<sup>26</sup> não obtiveram uma correlação estatística entre essas variáveis, como observado neste estudo, para as duas técnicas comparadas isoladamente.

Missir et al. (2009)<sup>17</sup> avaliaram o aquecimento ósseo após a reutilização de fresas em cirurgia guiada e concluíram que após 35 utilizações, as fresas geraram maior aquecimento. No presente estudo, em concordância houve uma tendência ao aumento da temperatura com a reutilização das fresas, porém sem diferença estatística. No mesmo estudo, a técnica de cirurgia guiada mostrou maior aquecimento ósseo quando comparado a técnica clássica, entretanto, a temperatura máxima registrada foi de 33°C não atingindo o limiar de 47°C, como destacado por Eriksson e Albrektsson (1983 e 1984)<sup>27-28</sup>.

Dentre os diversos fatores que podem influenciar o aquecimento ósseo, o formato da fresa é citado na literatura<sup>24-25</sup>. Nesse estudo, a fresa lança apresentou a maior oscilação térmica durante as fresagens, nas duas técnicas. Dessa forma, é importante que o profissional se conscientize da importância de minimizar os fatores que podem contribuir com o aquecimento ósseo durante a osteotomia para implantes, buscando realizar uma técnica cirúrgica menos traumática, com aumento do volume da irrigação, certificando-se de que a irrigação atinge a interface fresa-leito receptor e reduzindo a força exercida durante a fresagem, para não influenciar negativamente na osseointegração. Esses cuidados devem ser ampliados na realização da técnica de cirurgia guiada, tendo em vista o maior aquecimento ósseo promovido pela mesma.

## *2.8 CONCLUSÃO*

## 2.8 Conclusão

Baseado na metodologia estudada foi possível concluir:

1. A técnica de cirurgia guiada gerou maior oscilação térmica quando comparada com a técnica clássica durante as osteotomias para preparo do leito receptor de implantes dentários, sob irrigação externa. Todavia, na média das temperaturas não houve diferença estatisticamente significativa.
2. O aumento de temperatura foi diretamente proporcional ao número de reutilizações das fresas.
3. Ambas técnicas não atingiram o limiar de temperatura que causa necrose óssea imediata.

## *2.9 REFERÊNCIAS*

## 2.9 Referências Bibliográficas

1. Jabero M, Sarment DP: Advanced surgical guidance technology: a review. *Implant Dent* 15:135, 2006.
2. Bedrossian E: Laboratory and prosthetic considerations in computer-guided surgery and immediate loadin. *J Oral Maxillofac Surg* 65:47, 2007.
3. Marchack CB: CAD/CAM-guidede implant surgery and fabrication of an immediately loaded prosthesis for a partially edentulous patient. *J Prost Dent* 97:394, 2007.
4. Azari A, Nikzad S: Flapless implant surgery: review of the literature and report of 2 cases with computer-guided surgical approach. *J Oral Maxillofac Surg* 66:1015, 2008.
5. Bedrossian E, Sullivan RM, Fortin Y, et al.: Fixed-Prosthetic implant restauration of the edentulous maxilla: A systematic pretreatment evaluation method *J Oral Maxillofac Surg* 66: 112, 2008.
6. Kopp KC, Koslow AH, Abdo OS: Predictable implant placement with a diagnostic/surgical template and advanced radiographic imaging. *J Prost Dent* 89:611, 2003.
7. Bergkivist G, Sahlholm S, Nilner K, et al.: Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla 2-year clinical and radiological follow-up of treatment with non-submerged ITI implants. *Clin Oral Implants Res* 15: 351, 2004.
8. Nkenke E, Eitner S, Radespiel-Tröger M, et al.: Patient-centred outcomes comparing transmucosal implant placement with an open approach in the maxilla: a prospective, non-randomized pilot study. *Clin Oral Implants Res* 18:197, 2007.

9. Rao W, Benzi R: Single mandibular first molar implants with flapless guided surgery and immediate function: Preliminary clinical and radiographic study *J of Prost Dent* 97: 3, 2007.
10. Widmann G, Bale RJ: Accuracy in computer-aided implant surgery – a review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21: 305, 2006.
11. Vercruyssen M, Jacobs R, van Assche N, et al.: The use of CT scan based planning for oral rehabilitation by means of implants and its transfer to the surgical field: A critical review on accuracy. *J Oral Rehabilitation* 35: 454, 2008.
12. Jacobs R, Adriansens A, Verstreken K, et al.: Predictability of a three-dimensional planning system for oral implant surgery. *Dent Radiology* 28:105, 1999.
13. Dreiseidler T, Mischkowski RA, Neugebauer J, et al.: Comparison of conebeam imaging with orthopantomography and computerized tomography for assessment in presurgical implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24: 216, 2009.
14. Komiyama A, Klinge B, Hultin M: Treatment outcome of immediately loaded implants installed in edentulous jaws following computer-assisted virtual treatment planning and flapless surgery. *Clin Oral Implants Res* 19: 677, 2008.
15. Albrektsson T, Branemark P-I, Hansson H-A, Lindstrom, J: Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone to implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52:155, 1981.
16. Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, et al: Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res* 13:293, 2002.
17. Misir AF, Sumer M, Yenisey M, et al.: Effect of Surgical Drill Guide on Heat Generated From Implant Drilling. *J Oral Maxillofac Surg* 67:2663, 2009.

18. Yacker MJ, Klein M: The effect of irrigation on osteotomy depth and bur diameter. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11:634, 1996.
19. Cordioli G, Majzoub Z: Heat generation during site preparation: An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:186, 1997.
20. Tehemar SH: Factors affecting heat generation during implant site preparation: A review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:127, 1999.
21. Branemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T: *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago, Quintessence, 1985, p 201
22. Iyer S, Weiss C, Mehta A: Effects of drill speed on heat production and the rate and quality of bone formation in dental implant osteotomies. Part II: Relationship between drill speed and healing. *Int J Prosthodont* 10(6):536, 1997.
23. Sharawy M, Misch C: Heat generation during implant drilling: The significance of motor speed. *J Oral Maxillofac Surg* 60: 1160, 2002.
24. Chacon GE, Bower DL, Larsen PE, et al: Heat production by 3 implant drill systems after repeated drilling and sterilization. *J Oral Maxillofac Surg* 64:265, 2006.
25. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, et al: Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 1233, 2008.
26. Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee H-J, et al: The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: A study of drill durability. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19:335, 2004.



27. Eriksson R, Albrektsson, T: Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. *J of Prost Dent* 50: 101, 1983.
28. Eriksson R, Albrektsson T: The effect of heat on bone regeneration: An experimental study in rabbits using the bone growth chamber. *J Oral Maxillofac Surg* 42:705, 1984.

*FIGURAS*

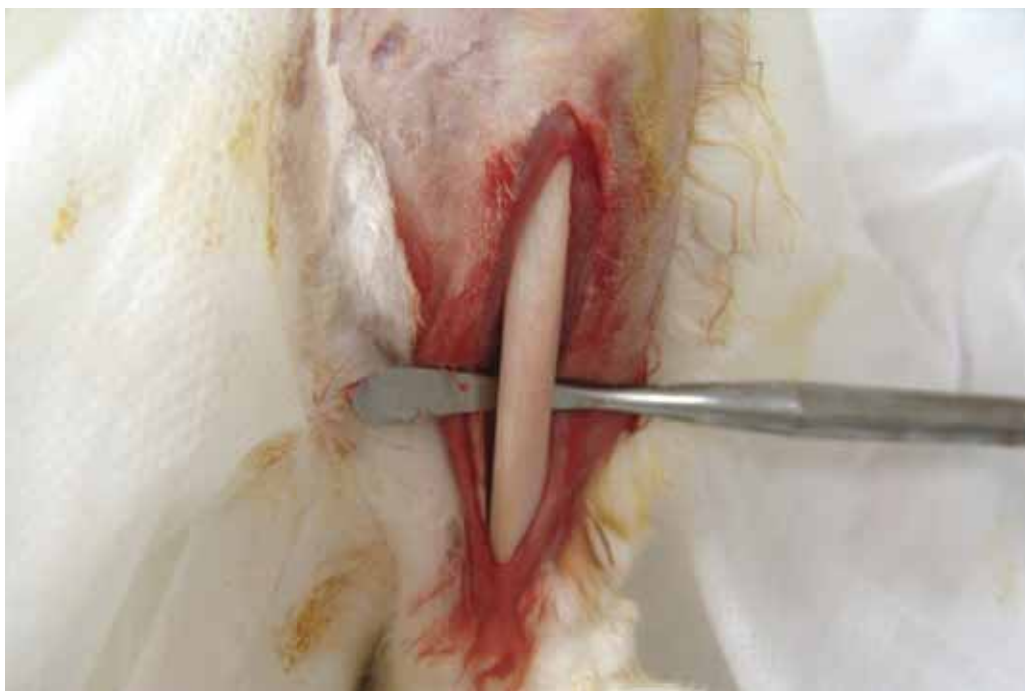


Figura 01 – Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.



Figura 02 - Termômetro digital Salvterm 700C utilizado para mensurar a temperatura.

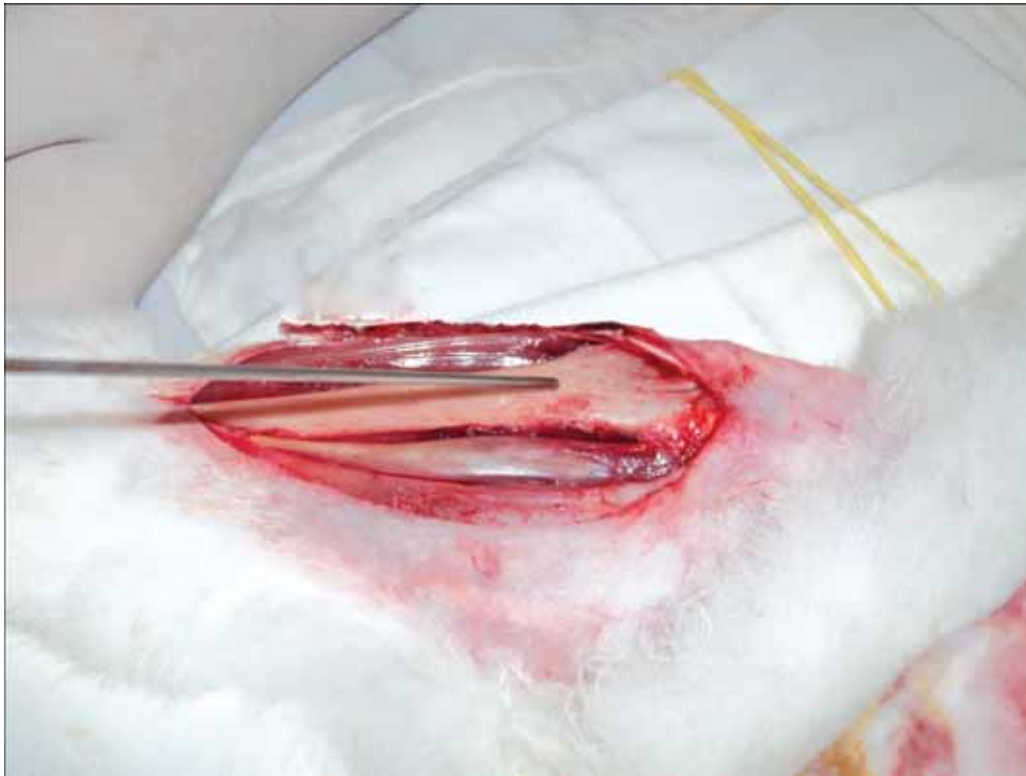


Figura 03 – Registro da temperatura prévia a fresagem



Figura 04 – Fresagem inicial do GC, com fresa tipo lança sob irrigação abundante de solução salina a 0,9%.



Figura 05 - Fresagem sequencial para implante do GC, com a fresa helicoidal.

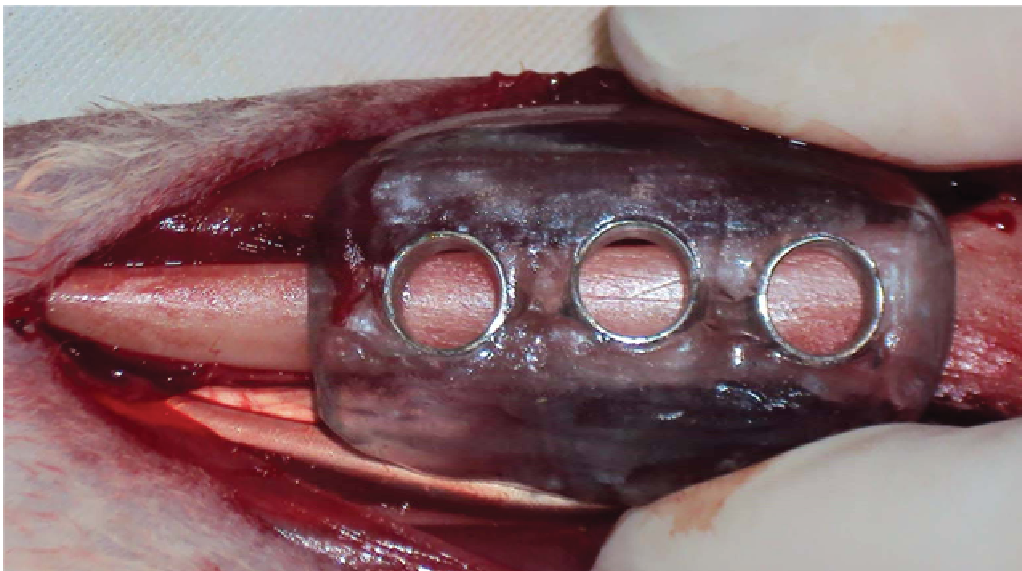


Figura 06 - Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.



Figura 07 - Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança.



Figura 08 - Fresagem sequencial para implante do GG, a fresa helicoidal.



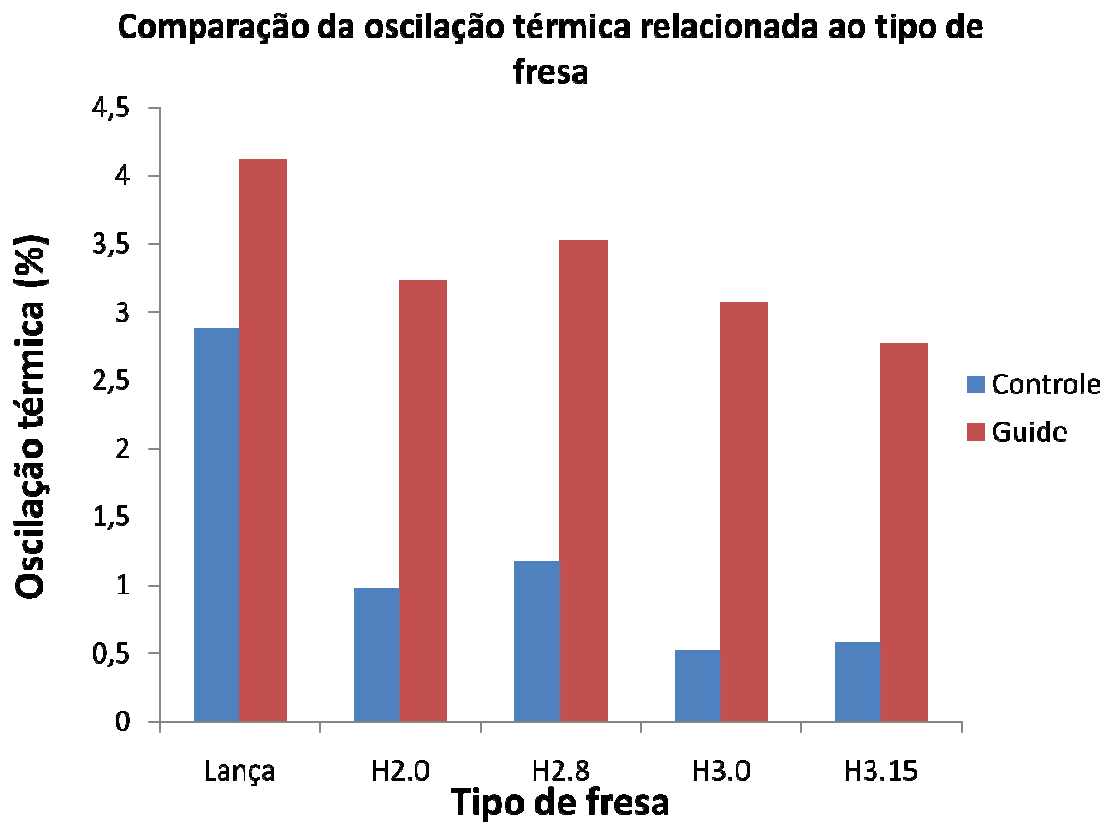


Figura 09 – Comparação da oscilação térmica relacionada ao tipo de fresa entre o GC e GG.

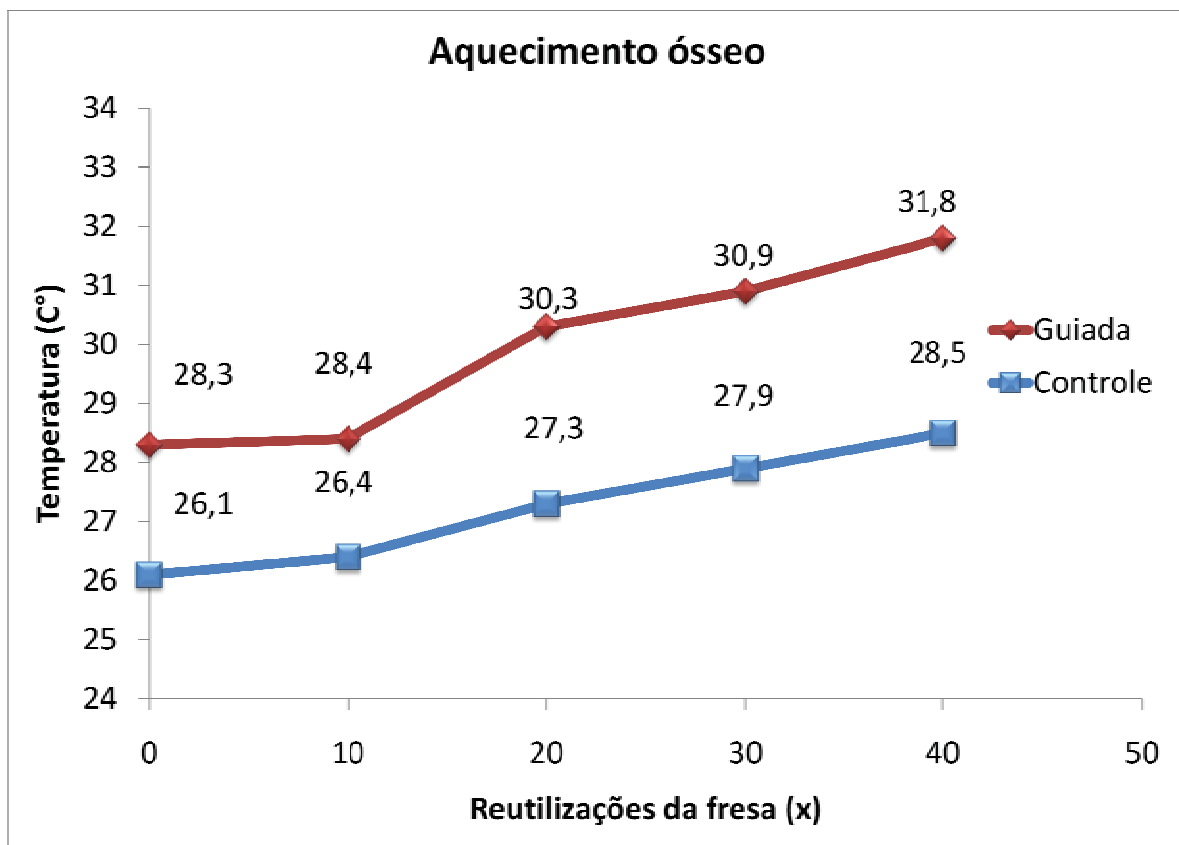


Figura 10 - Comparação do aquecimento ósseo em relação ao número de fresagens entre o GC e o GG.



## 3. *CAPÍTULO 2*

*“AVALIAÇÃO DA DEFORMAÇÃO DAS FRESAS  
APÓS OSTEOTOMIA PARA IMPLANTES: TÉCNICA  
CIRÚRGICA CLÁSSICA E GUIADA.”*

(Periódico: Journal of Applied Oral Science, Anexo D)

### *3.1 RESUMO*

### 3.1 Resumo

**Objetivo:** O propósito deste trabalho foi avaliar a deformação das fresas após repetidas osteotomias para implantes, simulando a técnica de fresagem de cirurgia guiada e comparando-a com a técnica de fresagem clássica. **Material e Método:** Foram utilizadas tíbias de 20 coelhos, divididos em 2 grupos: controle (GC) e guiada (GG), os quais foram subdivididos em 5 subgrupos: G0, G1, G2, G3 e G4 que corresponderam às fresas sem uso e as utilizadas 10, 20, 30 e 40 vezes, respectivamente. Os animais receberam 10 seqüências de osteotomias (sendo 5 em cada tibia) de acordo com cada técnica. As brocas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as áreas de deformação foram quantificadas por meio do software ImageLab2000. **Resultados:** Verificou-se que a deformação em GC e GG foi progressiva de acordo com a maior utilização das fresas, sendo que no GC houve diferença significativa entre o G0 com o G3 e G4. Já no GG houve diferença significativa entre G0 e todos os demais grupos. Também se verificou diferença significativa entre GC 4 e GG 4. **Conclusão:** A deformação das fresas é diretamente proporcional ao número de reutilizações das mesmas, em ambos os grupos. Além disso, houve maior tendência de deformação das fresas do GG, principalmente na 40ª osteotomia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Implantes dentários. Aquecimento ósseo. Osteotomias.

## 3.2 *ABSTRACT*

### 3.2 Abstract

The purpose of this study was to evaluate the deformation of the drills after repeated osteotomies for implants, mimicking the technique of keyhole surgery and comparing it with the classical technique. Methods: We used tibia of 20 rabbits were divided into two groups: control group (CG) and guided group (GG), which were divided into five groups: G0, G1, G2, G3 and G4 which corresponded to the cutters used 0, 10, 20, 30 and 40 times respectively. The animals received 10 osteotomies sequences (including 5 in each tibia) according to each technique (classical and guided). The drills were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), and quantification of the deformation of the cutters was performed using the software ImageLab2000. Results: It was found that the strain GG GC was progressive and in line with the increased use of cutters, while the CG was no significant difference between the G0 to G3 and G4. In the GG was no significant difference between G0 and all other groups. Also there was a significant difference between GC4 and GG 4. Conclusion: The deformation of the cutters is directly proportional to the number of reuses of the same in both groups. Furthermore, a greater tendency to deformation of the cutters GG, especially in the 40th osteotomy.

**Key words:** Dental implants. Heat generation.Osteotomy.

### *3.3 INTRODUÇÃO*

### 3.3 Introdução

A implantodontia é uma terapia altamente previsível e bem sucedida para reabilitação do sistema estomatognático, possuindo índices de sucesso que variam de 89% a 95%<sup>16</sup>. Essa alta taxa de sucesso na osseointegração de implantes dentários, dentre outros fatores, está relacionada à reparação óssea primária do sítio de instalação dos implantes<sup>1</sup>. Portanto, a adequada preparação do leito receptor, bem como a presença de um tecido ósseo saudável são precursores críticos nesse processo de reparo<sup>3,19</sup>.

Os procedimentos para preparação do leito receptor do implante dental podem causar danos mecânicos e térmicos. O aquecimento ósseo gerado nesse procedimento pode produzir necrose em uma discreta área cortical ou comprometer toda região, incluindo tecidos moles adjacentes<sup>10</sup>. Esse fato ocorre, pois a necrose óssea térmica provoca injúrias irreversíveis à porção orgânica do tecido ósseo bem como as células presentes na circulação sanguínea local<sup>11</sup>.

A extensão da necrose varia exponencialmente com a magnitude da temperatura alcançada, a pressão durante a osteotomia, o tamanho e forma da fresa, sua capacidade de corte, a fresagem contínua ou intermitente, gradativa ou de passo único, a técnica de irrigação empregada, a velocidade de perfuração, a espessura da cortical óssea, a duração da injúria térmica e finalmente com a densidade óssea<sup>7,19,22,24</sup>.

Eriksson e Albrektsson<sup>10,11</sup> (1983, 1984) evidenciaram que o tecido ósseo é mais susceptível à injúria térmica do que previamente se acreditava e que o limiar de temperatura para a sobrevivência tecidual durante a osteotomia é de 47°C, mantendo um tempo de fresagem abaixo de 1 minuto ou de 50° C por um período de 30 segundos. Dessa forma, o uso repetido de fresas durante o preparo para a instalação dos implantes pode aumentar seu desgaste, reduzindo a eficiência de corte, com conseqüente aumento do calor friccional<sup>9,20</sup>. Entretanto, na técnica cirurgica guiada, devido à escassez de informações sobre a longevidade das fresas utilizadas, a decisão do cirurgião-dentista para a substituição das fresas permanece empírica, o que pode comprometer térmica e mecanicamente o preparo do leito receptor e o conseqüente reparo ósseo.

A técnica de instalação de implantes dentários por meio de cirurgia guiada é uma ferramenta de suporte para o diagnóstico, planejamento reverso e tratamento de pacientes desdentados parcial ou totalmente. Através de um modelo esteriolitográfico criado a partir da tomografia computadorizada, confecciona-se o guia cirúrgico

individualizado. No entanto, esse dispositivo limita a irrigação direta na ponta ativa da fresa<sup>2,19</sup>.

Tendo em vista a função prejudicial que o aquecimento ósseo promove no processo de reparo ósseo e a consequência negativa na osseointegração dos implantes, a sobreutilização de fresas durante a osteotomia pode exercer uma influência sobre a temperatura produzida no tecido ósseo. Maiores elevações de temperatura foram relatadas quando fresas reutilizadas foram comparadas com fresas novas na cortical femoral humana de cadáver<sup>18</sup>.



### *3.4 PROPOSIÇÃO*

### **3.4 Proposição**

O propósito deste trabalho foi avaliar a deformação das fresas após repetidas osteotomias para implantes, simulando a técnica de fresagem de cirurgia guiada e comparando-a com a técnica de fresagem clássica.

## *3.5 MATERIAL E MÉTODO*

### 3.5 Material e Método

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo número 2010-004687).

Foram utilizados 20 coelhos machos brancos (*Oryctolagus cuniculus*, Nova Zelândia) com peso corporal entre 3 a 4 Kg. Os animais foram divididos em 2 grupos: GRUPO CONTROLE (GC), correspondente à fresagem clássica de implantes e o GRUPO GUIADA (GG), correspondente à fresagem simulando a técnica de cirurgia guiada. Ambos os grupos foram divididos em 5 subgrupos (G) onde o G0 correspondeu às fresas sem uso, G1 correspondeu às fresas utilizadas para 10 osteotomias, G2 às fresas utilizadas para 20 osteotomias, G3 às fresas utilizadas para 30 osteotomias, G4 às fresas utilizadas para 40 osteotomias. Vale ressaltar que o sistema estudado ainda não possui referências indicando a quantidade ideal de perfurações.

#### CIRURGIA

Os animais foram anestesiados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil).

Após a anestesia, foi realizada uma incisão na porção medial das tíbias direita e esquerda de cada coelho, seguida de divulsão do tecido mole e descolamento do periósteo para a realização das osteotomias (Figura 01). Posteriormente, um motor elétrico com velocidade de 1600 r.p.m. conectado a um contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo, Santa Catarina, Brasil) foi utilizado na confecção dos defeitos ósseos.

Cada animal recebeu 10 seqüências de osteotomias, sendo 5 de cada grupo (GC e GG), aleatoriamente em cada tíbia. O preparo dos leitos receptores do GC foi iniciado com uma fresa lança para delimitar a localização das perfurações e romper a cortical óssea. Em seguida, foram utilizadas as fresas helicoidais de 2.0mm, 2.8mm, 3.0mm e de 3.15mm (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, São Paulo, Brasil), seqüencialmente, na profundidade constante de 4 mm (Figuras 02 e 03), irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9%. (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Portanto, somente a cortical superior foi fresada, o que corresponde ao osso do tipo I<sup>4</sup>.

No preparo do GG, foi realizada a incisão, descolamento, e a seqüência de fresagem de forma semelhante ao GC. No entanto para realizar o GG foi confeccionado um guia cirúrgico de resina acrílica, obtido do molde de uma tíbia de

coelho. O guia foi posicionado e usado em toda preparação do leito receptor para simular a técnica de cirurgia guiada (Figura 04). Durante toda a preparação do leito receptor utilizou-se um guia cirúrgico posicionado simulando o procedimento de cirurgia guiada. (Figuras 04,05 e 06) Concomitante as fresagens foi realizada a irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9%. (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil)

A pressão exercida sobre o tecido ósseo durante as osteotomias não foi mensurada, entretanto toda a preparação foi executada com o cuidado de exercer pouca pressão e de realizar perfuração intermitente, permitindo o escape do osso desprendido e o livre acesso para a solução irrigadora.

A eutanásia foi realizada no pós-operatório imediato por meio da administração de sobredosagem anestésica.

### **ANÁLISE POR MEV**

As fresas utilizadas nas osteotomias foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97). Duas fotomicrografias (frente e verso) foram obtidas da ponta ativa de cada fresa, previamente à sua utilização e após 10, 20, 30 e 40 osteotomias, no aumento de 350X. Em seguida, foi realizada a quantificação das regiões de deformação (regiões de derretimento do aço, perda de substância, condensação de aço desgarrado da ponta ativa das fresas, defeitos em forma de cavidade, desgaste e abrasão) (Figuras 07,08 e 09).

Para auxiliar na quantificação das áreas de perda de substância na fresa lança, foi construído um *template* da fresa lança inicial, que foi sobreposto às imagens da lança dos demais grupos avaliados (Figuras 10 e 11).

As imagens obtidas foram trabalhadas no software Imagelab 2000 e por meio das ferramentas *selecionar região*, *cálculo de regiões* e *planilha de cálculos*, todas as regiões de deformação foram demarcadas, calculadas em pixels e somadas. Posteriormente, foi calculada a porcentagem que a área de deformação representou em relação à área total da fotomicrografia de cada fresa (Figuras 12 e 13).

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Baseado nos dados obtidos foi realizado a análise estatística por meio do teste de Holm-Sidak, teste t e Coeficiente de Correlação de Pearson (r).

### *3.6 RESULTADOS*

### 3.6 Resultados

Por meio da análise das imagens obtidas, as fresas do GC e do GG sem uso e as utilizadas com diferentes números de osteotomias foram comparadas.

Nos grupos G0, foi possível observar alguns artefatos de fábrica que foram considerados e quantificados na análise como defeito inicial. Os valores em percentual desses artefatos nas fresas dos GC e GG tiveram uma média de 9,23 e 5,12 % na ponta ativa de cada grupo, respectivamente (Figura 14).

As fresas do tipo lança tiveram maior deformação do que as fresas helicoidais, no GC. Em média, a deformação sofrida por essas fresas no GC foi de 33,88%, enquanto as do tipo helicoidal tiveram deformação média de 22,79%. Já no GG a fresa lança teve menor deformação que as helicoidais, sendo a média de deformação de 31,25 e 33,9%, respectivamente.

Nos subgrupos G1, G2, G3 e G4 observou-se o aumento gradativo da deformação das fresas, variando em proporção direta com o aumento do número de reutilizações, em ambos grupos (Figura 14).

Na comparação do GC isoladamente, por meio do teste de Holm-Sidak, foi possível verificar que houve diferença estatisticamente significativa na comparação de G0 com G3 e com G4. No entanto, esse fato não foi observado quando os demais grupos foram comparados entre si. Já na comparação do GG isoladamente, utilizando o mesmo teste, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as fresas do G0 quando comparadas com as fresas do G1, G2, G3 e G4, bem como na comparação das fresas do G1 e do G2 com o G4.

A comparação entre GC e GG foi realizada por meio do teste t, e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre GC1 e GG1, GC2 e GG2 e GC3 e GG3. Porém, na comparação de GC4 com GG4 observou-se diferença significativa.

A quantificação das áreas de deformação possibilitou verificar uma forte correlação diretamente proporcional entre as variáveis deformação e quantidade de uso das fresas no GC (Coeficiente de Correlação de Pearson  $r = 0,984$ ). Já no GG verificou-se uma moderada correlação diretamente proporcional entre essas variáveis (Coeficiente de Correlação de Pearson  $r = 0,635$ ).

### *3.7 DISCUSSÃO*



### 3.7 Discussão

A deformação das fresas e sua conseqüente influência na viabilidade do leito osteotomizado para implantes foi estudado por vários autores anteriormente <sup>9,13,20,21</sup>, sendo a tibia de coelhos o modelo ósseo in vivo mais utilizado em pesquisas para avaliar a osseointegração. Este fato está relacionado a tibia permitir a utilização de implantes e fresagens de tamanho compatível com a cavidade oral, a cortical superior da tibia possuir qualidade óssea semelhante a osso tipo I, ao baixo custo do emprego desse animal e ao fácil manuseio <sup>8,17,20</sup>. No entanto, devido a avanços tecnológicos, este tema permanece atual, o que gera muitas discussões principalmente quanto à longevidade das fresas para implante<sup>7</sup>. Na literatura, até o momento, não há estudo “in vivo” avaliando a deformação das fresas na técnica de cirurgia guiada.

Durante o preparo do leito receptor, a energia não utilizada é transformada em calor devido ao atrito da broca com o tecido ósseo<sup>23</sup> (Wiggins & Malkin 1976). Esse fato torna inevitável que se forme uma camada necrótica, a qual influencia diretamente a osseointegração. Porém, a extensão dessa zona necrótica está relacionada a alguns fatores, sendo os destacados nesse estudo o tipo de técnica cirúrgica empregada e a capacidade de corte da fresa <sup>6,19,22,24</sup>.

O desgaste da fresa é definido pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da ONU, como sendo um dano progressivo que envolve perda de material<sup>12</sup>. Diversos estudos avaliaram o desgaste da broca relacionada ao aquecimento ósseo, em técnica clássica de osteotomia para implantes, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)<sup>5,9,20</sup>. No entanto, a ausência de dados para a quantificação das áreas deformadas e a diferença de modelo experimental impossibilitou a comparação entre os trabalhos<sup>13,19</sup>.

Esse estudo é o primeiro na literatura a quantificar e comparar a deformação das fresas gerada nas osteotomias, simulando as técnicas cirúrgicas clássica e guiada. Foi possível verificar que as fresas lanças utilizadas na técnica clássica apresentaram deformação da ponta ativa discretamente maior do que na técnica guiada. Já nas fresas helicoidais, essa observação se inverteu, o que provavelmente relaciona-se ao fato de que durante o uso das fresas helicoidais na técnica guiada há maior proximidade entre fresa/anilha. Este fato gera uma maior troca de calor entre os metais (conjunto fresa e anilha), o que pode manter, dessa forma, ambas mais aquecidas e conseqüentemente gerar maior deformação da fresa helicoidal. Além disso, nesta técnica, a irrigação direta é deficiente devido à presença do guia acrílico com anilhas metálicas, contribuindo com o aumento de temperatura observado e conseqüente deformação da broca <sup>19</sup>.

O principal método para o controle da temperatura é a irrigação para a refrigeração do tecido ósseo. Lavelle e Wedgwood<sup>15</sup> (1980), relataram que a irrigação interna foi mais eficaz na redução de atrito do que a externa durante a osteotomia. Mais recentemente, em 2009, Misir, et al.<sup>19</sup>, realizaram um estudo que mostrou temperaturas mais altas quando se utilizou a irrigação externa associada à interna em comparação com a externa isolada. Os autores atribuíram esse fato ao envolvimento em osso cortical denso que causou a obstrução dos pontos internos de irrigação.

Outro fator que influencia a capacidade de corte das fresas, segundo Harris e Kohles<sup>13</sup>, é a repetição de ciclos de esterilização por autoclave. No entanto, Jochum e Reichart<sup>14</sup> não encontraram diferença estatística significativa para o aquecimento ósseo entre fresas reutilizadas após lavagem e esterilização e entre fresas reutilizadas após lavagem apenas. Na presente pesquisa esse fator não foi considerado.

Ercoli, et al<sup>9</sup> (2004), analisaram a influência do desgaste pelo uso da fresa na eficiência do corte da mesma e a relação deste fator com o aquecimento ósseo. Após as análises os autores concluíram que a durabilidade e a eficiência de corte da fresa estão diretamente relacionados com a forma (design) e com o material de fabricação da mesma. Por outro lado, Chacon, et al.<sup>5</sup>(2006), não encontram diferenças significantes quando compararam diferentes marcas. Nesse estudo optou-se por uma única marca comercial, mantendo este fator constante.

Considerando o número de reutilizações e a deformação das fresas foi possível observar uma relação diretamente proporcional entre esses fatores, tanto no GC como no GG, fato confirmado pela correlação de Pearson. O efeito direto da reutilização das fresas sobre a sua deformação foi confirmado pela análise estatística, que revelou diferença significativa entre as fresas sem uso e as fresas reutilizadas 10, 20, 30 e 40 vezes no GG e entre as fresas sem uso e as fresas reutilizadas 30 e 40 vezes no GC. Já na comparação entre os grupos (GC e GG) observou-se a diferença significativa somente na 40ª osteotomia.

Esses resultados podem ser explicados pela inclinação única atribuída à fresa durante a osteotomia pela técnica da cirurgia guiada, que é dada pelo guia cirúrgico acrílico com anilhas, que pode favorecer a menor perda de substância na sua ponta ativa e a menor deformação da mesma, diferentemente do que ocorre no GC, em que é possível mudar-se a inclinação da fresa durante a osteotomia, devido à ausência do guia cirúrgico.

Tendo em vista as diferenças observadas na deformação das fresas durante osteotomia para implantes simulando as técnicas de fresagem clássica e guiada, sugere-se que mais trabalhos sejam realizados comparando-as e verificando a

influência da reutilização das fresas de cada sistema na osseointegração de implantes dentários.

## *3.8 CONCLUSÃO*

### **3.8 Conclusão**

Baseado na metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. A deformação das fresas é diretamente proporcional ao número de reutilizações das mesmas, em ambos os grupos.
2. Houve maior tendência de deformação das fresas do GG, principalmente na 40ª osteotomia.
3. Infere que a troca das fresas no GG deve ser realizada após 30 osteotomias.

### *3.9 REFERÊNCIAS*

### 3.9 Referências Bibliográficas

1. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone to implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52: 155-70.
2. Almeida EO, Pellizzer EP, Goiato MC, Margonar R, Rocha EP, Freitas-Jr AC, Anchieta RB. Computer-Guided Surgery in Implantology: Review of Basic Concepts. *J Craniofac Surg*. 2010; 21: 1917-21.
3. Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, Sheridan S, Lamey PJ. Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13: 293-7.
4. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-Integrated Protheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence; 1985. p. 109-210.
5. Chacon GE, Bower DL, Larsen PE, McGlumphy EA, Beck M. Heat Production by 3 Implant Drill Systems After Repeated Drilling and Sterilization. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64:265-9.
6. Cordioli G, Majzoub Z. Heat generation during site preparation: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12: 186-93.
7. Cordioli G, Majzoub Z, Piatelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: An experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15:668-74.
8. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmén A. Improved Retention and Bone-to-Implant Contact with Fluoride-Modified Titanium Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19:659–66.
9. Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee HJ, Moss ME, Graser GN. The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19:335-49.
10. Eriksson R, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent*. 1983; 50:101-7.
11. Eriksson RA, Albrektsson T. The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in rabbits using the bone growth chamber. *J Oral Maxillofac Surg*. 1984; 42: 705-11.
12. Golin AL. Análise do comportamento de ferramentas de cortes com diferentes revestimentos e seu efeito sobre a geração de calor no osso. 2005.f.134.

[Dissertação de mestrado de Engenharia mecânica] – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Paraná.

13. Harris BH, Kohles SS. Effects of mechanical and thermal fatigue on dental drill performance. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16(6):819-26.
14. Jochum RM, Reichart PA. Influence of multiple use of Timedur-titanium cannon drills: Thermal response and scanning electron microscopic findings. *Clin Oral Implants Res*. 2000; 11:139-43.
15. Lavelle C, Wedgood D. Effect of internal irrigation on frictional heat generated from bone drilling. *J Oral Surg*. 1980; 38(7):499-503.
16. Leonhardt A, Grondahl K, Bergstrom C, Lekholm U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:127–32.
17. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent*. 2003;12(4):333-9.
18. Matthews LS, Hirsch C. Temperatures measured in human cortical bone when drilling. *J Bone Joint Surg Am*. 1972; 54: 297-308.
19. Misir AF, Sumer M, Yenisey M, Ergioglu E. Effect of Surgical Drill Guide on Heat Generated From Implant Drilling. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67:2663-8.
20. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia-Junior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66:1233-40.
21. Reingewirtz Y, Szmukler-Moncler S, Senger B. Influence of different parameters on bone heating and drilling time in implantology. *Clin Oral Implants Res*. 1997;8(3):189-97.
22. Tehemar SH. Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14:127-36.
23. Wiggins KL, Malkin S. Drilling of bone. *J Biomech*. 1976; 9: 553-9.
24. Yacker MJ, Klein M. The effect of irrigation on osteotomy depth and bur diameter. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:634-8.



*FIGURAS*



Figura 01 – Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.



Figura 02 – Fresagem inicial do GC, com fresa tipo lança sob irrigação abundante com solução salina fisiológica a 0,9%.



Figura 03 - Fresagem sequencial para implante do GC, com as fresas helicoidais.



Figura 04 - Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.



Figura 05 - Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança sob irrigação abundante com solução salina fisiológica a 0,9%.



Figura 06 - Fresagem sequencial para implante do GG, com a fresa helicoidal.

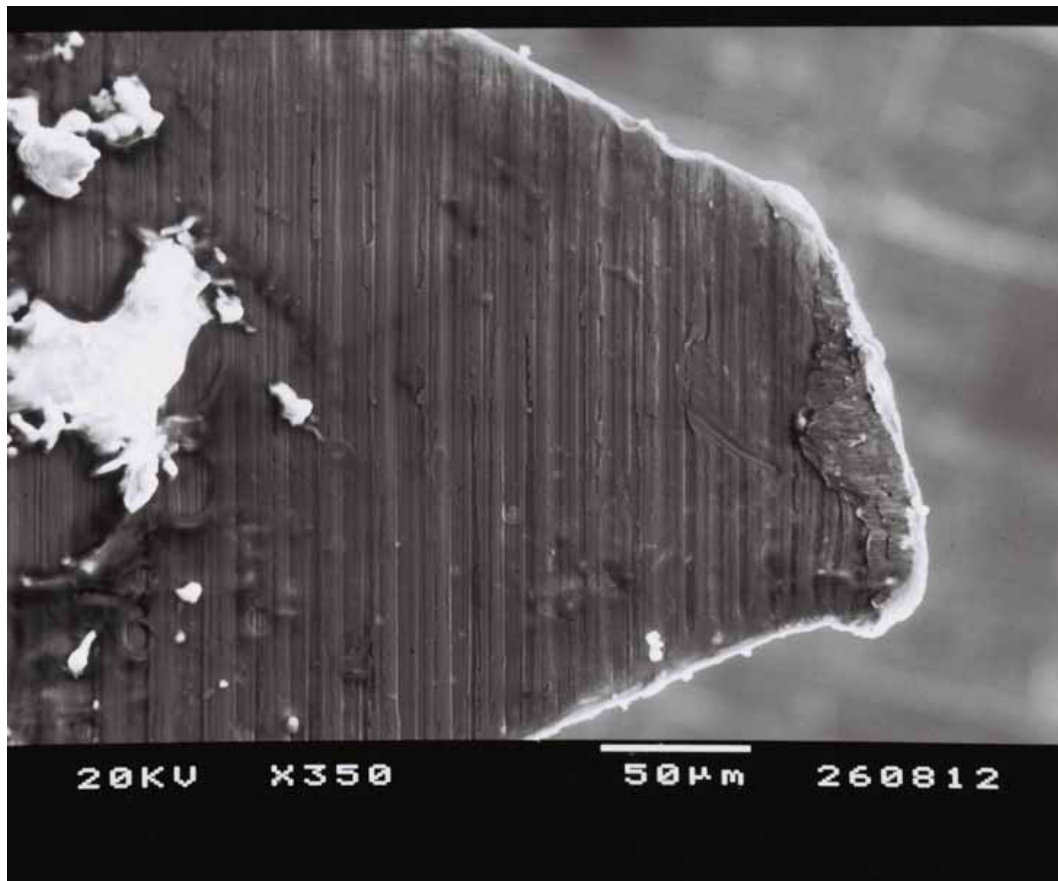


Figura 07 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), ilustrando deformação da ponta ativa da fresa lança, com áreas de derretimento do metal.

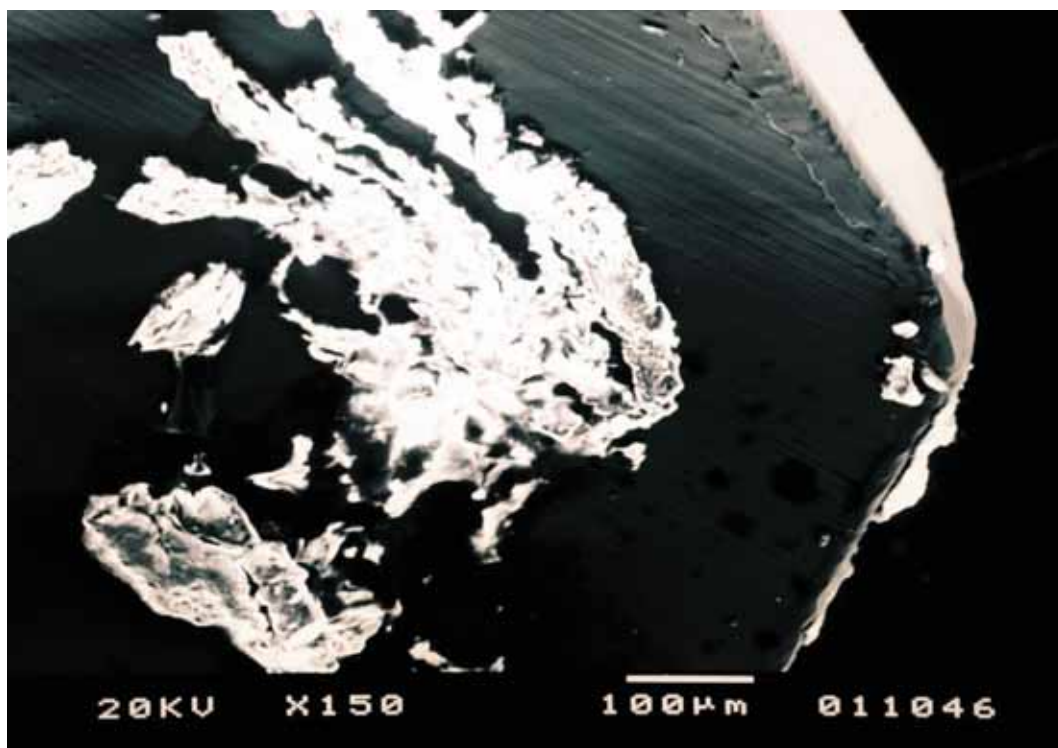


Figura 08 – MEV mostrando a condensação de metal desgarrado na ponta ativa da fresa helicoidal.



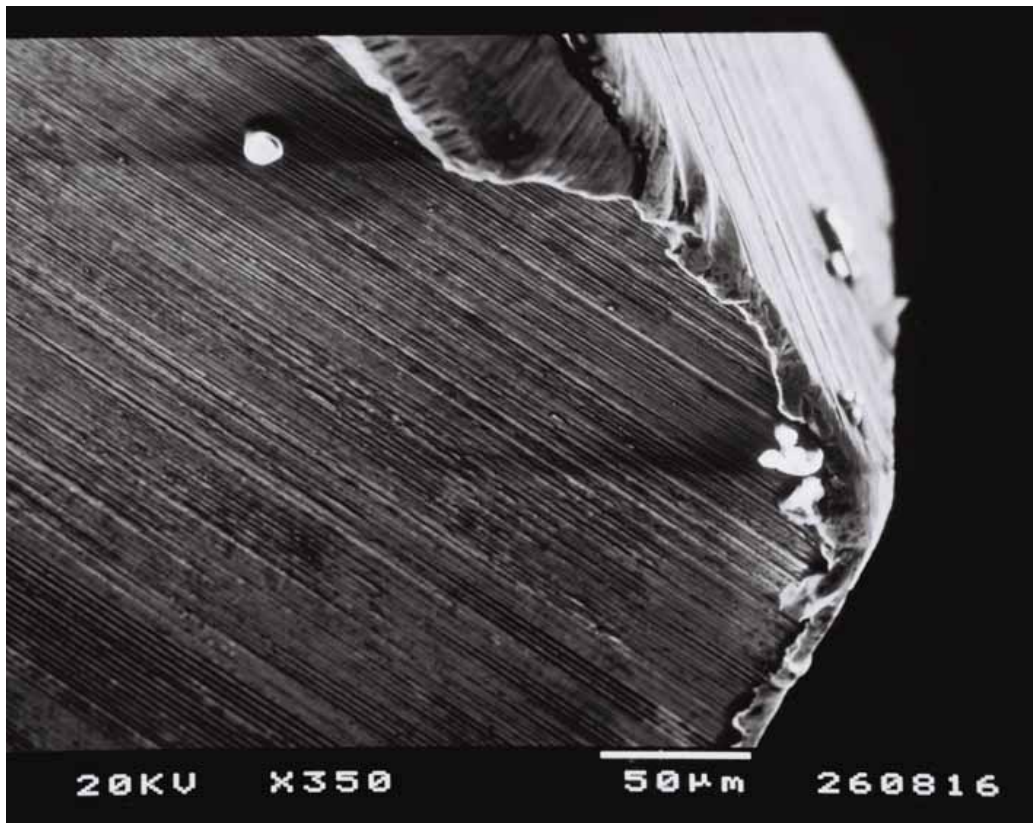


Figura 09 – MEV evidenciando defeitos em formato de cavidade (subtração de metal) na ponta ativa das fresas.

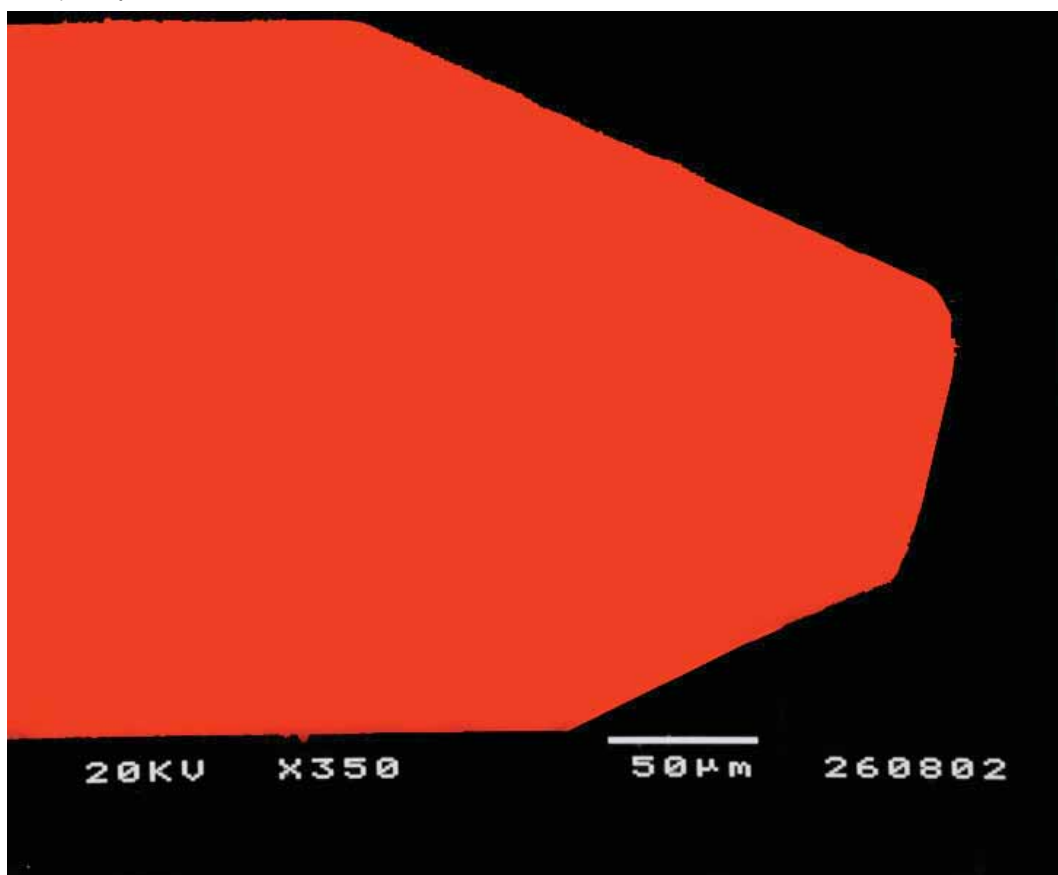


Figura 10– Template construído a partir da fresa lança inicial para auxiliar na quantificação das perdas de substância em fresas do tipo lança

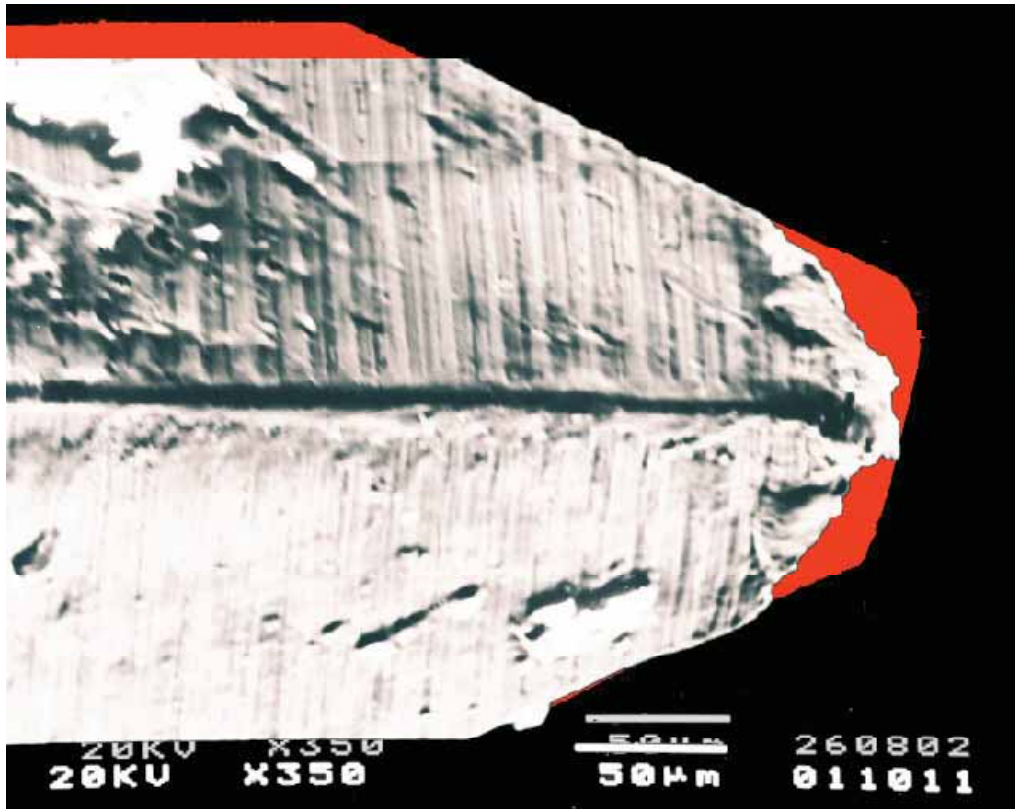


Figura 11 – MEV da fresa do tipo lança sobreposta no template (em vermelho) para evidenciar perda de substância na ponta ativa da fresa.

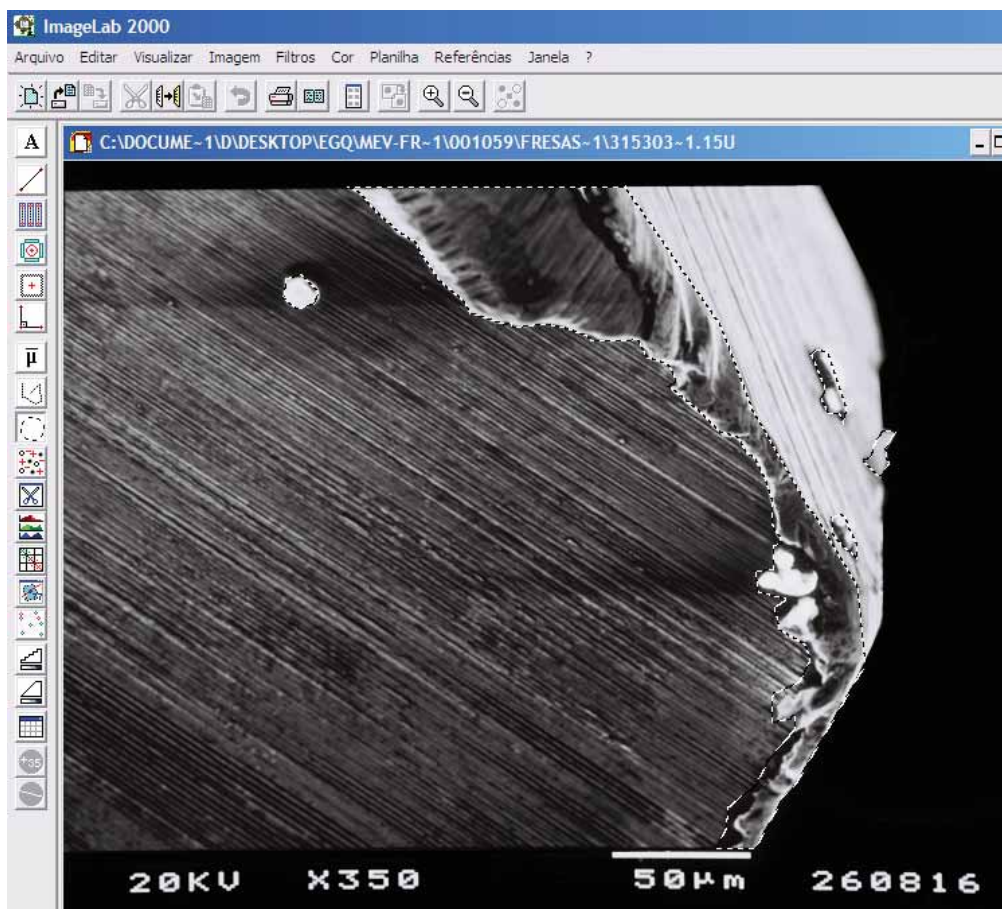


Figura 12 – Quantificação das deformações das fresas no software Imagemlab 2000 através da ferramenta *selecionar região*.

ImagLab 2000

Arquivo Editar Localizar Imagem Outros Gr. Ferramentas Ferramentas Janela 1

Estrutura(C:\DOCUME~1\110\DESKTOP\EGOUAR\FX-1\FRESA.T-1\20X.JPG)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
4	Largura: Altura:				Tde regiões: 13,8%									
5	777	637			em relação a área total da imagem									
7	Largura: Altura:				Densidade		#	187,687						
8	Largura: Altura:				Área média		#	188,951						
9	Largura: Altura:				das áreas		#	130,334						
10	Largura: Altura:				marcadas		Médo	177,435						
11	<b>Dados Estatísticos</b>													
12	MORFOMETRIA													
13	ABSORÇÃO DE COB													
14	Densidade													
15	DIÂMETROS													
16	CENTRO DE MASSA													
17	Número													
18	Soma													
19	Média													
20	Desvio Padrão													
21	Valor Mínimo													
22	Valor Máximo													
23	Significância S2													
24	Significância S3													
25	<b>Dados Individuais</b>													
26	Número													
27	Categorias													
28	Área													
29	Perímetro													
30	Valor de forma													
31	II													
32	G													
33	II													
34	Densidade													
35	Diâm. Transv.													
36	Diâm. Maior													
37	Diâm. Menor													
38	X													
39	Y													
40	Borda													

tware Imagelab

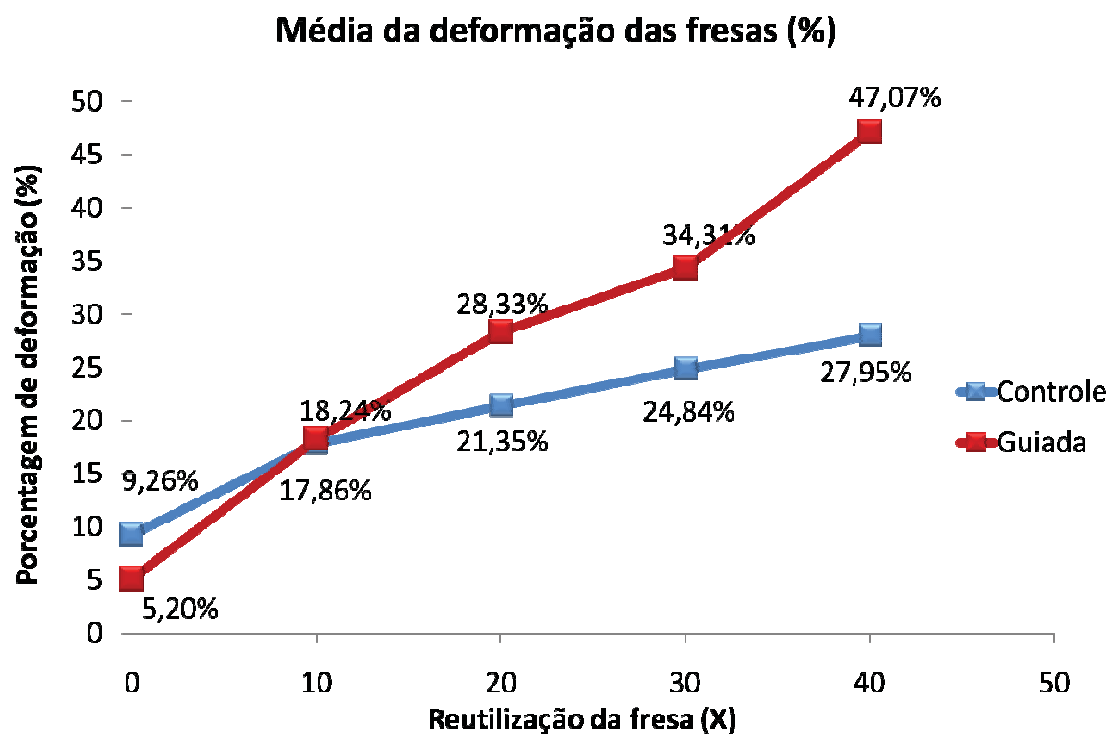


Figura 14: Média de deformação das fresas, em porcentagem, relacionada com o número de reutilizações.



## 4. *CAPÍTULO 3*

*“Cirurgia guiada para implantes: Qual a influência dessa nova técnica para a viabilidade celular imediata?”*

(Periódico: Clinical Oral Implants Research, Anexo E)

## *4.1 RESUMO*

## 4.1 Resumo

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da osteotomia para implantes sobre a viabilidade imediata das células ósseas simulando as técnicas cirúrgicas clássica e guiada. Uma simulação das técnicas cirúrgicas clássica e guiada foram realizados para comparar o efeito de ambas. **Material e Métodos:** Foram utilizadas tíbias de 20 coelhos, divididos igualmente em dois grupos: controle (GC) e cirurgia guiada (GG). Estes dois grupos foram, então, divididos em quatro subgrupos: G1, G2, G3 e G4, que correspondia corresponderam à utilização das fresas por 10, 20, 30 e 40 vezes, respectivamente. Os animais receberam 10 osteotomias (incluindo cinco em cada tíbia) de acordo com cada técnica (cirurgia clássica e guiada). As áreas osteotomizadas foram coletadas e processadas para inclusão em parafina. **Resultados:** A análise imunohistoquímica mostrou semelhança na expressão de proteínas associadas com a formação e atividade dos osteoclastos, tais como Osteoprotegerina (OPG) e Receptor Ativador do Fator Nuclear  $\kappa$ B (RANKL) para o GC e GG. Embora a imunorreação tendesse a ser mais intensa no GG. A expressão de Osteocalcina (OC), proteína associada à mineralização óssea, foi mais intensa no GC, permanecendo constante após a reutilização das fresas. A expressão da Caspase-3 (cas-3) manteve-se equilibrada no GC e aumentou no GG, proporcionalmente ao número de osteotomias. Este evento indica um aumento na apoptose celular. **Conclusão:** Com base nesses resultados, é possível concluir que a técnica clássica favorece a viabilidade celular quando comparada à técnica guiada.

**Palavras-chave:** osteotomia, implantes dentários, osteoprotegerina, RANKL, osteocalcina, caspase-3.

## 4.2 *ABSTRACT*

## 4.2 Abstract

**Objectives:** In this study, A simulations of the classical and guided surgical techniques were performed to compare their effect of both. The purpose of this study was to evaluate the effect of the osteotomy for implants on immediate bone cell viability. A simulation of the classic and guided surgical techniques were performed to compare the effect of both. **Material and Methods:** We used tibia Tibiae of 20 rabbits, were equally divided into two groups: control (CG) and guided surgery (GG). To test the influence of re-using the same drills for 10, 20, 30 and 40 times, These two groups CG and GG were , then, divided into four subgroups: G1, G2, G3 and G4, which correspond to the use of the drills for 10, 20, 30 and 40 times respectively. The animals received 10 5 osteotomies (including 5 in each tibia by using) according to each technique ( classical and guided surgeries.y). Osteotomized areas were collected and processed for paraffin embedding. Bone sections were submitted to immunohistochemistry for Osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B (RANKL), Osteocalcin (OC) or caspase-3 (cas-3) detection. **Results:** Immunohistochemical analysis showed similarity in the expression of proteins associated with the osteoclast formation and activity, such as OPG and RANKL, for CG and GG, although the immunoreaction tended to be more intense in GG. The expression of OC, protein associated with bone mineralization, was more intense in the CG, remaining constant after re-use of the drills. The expression of cas-3 was balanced in the different GC subgroups , whereas an increased expression was proportional to the increase in the number of osteotomies, in GG subgroups. This event indicates an increase in cellular apoptosis. **Conclusion:** Based on these results, it is possible to conclude that the classical technique favors cellular viability when compared to guided technique.

**Keywords:** osteotomies, dental implants, osteoprotegerin, RANKL, osteocalcin, caspase-3.

## 4.3 *INTRODUÇÃO*

### 4.3 Introdução

O objetivo de todos os procedimentos com implantes dentários, tanto em termos cirúrgicos, quanto protéticos, está na otimização da posição do implante, fato que garante melhores resultados biomecânicos, funcionais, estéticos e fonéticos (Spielberg et al. 2006; Xiaojun et al. 2007).

Atualmente, o desenvolvimento de softwares, por meio da tomografia computadorizada, permite o estudo e o planejamento protético reverso detalhado, minimizando as possibilidades de erros cirúrgicos e protéticos em Implantodontia. Com estes sistemas de imagens associados à estereolitografia, é possível a confecção de protótipos e guias cirúrgicos por meio de modelagem computacional (Jacobs et al. 1999; Viana Neto et al. 2008). O guia cirúrgico utilizado para instalação dos implantes é confeccionado em acrílico e tem o objetivo de orientar a correta posição e inclinação nas perfurações, garantindo, desse modo, a precisão do sistema implante-prótese (Pesun & Gardner 1995; Dreiseidler et al. 2009). Esta técnica cirúrgica é denominada de cirurgia guiada para implantes. Suas vantagens incluem a preservação do volume de tecido ósseo ao redor dos implantes, a redução do tempo cirúrgico, do sangramento, do edema e da dor pós-operatória (Azari & Nikzad 2008; Komiyama et al. 2008; Widmann & Bale 2006, Vercruyssen et al. 2008).

O sucesso da osseointegração depende da reparação primária do sítio de instalação dos implantes (Albrektsson et al. 1981). Portanto, a adequada preparação do leito receptor, bem como a presença de um tecido ósseo saudável são pré-requisitos críticos no processo de reparo (Benington et al. 2002).

Entre os fatores traumatogênicos que podem inviabilizar o sucesso da preparação do leito receptor está o trauma térmico local. O calor friccional gerado



durante a preparação cirúrgica de tecidos mineralizados ocasiona necrose celular (Tehemar 1999).

Os fatores relacionados à magnitude do aquecimento térmico no tecido ósseo segundo Franssen (2008) são: (1) técnica de osteotomia, a qual está relacionada com a velocidade, pressão e duração da osteotomia; (2) características da fresa, como o tamanho, forma e sua capacidade de corte; (3) fatores externos, incluindo a irrigação empregada (Yacker & Klein 1996; Cordioli & Majzoub 1997; Tehemar 1999).

A susceptibilidade do tecido ósseo à injúria térmica foi comprovada e o limiar de temperatura para a sobrevivência tecidual durante a osteotomia foi estabelecido em 47° C durante 1 minuto. O repetido uso das fresas durante o preparo para a instalação dos implantes, diminui seu poder de corte, ocasionando trauma excessivo, com conseqüente aumento do calor friccional (Eriksson & Albrektsson 1983, 1984).

O primeiro passo do processo de reparo ósseo é dependente de elementos celulares e vasculares do tecido (Tehemar 1999). Neste contexto destaca-se a presença de proteínas celulares e proteínas da matriz extracelular ósseas, que são conhecidas por exercerem uma importante função na atividade celular ao redor dos implantes e, conseqüentemente, na osseointegração (Nagai et al. 2002; Rammelt et al. 2004).

Dentre essas proteínas, destacamos o ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL) expresso por osteoblastos e linfócitos T ativados (Khosla 2001; Rogers & Eastell 2005). Além do RANKL, outra proteína que se destaca na dinâmica tecidual óssea é a osteoprotegerina (OPG), que é secretada por osteoblastos, fibroblastos e linfócitos T. Considerada inibidora da formação e atividade de osteoclastos, sua presença está envolvida com a inibição da reabsorção óssea (Bucay et al., 1998; Woo et al. 2002; Crotti et al. 2004). Considerando que RANKL e OPG têm funções opostas, a análise da expressão relativa das mesmas permite avaliar a tendência ao estímulo ou

inibição da formação e da atividade osteoclástica o que, conseqüentemente, influencia a remodelação óssea (Suda et al. 1999, Li et al. 2000).

Uma outra importante proteína óssea, é a osteocalcina (OC), a qual é expressa por osteoblastos e na matriz óssea liga-se à hidroxiapatita (Lieberman et al. 2002; Thorwarth et al. 2005; Rammelt et al. 2005). Sua atuação parece ocorrer nos estágios iniciais do reparo ósseo, sendo essencial para a regulação da atividade osteoblástica (Queiroz et. al. 2008).

Além das proteínas anteriormente mencionadas, as caspases também parecem exercer um importante papel no tecido ósseo. As caspases são um grupo de proteases essenciais na apoptose. A caspase-3 (Cas-3) é uma caspase executora associada à clivagem de proteínas do citoesqueleto celular (Alam et al. 2010). É ativada nas células de linhagem osteoblástica em apoptose e, portanto, pode demonstrar a viabilidade dessas células (Kim et al. 2009). Além disso, é importante ressaltar que parece existir uma ligação entre a apoptose de osteócitos e o recrutamento de osteoclastos para a remodelação óssea (Boabaid et al. 2001; Gu et al. 2005).

Tendo em vista a função prejudicial que o aquecimento ósseo promove no processo de reparo tecidual ósseo, a sobreutilização de fresas durante a osteotomia para implantes pode exercer uma influência negativa sobre a osseointegração. Assim, neste estudo foi realizada à comparação das técnicas clássica e guiada de osteotomia para implantes (por repetidas vezes), no que diz respeito à viabilidade celular.

## 4.4 *PROPOSIÇÃO*

#### **4.4 Proposição**

O propósito deste trabalho foi avaliar comparativamente por meio de imunohistoquímica, o efeito da osteotomia para implantes sobre a viabilidade celular óssea imediata, simulando as técnicas cirúrgicas clássica e guiada.

## *4.5 MATERIAL E MÉTODO*

## **4.5 Material e Método**

### ***ANIMAIS***

Foram utilizados 20 coelhos machos brancos (*Oryctolagus cuniculus*, Nova Zelândia) com peso corporal aproximado entre 3e 4 Kg. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (protocolo número 2010-004687).

Para a realização do trabalho dividiu-se os animais em 2 grupos: grupo controle (GC), correspondente à fresagem clássica para implantes e o grupo guiada (GG), correspondente à fresagem simulando a técnica de cirurgia guiada. Ambos os grupos foram subdivididos em 4 grupos (G), onde o G1 correspondeu às fresas utilizadas para 10 perfurações, G2 às fresas utilizadas para 20 perfurações, G3 às fresas utilizadas para 30 perfurações e G4 às fresas utilizadas para 40 perfurações.

### **CIRURGIA**

Os animais foram anestesiados pela combinação de 50 mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil).

Após a anestesia, foi realizada uma incisão na porção medial das tíbias direita e esquerda de cada coelho, seguida de divulsão do tecido mole e descolamento do periósteo para a realização das osteotomias. Posteriormente, um motor elétrico com velocidade de 1600 r.p.m. conectado a um contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo, Santa Catarina, Brasil) foi utilizado para a confecção dos defeitos ósseos.

Cada animal recebeu 10 seqüências de osteotomias, sendo 5 de cada grupo (GC e GG), aleatoriamente em cada tibia. O preparo dos leitos receptores do GC foi iniciado com uma fresa lança para delimitar a localização das perfurações e romper a cortical óssea. Em seguida, foram utilizadas as fresas helicoidais de 2.0 mm, 2.8 mm, 3.0 mm e de 3.15 mm (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, São Paulo, Brasil), seqüencialmente, na profundidade constante de 4 mm (Figuras 01), com concomitante irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Portanto, somente a cortical superior foi fresada, o que corresponde ao osso do tipo I (Branemark et al. 1985).

No preparo do GG foi realizada a incisão, descolamento e a seqüência de fresagem de forma semelhante ao GC. No entanto, para realizar o GG foi confeccionado um guia cirúrgico de resina acrílica, com anéis metálicos para adaptação das anilhas guias do kit de cirurgia guiada, obtido do molde de uma tibia de coelho. O guia foi posicionado e usado em toda preparação do leito receptor para simular a técnica de cirurgia guiada (figura 02, 03 e 04). Durante toda a preparação foi realizada a irrigação externa por meio de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil).

A pressão exercida sobre o tecido ósseo durante as osteotomias não foi mensurada, entretanto toda a preparação foi executada com o cuidado de exercer pouca pressão e de realizar perfuração intermitente, permitindo o escape do osso despreendido e o livre acesso para a solução irrigadora.

A eutanásia foi realizada no pós-operatório imediato por meio da administração de sobredosagem anestésica.

## ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras teciduais foram descalcificadas em ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 5%, por 3 meses desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Em seguida, as secções longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidas.

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas utilizando-se como anticorpos primários a OPG (Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), o RANKL (Goatanti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627), a OC (Goatanti-oc - Santa Cruz Biotechnology, SC18319) e a Cas-3 (Goat anti-cas-3 - Santa Cruz Biotechnology, USA, SC1225). O método de detecção foi pela imunoperoxidase utilizando-se anticorpo secundário biotilado anti-cabra (Pierce biotechnology). A amplificação do sinal foi realizada pela Streptavidina/Biotina (Dako) e as reações foram reveladas utilizando a diaminobenzidina (DAB, Dako). Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris.

O método de detecção foi pela imunoperoxidase utilizando-se anticorpo secundário biotilado anti-cabras (Pierce biotechnology). A amplificação do sinal foi realizada pela Streptavidina/Biotina (Dako) e as reações foram reveladas utilizando a diaminobenzidina (DAB, Dako) (Figura 05). Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris.

Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo). A cortical inferior da tíbia dos coelhos foi avaliada como sendo o controle positivo, para verificar a efetividade dos anticorpos utilizados. (dados não demonstrados).

As marcações positivas para as proteínas analisadas foram avaliadas por meio de microscópio óptico com objetiva de 20X de aumento (Leica Aristoplan Microsystems-



Leitz, Benshein, Alemanha) acoplado à uma câmera de captação de imagem (Leica□ DFC 300FX, Leicamicrosystems, Heerbrugg, Switzerland).

Parte das amostras teciduais seccionadas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE Merck & Co., Inc.), para análise morfológica, servindo como referência para a análise dos cortes submetidos à muno-histoquímica.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a análise imuno-histoquímica foram atribuídos escores, baseados na metodologia previamente descrita (Queiroz et al. 2008). Na análise imuno-histoquímica, a expressão das proteínas avaliadas foi observada na cortical superior das tíbias dos coelhos, próximos às osteotomias.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e, posteriormente, aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ( $\alpha = 5\%$ ).

Foi obtida também a razão RANKL:OPG para avaliar a tendência à inibição ou estímulo à formação osteoclastos, nos diferentes grupos, de acordo com estudos previamente realizados (De Souza Faloni et al. 2011).

## 4.6 *RESULTADOS*

## 4.6 Resultados

### TÉCNICA CLÁSSICA

As imunomarcações observadas para OPG e RANKL foram mantidos entre os níveis negativo e positivo. Os valores relacionados à expressão dessas proteínas foram comparados entre cada defeito por meio do teste de Mann-Whitney, não sendo encontrada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) (Figura 7 e 10).

Para avaliar a diferença de expressão protéica em relação ao número de fresagens, foi o utilizado teste de Kruskal-Wallis e não foram observadas diferenças entre G1, G2, G3 e G4 ( $p = 0,005$ ). Apesar disso, a expressão de OPG apresentou-se variável durante os períodos avaliados (Figura 6), enquanto a expressão de RANKL apresentou tendência ao aumento, proporcionalmente à repetição das fresagens.

Em todos os grupos analisados, a expressão da OC na cortical superior, não apresentou alterações qualitativas na sua dinâmica. A marcação de fundo, característica dessa proteína, foi observada na cortical superior, o que comprovou a viabilidade celular mesmo nos grupos nos quais foi realizado um maior número osteotomias (Figura 13).

A imunomarcação da cas-3, enzima presente nos osteócitos em apoptose, aumentou conforme a progressão das perfurações. Vale destacar que a partir da 10<sup>a</sup> osteotomia, a expressão desta proteína foi representada pelo escore positivo e na 30<sup>a</sup>, apresentou escore superpositivo (Figura 16).

Nos cortes histológicos corados com HE, os osteócitos apresentaram fortemente corados pela hematoxilina ao longo das corticais superior e inferior analisadas, sem maiores alterações morfológicas do tecido ósseo.

## TÉCNICA GUIADA

No GG, as imunomarcações observadas para OPG e RANKL foram mantidas entre os níveis negativo e positivo. Os valores relacionados à expressão dessas proteínas foram comparados entre os defeito por meio do teste de Mann-Whitney, e não foram encontradas diferenças na expressão de ambas ( $p = 0,886$ ) (Figuras 8 e 12). A expressão de OPG apresentou valores praticamente constantes para os períodos analisados (Figura 6), enquanto a expressão de RANKL apresentou padrão de distribuição semelhante à do GC (Figura 09).

A OC apresentou marcação negativa à positiva, mantendo o valor equilibrado em relação ao número de reutilizações (Figura 14).

Em relação à cas-3, observou-se uma marcação positiva a partir da 20ª osteotomia, observando-se níveis de marcação muito intensa na 40ª. Vale ressaltar que a partir da 20ª perfuração houve uma tendência de perda da viabilidade dos osteócitos, havendo um aumento gradativo na expressão dessa proteína conforme efetuadas as perfurações subseqüentes (Figura 15 e 17).

As imunomarcações de OPG, RANKL, OC e Cas-3 foram comparadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatisticamente significativa entre GG1, GG2, GG3 e GG4 (Tabela 01 e 02). Contudo, as análises qualitativas das expressões protéicas demonstraram tendência às respostas celulares descritas acima.

Os valores relacionados à expressão de cada proteína foram comparados entre GC e GG, por meio do teste de Mann-Whitney, não havendo diferença estatística para OPG e RANKL, o que confirmou o equilíbrio na expressão dessas proteínas (Figura 06 e 09). Já na comparação da OC, entre GC e GG, observou-se uma diferença significativa, havendo maior expressão no GC ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

A razão RANKL/OPG não apresentou diferenças entre os grupos. Na comparação de GC com GG na 10<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> osteotomias, houve uma tendência à maiores valores para o GG, porém na 40<sup>a</sup> osteotomia esse resultado se inverteu (Figura 18 e Tabela 3).

Os controles negativo confirmaram a especificidade das reações imunohistoquímicas. Nos controles positivos a marcação celular foi observada em osteócitos para cada proteína avaliada, comprovando a efetividade dos anticorpos estudados. Os cortes histológicos corados com HE, mostraram osteócitos fortemente corados pela hematoxilina ao longo das corticais superior e inferior analisadas, sem maiores alterações morfológicas do tecido (dados não demonstrados).

## *4.7 DISCUSSÃO*

## 4.7 Discussão

Os fatores que influenciam a viabilidade do leito osteotomizado para implantes são consagrados na literatura em pesquisas com modelos ósseos diferentes, incluindo ossos de animais mortos, animais vivos e humanos (Ercoli et al. 2004; Paterno et al. 2005; Queiroz et al. 2008). As principais diferenças entre o modelo experimental morto e vivo é a densidade óssea e a celularidade, a qual indica a viabilidade celular (Tehemar et al. 1999). No entanto, esses fatores continuam sendo amplamente pesquisados devido ao surgimento de novas tecnologias e protocolos no mercado.

A técnica de cirurgia guiada preconiza o uso de um guia cirúrgico, com o objetivo de conseguir maior precisão na fase cirúrgica e protética do implante dentário, porém esse dispositivo não permite irrigação direta na ponta ativa da fresa gerando temperaturas teciduais ósseas elevadas, fato que alguns autores sugerem causar conseqüências negativas para a osseointegração (Jabero & Sarment 2006; Azari & Nikzad 2008).

Até o momento não encontramos na literatura estudos como este, que avalia o efeito do uso do guia cirúrgico nas osteotomias para implantes sobre a viabilidade celular óssea imediata “in vivo”.

Diversas alterações celulares são relatadas na literatura após o trauma cirúrgico no tecido ósseo, como hiperemia, morte celular e fibrose. Neste contexto, destaca-se a importância do osteócito como um mecanossensor, ou seja, célula responsável por traduzir estímulos mecânicos impostos ao osso, por meio da expressão de proteínas que regulam a remodelação óssea (Rubin et al. 2006; Mann et al. 2006). Dessa forma, o aumento na expressão dessas proteínas ocorre após a injúria tecidual, induzindo a migração celular (Ocarino et al. 2006).

No presente estudo, a influência de repetidas fresagens na viabilidade celular imediata foi analisada por meio da expressão de proteínas de células e matriz ósseas. Esta análise é possível, pois, a partir de 2 a 3 minutos após a injúria tecidual, acontece a síntese e liberação de proteínas para o citoplasma celular, o que pode ser detectado por meio da reação imuno-histoquímica (Aires 1999; Queiroz et al. 2008).

A OPG tem um papel chave na regulação da osteoclastogênese, pois sua ação biológica é a de inibir a diferenciação e a atividade osteoclástica. Neste estudo, a imunexpressão de OPG foi observada em células da linhagem osteoblástica, sinalizando o processo de neoformação óssea e/ou inibição da reabsorção óssea (Suda et al. 1999). Já o RANKL possui como função principal no osso, estimular a diferenciação osteoclástica e sua atividade, além de inibir a apoptose destas células, (Khosla 2001). Neste estudo, a técnica de cirurgia guiada tendeu a apresentar uma imunomarcagem menos intensa para OPG e RANKL em relação à técnica clássica.

Considerando que o balanço da expressão proteica de RANKL e OPG pode confirmar viabilidade celular após osteotomias e sinalizar uma dinâmica óssea balanceada, o que é característico de um estado fisiológico do tecido ósseo (Ducy et al. 2000), no presente estudo, a razão entre RANKL:OPG para o GC e GG (De Souza Faloni et al. 2010) sugeriu que em 10, 20 e 30 osteotomias, houve uma tendência maior de formação e atividade osteoclástica no GG, porém na 40ª osteotomia esse fato se inverteu.

Dessa forma, sugere-se que a técnica de cirurgia guiada tende a induzir a reabsorção óssea. Isto talvez possa ser explicado pela deficiente irrigação diretamente na ponta ativa da fresa, devido à presença do guia cirúrgico, o que acarreta maior deformação das fresas, maior aquecimento ósseo e, conseqüentemente, favorece a



apoptose de osteócitos. Por sua vez, a apoptose dos osteócitos leva ao recrutamento de osteoclastos, possivelmente induzindo maior reabsorção óssea (Gu et al. 2005).

A expressão de OC indica o estado da mineralização óssea. Esta proteína é expressa principalmente por osteoblastos (Queiroz et al. 2008). No presente estudo, em ambos os grupos, a imunomarcagem dessa proteína mostrou-se equilibrada, mesmo após a reutilização das fresas (G1, G2, G3 e G4). Na comparação entre os GC e GG, constatou-se uma diferença significativa na expressão dessa proteína, indicando atraso na mineralização no GG, o que pode também ser atribuído ao maior trauma tecidual, que aumenta a ocorrência de morte celular e, possivelmente, induz maior reabsorção óssea, podendo influenciar negativamente o reparo do defeito (Gu et al. 2005).

A apoptose das células da linhagem osteoblástica é um mediada pela cas-3. Esse processo é fundamental durante o desenvolvimento do osso e remodelação óssea. Dessa forma, a imunomarcagem para cas-3 indica redução da atividade osteogênica (Miura et al. 2004). Nessa pesquisa, na técnica clássica, a expressão de cas-3 manteve-se equilibrada, conforme o aumento de perfurações. Por outro lado, na técnica de cirurgia guiada observou-se uma marcação positiva de cas-3 a partir da 20ª osteotomia, com a elevação da expressão dessa proteína para superpositiva, nas osteotomias subsequentes. Portanto, ocorreu uma tendência à redução da viabilidade celular no GG, pois, o maior aquecimento tecidual ósseo ocasiona apoptose de osteócitos, o que induz maior recrutamento de osteoclastos. Assim, esse processo local desencadeia a reabsorção óssea.

Outro fator que pode influenciar a viabilidade celular pela injúria térmica é a refrigeração dos tecidos durante as osteotomias. Lavelle e Wedgwood (1980), relataram que durante a osteotomia a irrigação interna foi mais eficaz na redução de atrito do que a irrigação externa. Já Benington e colaboradores (2002) não encontraram diferenças na

temperatura quantificada com irrigação interna ou externa, após preparação de leito receptor de implantes. Mais recentemente, Misir e colaboradores (2009) realizaram um estudo que mostrou temperaturas mais altas quando se utilizou a irrigação externa associada à interna em comparação com a externa isolada. Os autores atribuíram esse fato ao envolvimento em osso cortical denso que causou a obstrução dos pontos internos de irrigação. Nesse estudo foi efetuada irrigação externa nos dois grupos, mantendo esse fator constante.

## 4.8 *CONCLUSÃO*

## **4.8 Conclusão**

De acordo com o estudo realizado foi possível concluir que a técnica de fresagem clássica para instalação de implantes favoreceu a viabilidade celular imediata quando comparada a técnica guiada, o que provavelmente deve estar associado à deficiência na irrigação que ocorre durante a realização desta última técnica.

## *4.9 REFERÊNCIAS*

## 4.9 Referências Bibliográficas

1. Aires, M.M. (1999) Fisiologia. 2ª edition, p 44-45. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
2. Alam, M.S., Ohsako, T.W., Tay, N., Tsunekawa, Y., Kanai, M. & Kurohmaru (2010) Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat sertoli cells: a possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anatomia Histologia Embryologia* **39**: 186-193.
3. Albrektsson, T., Branemark, P.-I., Hansson, H.-A. & Lindstrom, J. (1981) Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone to implant anchorage inman. *Acta Orthopaedica Scandinavica* **52**: 155–170.
4. Almeida, E.O., Pellizzer, E.P., Goiato, M.C., Margonar, R., Rocha, E.P., Freitas-Jr, A.C. & Anchieta, R.B. (2010) Computer-Guided Surgery in Implantology: Review of Basic Concepts. *Journal Craniofacial Surgery* **21**: 1917-1921.
5. Azari, A. & Nikzad, S. (2008) Flapless implant surgery: review of the literature and report of 2 cases with computer-guided surgical approach. *Journal of Oral and MaxilloFacial Surgery* **66**:1015-1021
6. Bedrossian, E. (2007) Laboratory and prosthetic considerations in computer-guided surgery and immediate loadin. *Journal of Oral and MaxilloFacial Surgery* **65**:47-52.
7. Benington, I.C., Biagioni, P.A., Briggs, J., Sheridan, S. & Lamey P.J. (2002) Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clinical Oral Implants Reserch* **13**: 293-297.
8. Bergkivist, G., Sahlholm, S., Nilner, K. & Lindh, C. (2004) Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla 2-year clinical and radiological follow-up of

treatment with non-submerged ITI implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 351-359.

9. Boabaid, F., Cerri, P.S. & Katchburian, E. (2001) Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue and Cell*. **33**: 318-325.

10. Branemark, P.-I., Zarb, G.A. & Albrektsson, T. (1985) Tissue-Integrated Prosthesis: Osseointegration in Clinical Dentistry. *Quintessence*: 201.

11. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J. & Simonet WS. (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and Development* **12**: 1260-1268.

12. Cordioli, G. & Majzoub, Z. (1997) Heat generation during site preparation: an in vitro study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **12**: 186-193.

13. Crotti, T.N., Smith, M.D., Findlay, D.M., Zreiqat, H., Ahern, M.J., Weedon, H., Hatzinikolous, G., Capone, M., Holding, C. & Haynes, D.R. (2004) Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NF $\kappa$ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* **25**: 565-573.

14. Dreiseidler, T., Mischkowski, R.A., Neugebauer, J., Ritter, L. & Zoller, J.E. (2009) Comparison of conebeam imaging with orthopantomography and computerized tomography for assessment in presurgical implant dentistry. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 216–225.

15. Ducy, P., Schinke, T. & Karsenty, G. (2000) The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**:1501.

16. Ercoli, C., Funkenbusch, P.D., Lee, H.J., Moss, M.E. & Grasser, G.N. (2004) The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy

preparation for dental implants: a study of drill durability. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**:335-349.

17. Eriksson, A.R. & Albrektsson, T. (1983) Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. *Journal of Prosthetic Dentistry* **50**: 101–107.

18. Eriksson, A.R. & Albrektsson, T. (1984) The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in rabbits using the bone growth chamber. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* **42**: 705-711.

19. Franssen, B.B.G.M., van Diest, P.J., Schuurman, A.H. & Kon, M. (2008) Drilling K-wire, what about osteocytes? An study in rabbits. *Archives Orthopaedic and Trauma Surgery* **128**:83-87.

20. Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T.A. & Vaananen, H.K. (2005) Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. [\*Biochemical Biophysical Research Communication\*](#) **335**:1095-101.

21. Khosla, S. (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* **142**: 5050-5055.

22. Kim, Y.S., Koh, J., Lee, Y., Kim, B.J., Lee, S.H., Lee, K.U. & Kim, G.S. (2009) Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via upregulation of toll-like receptors. *Bone* **45**: 68–76.

23. Komiyama, A., Klinge, B. & Hultin, M. (2008) Treatment outcome of immediately loaded implants installed in edentulous jaws following computer-assisted virtual treatment planning and flapless surgery. *Clinical Oral Implant Research* **19**: 677-685.



24. Kopp, K.C., Koslow, A.H. & Abdo, O.S. (2003) Predictable implant placement with a diagnostic/surgical template and advanced radiographic imaging. *Journal of Prosthetic Dentistry* **89**:611–615.
25. Jaber, M. & Sarment, D.P. (2006) Advanced surgical guidance technology: a review. *Implant Dentistry* **15**:135-142.
26. Jacobs, R., Adriansens, A., Verstreken, K., Suetens, P. & van Steenberghe, D. (1999) Predictability of a three-dimensional planning system for oral implant surgery. *Dentomaxillofacial Radiology* **28**:105–111.
27. Lavelle, C. & Wedgwood, D. (1980) Effect of internal irrigation on frictional heat generated from bone drilling. *Journal of Oral Surgery* **38**:499-503.
28. Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S.C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C.R., Lacey, D.L. & Boyle, W.J. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **97**: 1566-1571.
29. Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A. (2002) The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *Journal Bone Joint Surgery American* **84-A**: 1032-1044.
30. Mann, V., Huber, C., Kogianni, G., Jones, D. & Noble, B. (2006) The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *Journal Musculoskeletal Neuronal Interaction* **6**:408-417.

31. Misir, A.F., Sumer, M., Yenisey, M. & Ergioglu E. (2009) Effect of Surgical Drill Guide on Heat Generated From Implant Drilling. *Journal of Oral and MaxilloFacial Surgery* **67**:2663-2668.
32. Miura, M., Chen, X.D., Allen, M.R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B.M., Lakhani, S., Flavell, R.A., Feng, X.H., Robey, P.G., Young, M. & Shi, S. (2004) A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *Journal Clinical Investigation* **114**: 1704-1713.
33. Nagai, M., Hayakawa, T., Fukatsu, A., Yamamoto, M., Fukumoto, M., Nagahama, F., Mishima, H., Yoshinari, M., Nemoto, K. & Kato, T. (2002) In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dental Materials Journal* **21**: 250-260.
34. Nkenke, E., Eitner, S., Radespiel-Tröger, M., Vairaktaris, E., Neukam, F.W. & Fenner, M. (2007) Patient-centred outcomes comparing transmucosal implant placement with an open approach in the maxilla: a prospective, non-randomized pilot study. *Clinical Oral Implants Reserch* **18**:197–203.
35. Ocarino, N.M., Gomes, M.G. & Melo, E.G. (2006) Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões. *Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial* **42**: 37-39.
36. Paterno, D. Jr., Mizutani, F.S., Honda, A.M., Massaru, A., Fernandez, A. & Donato, B. (2005) Avaliação do intra-ósseo em procedimentos implantológicos. *Implant News* **2**: 251-255.
37. Pesun, I.J. & Gardner, F.M. (1995) Fabrication of a guide for radiographic evaluation and surgical placement of implants. *Journal Prosthetics Dentistry* **73**:548-552.

38. Queiroz, T.P., Souza, F.A., Okamoto, R., Margonar, R., Pereira-Filho, V.A., Garcia-Júnior, I.R. & Vieira E.H. (2008) Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **66**: 1233-1240.
39. Rammelt, S., Schulze, E., Bernhardt, R., Hanisch, U., Scharnweber, D., Worch, H., Zwipp, H. & Biewener A. (2004) Coating of titanium implants with type I collagen. *Journal Orthopaedic Research* **22**: 1025-1034.
40. Rammelt, S., Neumann, M., Hanisch, U., Reinstorf, A., Pompe, W., Zwipp, H. & Biewener, A. (2005) Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *Journal of Biomedical Materials Research* **73A**: 284-294.
41. Rao, W. & Benzi, R. (2007) Single mandibular first molar implants with flapless guided surgery and immediate function: Preliminary clinical and radiographic study *Journal of Prosthetic Dentistry* **97**: 3-14.
42. Rogers, A. & Eastell, R. (2005) Review: circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *Journal Clinical Endocrinology Metabolic* **90**: 6323-6331.
43. Rubin, J., Rubin, C. & Jacobs, C.R. (2006) Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* **367**:1-16.
44. [de Souza Faloni, A.P.](#), [Schoenmaker, T.](#), [Azari, A.](#), [Katchburian, E.](#), [Cerri, P.S.](#), [de Vries, T.J.](#) & [Everts, V.](#) (2011) Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcified Tissue International* **88**:63-74.

45. Spielberg, M., Randelzhofer, P., Moctezuma, B., Gläser, R., Kurtz, C. & Strub, J. R. (2001) Image-Guided Oral Implantology. Available online at: <http://www.worddent.com/2001/05/article/strubj.xml> (December 2006).
46. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**: 345-357.
47. Tehemar, S.H. (1999) Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **14**:127-136.
48. Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, F., Wiltfang, E. & Schlegel K.A. (2005) Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) - an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* **26**: 2575-2584.
49. Vercruyssen, M., Jacobs, R., Van Assche, N. & van Steenberghe, D. (2008) The use of CT scan based planning for oral rehabilitation by means of implants and its transfer to the surgical field: A critical review on accuracy. *Journal of Oral Rehabilitation* **35**: 454-474.
50. Viana Neto, A., Neves, P.J.C., Madruga, F.A.T.T.A., Rocha, R.S. & Carvalho, R.W.F. (2009) Cirurgia guiada virtual para reabilitação oral: revisão de literatura e relato de caso. *Revista Cirurgia Traumatologia Buco-Maxilo-facial Camaragibe* **9**:45-52.
51. Widmann, G. & Bale, J.R. (2006) Accuracy in Computer-Aided Implant Surgery- A review. *International Oral Maxillofacial Implants* **21**:305-313.

52. Woo, K.M., Choi, Y., Ko, S.H., Ko, J.S., Oh, K.O. & Kim, K.K. (2002) Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Experimental Molecular Medicine* **34**: 347-352.
53. Xiaojun, C., Yanping, L., Yiqun, W. & Chengtao, W. (2007) Computer-aided oral implantology: methods and applications. *Journal Medical Engineering Technology* **31**:459-467.
54. Yacker, M.J. & Klein, M. (1996) The effect of irrigation on osteotomy depth and bur diameter. *International Journal Oral Maxillofacial Implants* **11**:634-638.

*FIGURAS*

## FIGURAS



Figura 01 - Fresagem sequencial para implante do GC, com fresa helicoidal.

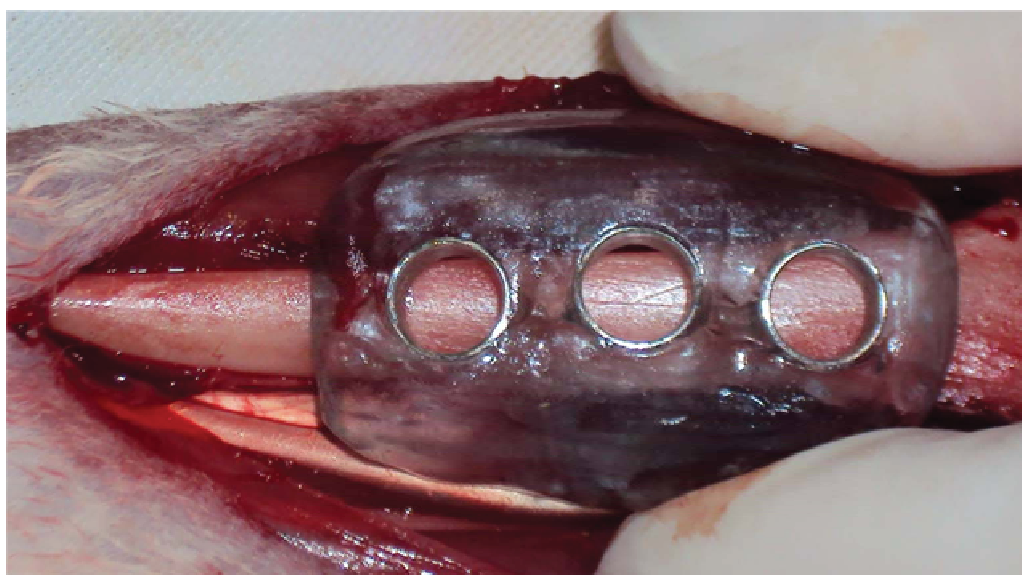


Figura 02 - Instalação do guia cirúrgico para osteotomia do GG.



Figura 03 -Fresagem inicial do GG, com fresa tipo lança. Note a utilização da anilha metálica para guiar a fresa.



Figura 04 -Fresagem sequencial para implante do GG, empregando-se fresa helicoidal.



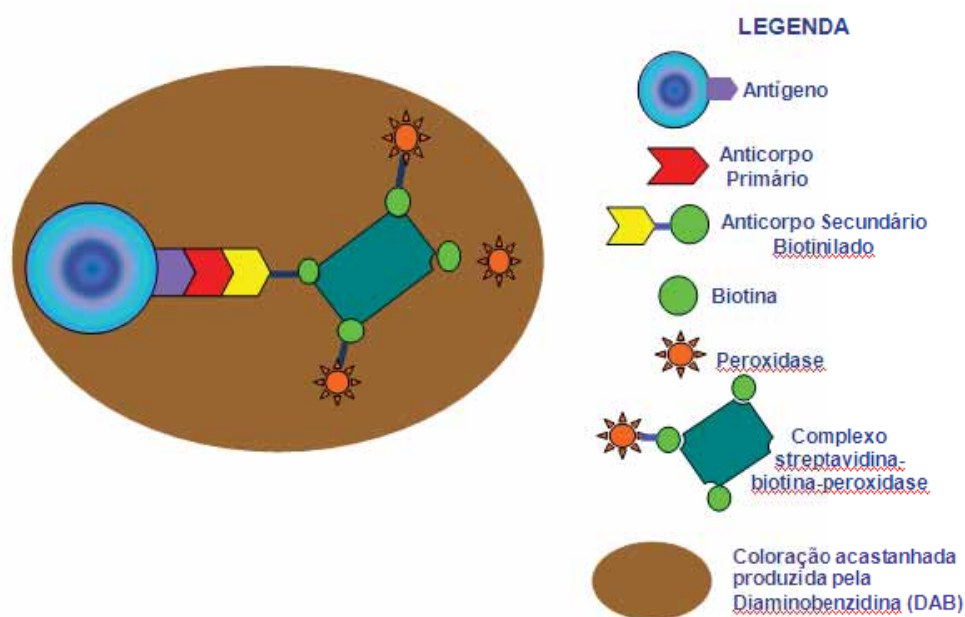


Figura 05 – Método de detecção da imunoperoxidase, utilizando-se o complexo Streptavidina-biotina para a amplificação do sinal da reação e a Diaminobenzidina (DAB) para coloração.

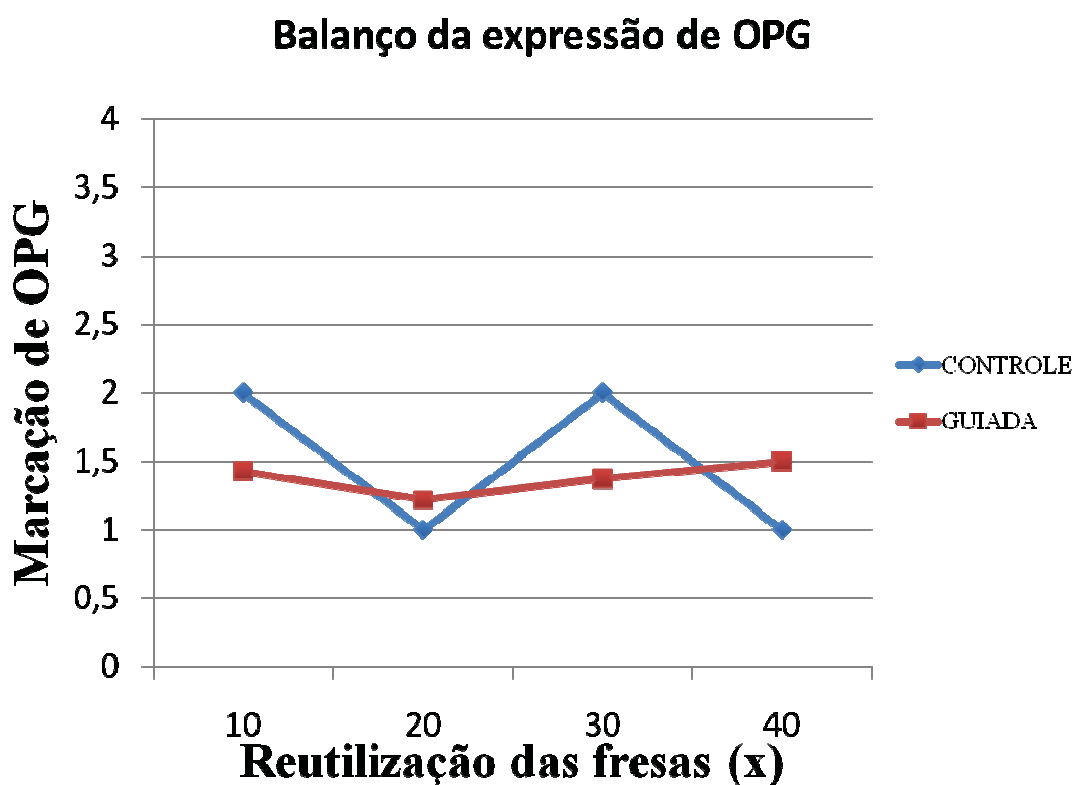


Figura 06 - Gráfico comparando o balanço entre a expressão de OPG após utilização das fresas no GC e no GG.

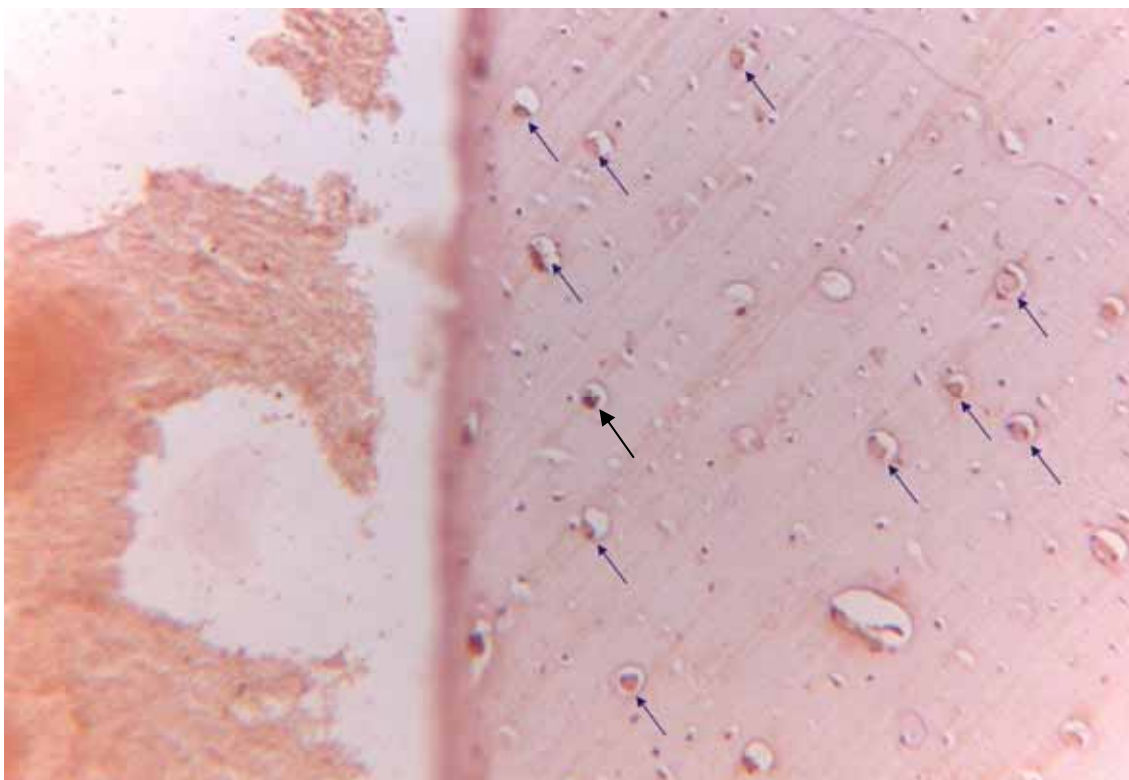


Figura 7 – Expressão de OPG no GC4 (Aumento de 200x). Marcação acastanhada nos citoplasmas celulares (setas azuis).

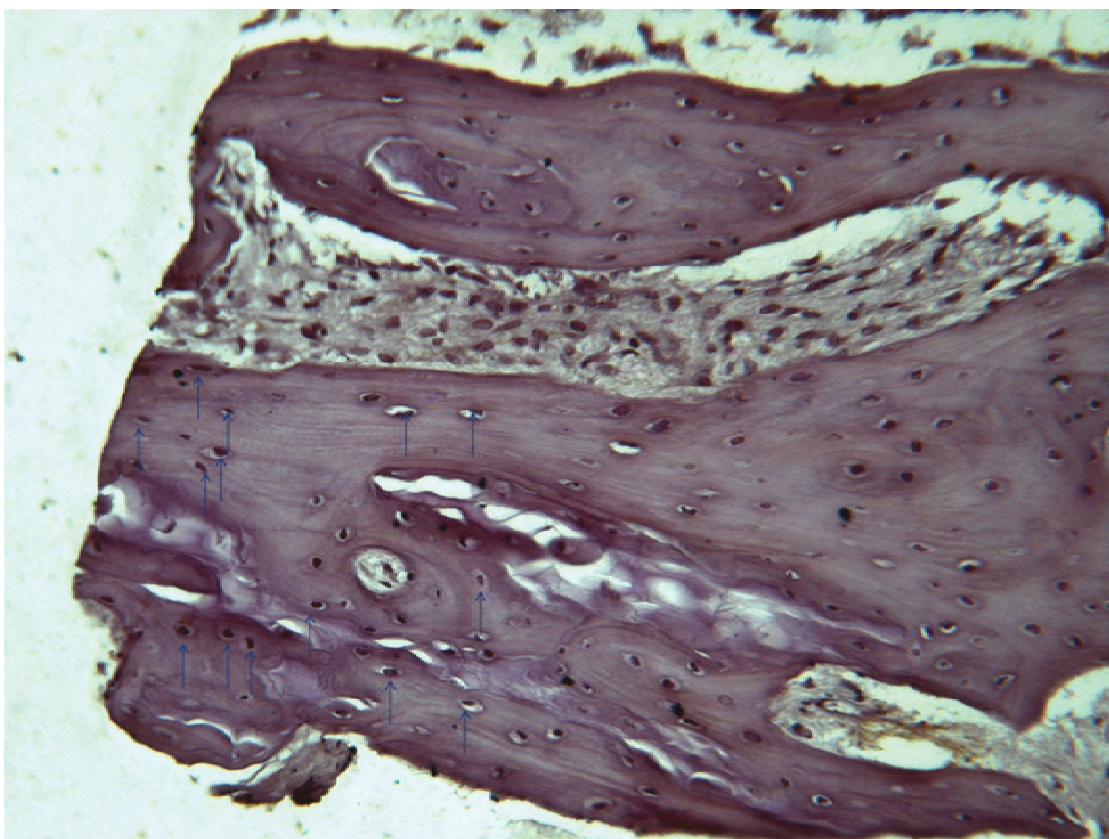


Figura 8 – Expressão de OPG no GG4 (Aumento de 200x). Marcação acastanhada nos citoplasmas celulares (setas azuis).

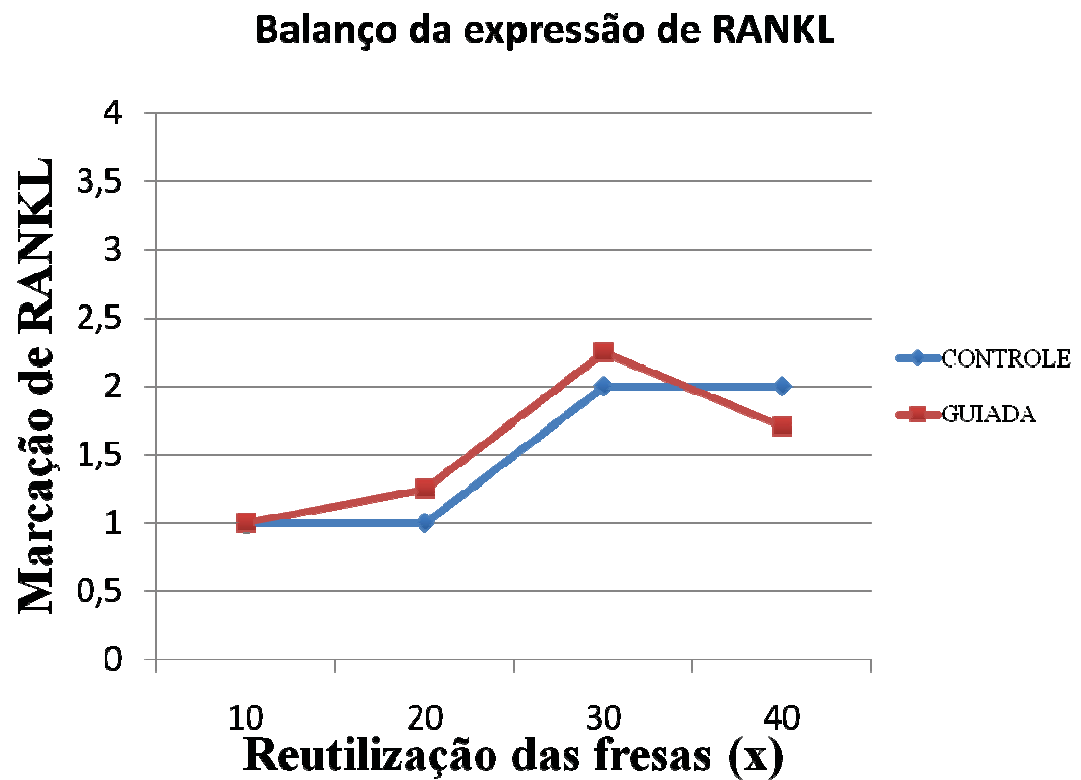


Figura 09: Gráfico comparando o balanço entre a expressão de RANKL após utilização das fresas em GC e GG.

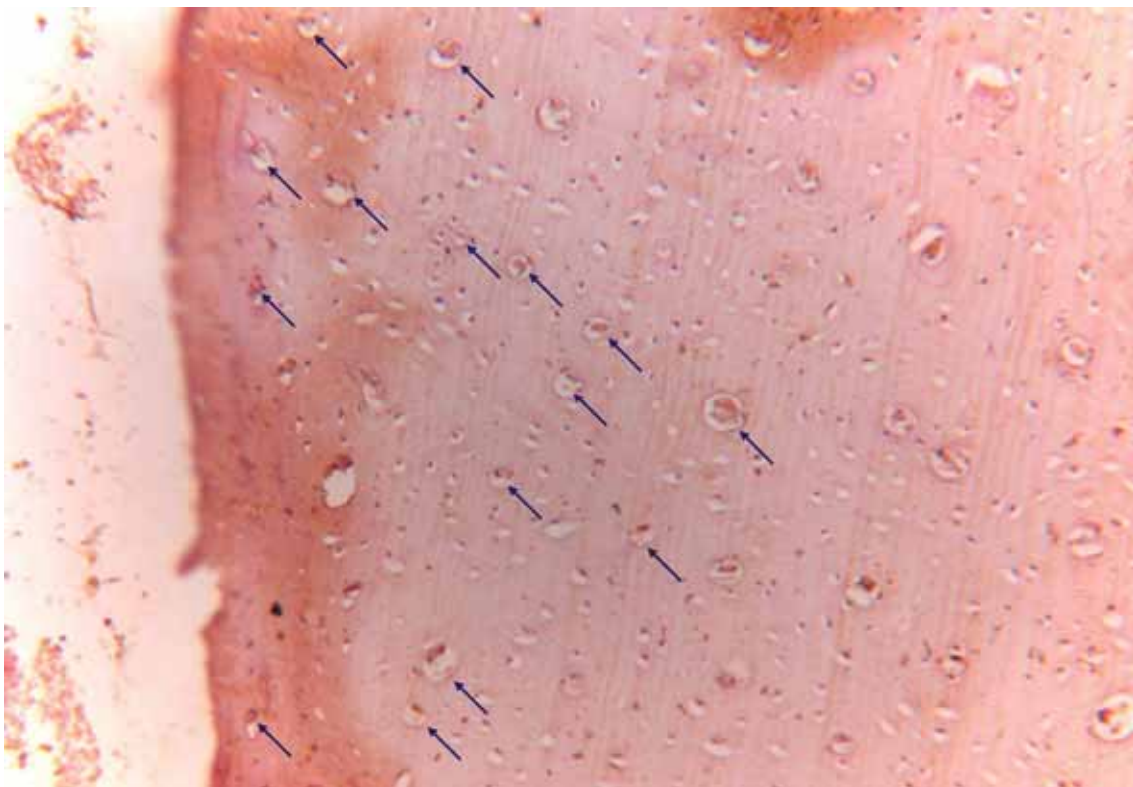


Figura 10 – Expressão de RANKL no GC4 (Aumento de 200x). Observar marcação no citoplasma dos osteócitos.

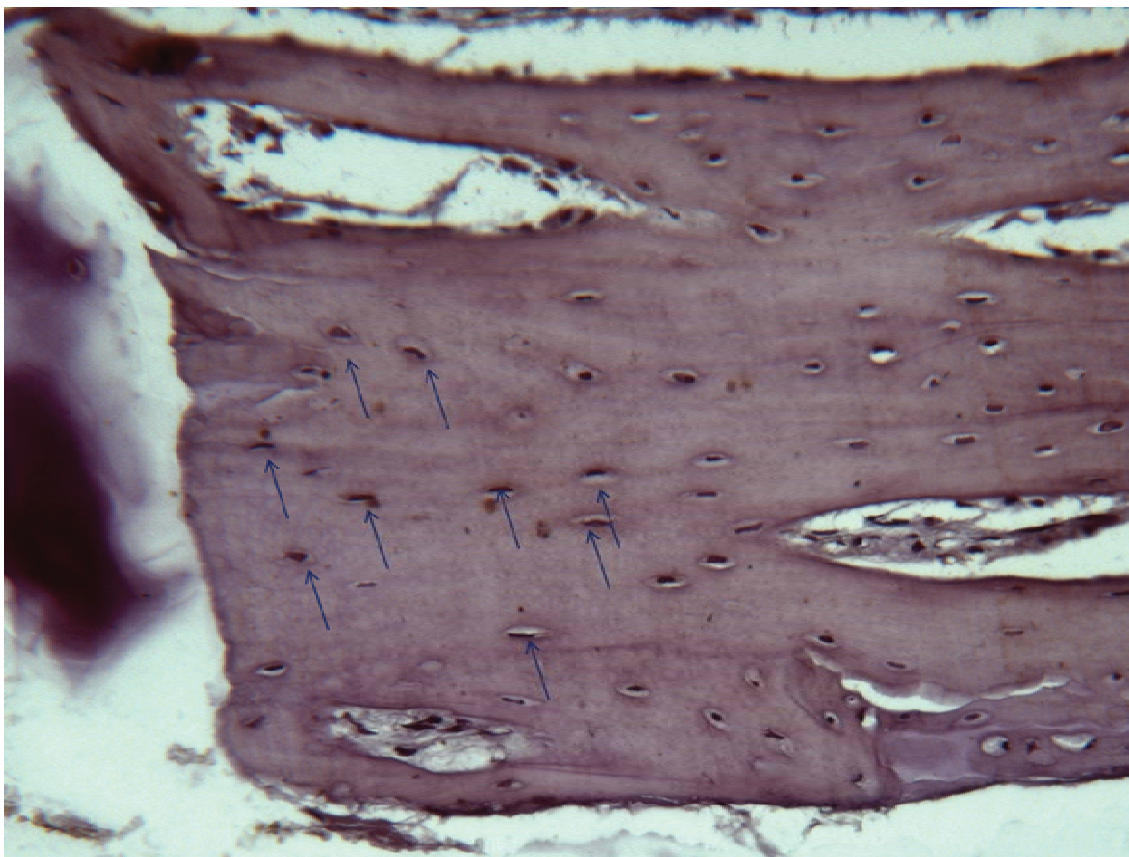


Figura 11 – Expressão de RANKL no GG4 (Aumento de 200x). Observar marcação no citoplasma dos osteócitos.

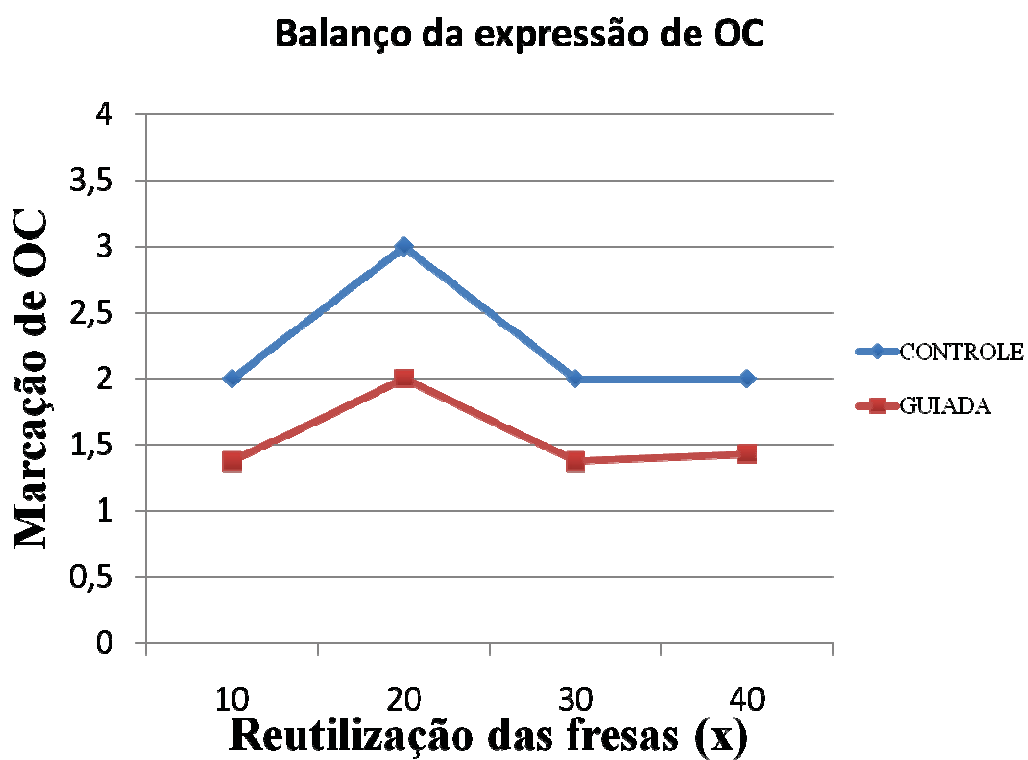


Figura 12: Gráfico comparando o balanço entre a expressão de OC após utilização das fresas em GC e GG.



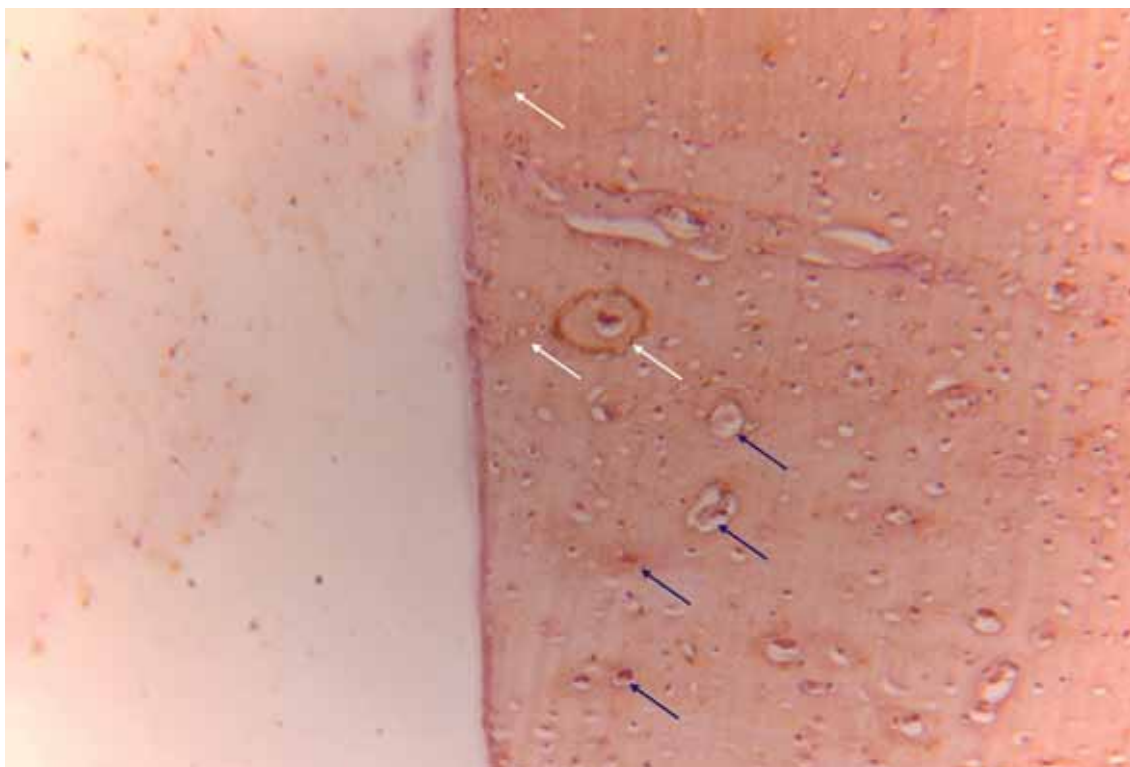


Figura 13 – Expressão de OC no GC4. Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

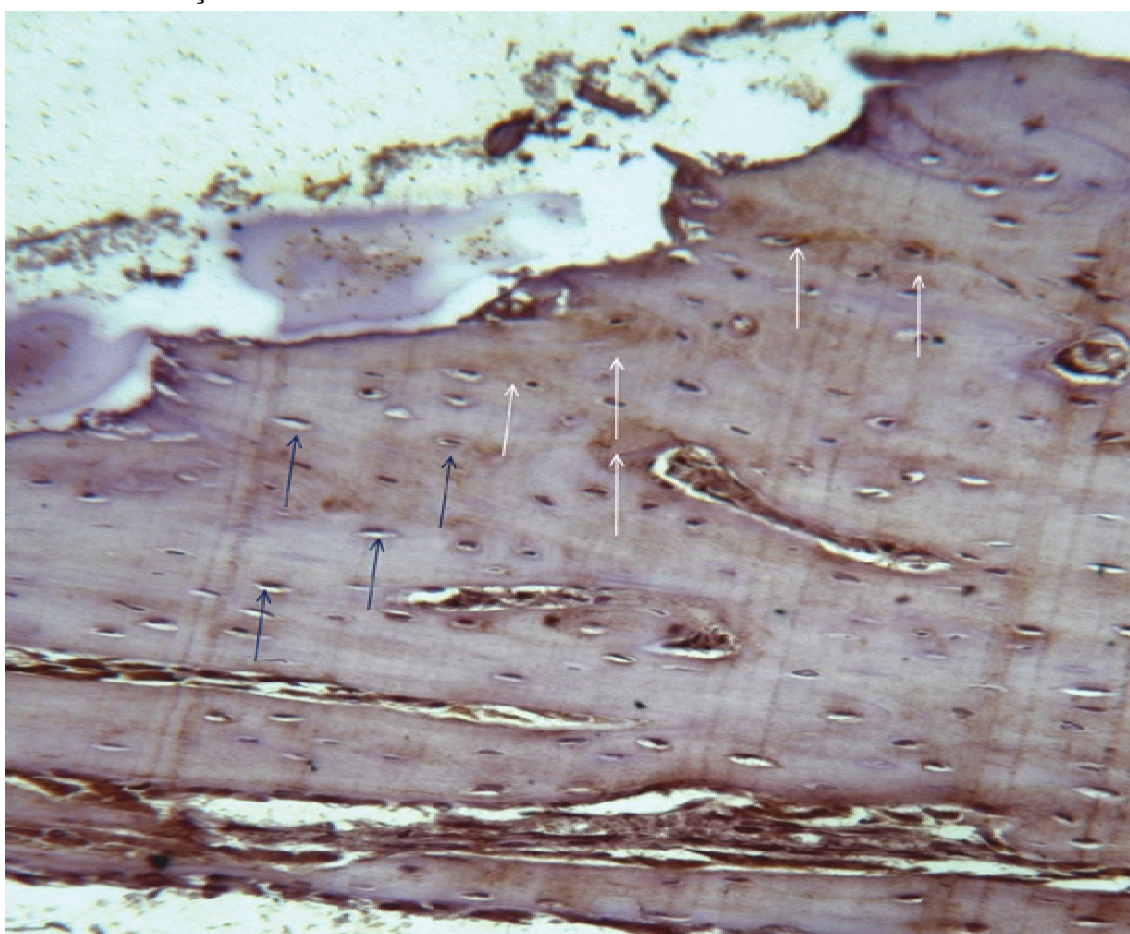


Figura 14 – Expressão de OC no GG4. Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

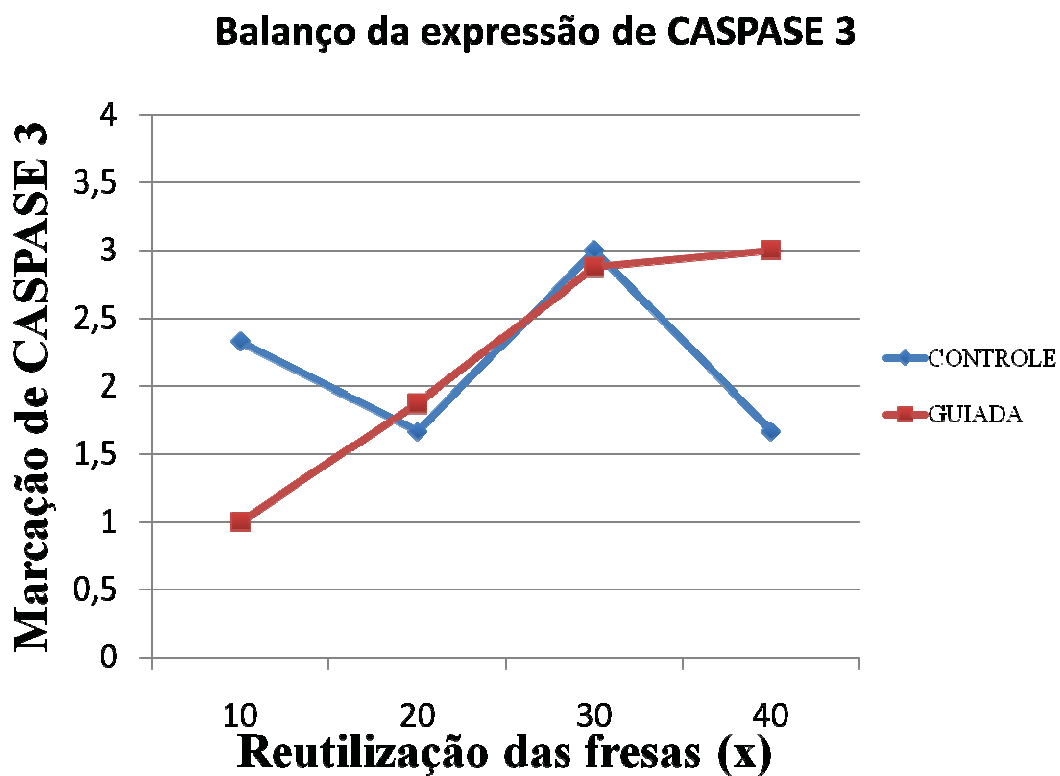


Figura14: Gráfico comparando o balanço entre a expressão de cas-3 após utilização das fresas em GC e GG.



Figura 15 – Expressão de CAS3 no GC3 (aumento de 200x). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

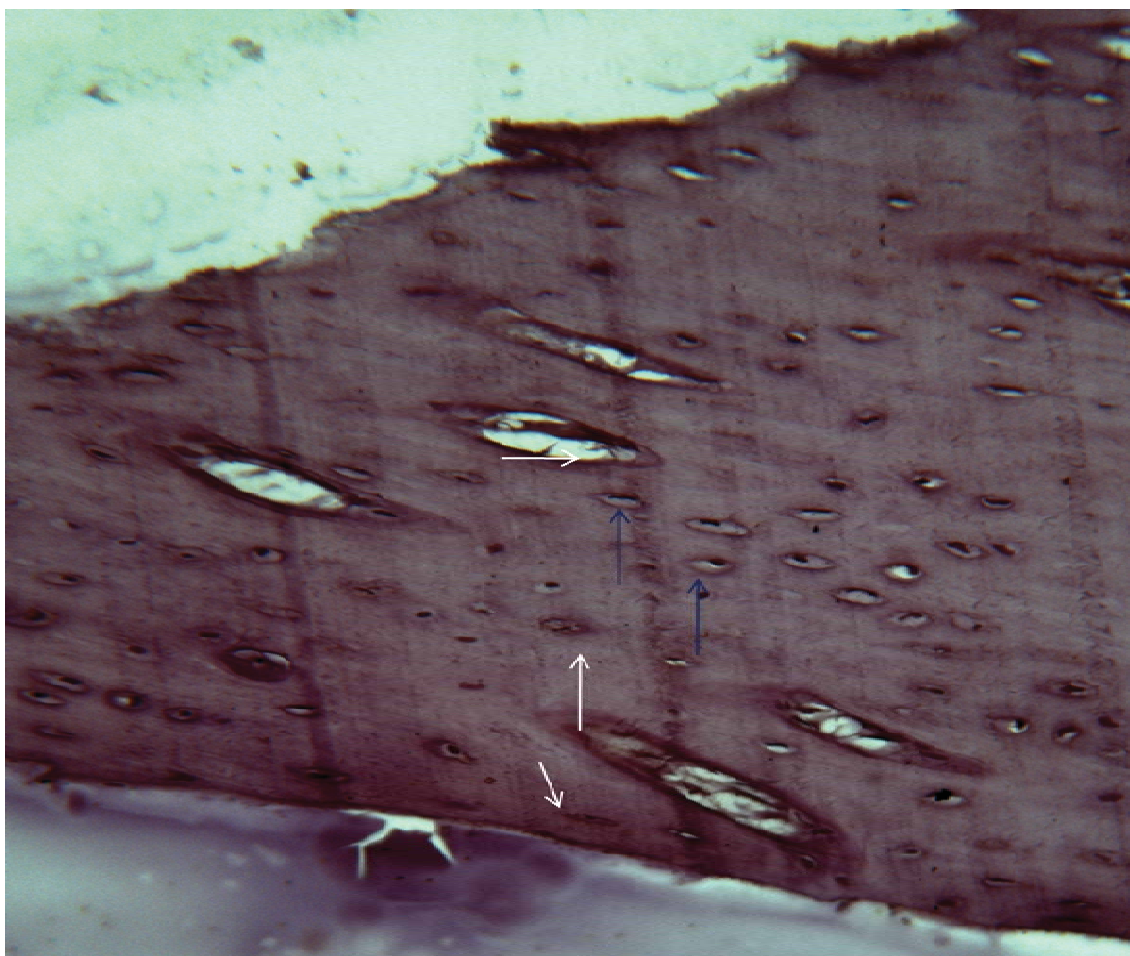


Figura 16 – Expressão de CAS3 no GG1 (aumento de 200x). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

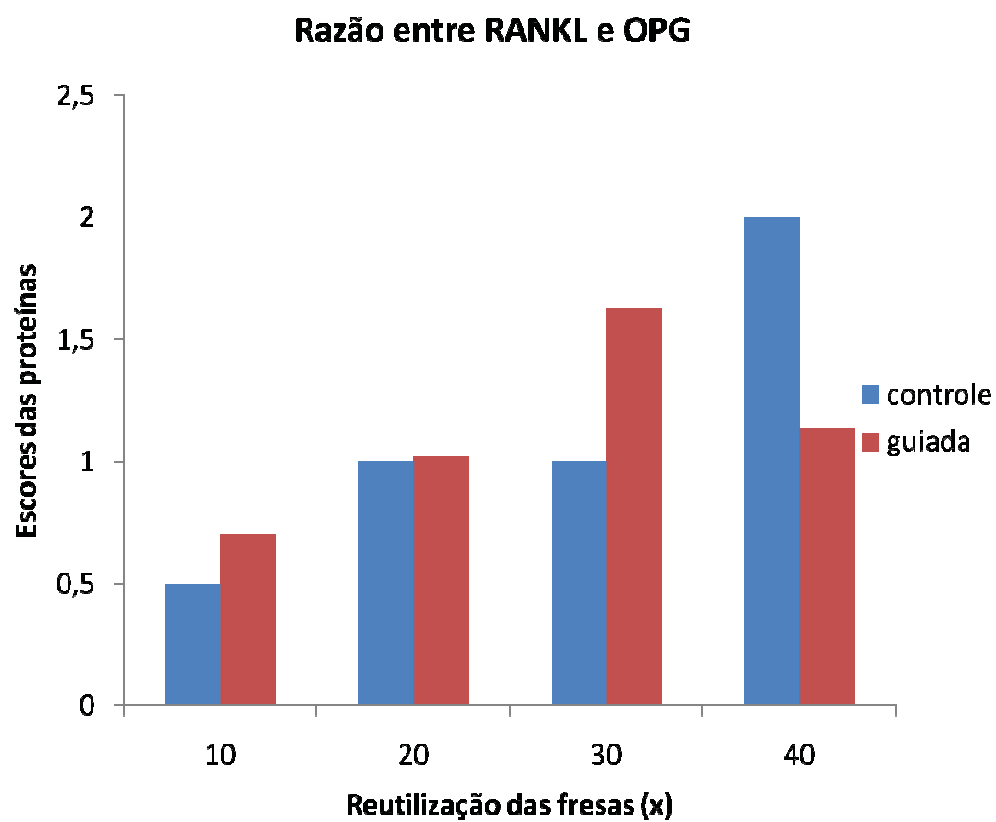


Figura 17: Gráfico comparando a razão RANKL:OPG em relação às reutilizações das fresas.



*TABELAS*

## TABELAS

Tabela 1 – Média da expressão das proteínas RANKL, OPG, OC, Caspase-3 no GC, analisados por meio da imuno-histoquímica.

	OPG	RANKL	OC	Caspase
Grupo 1	2	1	2	2,33
Grupo 2	1	1	3	1,67
Grupo 3	2	2	2	3
Grupo 4	1	2	2	1,67

negativo =1; positivo=2; superpositivo=3 e hiperpositivo=4

Tabela 2 – Média da expressão das proteínas RANKL, OPG, OC, Caspase-3 no GG, analisados pela imuno-histoquímica.

	OPG	RAnkL	OC	Caspase
Grupo 1	1,43	1	1,375	1,0
Grupo 2	1,22	1,25	2,0	1,875
Grupo 3	1,375	2,25	1,375	2,875
Grupo 4	1,5	1,71	1,43	3,0



negativo =1; positivo=2; superpositivo=3 e hiperpositivo=4

Tabela 3 – Razão entre RANKL: OPG

	GC	GG
Grupo 1	0,5	0,7
Grupo 2	1	1,02
Grupo 3	1	1,63
Grupo 4	2	1,14

*ANEXOS*

**ANEXO A** – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal

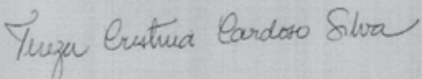
**unesp**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba 

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DO AQUECIMENTO ÓSSEO, DA VIABILIDADE CELULAR IMEDIATA E DO DESGASTE DAS FRESAS APOS OSTEOTOMIA PARA IMPLANTES, SEGUINDO O PROTOCOLO DE CIRURGIA GUIADA. ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E POR MICROSCOPIA DE VARREDURA"** sob responsabilidade do **Prof Adj Idelmo Rangel Garcia Junior** e colaboração de **Pâmela Leticia dos Santos, Thalita Pereira Queiroz, Prof Rogério Margonar** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-004687.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010



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

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP  
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: [dapsa@fmva.unesp.br](mailto:dapsa@fmva.unesp.br)

**ANEXO B – Referências (Introdução Geral)**

1. Worthington P, Lang BR, Lavelle WE. Osseointegração na odontologia: uma introdução. Chicago: Quintessence Books, 1996. P123.
2. Adell R, Lekholm B, Rockler B, et al. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg* 1981;10(6):387-416.
3. Bergkvist G, Sahlholm S, Nilner K, et al. Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla 2-year clinical and radiological follow-up of treatment with non-submerged ITI implants. *Clin Oral Implants Res* 2004 Jun; 15 (3): 351-9.
4. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, et al. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study em dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Feb; 88(2):387-93.
5. Jabero M, Sarment DP. Advanced surgical guidance technology: a review. *Implant Dent* 2006;15:135-42.
6. Bedrossian E. Laboratory and prosthetic considerations in computer-guided surgery and immediate loadin. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:47-52.
7. Marchack CB. CAD/CAM-guidede implant surgery and fabrication of an immediately loaded prosthesis for a partially edentulous patient. *J Prosthet Dent* 2007;97:394-8.
8. Azari A, Nikzad S. Flapless implant surgery: review of the literature and report of 2 cases with computer-guided surgical approach. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66:1015-21.

9. Komiyama A, Klinge B, Hultin M. Treatment outcome of immediately loaded implants installed in edentulous jaws following computer-assisted virtual treatment planning and flapless surgery. *Clin Oral Implant Res* 2008;19: 677-85.
10. Carvalho RS, Francischone Jr. CE, Kobayashi FM, et al. Novo implante P-I Brånemark Philosopy™ e cirurgia guiada por computador: inovações tecnológicas inaugurando uma nova era na Implantologia. *Rev Dental Press Periodontia Implantol* 2007 jul./ago./set; 1(3): 74-86.
11. Verduyssen, M. The use of CT scan based planning for oral rehabilitation by means of implants and its transfer to the surgical field: A critical review on accuracy. *J of Oral Rehabilitation* 2008; 35: 454-74.
12. Widmann G, Bale JR. Accuracy in Computer-Aided Implant Surgery- A review. *Int. Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:305-13.
13. Pesun IJ, Gardner FM. Fabrication of a guide for radiographic evaluation and surgical placement of implants. *J Prosthet Dent* 1995;73(6):548-52.
14. Albrektsson T, Branemark P-I, Hansson H-A, et al. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone to implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155-70.
15. Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, et al.: Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13: 293-7.
16. Lehninger AL. *Princípios da bioquímica*. Sarvier: São Paulo, 1991. P725.
17. Yacker MJ, Klein M: The effect of irrigation on osteotomy depth and bur diameter. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11:634-8.
18. Cordioli G, Majzoub Z: Heat generation during site preparation: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 186-93.

19. Tehemar SH: Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:127-36.
20. Branemark P-I, Breine U, Joshi M, et al. Part 1: Pathophysiology of thermal burns. Microvascular pathophysiology of burned tissue. *Ann NY Acad Sci* 1968; 150(3):474-94.
21. Eriksson R, Albrektsson T: Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 1983; 50:101-7.
22. Eriksson RA, Albrektsson T: The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in rabbits using the bone growth chamber. *J Oral Maxillofac Surg* 1984; 42: 705-11.
23. Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee H-J, et al. The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:335-49.
24. Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, et al. In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dent Mater J* 2002; 21: 250-60.
25. Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, et al. A. Coating of titanium implants with type-I collagen. *Orthopaedic Research* 2004;22:1025–34.
26. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al.: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-68.
27. Woo KM, Choi Y, Ko S-H, et al.: Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med* 2002; 34: 347-52.
28. Crotti TN, Smith MD, Findlay DM, et al.: Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of

- receptor activator NF $\kappa$ B, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials* 2004; 25: 565-73.
29. Khosla S: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol* 2001; 142: 5050-55.
30. Rogers A, Eastell R. Review: circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6323-31.
31. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-57.
32. Li J, Sarosi I, Yan X-Q, et al.: RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1566-71.
33. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 1032-44.
34. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, et al.: Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp) - an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005; 26: 2575-84.
35. Rammelt S, Neumann M, Hanisch U, et al.: Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res* 2005; 73A: 284-94.
36. Alam, M.S., S. Ohsako, T.W. Tay, N. Tsunekawa, Y. Kanai, M. Kurohmaru (2010) Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat sertoli



- cells: a possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *AnatHistolEmbryol* 39: 186-193.
37. Kim YS, Koh J, Lee Y, et al: Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via upregulation of toll-like receptors. *Bone* 2009; 45: 68–76.
38. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell*. 2001;33(4):318-25.
39. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(4):1095-101.

## **ANEXO C - Normas para publicação na Revista Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**

### **Guide for Authors**

#### **Notice to Contributors**

Reprints of the notice are available from the Editor-in-Chief and are also available at [www.joms.org](http://www.joms.org). The JOURNAL publishes articles reflecting a wide range of opinions and techniques, provided they are original, contribute new information, and meet the standards of scientific thought, rational procedure, and literary presentation.

*Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/joms>, authors will be guided through the electronic submission process; original source files (text documents in Word, image files in TIFF or EPS) are required. The author should specify a category designation for the manuscript (original investigation, review article, letter to the editor, etc) and choose a set of classifications from the list provided online. All authors must download and fill out the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office ([juliush@ohsu.edu](mailto:juliush@ohsu.edu)). All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be sent via e-mail.

**All author correspondence may be directed to the Editor-in-Chief:**

Dr Leon A. Assael

Oral and Maxillofacial Surgery

School of Dentistry?SD-522

Oregon Health & Science University

611 SW Campus Dr

Portland, OR 97239

Phone: (503) 494-0293

Fax: (503) 494-0294

E-mails: [assaell@ohsu.edu](mailto:assaell@ohsu.edu), [juliush@ohsu.edu](mailto:juliush@ohsu.edu)

**Original articles are considered and accepted for publication on the condition that they have not been published, or submitted for publication, elsewhere.** The Editor reserves the right to edit manuscripts to fit articles within the space available and to

ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency. A title page should be included with each article that lists the title, the authors' names, degrees, affiliations, complete mailing address (including street number), and the telephone number, fax number, and e-mail address for the corresponding author. Titles of articles should be descriptive but as concise as possible. A structured abstract (introductory summary) of no more than 250 words should be included. It should be divided into four sections labeled *Purpose, Materials (or Patients) and Methods, Results, and Conclusions*. All Contributors to *JOMS* should refer to the Consort statement on clinical research design and the Helsinki statement on medical protocols and ethics.

Consort statement:

⇒ <http://www.consort-statement.org/statement/revisedstatement.htm>

Helsinki:

⇒ <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>

**References.** Type with double spacing. All references given must be cited in numerical order in the text. Bibliographies and reading lists are not used. For journal references, give the author's name, article title, journal name as abbreviated in Index Medicus, volume, pagination, and year.

1. Regezi JA, Batsakis JG, Courtney RM: Granular cell tumors of the head and neck. *J Oral Surg* 37:402, 1979

For books, give the author's name, book title, location and name of publisher, and year of publication (exact page numbers are required for direct quotations):

1. Skinner EW, Phillips RW: *Science of Dental Materials* (ed 5). Philadelphia, PA, Saunders, 1960, p 246

**Figures.** All figures must be numbered and cited in the text in order.

**Legends.** All submitted figures require a legend. For photomicrographs, magnification and stain should be specified.

**Photographs.** Photographs should be high-quality, sharp images. Color art and color photography submissions are encouraged. Images must be high-resolution digital illustrations (EPS or TIFF files); Powerpoint is acceptable for review purposes, but not of sufficient quality for publication. Authors may contact Elsevier for more information or should download a copy of the Specifications for Supplying Digital Artwork from [www.us.elsevierhealth.com/subguide](http://www.us.elsevierhealth.com/subguide).

**Tables.** Each table should be logically organized and should supplement the article. Each table should be numbered consecutively and cited in the body of the text in order. Title and footnotes should be on the same page with the table. Do not draw vertical rules in tables.

**Acknowledgments.** Only persons who have made significant contributions to an article can be acknowledged.

**Permission and Waivers.** These should accompany the manuscript when it is submitted for publication. Include the following statement in the covering letter: In consideration of the *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership to the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in the event that such work is published in the JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY. Permission of original author and publisher must be obtained for direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that is not your own. (Up to 100 words of prose material usually can be quoted without getting permission, provided the material quoted is not the essence of the complete work.) **Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Waivers must be obtained for full-face photographs unless eyes are masked to prevent identification. Waiver forms are available from the Editor-in-Chief.**

**Financial Interests.** As specified in the [AAOMS disclosure statement](#) regarding dual commitment, any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors. A covering letter at the time of submission should inform the Editor about pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will discuss with the authors how best to disclose the relevant information.

## **ANEXO D - Normas para publicação na Revista Journal of Applied Oral Science**

### 1 SCOPE

The Journal of Applied Oral Science is committed in publishing the scientific and technologic advances achieved by the dental community, according to the quality indicators and peer reviewed material, with the objective of assuring its acceptability at the local, regional, national and international levels. The primary goal of The Journal of Applied Oral Science is to publish the outcomes of original investigations as well as invited case reports and invited reviews in the field of Dentistry and related areas.

### 2 General Guidelines

2.1 The papers sent for publication must be original and the simultaneous submission to other journal, either national or international, is not allowed. The Journal of Applied Oral Science shall retain the copyright of all papers published, including translations, yet allowing future reproduction as a transcription, provided the source is properly mentioned.

2.2 Only papers written in the English language shall be accepted, and the authors are fully responsible for the texts, citations and references.

2.3 The Journal of Applied Oral Science has the right to submit all manuscripts to the Editorial Board, which is fully authorized to settle the convenience of their acceptance, or return them to the authors with suggestions for modifications in the text and/or for adaptation to the editorial rules of the Journal. In this case, the manuscript will be re-evaluated by the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.4 The concepts stated on the papers published are full responsibility of the authors and do not necessarily reflect the opinion of the Editor-in-Chief and Editorial Board.

2.5 The dates of receipt of the original paper and its acceptance will be indicated in the occasion it is published.

2.6 Each author will receive one copy of the Journal. Additional reprints may be supplied upon request and must be paid by the authors.

2.7 Depending on the financial resources of the Journal of Applied Oral Science or the authors, color illustrations will be published at the discretion of the Editor-in-Chief.

## **Form and preparation of manuscripts**

### 1 Presentation of the Manuscript

#### 1.1 Structure of the manuscript

- Cover page (must be submitted as a supplementary file through the online submission system ) which should contain only:

- Title of the manuscript in English.

- Names of the authors in direct order with their respective degrees and affiliations in English. Correspondence between International and Brazilian degrees may be obtained at our web page: [www.fob.usp.br/jaos](http://www.fob.usp.br/jaos).

- Full address of the corresponding author, to whom all correspondence should be addressed, including fax and phone number as well as e-mail address.

#### 1.2 Text

- Title of the manuscript and subtitle, if necessary, in English.

- Abstract: should comprise at most 300 words, highlighting a little introduction, objective, material and methods, results and conclusions.

- Key words: (words or expressions that identify the contents of the manuscript). The authors are referred to the list of subjects of the "Index Medicus" and DeCS (Health Sciences Descriptors available at <http://decs.bvs.br/>). Authors must use "periods" to

separate the key words, which must have the first letter of the first word in capital letters. Ex: Dental implants. Fixed prosthesis. Photoelasticity. Passive fit.

- Introduction: summary of the rationale and proposal of the study including only proper references. It should clearly state the hypothesis of the study.

- Material and Methods: the material and the methods are presented with enough detail to allow confirmation of the findings. Include city, state and country of all manufacturers right after the first appearance of the products, reagents or equipments. Published methods should be referred to and briefly discussed, except if modifications were made. Indicate the statistical methods employed, if applicable. Please refer to item 3 for ethical principals and registration of clinical trials.

- Results: presents the outcomes in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Data contained in tables and illustrations should not be repeated in the text, and only important findings should be highlighted.

- Discussion: this should emphasize the new and important aspects of the study and the resulting conclusions. Any data or information mentioned in the introduction or results should not be repeated. Findings of other important studies should be reported. The authors should point out the implications of their findings as well as their limitations.

- Conclusion(s) (if any)

- Acknowledgments (when appropriate). Acknowledge those who have contributed to the work. Specify sponsors, grants, scholarships and fellowships with respective names and identification numbers.

- References (please refer to item 2.3)

## 2 TECHNICAL NORMALIZATION

The manuscript should be typed as follows: 1.5 spacing in 11 pt Arial font, with 3-cm margins at each side, on an A4 page, adding up to at most 15 pages, including the illustrations (graphs, photographs, tables, etc). The authors should keep a copy of the manuscript for possible requests.

## 2.1 Illustrations and Tables

2.1.1 The illustrations (photographs, graphs, drawings, charts, etc.), regarded as figures, should be limited to the least amount possible and should be uploaded in separate files, consecutively numbered with Arabic numbers according to the order they appear in the text.

2.1.2 Photographs should be sent in original colors and digitized in .jpg, tif or gif formats with 10cm width and at least 300dpi. These illustrations should be provided in supplementary files and not inserted in the Word document.

2.1.3 The corresponding legends for figures should be clear, concise and typed at the end of the manuscript as a separate list preceded by the corresponding number.

2.1.4 The tables should be logically arranged, consecutively numbered with Arabic numbers. The legend shall be placed on the top of the tables. Tables should be open in the right and left laterals.

2.1.5 Footnotes should be indicated by asterisks and restricted to the least amount possible.

## 2.2 Citation of the Authors

Citation of the authors in the text may be performed in two manners:

1) Just numeric: ... and interfere with the bacterial system and tissue system 3,4,7-10.

References must be cited in a numeric ascending order within the paragraph.

2) or alphanumeric

- one author - Silva23 (1986)



- two authors - Silva and Carvalho<sup>25</sup> (1987)
- three authors - Ferreira, Silva and Martins<sup>27</sup> (1987)
- more than three authors- Silva, et al.<sup>28</sup> (1988)

Punctuation characters such as "periods" and "commas" must be placed after the numeric citation of the authors. Ex: Ferreira<sup>38</sup>.

### 2.3 References

The references must follow the Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals – Vancouver available at: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

2.3.1 All references must be cited in the text. They should be alphabetically ordered by the last name of the author and numbered in increasing order accordingly. The order of citation in the text should follow these numbers. Abbreviations of the titles of the international journals cited should follow the Index Medicus/MEDLINE.

2.3.2 Personal communications and unpublished data with no publication date must not be included in the reference list.

2.3.3 Abstracts, monographs, dissertations and theses will not be accepted as references.

2.3.4 The names of all authors should be cited up to 6 authors; in case there are more authors, the 6 first authors should be cited, followed by the expression ", et al.", which must be followed by "period" and should not be written in italics. Ex: Uhl, et al.

2.3.5 At most 30 references may be cited, except for invited reviews by the Editor-in-Chief.

Examples of references:

Book

Melberg JR, Ripa LW, Leske GS. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications. Chicago: Quintessence; 1983.

#### Book chapter

Verbeeck RMH. Minerals in human enamel and dentin. In: Driessens FCM, Woltgens JHM, editors. Tooth development and caries. Boca Raton : CRC Press; 1986. p.95-152.

#### Papers published in journals

Wenzel A, Fejerskov O. Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surfaces of extracted third molars. *Caries Res.* 1992;26:188-93.

#### Papers with more than 6 authors

The first 6 authors are cited, followed by the expression ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood - leukemia in Europe after Chernobyl : 5 years follow-up. *Br J Cancer.* 1996;73:1006-12.

#### Papers without authors' names

Seeing nature through the lens of gender. *Science.* 1993;260:428-9.

#### Volume with supplement and/or Special Issue

Davidson CL. Advances in glass-ionomer cements. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(sp. Issue):3-9.

#### Entire issue

Dental Update. Guildford 1991;18(1).

The authors are fully responsible for the correctness of the references.

### 3 ETHICAL PRINCIPLES AND REGISTRATION OF CLINICAL TRIALS

#### 3.1 Experimental procedures in humans and animals

The Journal of Applied Oral Science reassures the principles incorporated in the Helsinki Declaration and insists that all research involving human beings, in the event of publication in this journal, be conducted in conformity with such principles and others specified in the respective ethics committees of authors' institution. In the case of

experiments with animals, such ethical principles must also be followed. When surgical procedures in animals were used, the authors should present, in the Material and Methods section, evidence that the dose of a proper substance was adequate to produce anesthesia during the entire surgical procedure. All experiments conducted in human or animals must accompany a description, in the Material and Methods section, that the study was approved by the respective Ethics Committee of authors' affiliation and provide the number of the protocol approval. The Editor-in-Chief and the Editorial Board reserve the right to refuse manuscripts that show no clear evidence that the methods used were not appropriate for experiments in humans or animals.

### 3.2 Clinical Trial Registration - International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

The Journal of Applied Oral Science supports the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) for the registration of clinical trials. The journal recognizes the importance of such initiatives for the registration and international publication of clinical studies with an open access. Therefore, the Journal of Applied Oral Science will publish only those clinical trials that have previously received an identification number, the ISRCTN, validated by the criteria established by the WHO and ICMJE. The WHO defines clinical trials as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioral treatments, process-of-care changes, preventive care, etc".

In order to register a clinical trial, please access one the following addresses:

Register in the [Clinicaltrials.gov](http://Clinicaltrials.gov)

URL: <http://prsinfo.clinicaltrials.gov/>

Register in the International Standard Randomized Controlled Trial Number (ISRCTN)

URL: <http://www.controlled-trials.com/>

4 ANY QUERIES SHALL BE SOLVED BY THE Editor-in-Chief AND EDITORIAL BOARD

Sending of manuscripts

#### 1 MANUSCRIPT SUBMISSION

1.1 Articles must be submitted through the following address <http://www.scielo.br/jaos>

1.2 The corresponding author should retain the original file in Word format as well as illustrations (when applicable).

1.3 The original file containing the main manuscript must be submitted without the authors' identification and affiliations. The cover page must be submitted as a supplementary file containing the names of the authors, affiliations and correspondence address.

1.4 Figures must be submitted as supplementary files according to the specifications of item 2.1 regarding the form and preparation of manuscripts.

1.5 - Tables must be prepared in Excel format and must be submitted as a supplementary files.

1.6 The submission Form, signed by ALL the authors, must be submitted as a supplementary file containing the following text:

By signing the Submission Form, the authors state:

Copyright transfer: In the event of publication of the above mentioned manuscript, we, the authors, transfer to the Journal of Applied Oral Science all rights and interest of the manuscript. This document applies to translations and any preliminary presentation of

the contents of the manuscript that has been accepted, but yet not published. If any authorship modification occurs after submission, a document with of agreement of all authors is required to be kept by the Editor-in-Chief. Exclusion of authors may only be accepted by his/her own request.

Responsibilities of the authors: I hereby state that:

The content is original and does not consist of plagiarism or fraud;

The work is not under consideration or will be submitted to other journal until a final decision is issued by this journal;

I have effectively contributed to this work and am familiar with its contents;

I have read the final version and assume the responsibility for its contents. I understand that if the work, or part of it, is considered deficient or a fraud, I take shared responsibility with the other authors.

Release of conflict of interest:

All my affiliations, corporate or institutional, and all sources of financial support to this research are properly acknowledged, except when mentioned in a separate letter. I certify that do not have any commercial or associate interest that represents a conflict of interest in connection with the submitted manuscript.

PRINT NAME: \_\_\_\_\_ SIGNATURE: \_\_\_\_\_ DATE: \_\_\_\_\_

1.7 For further information on the online submission system, please refer to the TUTORIAL FOR AUTHORS available at: <http://www.scielo.br/jaos>

## **ANEXO E – - Normas para publicação no Clinical Oral Implant Research**

### 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](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

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

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

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

#### 2.5 Appeal of Decision

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

#### 2.6 Permissions

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

#### 2.7 Copyright Assignment

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

600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square

Singapore 188778

Alternatively a scanned version of the form can be emailed to [clr@oxon.blackwellpublishing.com](mailto:clr@oxon.blackwellpublishing.com) or faxed to +65 6295 6202. 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](mailto:coir@zmk.unibe.ch)

#### 3.1. Getting Started

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

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

your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select Corresponding Author Center.

### 3.2. Submitting Your Manuscript

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

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. 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](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

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

**Scientific Names:** Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first

letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

## 5.2. Structure

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

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

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

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

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

**Material and Methods:** Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and



discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

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

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

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

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

### 5.3. References

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

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

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

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

(i) for journal references:

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

(ii) for book references:

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

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

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

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

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

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

Examples:

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

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

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

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

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

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

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

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

Check your electronic artwork before submitting it:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

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

## 6. AFTER ACCEPTANCE

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

### 6.1 Proof Corrections

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

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

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

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

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

### 6.3 Author Services

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