
ANDRÉ LUIS DA SILVA FABRIS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE
BIÓPSIAS DE TECIDO ÓSSEO DE PACIENTES
HIPERTENSOS COMPENSADOS**

Araçatuba – São Paulo

2016

ANDRÉ LUIS DA SILVA FABRIS

**ANÁLISE HISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE
BIÓPSIAS DE TECIDO ÓSSEO DE PACIENTES
HIPERTENSOS COMPENSADOS**

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

Orientador: Prof^a. Ass. Dr^a. Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani

Araçatuba – São Paulo

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Fabris, André Luís da Silva.

F128a Análise histológica, imunoistoquímica e morfométrica de
biópsias de tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados

André Luís da Silva Fabris. - Araçatuba, 2016

66f. : il. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

1. Hipertensão 2. Implantes dentários 3. Osso e ossos

I. T.

Black D7

CDD 617.64



DEDICATÓRIA

Dedicatória

Dedico esta tese às pessoas mais importantes para mim: aos meus pais Abílio Fabris (*in Memoriam*), porém vivo em mim, e Maria Ivone da Silva Fabris (Dona Ivone) por me ajudarem sempre durante minha caminhada sendo tão especiais não só na minha formação, educação, mas me ensinando a ser uma pessoa melhor, justa e honesta. Só uma palavra que resume isso, Amor. Aos meus irmãos Rodrigo da Silva Fabris e Gustavo da Silva Fabris por sempre me apoiarem em todas as fases da minha vida, me amparando nas dificuldades ensinando a ter paciência, perseverança e uma força no qual nos une de forma extraordinária.

Aos meus tios José Alberto da Silva (Zé Branco) e Claudineia Green Silva por cuidarem de mim de forma tão especial durante um período no qual ingressei na odontologia e me acolheram na casa de vocês como um filho, tendo uma gratidão eterna.

Tia Sônia Maria da Silva sendo minha segunda mãe, cuidando de tudo e de todos abdicando de suas próprias coisas para cuidar dos demais. Deixo aqui meu sentimento de amor por você.

Tio Paulo Roberto da Silva uma pessoa especial que sempre mostrou a todos sua honestidade, seriedade e compromisso me ajudando na formação de meu caráter. Deixo aqui meu profundo abraço.



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora, Professora Assistente Doutora Roberta Okamoto. Agradeço o apoio, a amizade, a disponibilidade, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigado por me acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e vida académica, que me recebeu sempre de braços abertos e com um sorriso estampado no rosto, constantemente disponível para resolver os meus problemas, indecisões e impasses

Ao Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Uma pessoa iluminada, no qual não mede esforços para ajudar o próximo, ser mestre é o seu dom. Meu muito obrigado e receba meu carinho!

Ao Prof. Titular Tetuo Okamoto (*in memoriam*). Desde a minha graduação estive ao meu lado segurando minha mão durante cirurgias, tendo como espelho e um exemplo de vida como pessoa e como pesquisador. **Ao Prof. Ruy dos Santos Pinto** minha sincera gratidão por me proporcionar momentos de extrema felicidade durante atendimentos no CAOE “centrinho” um lugar onde pacientes recebem amor de forma plena.

Ao Professor Adj Osvaldo Magro Filho, por ser um exemplo de professor para todos os alunos da FOA. Sempre extremamente carinhoso no qual me recepcionou com um aperto de mão, palavras de conforto e tranquilidade, nos mostra o caminho desta linda profissão. Muito obrigado pelo incentivo e ensinamentos. Receba minha admiração!

Ao meu coorientador Professor Assistente Dr. Leonardo Perez Faverani. Um amigo especial e agora professor desta instituição tão respeitada, merecedor de estar trilhando o caminho da docência com extrema competência e brilho, deixo aqui meu abraço especial.

Ao Professor Assistente Dr. Francisley Ávila Souza. Por várias conversas de incentivo pela confiança e a oportunidade em abrir caminhos aonde jamais havia pensado seguir,

mesmo sem me conhecer. Agradeço por sempre me ajudar em tudo. Saiba que é uma dádiva a confiança depositada em mim.

A Professora Assistente Doutora Alessandra Marcondes Aranega. Muito obrigado por todo o carinho e amizade que me manifestou. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição.

Aos Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Daniela Ponzoni e Ana Paula Farnezi Bassi, pela amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

Ao Professor Wilson Roberto Poi, pelo maior exemplo do “Ser Professor”. Muito obrigado por fazer parte da minha formação e me fazer descobrir o professor que está em mim.

Ao Professor Claudio Maldonado Pastori, um professor e acima de tudo uma pessoa extremamente humana, educada, solícita e que sempre me inspirou durante a residência a sermos cirurgiões melhores. Deixo aqui um abraço forte e minha gratidão.

Ao professor Paulo Roberto Botacin, uma pessoa extremamente contagiante, maravilhosa e educada, sempre preocupado com a formação dos alunos, mas nunca deixando de ser amigo. Deixo aqui meu abraço.

A professora Ass. Dra Ana Claudia Rossi, pela educação, empenho e disponibilidade em aceitar o convite para formar a banca examinadora em um momento impar para minha formação, muito obrigado. Estendo meus agradecimentos ao **Professor Alexandre Freire,** pela pronta disposição na interpretação dos dados microtomográficos e das imagens tridimensionais deste trabalho. Assim, agradeço a **Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP** pela facilitação destas análises.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada (Sônia Regina Panzarini Barioni, Denise Pedrini, Daniela Brandini e Celso Sonoda), por serem os maiores exemplos de

professores. Pela disposição e empenho com o crescimento da nossa faculdade. Pelo cuidado no trato com os alunos da graduação e da pós-graduação. Vocês são mestres por excelência. Recebam minha eterna gratidão, carinho e admiração neste momento.

À “Sassá” (Sabrina Ferreira), pelo imenso respeito e carinho que existe entre nós. O Doutorado não seria tão legal sem a sua presença. Uma menina especial, competente, dedicada e que tem um futuro brilhante pela frente, pois do fundo do coração desejo o melhor pra você minha amiga.

À “Ju Zorzi” (Juliana Zorzi Colete), pelo respeito, amor e amizade. Obrigado por estar ao meu lado.

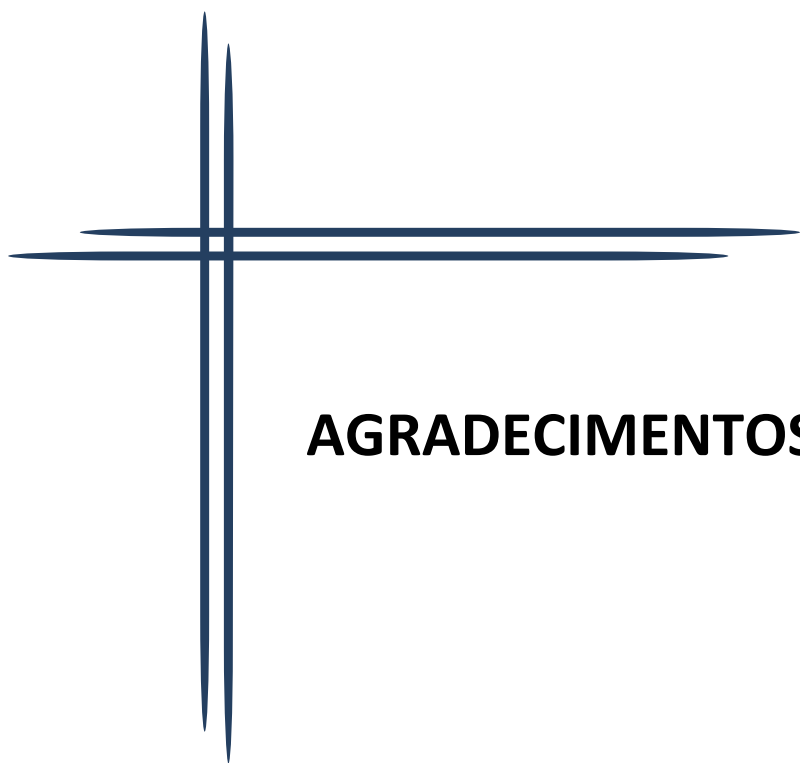
À “Pili” (Maria del Pilar), pela amizade, carinho e alegria que você irradia. Receba meu carinho!

Aos amigos da pós graduação, Valthierre, João Paulo, Erik, Pedro, Leonardo, Heldo, Carulina, Wilian, Ricardo, Tarik, Igor, Gabriel, André, Ciro, Jhonathan, Rodrigo, Sormani, por estarem ao nosso lado e sempre dispostos a nos ajudar no desenvolvimento de nossas pesquisas. Vocês são exemplos a serem seguidos.

Ao senhor Camilo Roberto Venancio pela disponibilidade, carinho e atenção com os animais do biotério desta faculdade, assim como o senhor **Arnaldo Cezar Dos Santos**, que com o mesmo carinho vem tratando dos animais aqui operados sendo de fundamental importância para o andamento de nossas pesquisas. Deixo aqui um grande abraço.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela facilitação na obtenção das imagens microtomográficas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado durante o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do doutorado.



AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**, pela competência e afinho na condução da nossa pós-graduação.

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

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

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Dirce, Gilmar, Odair, Tina, Paulo Gratão, Renato e Joilson). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Tenho aprendido a cada momento com cada um de vocês. Obrigado pelo auxílio constante na minha vida e na pós-graduação.



LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

- Figura 1** – Imagens microtomográficas com transparência da biópsia do grupo GSA (A) e GAS (B) em vista frontal
34
- Figura 2.** Imagens microtomográficas sem transparência da biópsia do grupo GSA (A) e GAS (B) em vista frontal
35
- Figura 3** –Representação dos valores médios de BV entre os grupos experimentais GSA e GAS.
36
- Figura 4** – Representação dos valores médios de BV/TV entre os grupos experimentais GSA e GAS.
36
- Figura 5** - Representação dos valores médios de Tb.Th entre os grupos experimentais GSA e GAS.
37
- Figura 6** - Representação dos valores médios de Tb.N entre os grupos experimentais GSA e GAS.
37
- Figura 7** - Representação dos valores médios de Tb.Sp entre os grupos experimentais GSA e GAS.
38
- Figura 8** - Representação dos valores médios de Potot entre os grupos experimentais GSA e GAS.
38
- Figura 9** - Imagens histológicas da biópsia do grupo GSA (A) e GAS (B) no aumento de 6,3X.
40
- Figura 10** - Imagens histológicas das biópsia do grupo GAS (A) e GSA (B) em aumento de 40X.
40
- Figura 11** - Imagens imunoistoquímicasdos grupo GSA e GAS com imunomarcações de Runx2, OP e OC no aumento de 40X.
43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valores médios, desvio padrão e do coeficiente estatístico (p) para os parâmetros volumétricos (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb. Sp e Po (tot), na comparação entre os grupos GSA e GAS.

34

Tabela 2 – Representação dos escores mais frequentes durante a análise qualitativa ordinal da imunoistoquímica das proteínas Runx2, OP e OP, para os grupos GSA e GAS.

41

Lista de Abreviaturas

mm	= Unidade de medida milímetros
HAS	= Hipertensão arterial sistêmica
SRAA	= Sistema renina-angiotensina-aldoesterona
Ang II	= Angiotensina II
ECA	= Enzima conversora de angiotensina
Runx2	= Fator 2 de transcrição relacionado a Runt
OP	= Osteopontina
OC	= Osteocalcina
α	= Coeficiente estatístico de confiabilidade
p	= Nível de significância estatística ($p < 0,05$)
mg/kg	= Unidade de medida miligramas por quilograma
IM	= Via de administração intramuscular
%	= Percentual
Rpm	= Rotação por minuto
ml	= Unidade de volume mililitro

EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	= Corantes Hematoxilina e Eosina
μm^2	= Unidade de medida micrometros ao quadrado
BV	= Volume ósseo
BV/TV	= Percentual de volume ósseo
Tb.Th	= Espessura trabecular
Tb.N	= Número de trabéculas
Tb.S	= Separação trabecular
Potot	= Porosidade total
GSA	= Grupo sem alteração
GAS	= Grupo alteração sistêmica
ASA	= Articulador Semi-ajustável
INR	= Razão normalizada internacional
N.cm	= Newtons por centímetros

Sumário

Análise histológica, imunoistoquímica e morfométrica de biópsias de tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados

Resumo	20
Abstract	22
Introdução	24
Material e Métodos	27
Resultados	33
Discussão	44
Referências	49
Anexos	53

Análise histológica, imunoistoquímica e morfométrica de biópsias de tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados

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

Fabris ALS. Análise histológica, imunoistoquímica e morfométrica de biópsias de tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

Resumo

Objetivo: O presente estudo objetivou avaliar as características morfométricas, histológicas e imunoistoquímicas do tecido ósseo coletado de pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica compensada pelo uso de medicamentos antagonistas do sistema renina-angiotensina-aldoesterona (SRAA).

Materiais e Métodos: Trinta pacientes com indicação para reabilitação por meio de implantes instalados na região posterior de mandíbula foram divididos em dois grupos, seguindo os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. O primeiro grupo não apresentava alterações sistêmicas (GSA) e não fazia uso de qualquer medicação e, o segundo grupo foi composto por pacientes hipertensos diagnosticados e medicados por antagonistas do SRAA (GAS). Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes osseointegráveis com superfície texturizada, foram coletados blocos ósseos por meio de biópsia com broca trefina de 3,0mm de diâmetro nos locais de instalação dos implantes. As biópsias coletadas foram separadas para avaliação por microtomografia computadorizada, sendo avaliados os seguintes parâmetros: volume ósseo (BV/TV), percentual de volume ósseo (BV/TV), espessura de trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação entre as trabéculas (Tb.S) e porosidade total (Po-tot). Também foi realizada a análise dos cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina, bem como a avaliação

imunoistoquímica de proteínas que caracterizam as células da linhagem osteoblástica:

Runx2, Osteopontina e Osteocalcina

Resultados: Para todos os parâmetros analisados (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.S e Po-tot), houve similaridade na comparação entre os grupos GAS e GSA ($p < 0,05$, teste t). As imunomarcações para osteopontina e osteocalcina mostraram-se semelhantes nos dois grupos. Vale destacar importante marcação observada no grupo GAS para o fator de transcrição Runt 2 (Runx2), em comparação a marcação da mesma proteína no grupo GSA. Além disso, a biologia do tecido ósseo do ponto de vista histológico foi semelhante nos dois grupos.

Conclusões: Foi possível concluir que indivíduos hipertensos tratados com antagonistas do SRAA apresentam grande similaridade óssea microestrutural e também celular/protéica aos indivíduos normotensos.

Palavras chaves: hipertensão, implantes dentários, osso e ossos.

Fabris ALS. Histological, molecular and morphometric analysis of bone tissue biopsies in compensated hypertensive patients [Thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

Abstract

Objectives: This study aimed to evaluate the morphometric characteristics, histological and immunohistochemical bone tissue collected from patients with hypertension offset by the use of drugs antagonists of the renin angiotensin system.

Material and Methods: 30 patients referred for rehabilitation with implants placed in the posterior mandible were divided into two groups, following the criteria of inclusion and exclusion previously established. The first group showed no systemic changes (GSA) and did not use any medication and the second group was composed of diagnosed hypertensive patients treated by RAAS (RAS) antagonists. During the procedure for installation of dental implants with textured surface, they were collected bone blocks through biopsy trephine drill 3.0mm diameter implants in the installation sites. The collected biopsies were separated for evaluation by microtomography, being evaluated the following parameters: bone volume (BV / TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), separation of the trabecular (Tb.S) and total porosity (Po-tot). Also the analysis of histological sections stained with hematoxylin and eosin staining was performed as well as the immunohistochemical evaluation of proteins that characterize the cells of osteoblast lineage: Runx2, osteopontin and osteocalcin

Results: For all parameters (BV, BV / TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.S and E-tot) were similar in the comparison between GAS and GSA ($p > 0.05$, t test). The biology of bone tissue to analyze by immunohistochemistry presented similar results in both groups, with markings scores in ordinal qualitative analysis for transcription factor related to Runt 2 (Runx2) - GSA (light) and GAS (moderate), osteopontin (OP) - GSA (mild to moderate) and GAS (moderate to intense), osteocalcin (OC) - GSA (intense) and GAS (moderate). Furthermore, the biology of bone tissue was histologically similar in both groups.

Conclusions: Therefore, it was concluded that hypertensive subjects treated with renin-angiotensin system antagonists have great bone microstructural similarity and also cell / protein to normotensive individuals.

Key-words: hypertension, dental implants, bone and bones.

Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi considerada como a complicação cardiovascular mais encontrada em todo o mundo nas últimas duas décadas (Afghani e Goran, 2007; Otgontuya *et al.*, 2013; Tibazarwa e Damasceno, 2014). De acordo com a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico – Vigitel de 2014, 24,8% da população brasileira apresenta hipertensão arterial, segundo dados da American Heart Association 2013, uma a cada 3 pessoas na população adulta dos EUA tem hipertensão. Estima-se que cerca de 50% dos acidentes vasculares encefálicos, 42% das doenças isquêmicas do coração e 22% de outras complicações cardiovasculares em homens e mulheres com idade superior a 30 anos, são decorrentes da HAS (Mohan *et al.*, 2013; Gealh *et al.*, 2014; Tibazarwa e Damasceno, 2014).

Dentre as disfunções metabólicas observadas na hipertensão em relação ao tecido ósseo, é conhecido que indivíduos hipertensos apresentam metabolismo anormal de cálcio resultando em concentrações inferiores desse mineral, de vitamina D, magnésio e altas concentrações de hormônio da paratireoide (PTH) (Mccarron *et al.*, 1981; Wright e Rankin, 1982; Javed *et al.*, 2012; Pludowski *et al.*, 2013), prejudicando a qualidade e a densidade do tecido ósseo (Afghani e Goran, 2007; Manrique *et al.*, 2012). Portanto, uma questão que precisa ser abordada de forma adequada, refere-se à qualidade do tecido ósseo em pacientes hipertensos, e ainda, a capacidade de formação óssea em situações como a osseointegração após a instalação desses implantes.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) consiste numa cascata hormonal que atua como um dos principais controladores da pressão sanguínea e volume de fluidos corporais (Haznedaroglu e Buyukasik, 1997; Namazi *et al.*, 2011). Estudos recentes mostraram que componentes deste sistema como a renina, a enzima conversora de angiotensina e receptores da angiotensina II (Ang II), são expressos no tecido ósseo, tendo a Ang II a capacidade de interferir através de receptores localizados nos osteoblastos e osteoclastos ou pelo fluxo sanguíneo capilar da medula óssea. Existem dois principais subtipos de receptores da angiotensina, AT1 e AT2 (Wright e Rankin, 1982; Whitebread *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 2013).

O losartan, droga da classe de antagonistas de receptor da Ang II, é um fármaco seletivo e age especificamente nos receptores de AT1 da Ang II no músculo liso vascular e a glândula supra-renal, tendo efeito vasoconstritor e de secreção de aldosterona. Esta é uma droga de interesse, não apenas sua eficácia, mas também por ter a capacidade de proteger órgãos alvo, com uma baixa incidência de efeitos adversos (Broulik *et al.*, 2001; Al-Majed *et al.*, 2015). Já o captopril, droga pertencente a classe de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), tem efeito de inibir toda cascata SRAA, inclusive a formação de Ang II e seus efeitos (Diao *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

O SRAA está presente nos tecidos periodontais de humanos e em ratos, e mostra uma ação funcional nos tecidos periodontais. Podendo assim, haver a prevenção da perda óssea periodontal em ratos com periodontite induzida por meio do bloqueio do receptor AT1 com o losartan de forma significativa (13).

Investigações *in vitro* (Nishiya e Sugimoto, 2001; Nakai *et al.*, 2013) e *in vivo* (Strawn e Ferrario, 2008; Donmez *et al.*, 2012; Pereira, 2013; Rajkumar *et al.*, 2013) mostraram uma participação importante desta classe de medicamentos na melhora das respostas do metabolismo ósseo, aumentando a quantidade de osso formado, bem como suas características biomecânicas (Shimizu *et al.*, 2008; Nakai *et al.*, 2013; Rajkumar *et al.*, 2013; Zhang, Y. *et al.*, 2013). Os bloqueadores dos receptores AT1 como o losartan, parecem agir de maneira seletiva nas células do tecido ósseo, como observado em experimentos de cultura de células (Nakai *et al.*, 2013).

No entanto, ainda permanecem dúvidas e algumas controvérsias em relação à ação destes medicamentos e faltam informações consistentes quanto às vias de sinalização celulares envolvidas nas respostas já observadas e também quanto a microestrutura óssea presente nesses casos de hipertensão compensada. Tendo em vista a alta frequência de extrações dentárias e o aumento da procura pela instalação de implantes osseointegráveis, faz-se necessária a busca por respostas do tecido ósseo comprometido pela hipertensão, mesmo que compensada por anti-hipertensivos.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o tecido ósseo comprometido pela hipertensão instalada, levando-se em conta a terapia anti-hipertensiva que tem sido bastante utilizada na atualidade, que são as medicações antagonistas do SRAA. A caracterização ocorreu a partir de aspectos histológicos, imunoistoquímicos e microtomográficos tridimensionais de pacientes com hipertensão submetidos a instalação de implantes e tratados com medicações do SRAA ou pacientes sem alteração sistêmica (normotensos).

Material e Métodos

Esse estudo foi cadastrado na Plataforma Brasil e realizado de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação em Humanos, submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Humana da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e obteve parecer favorável sob o número 1.521.728 (Anexo A). Os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, assim como os autores da pesquisa. Os procedimentos cirúrgicos foram iniciados, após o parecer favorável do Comitê de Ética,

Foram selecionados para este estudo 30 pacientes divididos em dois grupos, em que o primeiro grupo correspondeu aos pacientes sem alterações sistêmicas e que não faziam uso de qualquer medicação (Grupo Sem alteração – GSA, n=15) e os demais pacientes, hipertensos diagnosticados e medicados por antagonistas do SRAA, sendo estes losartan ou captopril (Grupo Alteração Sistêmica - GAS, n=15). Estes pacientes foram preparados para reabilitação com implantes osseointegráveis na região posterior da mandíbula, tendo sido triados na clínica de Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Os fatores de exclusão desta pesquisa foram os pacientes tabagistas, etilistas, presença de raiz residual em região da instalação do implante, pacientes com alterações sistêmicas tais com diabetes, doenças ósseas e alterações ósseas por medicamentos, radiação na área de cabeça e pescoço e pacientes em tratamento de quimioterapia, além de problemas periodontais não controlados.

Procedimento cirúrgico

Antes do procedimento cirúrgico, os pacientes foram moldados para a confecção de modelos de estudo em gesso, foi feita a tomada do arco facial e montagem dos modelos em articulador semi-ajustável ASA (Bio-art, São Carlos, SP, Brasil), confecção do registro inter-oclusal para o planejamento reverso. Destes modelos, foi confeccionado o guia-cirúrgico com silicone transparente, para a fresagem com a maior precisão possível em relação ao posicionamento e paralelismo dos implantes. Ainda no que diz respeito ao planejamento, foram solicitados exames imaginológicos, em geral tomografia computadorizada Cone Beam, para o correto diagnóstico da atrofia óssea alveolar, bem como da correta mensuração da altura entre o rebordo óssea alveolar e a parede superior do canal mandibular. Por fim, foram solicitados exames laboratoriais pré-operatórios para a averiguação das condições hematológicas, tais como hemograma completo (séries branca, vermelha e função plaquetária) e coagulograma (tempos de sangria, coagulação e INR).

Cabe salientar que para todos os procedimentos cirúrgicos foram feitos por um operador e foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental, proteção do paciente e das superfícies em contato com os instrumentais com campos estéreis usa de aventais e luvas cirúrgicas estéreis, bem como dos equipamentos individuais de proteção.

As cirurgias para instalação dos implantes dentários na região posterior da mandíbula foram realizadas sob anestesia local, seguida de incisão na crista do rebordo alveolar edêntulo, realização do descolamento mucoperiosteal e exposição do

osso alveolar. Após a adaptação do guia cirúrgico, foram coletadas biópsias do tecido ósseo nas áreas planejadas para os implantes. Para tanto, foi utilizada broca trefina de 2,0 mm de diâmetro interno e 3,0 mm de diâmetro externo montada em contra-ângulo de implante e este conectado a um motor elétrico Kavo Konzept Surg (Kavo do Brasil Ind., Joinville, SC, Brasil) em 1200 rpm. Destas biópsias, aquelas destinadas às análises microtomográficas, histométricas e imunoistoquímicas foram armazenadas em solução de paraformaldeído a 10% para prosseguir-se com as etapas laboratoriais.

Foram instalados implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido (Implalife Biotecnologia - IMPLALIFE®, Jales, São Paulo, Brasil), com contra-ângulo montado em motor elétrico em 20 a 25 rpm ou em chave catraca, com torque máximo de 50 N.cm.

Como protocolo medicamentoso pós-operatório, foi instituída antibioticoterapia preventiva, com Amoxicilina 500 mg, 1 comprimido e/ou cápsula a cada 8 horas por 7 dias. Caso o paciente fosse alérgico às penicilinas, foi prescrito Clindamicina 300 mg, a cada 6 horas por 7 dias. Também foi prescrito Nimesulida 100 mg, 1 comprimido a cada 12 horas por 3-4 dias, Dipirona Sódica 500 mg, 1 comprimido a cada 6 horas, enquanto dor e, de uso tópico do Digluconato de Clorexidina a 0,12%, a partir do segundo dia pós-operatório, na forma de bochechos.

Aquisição de imagens e análise microtomográfica

As biópsias do tecido ósseo, após o armazenamento em paraformaldeído, foram levadas para escaneamento e análise em microtomógrafo computadorizado.

Para isso, ao término da etapa de fixação, as biópsias foram lavadas por 24 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (IB-Unicamp). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1178 BrukerMicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm.

As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas (figuras 1 e 2) para adequação da posição padrão para todas as amostras, podendo ser observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital) , como nas figuras 1 e 2. Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área para avaliação tridimensional. No software CTAnalyser, todos os slices foram avaliados de acordo com a escalas de cinza (*threshold*). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção da morfometria tridimensional do osso das amostras coletadas.

Os parâmetros adotados seguiram o guia para avaliação da microarquitetura do osso em roedores usando microtomografia computadorizada (Bouxsein *et al.*, 2010). Portanto, foi possível obter parâmetros volumétricos relacionados à quantidade do tecido ósseo (volume e porcentagem do volume ósseo: BV e BV/TV) e relacionados

à quantidade do tecido ósseo (espessura das trabéculas: Tb.Th; número das trabéculas: Tb.N; separação entre as trabéculas: Tb.Sp e porosidade total: Po (tot))

Etapas laboratoriais para obtenção das lâminas histológicas e análise imunoistoquímica

As amostras destinadas para as avaliações histológicas e imunoistoquímicas foram lavadas em água corrente, submetidas a trocas semanais de solução de EDTA (4 semanas), desidratadas em álcoois gradativamente (70 - 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes em micrótomo (5 µm) e montagem em lâminas histológicas. Os cortes pares foram destinados para a análise histológica, enquanto que os ímpares foram destinados para a análise imunoistoquímica.

Análise histológica

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram capturadas em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland)

Foi avaliada de forma qualitativa tanto a morfologia como a espessura do tecido ósseo que compunha a amostra obtida após a cirurgia de coleta da biópsia, estabelecendo comparação entre os grupos de pacientes pertencentes aos grupos GSA vs GAS. As lâminas foram fotomicrografadas nos aumentos originais de 6,3x e 40x.

Análise imunoistoquímica

Os anticorpos primários policlonais, produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados com o objetivo de caracterizar as etapas de diferenciação das células da linhagem osteoblástica observadas nas amostras coletadas. Foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase e como anticorpos primários foram utilizados o anti-RUNX2, que marca pré-osteoblastos, o anti-Osteopontina, que marca a etapa inicial de mineralização do tecido ósseo (os osteoblastos jovens) e, o anti-Osteocalcina, que marca a etapa final de mineralização do tecido ósseo (os osteoblastos em grau de maior maturidade).

Como anticorpo secundário, foi utilizado o anticorpo biotilado anti-cabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology, Waltham, Massachusetts, USA). A amplificação do sinal da reação foi realizado pelo kit Avidina-Biotina (Vector laboratories, Burlingame, CA, EUA) e o cromógeno de escolha foi a Diaminobenzidina (Dako, Glostrup Denmark), que marcou no tom de marrom acastanhado as células positivas para cada um dos antígenos determinados das reações imunoistoquímicas. Ainda foi realizada a contra-coloração por Hematoxilina de Harris e na sequência as lâminas foram desidratadas para a montagem das lamínulas com resina permount.

As reações imunoistoquímicas foram avaliadas através da atribuição de escores, por análise qualitativa ordinal. Após a análise de toda a amostra de tecido ósseo, foram considerados os seguintes escores: leve, com 25% da área avaliada com marcação positiva para o antígeno de interesse; moderado, com 50% da área avaliada com marcação positiva para o antígeno de interesse; intensa, com 75% da área

avaliada com marcação positiva para o antígeno de interesse (Pedrosa *et al.*, 2009; Manrique *et al.*, 2015). A atribuição dos escores foi feita por um único avaliador, submetido ao teste Kappa ($k > 0,8$), após três testes consecutivos. Foram considerados representativos os escores com maior frequência após a análise de todos os espécimes estudados. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o Fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i, conectado a um micro-computador.

Análise Estatística

Todos os dados quantitativos da avaliação microtomográfica foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilk). Os parâmetros microtomográficos (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po (tot)) foram comparados pelo teste t.

Os testes foram aplicados no programa computacional SigmaPlot™ (SigmaPlot Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA), em que foi considerado como nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

Análise Microtomográfica

Em relação aos parâmetros morfométricos, foi observado que todos os parâmetros analisados (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po (tot)) apresentaram resultados similares estatisticamente na comparação entre as características

sistêmicas analisadas (GSA e GAS) ($p>0,05$, Teste t) e similar também nas imagens microtomográficas tridimensionais das figuras 1 e 2. Os valores médios e desvio padrão dos parâmetros morfométricos estão representados na tabela 1. A representação gráfica destes valores pode ser visualizada nas figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

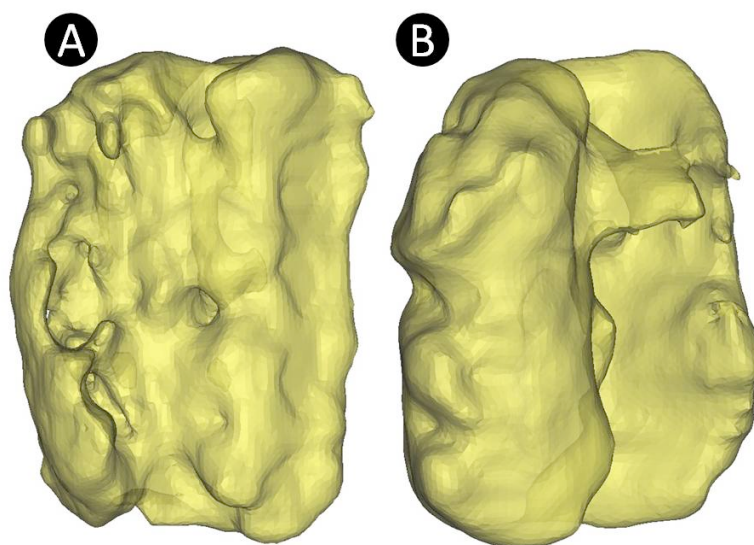


Figura 1. Imagens microtomográficas com transparência da biópsia do grupo GSA (A) e GAS (B) na vista frontal, obtidas pelo software Mimics v.18 (Materialise, Bélgica).

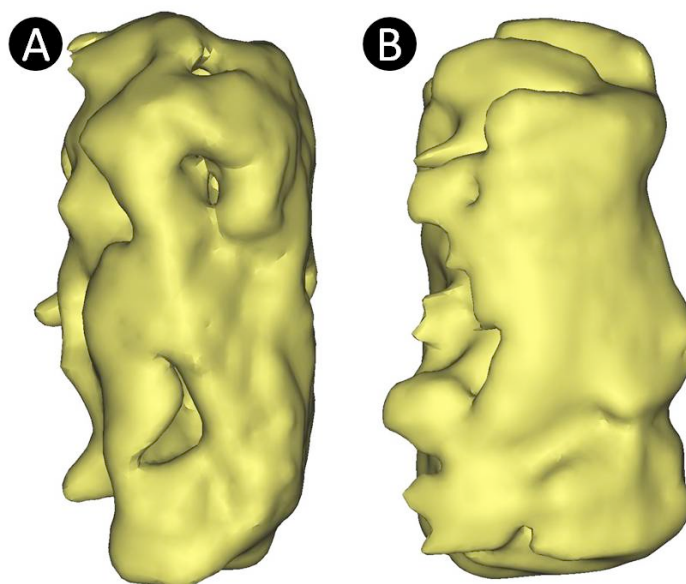


Figura 2. Imagens microtomográficas sem transparência da biópsia do grupo GSA (A) e GAS (B) na vista frontal, obtidas pelo software Mimics v. 18 (Materialise, Bélgica).

Tabela 1 – Valores médios, desvio padrão e do coeficiente estatístico (p) para os parâmetros volumétricos (BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb. Sp e Po (tot)), na comparação entre os grupos GSA e GAS.

Grupos/ Parâmetros Volumétricos	BV	BV/TV	Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp	Po (tot)
GSA	21.58±3.6	1.59±0.9	1.43±0.58	0.009±0.001	4.18±1.08	98.39±0.91
GAS	19.13±9,1	1.93±1.6	1.23±0.53	0.01±0.006	4.25±0.41	98.05±1.6
Valores de p	0.687	0.649	0.4	0.384	0.926	0.764

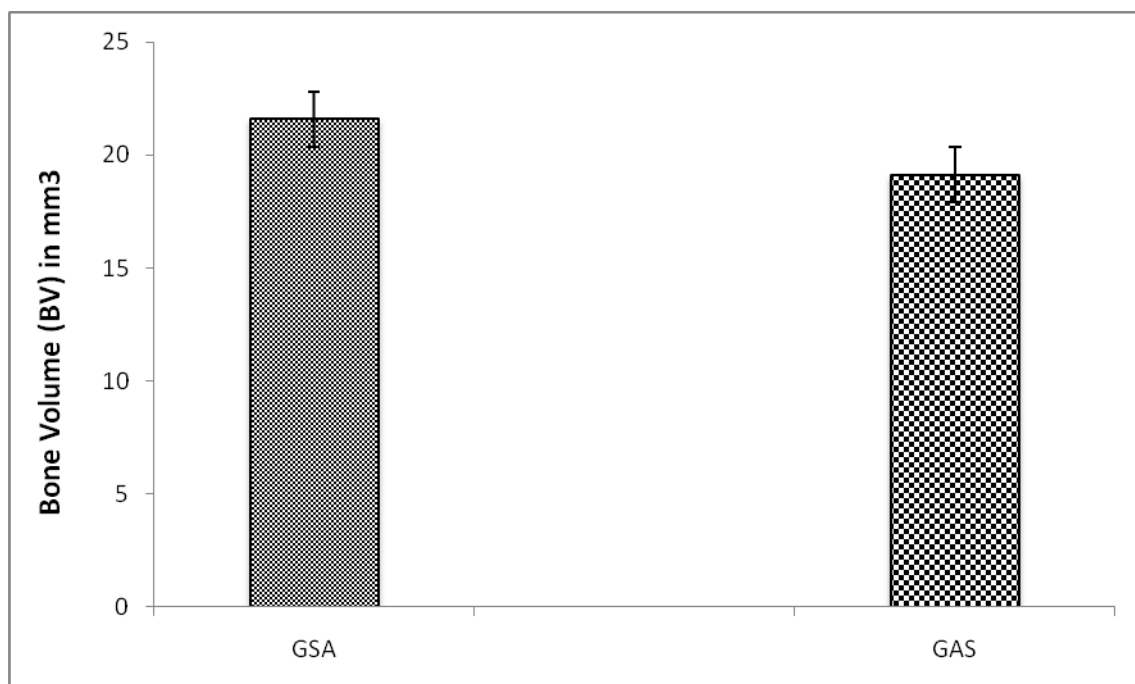


Figura 3 – Representação dos valores médios de BV entre os grupos experimentais GSA e GAS.

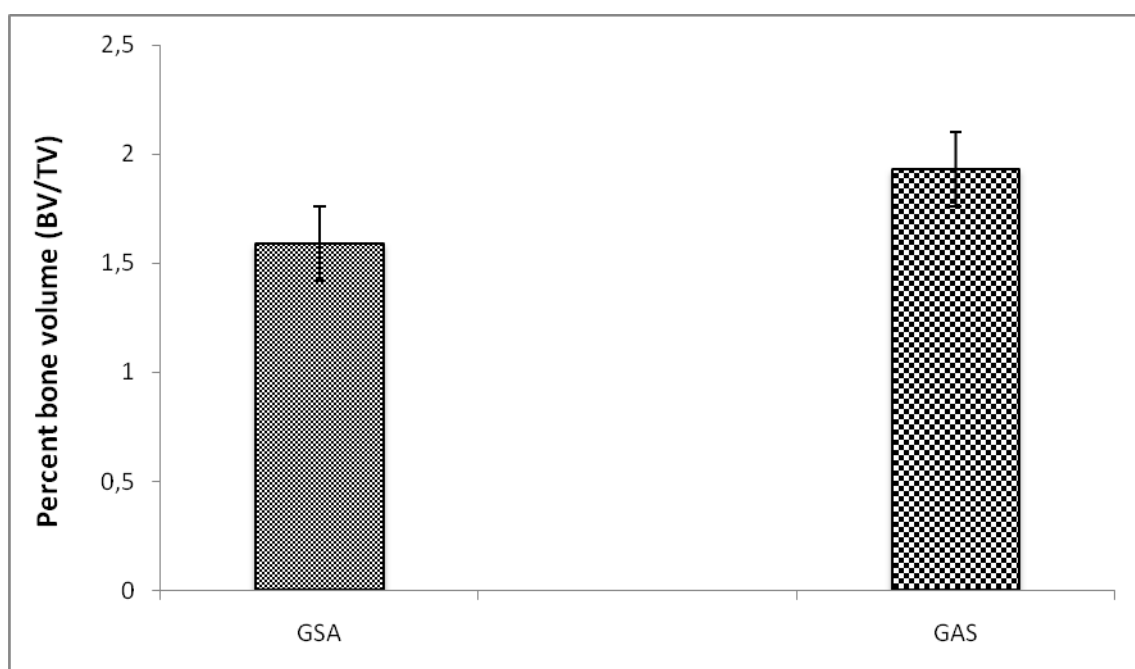


Figura 4 – Representação dos valores médios de BV/TV entre os grupos experimentais GSA e GAS.

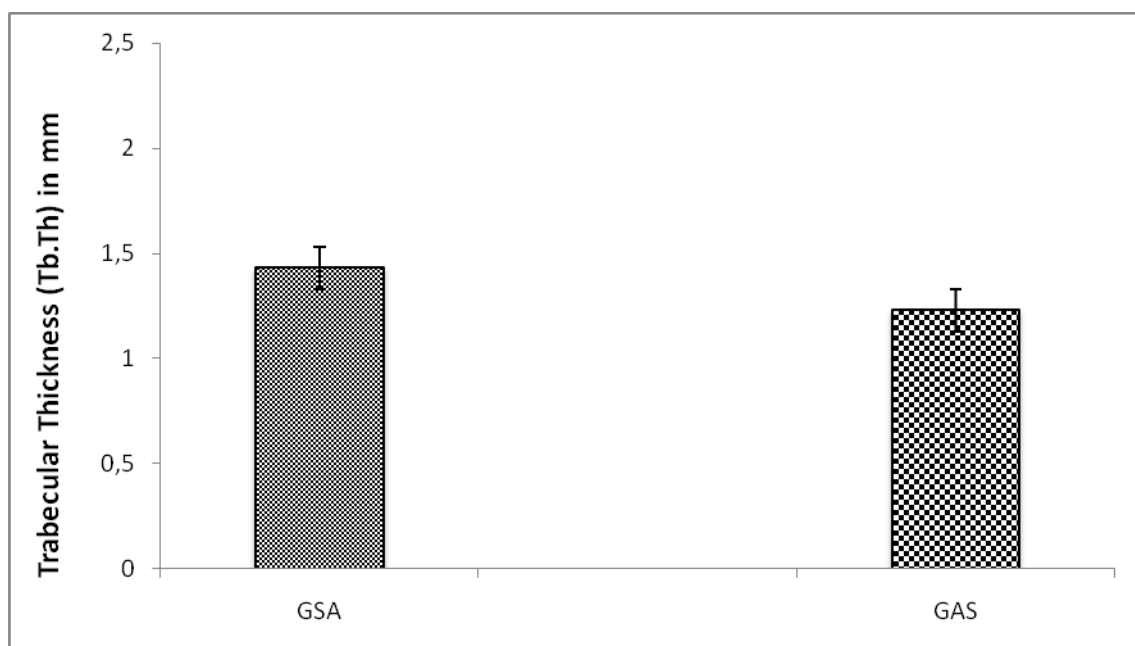


Figura 5 – Representação dos valores médios de Tb.Th entre os grupos experimentais GSA e GAS.

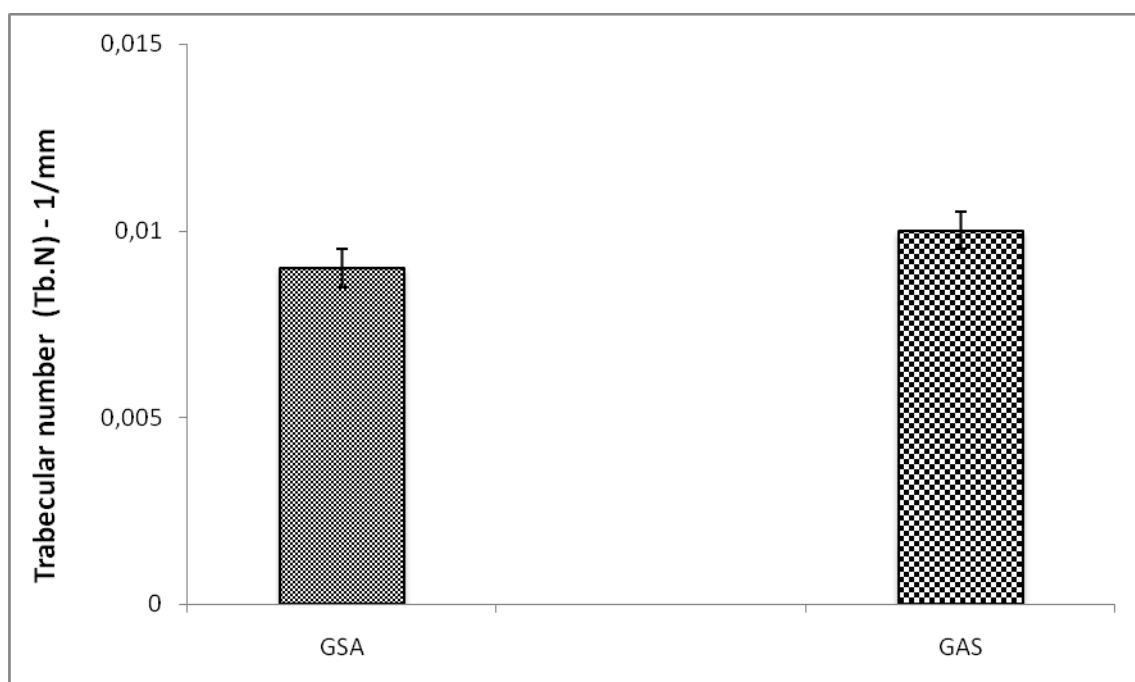


Figura 6 – Representação dos valores médios de Tb.N entre os grupos experimentais GSA e GAS.

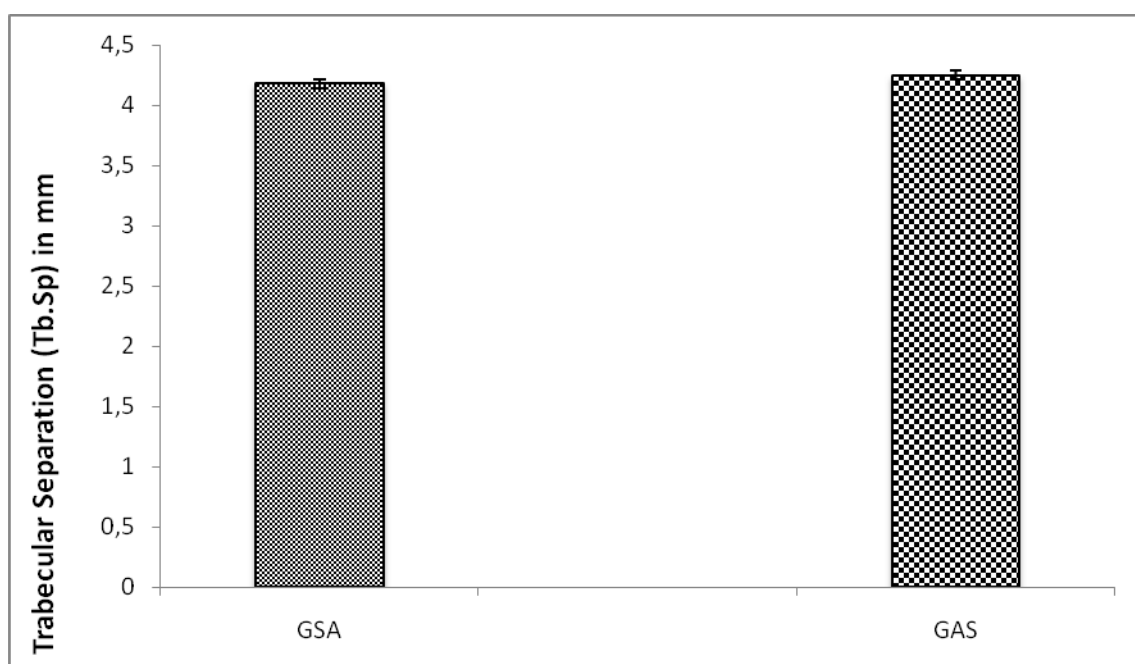


Figura 7 – Representação dos valores médios de Tb.Sp entre os grupos experimentais GSA e GAS.

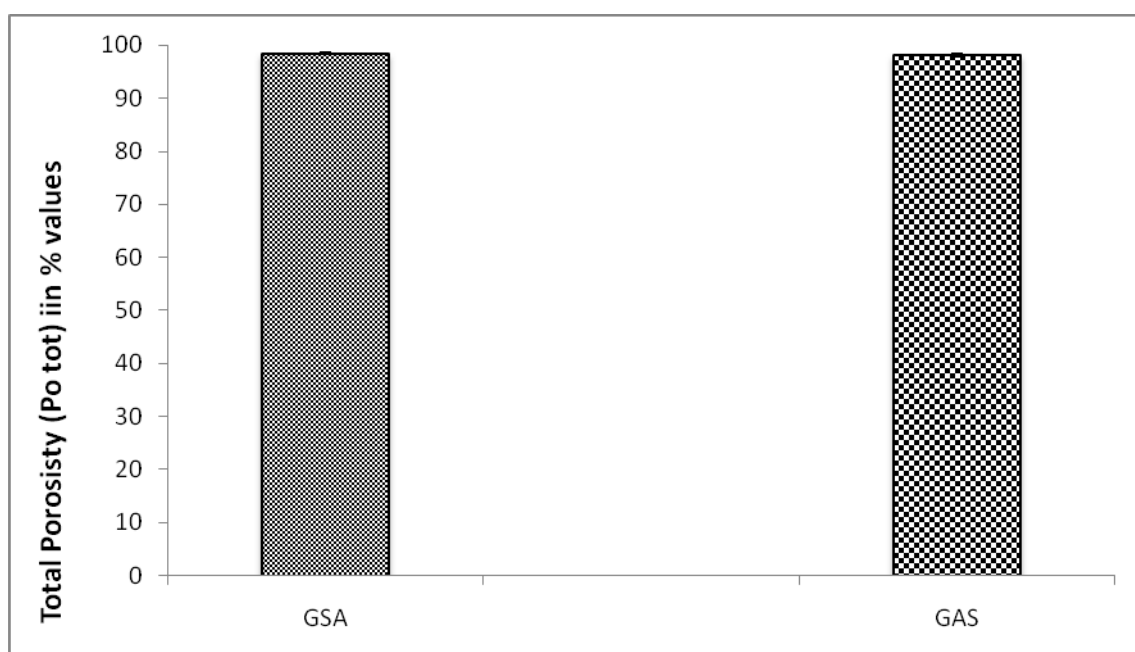


Figura 8 – Representação dos valores médios de Potot entre os grupos experimentais GSA e GAS.

Análise histológica da citoarquitetura do tecido ósseo

O tratamento com medicamentos antagonistas do SRAA no grupo GAS evidenciou tecido ósseo organizado, com a presença de osso trabecular, caracterizado por menor espessura quando comparado ao grupo GSA. Notou-se também a importante presença de osteócitos aprisionados no tecido ósseo reparacional.

No grupo GSA, o osso trefinado mostrou-se preenchido por trabéculas ósseas bem diferenciadas, espessas e organizadas. Também foram observados osteócitos aprisionados interior do tecido ósseo avaliado, como observados nas figuras 9 e 10.

Dessa forma, foi possível caracterizar o tecido ósseo alveolar durante a condição de hipertensão compensada pelos fármacos antagonistas do SRAA, ficando claro que a morfologia tecido ósseo do ponto de vista histológico é semelhante nos dois grupos, sendo importante para procedimentos futuros de reabilitação.

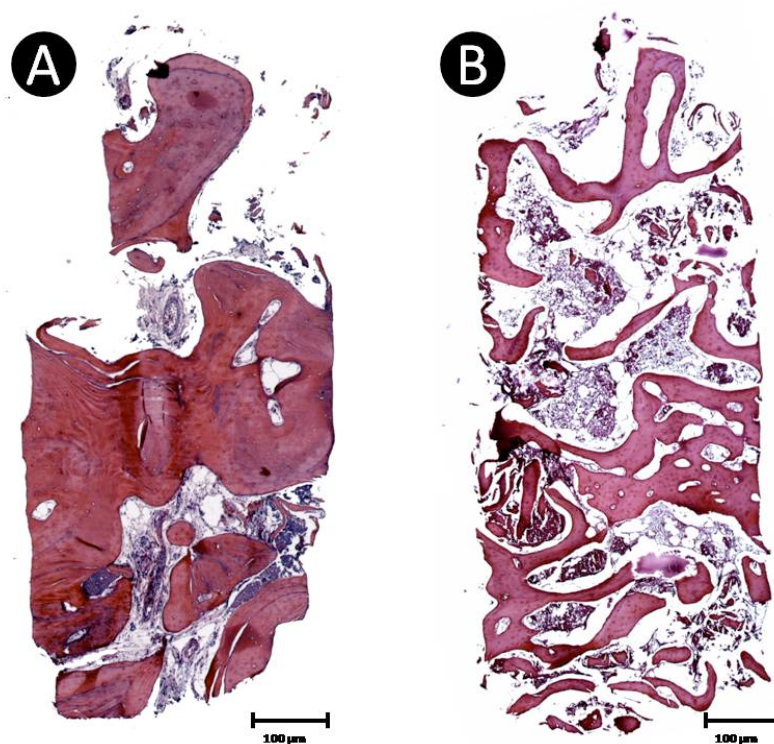


Figura 9. Imagens histológicas da trefina do grupo GSA (A) e GAS (B) no aumento de 6,3X.

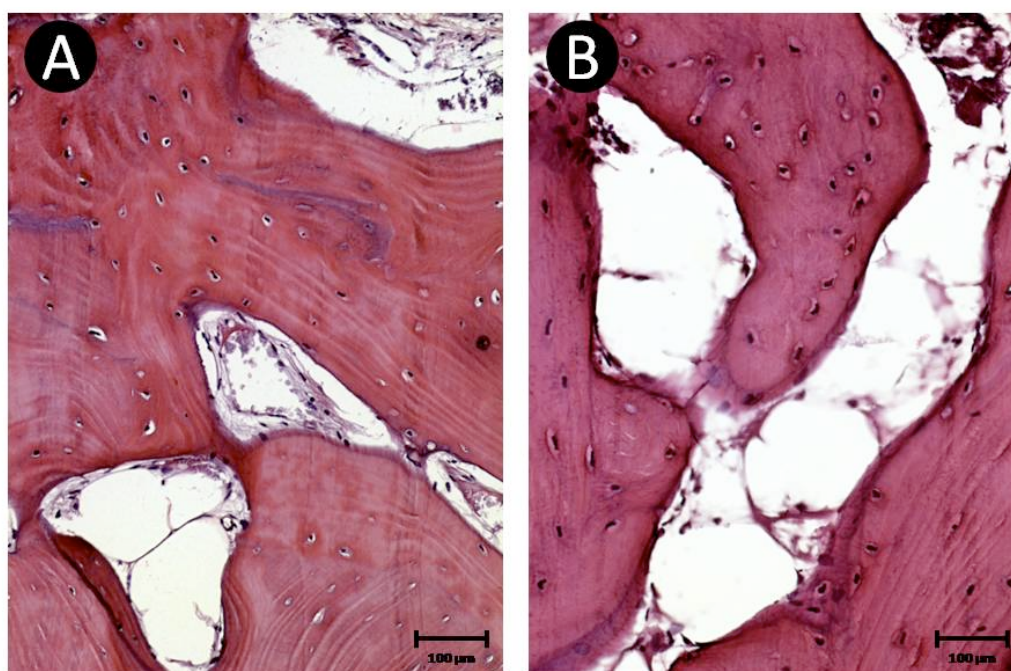


Figura 10. Imagens histológicas da trefina do grupo GAS (A) e GSA (B) em aumento de 40X.

Análise imunoistoquímica

Foram realizadas as análises para a imunomarcação de proteínas que são marcadoras de importantes etapas da diferenciação osteoblástica, para caracterizar o perfil celular das células coletadas nas amostras dos diferentes grupos, com resultados apresentados na tabela 2 e figura 11.

A marcação positiva para RUNX2 caracteriza a presença de células jovens, em etapa de diferenciação osteoblástica, passando da etapa de pré-osteoblastos para osteoblastos jovens. No Grupo GSA foi possível observar áreas de tecido ósseo com células positivas para RUNX2 na porção medular, porém este foi um achado bastante escasso. No grupo GAS, foi observado osso trabecular em grande quantidade na amostra e o tecido conjuntivo entre as trabéculas apresentou-se com importante evidência das células positivas para RUNX2.

A osteopontina marca os osteoblastos jovens, quando iniciam o processo de mineralização óssea. Também é um marcador das linhas de reversão do tecido ósseo.

No grupo GSA foram observadas as lamelas de tecido ósseo bem organizadas, com a marcação positiva para OP incipiente, conforme esperado (osso em atividade de remodelação). No grupo GAS, as trabéculas ósseas apresentavam-se repletas de osteoblastos marcados positivamente para osteopontina. Este achado também foi observado no tecido conjuntivo intertrabecular.

A osteocalcina é uma glicoproteína que se caracteriza por ser o marcador da mineralização óssea, apresentando-se expressa em osteoblastos maduros e na matriz

extracelular precipitada com cálcio. Dentre as proteínas não colágenas, é a que predomina no tecido ósseo.

No Grupo GSA, o tecido ósseo apresenta intensa marcação de OC, precipitação da DAB sobre a matriz colágena. As lamelas concêntricas apresentam-se também bem marcadas por esta proteína. No Grupo GAS, o osso trabecular, com trabéculas delgadas de moderada a intensa, apresenta precipitação deste cromógeno ligado a osteocalcina. Na região intertrabecular observa-se importante marcação positiva para a osteocalcina nas células da linhagem osteoblástica.

Tabela 2 – Representação dos escores mais frequentes durante a análise qualitativa ordinal da imunoistoquímica das proteínas Runx2, OP e OC, para os grupos GSA e GAS.

	GSA	GAS
Runx 2	leve	moderado
OP	leve a moderado	moderado a intenso
OC	intenso	moderado

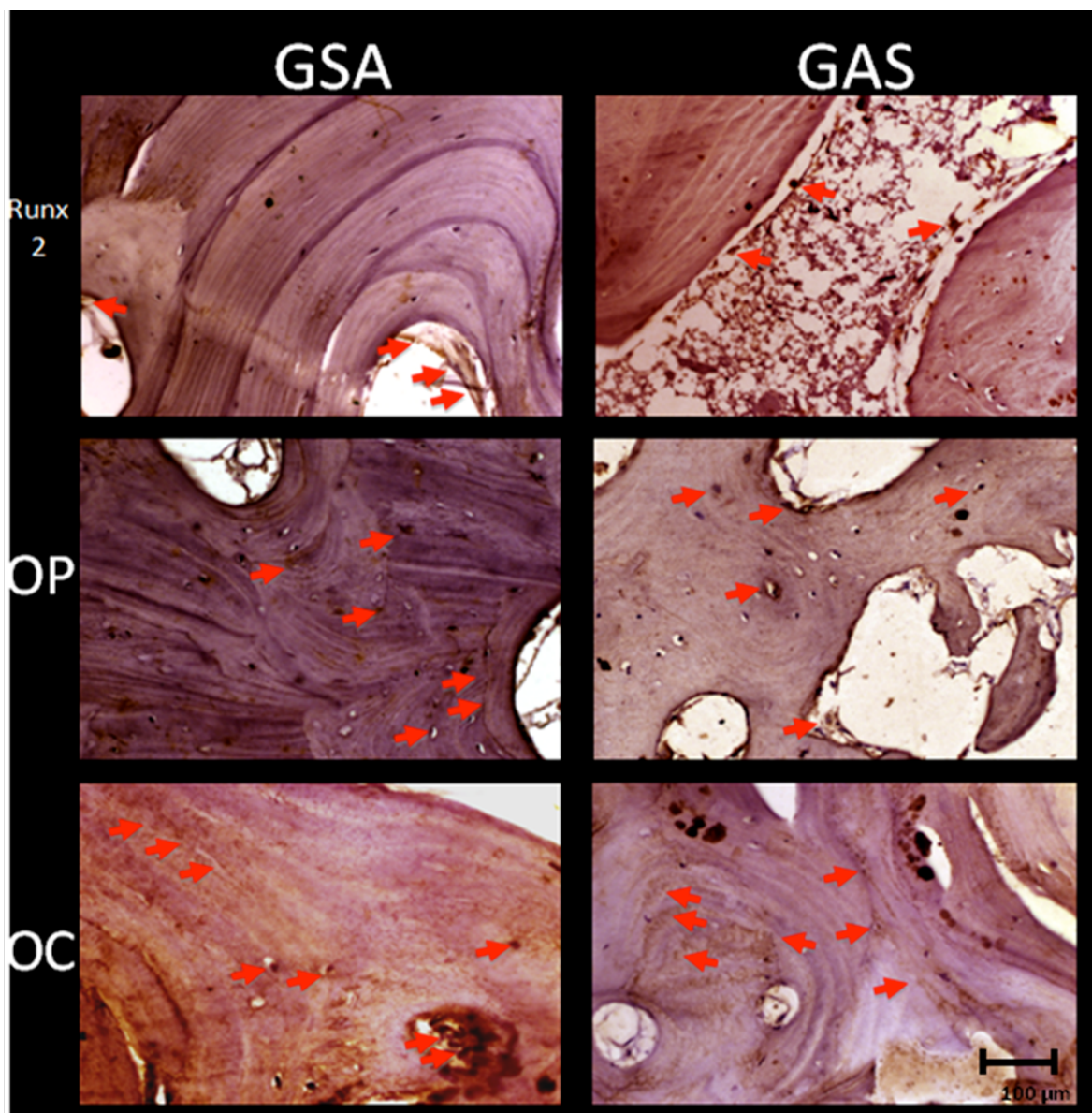


Figura 11. Imagens imunoistoquímicas dos grupo GSA e GAS com imunomarcações apontadas pelas setadas de Runx2, OP e OC no aumento de 40x. Na imunomarcação da proteína osteopontina, pode-se observar que no GSA, as linhas cementantes apresentaram-se mais marcadas que em GAS. J  na osteocalcina, tanto GSA como GAS, a impregnação ocorreu na matriz extracelular do tecido ósseo (destacadas pelas setas em vermelho).

Os escores observados representam que há células viáveis em atividade de síntese da matriz extracelular presentes tanto nas amostras dos grupos GSA e GAS. Apesar da presença evidenciada de osso trabecular no grupo GAS, importante destacar

que as células presentes se apresentam com importante atividade de síntese de matriz, evidenciado pela importante presença dos 3 marcadores analisados neste estudo.

Discussão

Este estudo permitiu caracterizar a microcitoarquitetura óssea, no que diz respeito aos aspectos teciduais histológicos e as repostas moleculares presentes no tecido ósseo de indivíduos hipertensos compensados e de indivíduos sem alterações sistêmicas por meio da microtomografia, da análise histológica e imunoistoquímica.

Com os resultados obtidos na análise histológica, foi possível comparar a qualidade histológica entre os dois grupos. No grupo GSA, notaram-se trabéculas ósseas mais espessas, organizadas, com menor espaçamento entre elas. Já no grupo GAS, observou-se um trabeculado ósseo menos espesso e com maior separação entre as trabéculas. Em ambos os grupos foi evidenciada a qualidade óssea do tecido avaliado, caracterizado pela presença tecido ósseo maduro e com osteócitos em seu interior. Esse fato, pode ser explicado por estudos prévios, em que a administração de losartan, uma droga antagonista do SRAA, contribuiu para melhora da angiogênese em quadros de hipertensão (Gealh *et al.*, 2014). Pode ser sugerido neste estudo que a vasodilatação propiciada pelo agente anti-hipertensivo no grupo GAS, fez com que houvesse melhora no aporte sanguíneo pela angiogênese nos quadros de hipertensão, ao ponto que o grupo GAS obtivesse uma maturação óssea semelhante ao GSA (Gealh

et al., 2014). Corroborando com outros estudos, onde mostrou-se que agentes anti-hipertensivos contra HAS proporcionaram aumento do número de células progenitoras circulantes, restabelecendo o potencial angiogênico diminuído em ratos espontâneamente hipertensos (You *et al.*, 2008).

Os aspectos imunoistoquímicos devem ser ressaltados como sendo uma possibilidade de se avaliar as células e seu potencial de síntese proteica no momento de análise do estudo. Ficou evidente com estes resultados que para os dois grupos experimentais, as células reparacionais se encontram em momentos diferentes, mas muito próximos quando se considera os eventos de remodelação óssea. O grupo GSA, que caracteriza os pacientes normotensos, mostra que as biópsias coletadas são constituídas por osso com poucas trabéculas e caracterizado por células ósseas maduras e com atividade de síntese de proteínas da matriz extracelular importantes para a formação óssea. Com relação ao grupo GAS, hipertensos compensados, o padrão de amostras observados é semelhante, no entanto uma característica que precisa ser ressaltada é que entre as trabéculas ósseas foi observado um tecido conjuntivo bastante celularizado e imunorreativo às proteínas avaliadas nas imunomarcações, especialmente quando se avaliou a RUNX2. Este último achado é bastante importante porque mostra que há uma expectativa de *turnover* do tecido ósseo, já que a renovação promovida pelos pré-osteoblastos está evidenciada pela presença deste fator de transcrição. Na marcação da osteocalcina, tanto no grupo GSA como GAS, a impregnação do cromógeno sobre a matriz extracelular do tecido ósseo, caracterizaram um tecido mineralizado e com grau de maturidade importante, e que

foi comum aos dois grupos. Portanto, com relação ao aspecto celular, as amostras de GAS mostram um osso tão viável para a reabilitação quanto as amostras de GSA.

Não há como esperar que os tecidos comparados nas duas condições estudadas tenham a mesma morfologia ou sejam iguais (Afghani e Goran, 2007). O que se espera é que sabendo das diferenças micro arquiteturas que devem estar presentes pela condição sistêmica estudada, o tratamento escolhido para a interferência sistêmica poderia recuperar parcialmente a condição do tecido ósseo comprometido, tornando-o adequado para as manobras de reabilitação (Chen *et al.*, 2015). E isto foi possível observar também nos resultados da análise microtomográfica.

Assim, na análise tridimensional, levando em conta o volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), separação entre as trabéculas (Tb.S) e porosidade (Po-tot) foi possível notar que o tecido ósseo dos pacientes hipertensos compensados apresentou microarquitetura semelhante em todos estes parâmetros, quando comparados aos indivíduos normotensos. Além disso, quando comparadas as imagens microtomográficas das reconstruções tridimensionais, observou-se que do ponto de vista macroscópico, os dois grupos apresentaram características do trabeculado bastante parecidas, observando-se que o grupo com hipertensão compensada foi capaz de manter sua morfologia estrutural, e portanto, podendo assim, desempenhar suas atividades funcionais.

Em relação ao SRAA, nos quadros de hipertensão, a Ang II leva ao aumento da expressão do Receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANKL) e diminuição da expressão do fator de transcrição relacionado a Runt 2 (Runx2) (Moura *et al.*, 2016).

Ambos mediadores desempenham papel importante na diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos. Quando isso ocorre, há diminuição da formação óssea e aumento da reabsorção. Ao impedir a ação de Ang II pelo bloqueio do SRAA, por meio de drogas que agem nesse sistema, inibidores da reabsorção óssea e marcadores para diferenciação osteoblástica como a osteoprotegerina e RUNX2 respectivamente (Zhang, Y. F. *et al.*, 2013), são aumentados. Da mesma forma como observado neste estudo com relação ao RUNX2, melhorando assim o processo de formação óssea. Este estudo apresenta como aspecto de grande relevância, a caracterização do tecido ósseo que atuará como suporte para os implantes dentários instalados. Com base no exposto, foi possível observar a viabilidade óssea do ponto de vista microestrutural e também do aspecto celular/proteico, como evidenciado na imunomarcagem no tecido ósseo em quadros de hipertensão compensadas pelo uso de bloqueadores do SRAA.

Uma limitação deste estudo consistiu na dificuldade em se separar os medicamentos bloqueadores do SRAA como losartan/captopril, pois apesar deles apresentarem o mesmo mecanismo de ação, atuam em receptores diferentes. Deste modo, estudos futuros deverão buscar a diferenciação também entre os fármacos do sistema.

Portanto, dentro dos limites no presente estudo, podemos concluir que:

1. Do ponto de vista histológico e imunoistoquímico, GSA e GAS apresentaram tecido ósseo semelhante e caracterizado por células

marcadas positivamente para RUNX2, OP e OC, mostrando a viabilidade celular das amostras avaliadas nos dois grupos.

2. Indivíduos hipertensos tratados com antagonistas do sistema renina angiotensina apresentam microarquitetura óssea semelhante aos indivíduos normotensos.

3. A medicação antagonista do SRAA desempenha papel importante no metabolismo ósseo, fazendo com que o tecido ósseo apresente características quantitativas e qualitativas favoráveis a reabilitação com implantes osseointegráveis.

Referências

AFGHANI, A.; GORAN, M. I. Lower bone mineral content in hypertensive compared with normotensive overweight Latino children and adolescents. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 2, p. 190-6, Feb 2007. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061.

AL-MAJED, A. R. et al. Losartan: Comprehensive Profile. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol**, v. 40, p. 159-94, 2015. ISSN 1871-5125 (Print)

1871-5125.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1468-86, Jul 2010. ISSN 1523-4681 (Electronic) 0884-0431 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20533309> >.

BROULIK, P. D. et al. Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. **Physiol Res**, v. 50, n. 4, p. 353-8, 2001. ISSN 0862-8408 (Print)

0862-8408.

CHEN, S. et al. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. **Mol Genet Metab**, v. 115, n. 1, p. 53-60, May 2015. ISSN 1096-7192.

DIAO, T. Y. et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **J Bone Miner Metab**, v. 32, n. 3, p. 261-70, May 2014. ISSN 0914-8779.

DONMEZ, B. O. et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 4, p. 878-88, 2012. ISSN 1734-1140 (Print)

1734-1140.

GEALH, W. C. et al. Healing process of autogenous bone graft in spontaneously hypertensive rats treated with losartan: an immunohistochemical and histomorphometric study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 12, p. 2569-81, Dec 2014. ISSN 0278-2391.

HAZNEDAROGLU, I. C.; BUYUKASIK, Y. Current evidence for the existence of a local renin-angiotensin system affecting physiological and pathological haemopoiesis in the bone marrow. **Br J Haematol**, v. 99, n. 2, p. 471, Nov 1997. ISSN 0007-1048 (Print)

0007-1048.

JAVED, F. et al. Association of hypertension and bone mineral density in an elderly African American female population. **J Natl Med Assoc**, v. 104, n. 3-4, p. 172-8, Mar-Apr 2012. ISSN 0027-9684 (Print)

0027-9684.

LUDWIG, M. et al. Characterization of ion currents of murine CD117(pos) stem cells in vitro and their modulation under AT2 R stimulation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 208, n. 3, p. 274-87, Jul 2013. ISSN 1748-1708.

MANRIQUE, N. et al. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 2, p. 222-7, Mar-Apr 2012. ISSN 1678-7757.

_____. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 6, p. 1319-27, Jul 2015. ISSN 1432-6981.

MCCARRON, D. A. et al. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 3, n. 3 Pt 2, p. 1162-7, May-Jun 1981. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911x.

MOHAN, V.; SEEDAT, Y. K.; PRADEEPA, R. The rising burden of diabetes and hypertension in southeast asian and african regions: need for effective strategies for prevention and control in primary health care settings. **Int J Hypertens**, v. 2013, p. 409083, 2013. ISSN 2090-0384 (Print).

MOURA, A. P. et al. Effects of angiotensin II type I receptor blocker losartan on orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 149, n. 3, p. 358-65, Mar 2016. ISSN 0889-5406.

NAKAI, K. et al. Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT(1) receptor in osteoblasts. **Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 922-33, Apr 2013. ISSN 0300-9084.

NAMAZI, S.; ARDESHIR-ROUHANI-FARD, S.; ABEDTASH, H. The effect of renin angiotensin system on tamoxifen resistance. **Med Hypotheses**, v. 77, n. 1, p. 152-5, Jul 2011. ISSN 0306-9877.

NISHIYA, Y.; SUGIMOTO, S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 6, p. 628-33, Jun 2001. ISSN 0918-6158 (Print)

0918-6158.

OTGONTUYA, D. et al. Assessment of total cardiovascular risk using WHO/ISH risk prediction charts in three low and middle income countries in Asia. **BMC Public Health**, v. 13, p. 539, 2013. ISSN 1471-2458.

PEDROSA, W. F., JR. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 11, p. 1254-64, Nov 2009. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531103> >.

PEREIRA, C. **Análise do processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não tratados e tratados com losartan. Estudo imunoistoquímico e histomorfométrico.** <http://unesp.br/porta/cgb/bibliotecas-digitais/cthedra-biblioteca-digital-teses/>: Aracatuba Dental School (Univ. Estadual Paulista - UNESP) 2013.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D status, body composition and hypertensive target organ damage in primary hypertension. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Nov 1 2013. ISSN 0960-0760.

RAJKUMAR, D. S. et al. Comparative evaluation of enalapril and losartan in pharmacological correction of experimental osteoporosis and fractures of its background. **J Osteoporos**, v. 2013, p. 325693, 2013. ISSN 2090-8059 (Print) 2042-0064.

SHIMIZU, H. et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. **Faseb j**, v. 22, n. 7, p. 2465-75, Jul 2008. ISSN 0892-6638.

STRAWN, W. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade normalizes CD11b+ monocyte production in bone marrow of hypercholesterolemic monkeys. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 2, p. 624-32, Feb 2008. ISSN 0021-9150.

TIBAZARWA, K. B.; DAMASCENO, A. A. Hypertension in developing countries. **Can J Cardiol**, v. 30, n. 5, p. 527-33, May 2014. ISSN 0828-282x.

WHITEBREAD, S. et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 163, n. 1, p. 284-91, Aug 30 1989. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

WRIGHT, G. L.; RANKIN, G. O. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. **Am J Physiol**, v. 243, n. 3, p. H365-70, Sep 1982. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513.

YOU, D. et al. Hypertension impairs postnatal vasculogenesis: role of antihypertensive agents. **Hypertension**, v. 51, n. 6, p. 1537-44, Jun 2008. ISSN 0194-911x.

ZHANG, Y. et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on bones in mice with type 1 diabetes induced by streptozotocin. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, Jan 2 2013. ISSN 1470-3203.

_____. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on bones in mice with type 1 diabetes induced by streptozotocin. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 15, n. 3, p. 218-27, Sep 2014. ISSN 1470-3203.

ZHANG, Y. F. et al. Effect of angiotensin II type I receptor blocker losartan on bone deterioration in orchietomized male hypertensive and normotensive rats. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 14, p. 2661-5, Jul 2013. ISSN 0366-6999 (Print)

0366-6999.



ANEXOS

Anexo A – Aprovação do projeto pelo comitê de ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aspectos histológicos, moleculares e tridimensionais de biópsias de tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados

Pesquisador: André Luis Da Silva Fabrís

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55502614.7.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.521.728

Apresentação do Projeto:

o presente projeto tem como objetivo avaliar as características histológicas, moleculares e volumétricas do tecido ósseo coletado de pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica compensada pelo uso de medicamentos antagonistas do sistema renina angiotensina. Durante o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes osseointegráveis com superfície tratada por duplo ataque ácido, (Implalife Biotecnologia - IMPLALIFE®) serão coletados blocos ósseos por meio de biópsia com broca trefina de 3,0mm de diâmetro nos locais de instalação dos implantes para análise. As biópsias coletadas serão separadas para a realização dos diferentes procedimentos de análise com o intuito de se obter cortes histológicos para as reações imunoistoquímicas, extração do RNA mensageiro para a realização das reações de PCR em tempo real e a realização de secções por microtomografia computadorizada para que sejam realizadas reconstruções tridimensionais e a avaliação do volume de tecido ósseo que constitui a biópsia coletada. Os resultados a serem obtidos serão submetidos à análise estatística, estabelecendo-se comparações.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será caracterizar o tecido ósseo de pacientes hipertensos compensados do ponto

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

Author Guidelines

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

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

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

1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town,

state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

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

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

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

Creative Commons Attribution License OAA

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

2.8 OnlineOpen

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

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

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

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

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review

process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started

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

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

3.2. Submitting Your Manuscript

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

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process.

The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

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

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and

arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

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

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

5.2. Structure

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. References

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

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

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

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

(i) for journal references:

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

(ii) for book references:

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

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

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

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

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

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

Examples:

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

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

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

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/eachchecklist.asp>

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

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

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

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Author Services

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