



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**

**Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba**

**Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada**

**Pâmela Letícia dos Santos**

**Avaliação de substitutos ósseos em  
defeitos peri-implantares criados em  
coelhos.**

**Araçatuba-SP**

**2013**

**Pâmela Letícia dos Santos**

**Avaliação de substitutos ósseos em defeitos  
peri-implantares criados em coelhos.**

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

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

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Eloá Rodrigues Luvizuto

**Araçatuba-SP**

**2013**

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

S237a Santos, Pâmela Letícia dos.  
Avaliação de substitutos ósseos em defeitos peri-implantares criados em coelhos / Pâmela Letícia dos Santos. – Araçatuba : [s.n.], 2013  
106 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior  
Coorientadora: Profa. Dra. Eloá Rodrigues Luvizuto

1. Implante dentário 2. Substitutos ósseos 3. Osseointegração 4. Biomecânica 5. Coelhos

Black D7  
CDD 617.64

# ***DEDICATÓRIA***

*Dedico esta Dissertação...*

*À Deus,*

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

*À minha mãe, Marilda Correa Leite,*

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*

Agradeço o apoio, incentivo e toda participação durante o transcorrer desta jornada.

### *Aos meus irmãos Livia 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...***

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior,*

*“Professor não é o que ensina, mas o que desperta a vontade do aluno apreender” (Jean Peaget)*

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, pelos ensinamentos transmitidos e principalmente por despertar em mim a vontade de apreender em todas as nossas conversas.

*À Profa. Dra. Roberta Okamoto*

Pelos ensinamentos durante toda essa jornada, dividindo experiências e oportunidades únicas. Sempre acreditando e investindo em mim, sempre bem disposta a aceitar e complementar minhas idéias dando total liberdade

para que eu possa desenvolvê-las. Obrigada pelas experiências e oportunidades únicas, pela alegria, entusiasmo e principalmente pela amizade. A professora é um exemplo de serenidade, humildade e dedicação ao ensino e pesquisa.

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

Pelo exemplo de professor, chefe e pessoa . Obrigada por todo o carinho e conhecimento compartilhado durante todos os momentos que convivemos! Agradeço principalmente por toda a atenção dada e pelas suas grandes aulas durante as cirurgias, que jamais serão esquecidas!

*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 profissional, 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. Orgulho-me 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. Paulo Tambasco de Oliveira,*

Pela disponibilidade de sempre nos ajudar em tudo que foi preciso, pela competência como ser humano, professor e pesquisador. Agradeço especialmente por todo carinho e simpatia que me recebeu na USP. Por toda a sua contribuição científica a essa pesquisa.

*À Profa. Dra. Eloá Rodrigues Luvizuto*

Professora que me incentivou nessa pesquisa. Além de todo reconhecimento pela sua ajuda e seus ensinamentos, agradeço pela nossa amizade. Muito obrigado por tudo!

*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 e Ana Paula Bassi*

que com muito primor contribuíram 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!

*Ao Prof. Dr. Francisley Ávila Souza*

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

*À Profa. Dra. 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.

*À Profa. Dra. Ana Paula de Souza Faloni,*

pela pessoa maravilhosa que você é, por toda sua dedicação a vida acadêmica e disponibilidade em me ajudar nesse trabalho. Muito obrigada!

*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 Thaís Yumi Umeda Suzuki,*

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.

*Aos amigos Abrahão, Rodolpho, Igor, Lamis, Juliana, Fernanda,  
Carol e Ligia,*

Amigos que me aproximei em Araçatuba, e com eles desfrutei de bons momentos. 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 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 Homsí, Marta, Marcos Heidi, Albanir, Heloísa, 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 colegas do Mestrado,*

Derly, Carla, Lídia, Amália, Daniel e Joel, pela amizade que estamos construindo, pelos aulas agradáveis que passamos juntos, enfim, por todo trabalho que desenvolvemos juntos na pós-graduação. Tenho certeza que essa amizade que está apenas começando ainda vai nos proporcionar bons frutos.

### *Aos colegas de pós-graduação,*

Ellen, Leonardo, Gabriel, Pilar, André, Patrícia, Rodrigo, Giovanna e Sabrina. Agradeço pelos momentos agradáveis que tivemos juntos durante esses anos.

### *Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,*

Bernadete, Gilmar, Paulo, Odair, João, Camilo e Alan 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,*

Carol, Ligia, Tarik, Bruno e Igor, pela convivência que tivemos e pela ajuda que vocês me deram durante esse período. Sou muito grata a todos vocês.

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

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

*Aos funcionários da Pós-graduação: Valéria, Lillian e Cristiane,*

Pela paciência, disponibilidade em nos ajudar sempre. Parabéns pela competência de vocês!

# EPÍGRAFE

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

*Fernando Pessoa*

Santos PL. Avaliação de substitutos ósseos em defeitos peri-implantares criados em coelhos. [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

## **Resumo**

**Objetivo:** Avaliar a efetividade dos substitutos ósseos, matriz de osso bovino mineralizada – (Bio-Oss<sup>®</sup>) e matriz de osso bovino mineralizada com adição de 10% de colágeno suíno – (Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen), no preenchimento de defeitos peri-implantares criados em tíbia de coelhos, por meio das análises biomecânica, histológica e imunoistoquímica para a expressão das proteínas OC, Runx 2, OPG, RANK-L e TRAP .

**Material e Métodos:** Trinta coelhos receberam 1 ostectomia em cada tíbia por meio de trefina de 6.1 mm de diâmetro. Em seguida, foram utilizadas as fresa lança e helicoidais no preparo de leitos receptores com 3,0mm e 1 implante de 4,1 mm/8,5 mm foi instalado. Os defeitos ósseos peri-implantares foram preenchidos de acordo com os seguintes grupos: I- coágulo sanguíneo (CO); II- Bio-Oss<sup>®</sup> (BI); e III- Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen (BC). Dez animais por período foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, para as análises biomecânica, histológica e imunoistoquímica. **Resultados:** Na análise biomecânica, pode-se observar que o grupo BC apresentou melhor resposta, estatisticamente significativa, quando comparado ao CO, no período de 30 dias. Os resultados imunoistoquímicos mostraram na comparação entre os 3 grupos a expressão da OC foi diferente estatisticamente nos períodos de 15 e 60 dias entre os grupos CO e BC; e CO e BI, respectivamente, observando maior expressão para o grupo dos biomateriais aos 15 dias. A expressão de Runx2 foi menor estatisticamente para o grupo BI quando comparado aos demais grupos, no período de 15 dias. Aos 60 dias, a expressão de OPG no grupo BI se apresentou estatisticamente maior que o grupo CO. Nos períodos de 15 e 60 dias, pode-se observar maior expressão de RANK-L para o



grupo BI comparado ao CO. No balanço da expressão da TRAP, pela avaliação estatística não foi encontrada diferença entre os grupos nos períodos estudados.

Conclusão: O grupo BC apresentou respostas biológicas satisfatórias, com excelentes propriedades osteocondutoras em defeitos peri-implantares.

**Palavras chaves:** Implante Dentário, Substitutos ósseos, Osseointegração, Biomecânica, Coelhos.

Santos PL. Evaluation of bone substitutes in the treatment of bone defects around implants in rabbits. [thesis]. Araçatuba: UNESP – Sao Paulo State University; 2013.

### **Abstract**

**Objective:** To evaluate the effectiveness of bone substitutes in peri-implant defects created in tibia of rabbits which were filled either by blood clot, deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss<sup>®</sup> / Geistlich) and bovine bone mineral with the addition of 10% collagen porcine origin (Bio-Oss Collagen<sup>®</sup> / Geistlich), through biomechanics, histology and immunohistochemical analysis of OC, Runx 2, OPG, RANK-L and TRAP proteins. **Material and methods:** Thirty rabbits received one osteotomy in each tibia using trefine of 6.1 mm in diameter. Subsequently, a spear and helical drills, 2.0 mm, 2.0/3.0 pilot and 3.0 mm were used and 1 implant 4.1 mm/8.5 mm was installed. Bone defects were filled according to the following groups: I-blood clot (CO); II-deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss<sup>®</sup>) (BI); III-bovine bone mineral with addition of 10% collagen porcine origin (Bio-Oss Collagen<sup>®</sup>) (BC). Ten animals per period were euthanized at 15, 30 and 60 postoperative days, subsequently biomechanical analysis were performed. Routine histologic processing for histological and immunohistochemistry analysis were also performed. **Results:** In biomechanics analysis, comparing the different groups for each period can be observed that within 30 days, the BC group showed better biological response statistically proven compared to CO. In immunohistochemistry analysis, the OC expression was statistically significant at 15 and 60 days between CO and BC groups, and between CO and BI groups, respectively, with largest expression for the group of biomaterials. In these same analysed periods, an increased expression of RANK-L can be observed on BI group compared to CO group. OPG expression was statistically significant only iat 60 postoperative days for BI group compared to CO group. At 15 days, Runx2 expression

was statistically significant different for BI group compared to the other groups. TRAP expression showed no statistical difference among the analyzed groups in both periods.

Conclusion: BC showed satisfactory biological responses, with excellent osteoconductive properties in peri-implant defects.

**Keywords:** Dental Implantation, Bone substitutes, Osseointegration, Biomechanics, Rabbits.

# LISTA DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Incisão na porção medial da tíbia do coelho.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 72 |
| <b>Figura 2</b> | Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 72 |
| <b>Figura 3</b> | Trefina de 6.1 milímetros para delimitar a localização dos implantes e remover a primeira cortical óssea.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 73 |
| <b>Figura 4</b> | Broca piloto utilizada para alargar o orifício na segunda cortical de 2 para 3 milímetros.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 73 |
| <b>Figura 5</b> | Os dois defeitos confeccionados, com 6.1 milímetros na primeira cortical e 3 milímetros na segunda cortical.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 74 |
| <b>Figura 6</b> | Instalação dos implantes.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 74 |
| <b>Figura 7</b> | Preenchimento do defeito peri-implantar com biomaterial.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 75 |
| <b>Figura 8</b> | Representação gráfica de médias e desvio padrão do torque reverso (colunas), em N.cm, em relação aos períodos (dias). (ANOVA e Teste de Tukey - $p < 0,05$ ). No grupo BC: * 15dias $\neq$ 30dias. No período de 30 dias: ** CO $\neq$ BC.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 75 |
| <b>Figura 9</b> | Fotomicrografias de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), contendo porções de tecido previamente localizadas entre as espiras dos implantes (EI) nos grupos CO (9a, 9d e 9g), BI (9b, 9e e 9h) e BC (9c, 9f e 9i), nos períodos de 15 (9a-9c), 30 (9d-9f) e 60 dias (9g-9h). Aumento original: 120x. No período de 15 dias, é possível observar a presença de trabéculas ósseas (O) nos grupos BI e BC, com predominância no BC. No Grupo CO observa-se tecido conjuntivo fibroso (C) em todos os períodos investigados (9a, 9d e 9g). Aos 30 dias ainda é possível observar trabéculas ósseas (O) no BI e BC (9e e 9f, respectivamente). Em todos os períodos observa-se a presença de biomaterial (B) nos grupos BI e BC. No período de 60 dias | 76 |

(9c, 9f e 9i), observa-se nitidamente, no grupo BI, o tecido conjuntivo (C) envolvendo o biomaterial (B).

- Figura 10** Fotomicrografias de cortes corados com HE, contendo porções de cortical superior (CS) e do defeito ósseo criado nos grupos CO (10a, 10d e 10g), BI (10b, 10e e 10h) e BC (10c, 10f e 10i), nos períodos de 15 (10a-10c), 30 (10d-10f) e 60 dias (10g-10i). Aumento original: 120x. Aos 15 dias, em todos os grupos observa-se linha cementante (setas), demarcando as áreas em que tecido ósseo (O) neoformado encontra-se em contato com o tecido ósseo da cortical superior (CS). Trabéculas ósseas (O), aparentemente estão presentes em maior número e volume nos grupos BI e BC. Nos grupos BI e BC é possível visualizar a presença dos biomateriais (B) (10b e 10c), respectivamente. Aos 30 dias nos grupos BI e BC observa-se a presença de biomateriais envoltos por tecido ósseo (10e e 10f, respectivamente). No período de 60 dias, observa-se presença de tecido conjuntivo (C) envolvendo o biomaterial (B) no grupo BI (10h). Trabéculas ósseas (O) e de medula óssea (MO) são encontrados no BC (10i). 77
- Figura 11** Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (11a, 11d e 11g), BI (11b, 11e e 11h) e BC (11c, 11f e 11i), nos períodos de 15 (11a-11c), 30 (11d-11f) e 60 dias (11g-11h). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo. 78
- Figura 12** Representação gráfica do balanço da expressão de OC pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney –  $p < 0,05$ ). 15 dias: \* CO  $\neq$  BC. 60 dias: \*\*CO  $\neq$  BC e \*\*\*CO  $\neq$  BI. 79
- Figura 13** Fotomicrografias de cortes Imunoistoquímicos representando a expressão de Runx 2, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (13a, 13d e 13g), BI (13b, 13e e 13h) e BC (13c, 13f e 13i), nos períodos de 15 (13a-13c), 30 (13d-13f) e 60 dias (13g-13i). 80

(aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14</b> | Representação gráfica do balanço da expressão de Runx 2 pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney – $p < 0,05$ ). 15 dias: *CO $\neq$ BI ; **BI $\neq$ BC.                                                                                                                                                                                                   | 81 |
| <b>Figura 15</b> | Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de OPG, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (15a, 15d e 15g), BI (15b, 15e e 15h) e BC (15c, 15f e 15i) nos períodos de 15 (15a-15c), 30 (15d-15f) e 60 dias (15g-15i). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.     | 82 |
| <b>Figura 16</b> | Representação gráfica do balanço da expressão de OPG pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney – $p < 0,05$ ). 60 dias: *CO $\neq$ BI                                                                                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Figura 17</b> | Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de RANK-L, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (17a, 17d e 17g), BI (17b, 17e e 17h) e BC (17c, 17f e 17i), nos períodos de 15 (17a-17c), 30 (17d-17f) e 60 dias (17g-17i). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma. | 84 |
| <b>Figura 18</b> | Representação gráfica do balanço da expressão de RANK-L pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney – $p < 0,05$ ). 15 dias: *CO $\neq$ BI ; **BI $\neq$ BC. 60 dias: ***CO $\neq$ BI.                                                                                                                                                                         | 85 |
| <b>Figura 19</b> | Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de TRAP, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (19a, 19d e 19g), BI (19b, 19e e 19h) e BC (19c, 19f e 19i), nos períodos de 15 (19a-19c), 30 (19d-19f) e 60 dias (19g-19i). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.   | 86 |
| <b>Figura 20</b> | Representação gráfica do balanço da expressão de TRAP pelo período de tempo.                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 87 |

# LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                              |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Valores, médias e desvios-padrão de torque-reverso, em N.cm, para os grupos estudados, de acordo com o período de avaliação. | 88 |
| <b>Tabela 2</b> | Tabela da razão RANK-L/OPG.                                                                                                  | 88 |

# LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------|
| CTBMF  | Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial              |
| R.P.M  | Rotações por minuto                                      |
| CO     | Grupo Coágulo Sanguíneo                                  |
| BI     | Grupo Bio-Oss <sup>®</sup>                               |
| BC     | Grupo Bio-Oss <sup>®</sup> Collagen                      |
| UNESP  | Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho   |
| DAB    | Diaminobenzidina                                         |
| EDTA   | Ácido etileno-diamino-tetracético                        |
| PBS    | Tampão fosfato salina                                    |
| HE     | Hematoxilina e eosina                                    |
| OPG    | Osteoprotegerina                                         |
| OC     | Osteocalcina                                             |
| TRAP   | Fosfatase ácida tartarato-resistente                     |
| Runx 2 | Runt-related transcription factor 2                      |
| RANKL  | Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear $\kappa$ B |
| TNF    | Fator de Necrose Tumoral                                 |



# *Sumário*

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1 Introdução               | 26 |
| 2. Proposição              | 31 |
| 3. Material e Métodos      | 33 |
| 4. Resultados              | 40 |
| 5. Discussão               | 48 |
| 6. Conclusão               | 56 |
| Referências Bibliográficas | 58 |
| Figuras                    | 71 |
| Tabela                     | 88 |
| Anexos                     | 90 |

# *INTRODUÇÃO*

## 1. Introdução <sup>1</sup>

A extração dentária tem como consequência a reabsorção significativa do rebordo alveolar (Mardas et al. 2010). Imediatamente após a exodontia, o alvéolo é preenchido por coágulo sanguíneo, o qual estimula a formação óssea. Contudo, o processo de reparo alveolar não resulta na restituição completa do volume ósseo original devido à reabsorção fisiológica (Brokovic et al. 2012). Pesquisas evidenciam que no período de 6 a 12 meses após a extração, o rebordo alveolar reduz aproximadamente de 0,34 a 7,7 milímetros na dimensão horizontal, e 0,22 a 3,25 na dimensão vertical, e essa redução é mais acentuada nos primeiros 3 meses (Schropp et al. 2003; Chen et al. 2004; Shi et al. 2007).

Nestas áreas de reabsorção óssea torna-se difícil a obtenção de resultados estéticos e funcionais satisfatórios quando é realizada a instalação de implantes tardios (Buser et al. 1996; Shi et al. 2007). Para suprir essa limitação, em 1976, os pesquisadores Schulte & Heimke descreveram a instalação de implantes em alvéolos frescos, nomeando esse procedimento de implante imediato. Esse tipo de cirurgia além permitir a estabilidade primária do dispositivo de titânio, possui a vantagem de reduzir o tempo de reabilitação e o número de procedimentos cirúrgicos (Lazzara 1989, Becker & Becker 1990; Nyman et al. 1990; Gelb 1993; Gher et al. 1994; Lang et al. 1994; Bragger et al. 1996; Rosenquist & Grenthe 1996; Schwartz-Arad & Chaushu 1997; Becker et al. 1998; Grunder et al. 1999; Nemcovsky et al. 1999. Botticelli et al. 2003; Botticelli et al. 2008). No entanto, após a extração dentária o alvéolo pode apresentar um diâmetro maior que o diâmetro do implante dental, resultando em um *gap* marginal entre o implante e o osso hospedeiro (Botticelli et al. 2003). Em 1977, Schenk & Willenegger,

---

As referências estão de acordo com as normas do periódico *Clinical Oral Implants Research* e encontram-se no Anexo B.

realizaram um estudo em coelhos, e concluíram que nos *gaps* maiores que 1 milímetro, entre o implante e o osso marginal, não há formação óssea completa.

Com a finalidade de preservar as dimensões do rebordo alveolar, o enxerto autógeno é a primeira opção de tratamento. No entanto, a limitada disponibilidade de tecido e o aumento do tempo e número de intervenções torna questionável esta opção de tratamento, principalmente em casos de grandes reconstruções (Gotfredsen et al. 1991; Becker et al. 1994; Piattelli et al. 1997; Becker et al. 1998; Trejo et al. 2000). Esses motivos incentivam a busca por substitutos ósseos, que devem permitir o crescimento das células osteoblásticas em sua superfície, possuir porosidade suficiente para penetração das células, induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ativos e, conseqüentemente, promover a substituição gradual pelo osso primário (Zerbo et al. 2001; Brokovic et al. 2012).

A matriz de osso bovino mineralizada (Bio-Oss<sup>®</sup>) é composta de osso bovino desproteinizado, e têm sido amplamente utilizada, na preservação da dimensão do rebordo alveolar após extração dentária, bem como, em defeitos ósseos próximos a dentes e em procedimentos de levantamento do seio maxilar (Hurzeler et al. 1997; Berglundh & Lindhe 1997; Piattelli et al. 1999; Artzi et al. 2000; Yildirim et al. 2000; Froum et al. 2002; Carmagnola et al. 2003; Norton et al. 2003; Nevins et al. 2006). Esse material possui características osteocondutoras que favorece a formação de novo osso lamelar e a aposição óssea para instalação de implante imediato (Berglundh & Lindhe 1997).

Outro substituto ósseo sintético que vêm se destacando é o Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen (Geistlich- Biomaterials), o qual é composto por matriz óssea bovina mineralizada com adição de 10% de colágeno suíno. O colágeno possui qualidade pro-angiogênica e

acelera o crescimento, proliferação e maturação de células endoteliais, o que favorece a regeneração fisiológica (Heinemann et al. 2011). Esse biomaterial é indicado para preenchimento de alvéolos de extração e defeitos periodontais. Em um experimento em animais, Araújo et al., em 2011, avaliou o processo de reparo ósseo após a instalação de implantes imediatos somados ao osso bovino mineralizado com adição de 10% de colágeno suíno, após 6 meses as biopsias foram coletadas e a análise histológica realizada. Nessa pesquisa os autores concluíram que o Bio-Oss<sup>®</sup> collagen inserido no *gap* peri-implantar modificou o processo de cicatrização do tecido duro, favorecendo a região de contato osso/implante.

O tecido ósseo realiza processos regenerativos altamente regulados, durante seu crescimento, desenvolvimento e manutenção (Nijweide et al. 1986). Estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica, as proteínas, os hormônios, os fatores de crescimento e as citocinas, (Ducy et al. 2000). Nesse contexto destaca-se a presença de proteínas da matriz extracelular, que são conhecidas por desempenharem uma importante função na atividade celular ao redor dos implantes e, conseqüentemente, na osseointegração (Rammelt et al. 2004).

Dentre essas proteínas destacam-se a osteocalcina (OC) e a Runx 2 (Runt-related transcription factor 2), ambas são expressas por osteoblastos, sendo essenciais na regulação da atividade osteoblástica. (Ducy et al. 2000; Rammelt et al. 2004).

Outra proteína importante na dinâmica tecidual óssea é a osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibitório de osteoclastogênese. A OPG 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 (Crotti et al. 2004). Ela atua como um receptor decodificador por ligação e neutralização da RANK-L, inibindo a maturação e a reabsorção óssea osteoclástica e, portanto, regula a densidade óssea (Woo et al. 2002; Rogers & Eastell 2005).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK-L), é constituinte da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Alguns tipos celulares expressam esta proteína, incluindo osteoblastos e linfócitos T ativados (Rogers & Eastell 2005). Considerando que OPG e RANK-L têm 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, influencia a remodelação óssea (Suda et al. 1999).

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) consiste de uma enzima encontrada nas células de origem osteoclástica e eritrócitos, liberadas durante a reabsorção óssea e após o afastamento dos osteoclastos do seu local de atuação, sendo utilizada como importante marcador da atividade osteoclástica (Schwarz & O'Keefe 2000).

Tendo em vista a dinâmica do processo de reparo ósseo e a necessidade de melhor entendimento do mesmo com o uso de substitutos ósseos, torna-se relevante avaliar os defeitos peri-implantares, criados em tíbia de coelhos, preenchidos por coágulo sanguíneo, Bio-Oss<sup>®</sup> e Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen, por meio das análises biomecânica histológica e imunoistoquímica.

***PROPOSIÇÃO***

## **2. Proposição**

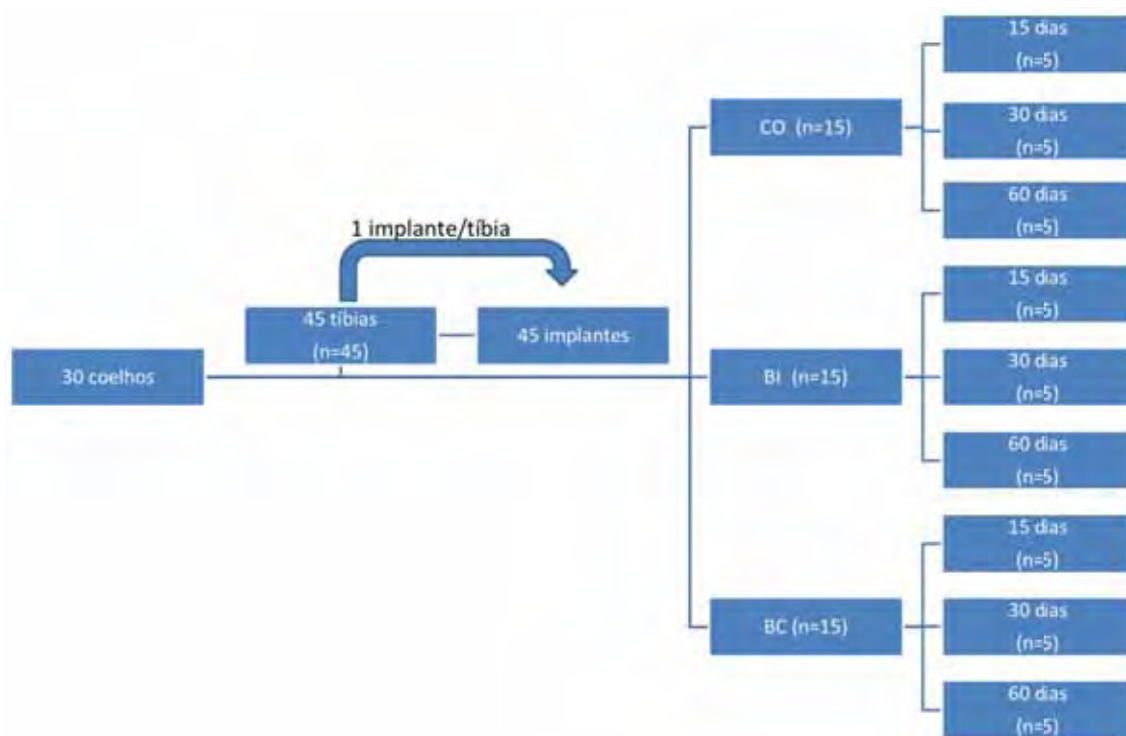
Avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos peri-implantares, criados em tíbia de coelho, preenchidos com coágulo sanguíneo, Bio-Oss<sup>®</sup> e Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen, por meio das análises biomecânica, histológica e imunoistoquímica.



# ***MATERIAL E MÉTODO***

### 3. Material e Métodos

Foram utilizados 30 coelhos machos brancos (Nova Zelândia), variação *albinus*, com idade de aproximadamente 5 meses e peso corporal entre 3 e 4 Kg. Os animais foram divididos em 3 períodos experimentais: 15, 30 e 60 dias pós-operatórios (10 animais/ período), nos quais 5 animais, em cada período, receberam 1 implante em cada tibia, e os outros 5 animais apenas um implante na tibia direita ou esquerda. A definição da escolha da tibia (lado direito ou esquerdo) foi realizada de forma aleatória, por meio de sorteio, com o intuito de não influenciar no resultado (Fluxograma 01).



Fluxograma 01 – Exemplificação da divisão dos grupos.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho, Primor) e água “ad libitum”, exceto no período de oito horas antecedentes ao ato cirúrgico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (número protocolo: 02388-2011).

### *3.1 Procedimento cirúrgico*

Os animais foram sedados administrando, por via intramuscular, a combinação de 50mg/kg de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Em seguida, foi realizada tricotomia em ambas tíbias e antissepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), associado ao PVPI tópico. Após a degermação, os animais receberam anestesia local por meio de cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) para auxiliar na hemostasia do campo operatório.

Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha), foi realizada uma incisão de 3 cm de comprimento na porção medial das tíbias, até a base óssea e, a seguir, o tecido mole foi divulsionado e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo-se, deste modo, o osso para receber os implantes (Figura 1 e 2).

O preparo dos leitos receptores foi iniciado com uma trefina de 6.1 mm para delimitar a localização dos implantes e remover a primeira cortical óssea (Figura 3). Em seguida, no centro do orifício de 6.1 mm, foram utilizadas as fresa lança, fresa de 2.0 mm, piloto de 2.0/3.0 mm e fresa de 3.0 mm passando pela segunda cortical, seqüencialmente, na velocidade máxima de perfuração de 1200 RPM, com irrigação

constante com cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), durante toda a preparação (Figura 4 e 5).

Posteriormente, foi instalado 1 implante de 4,1 mm/8,5 mm cônicos (SIN – Sistemas de Implantes, São Paulo – SP, Brasil), na porção medial da tíbia, com um torque de 40N, com o auxílio de motor e contra-ângulo, totalizando 45 implantes (Figura 6). Em seguida, foi colocado o parafuso de cobertura.

Os defeitos foram preenchidos por: I. coágulo sanguíneo (CO), II. Bio-Oss<sup>®</sup> - (Geistlich Pharma AB, Wolhusen, Switzerland) - (BI), e III - Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen - (Geistlich Pharma AB, Wolhusen, Switzerland) – (BC) (Figura 7).

Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em diferentes planos, empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo, a fim de obter o fechamento primário da ferida. Após a sutura, novamente foi realizada a anti-sepsia da área com PVPI (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

No pós-operatório, os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1mL/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) com uma dose no pós-operatório imediato e outra dose após 5 dias e de Dipirona Sódica (1mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) totalizando 3 doses. Nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, durante todo o experimento.

Nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de pentobarbital 200mg/kg.

### 3.2 *Análise Biomecânica*

As metáfises tibiais de 10 coelhos foram reabertas, nos períodos de 15, 30 e 60 dias para exposição dos implantes e remoção dos mesmos por meio do torque reverso. Nos períodos de 30 e 60 dias, os implantes apresentaram-se parcial ou totalmente cobertos por tecido ósseo, e foi necessário realizar a ostectomia com o auxílio de uma fresa esférica número 2, sob irrigação abundante com soro fisiológico, para permitir a exposição do módulo de rebordo quadrado do implante e conseqüente adaptação da chave intermediária e do torquímetro.

Em seguida, o torquímetro analógico (ATG24CN, Tohnichi, Tokyo, Japan/[www.tohnichi.co.jp](http://www.tohnichi.co.jp)) com escala graduada de 3 N.cm à 24 N.cm foi acoplado à chave adaptadora intermediária, e foi aplicada a força de torque reverso para remoção dos implantes. Para o teste foi aplicado um movimento anti-horário aumentando o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm).

Para a comparação entre os valores médios de torque-reverso, obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, foi realizado inicialmente o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Como as distribuições apresentaram-se normais, aplicou-se o teste paramétrico One-Way ANOVA, adotando-se o nível de significância de 5%. Nos casos em que houve diferença significativa, aplicou-se, em seguida, o teste de Tukey, para comparações entre os grupos.

### *3.3 Processamentos Histológico*

Após a remoção dos implantes por torque-reverso, as amostras de tíbia, contendo a região de interface osso/implante, foram removidas e imersas em formalina neutra tamponada a 10%, durante 48 horas. Em seguida, foi realizada a descalcificação das mesmas em ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 5%, por 3 meses. Finalizado o processo de descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. A partir dos blocos de parafina contendo porções de tíbia foram obtidos cortes de 5 e 6  $\mu\text{m}$  de espessura. Cortes seriados de 6  $\mu\text{m}$  foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e utilizados para a análise morfológica do processo de reparo ósseo ocorrido nos diferentes grupos estudados.

Para análise dos resultados, foi utilizada uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) acoplada à um microscópio de luz (Leica Aristoplan Microsystems- Leitz, Bensheim, Alemanha), em aumento final de 125x.

### *3.4 Análise Imunoistoquímica*

Para a análise imunoistoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos primários: osteoprotegerina (OPG, Goat anti-OPG - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (RANKL, Goat anti-RANKL - Santa Cruz Biotechnology, SC7627), osteocalcina (OC, Goat anti-OC – Santa Cruz Biotechnology, SC18319), fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP, Goat anti-TRAP – Santa Cruz Biotechnology) e runt-related transcription factor 2 (Runx2, Goat anti-runx2 – Santa Cruz Biotechnology).

O método de detecção foi pela imunoperoxidase, utilizando-se como anticorpo secundário o anticorpo biotinilado anti-cabras e produzido em burros (Jackson Immunoresearch). A amplificação do sinal foi realizada pela Avidina/Biotina (Vector Laboratories) e as reações foram reveladas utilizando-se diaminobenzidina (DAB, Dako) como cromógeno. Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e passaram pelas etapas de desidratação e montagem da lâmina com *Permount*.

Foram realizados procedimentos de controle negativo por meio da omissão dos anticorpos primários. A cortical inferior da tíbia dos coelhos foi utilizada como controle positivo, a fim de verificar a efetividade dos anticorpos utilizados.

A expressão das proteínas foi analisada na região das espiras do implante, por meio da atribuição de escores, hiperpositivo, superpositivo, positivo e negativo, de acordo com a metodologia previamente descrita (Queiroz et al. 2008). Foi obtida também a razão RANK-L: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).

A comparação de cada grupo entre si nos diferentes períodos, bem como a comparação dos diferentes grupos para cada período, foi realizada por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis para a comparação de médias percentuais de marcações celulares, adotando-se o nível de significância de 5%. Nos casos em que houve diferença estatisticamente significativa, aplicou-se, em seguida o teste de Mann-Whitney ( $\alpha = 5\%$ ).

## ***RESULTADOS***



## 4. Resultados

O pós-operatório transcorreu sem intercorrências em todos os coelhos. Não foram observadas complicações tais como reações alérgicas, fraturas ou infecções, em nenhum período do estudo.

### 4.1 Análise Biomecânica

Foram considerados os valores absolutos de torque reverso, em N.cm, nos grupos CO, BI e BC, nos períodos de 15, 30 e 60 dias. Esses valores estão demonstrados na tabela 1, destacando as médias e desvios padrão.

Na comparação de cada grupo entre si, nos diferentes períodos, observou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes nos grupos CO e BI. Porém, no grupo BC, o período de 15 dias evidenciou estatisticamente um menor torque de remoção quando comparado ao período de 30 dias ( $p = 0,005$ ). Entretanto, na comparação de 15 e 60 dias, essa diferença não ocorreu ( $p=0,273$ ).

Já na comparação dos diferentes grupos em cada período, observou-se que, no período de 30 dias, o grupo BC apresentou, estatisticamente, maior torque que o grupo CO ( $P=0,005$ ).

Avaliando a figura 8, pode-se notar que os valores médios de torque-reverso nos grupos BI e BC aumentaram de 15 para 30 dias, contudo apresentaram redução de 30 para 60 dias. Estes resultados diferem do encontrado no grupo CO. Neste grupo, os valores médios de torque-reverso, por período, tendem a manterem-se constantes de 15 para 30 dias, aumentando no período de 60 dias.

## 4.2 *Análise Morfológica*

### 4.2.1 – Período de 15 dias

Decorridos 15 dias do pós-operatório, no grupo CO, a região das espiras do implante (EI), nota-se a etapa inicial do processo de reparo com a intensa proliferação de tecido conjuntivo (C) e a presença de remanescente de coágulo sanguíneo. Há presença de tecido conjuntivo em contato direto com a superfície do implante (Figura 9a). Na região da cortical superior (CS) nota-se a presença da linha cementante (setas) e as trabéculas ósseas (O) foram circundadas por tecido conjuntivo celularizado (C) (Figura 10a).

Nos grupos BI e BC na região das espiras (EI) há o início da neoformação óssea (O) com osteoblastos na área de contato osso/implante e a presença de tecido conjuntivo (C) no interior da espira (Figura 9b e 9c). Na cortical superior (CS), observa-se a presença da linha cementante (setas), e o osso neoformado (O) envolvendo o biomaterial (B), com presença de tecido conjuntivo (C) (Figura 10b e 10c).

### 4.2.2 Período de 30 dias

No grupo CO aos 30 dias do pós-operatório, nas regiões das espiras do implante e da cortical óssea superior observa-se em quase toda sua extensão a presença de tecido conjuntivo (C), sem sinais de osseointegração (Figura 9d e 10d).

Em contrapartida, nos grupos BI e BC pode-se notar, na região das espiras (EI) a neoformação óssea (O) com osteoblastos em quase todo o perímetro de contato osso/implante e a discreta presença de tecido conjuntivo (C) (Figura 9e e 9f). Na

cortical superior (CS) observa-se o osso neoformado (O) envolvendo o biomaterial (B), com discreta presença de tecido conjuntivo (C) (Figura 10e e 10f).

#### 4.2.3 Período de 60 dias

No período de 60 dias do pós-operatório, o grupo CO, observa-se características similares ao período anterior, isto é, as regiões das espiras do implante e da cortical superior observa-se a presença de tecido conjuntivo fibroso (C), sem sinais de osseointegração (Figura 9 g e 10g).

Os grupos BI e BC apresentam respostas similares na região das espiras, nos quais nota-se, a presença do biomaterial acelular envolto por tecido conjuntivo (Figura 9 h e 9i). Na região da cortical superior do grupo BI o biomaterial (B) apresenta-se circundado por tecido conjuntivo fibroso (C) (Figura 10h).

No entanto, na região da cortical superior, no grupo BC as partículas do biomaterial (B) são envoltas por trabéculas ósseas (O). Neste período parece haver uma redução do número e do volume das trabéculas ósseas (Figura 10i).

#### 4.3 *Análise Imunoistoquímica*

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas OC, Runx 2, OPG, RANKL e TRAP analisadas durante o processo de reparo na interação tecido ósseo/implante.

#### 4.3.1 OSTEOCALCINA - (OC)

A marcação de fundo, característica da OC, foi observada na região das espiras do grupo coágulo em todos os períodos, o que comprovou a viabilidade celular do grupo. Na comparação do grupo CO, entre os diferentes períodos, no tempo de 15 dias as imunomarcações observadas apresentaram níveis positivos, sendo diferente estatisticamente dos períodos de 30 e 60 dias, os quais apresentaram imunomarcações superpositivas (Figura 11a, 11d e 11g).

No grupo BI, a OC apresentou marcação positiva, mantendo o valor equilibrado em relação ao aumento do período pós-operatório (Figura 11b, 11e, 11h). No entanto, nota-se pela figura 12 a tendência de redução da expressão dessa proteína entre os períodos de 15 e 30 dias, e o equilíbrio entre 30 e 60 dias.

Já no grupo BC, a expressão de OC variou de superpositivo a positivo, no período inicial e nos finais, respectivamente (Figura 11c, 11f, 11h). Por meio da análise estatística foi confirmada a diferença estatística do período de 15 dias com os demais tempos. (Figura 12).

Na comparação entre os 3 grupos em relação a OC, no período de 15 dias houve diferença estatística entre os grupos CO e BC, sendo a expressão dessa proteína maior no biomaterial (Figura 12). No período de 30 dias não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, no entanto, pela avaliação gráfica nota-se uma tendência a maior expressão de OC no grupo coágulo nesse período. Já no período de 60 dias, o grupo CO apresentou, estatisticamente, uma maior expressão de OC quando comparado aos grupos dos biomateriais.

#### 4.3.2 RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2 - (RUNX 2)

A expressão de Runx 2 para os grupos CO e BC não apresentou diferença estatística, mantendo a expressão para essas proteínas em equilíbrio nos períodos estudados (Figura 13a e 13c). Porém no grupo CO, houve uma tendência a redução de sua marcação, de positivo para negativo, no período de 60 dias (Figura 13g).

No grupo BI, a proteína Runx 2, exibiu imunomarcações de níveis negativos a positivos. Esses dados proporcionaram uma diferença estatisticamente significativa, entre os períodos de 15 e 30 dias, com menor expressão no tempo inicial (Figura 13b, 13e, 13h e 14).

Na comparação entre os grupos, o BI apresentou no período de 15 dias, uma expressão estatisticamente menor para Runx 2 quando comparado aos grupos CO e BC. Porém nos períodos de 30 e 60 dias houve um equilíbrio na expressão dessa proteína nos 3 grupos (Figura 14).

#### 4.3.3 OSTEOPROTEGERINA - (OPG)

Nos grupos CO e BC, as imunomarcações observadas para OPG foram mantidas entre os níveis negativo e positivo, não apresentando alteração qualitativa na sua dinâmica em relação aos períodos analisados (Figuras 15a, 15c, 15d, 15f, 15g e 15i).

Em contrapartida no grupo BI, observou-se que as marcações de OPG que variam de positivo a superpositivo, sendo confirmado pelo teste de Mann-Whitney uma diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 30 e 60 dias, sendo maior a expressão dessa proteína no período de final. (Figura 15b, 15e, 15h e 16).

A OPG, nos períodos de 15 e 30 dias, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos. Todavia, no período de 60 dias houve diferença estatística da sua expressão para o grupo BI em relação ao CO, com maior expressão de OPG no grupo BI (Figura 16).

#### 4.3.4 LIGANTE DO RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR $\kappa$ B (RANK-L)

As imunomarcações observadas RANK-L, no grupo CO, foram mantidas entre os níveis negativo e positivo. Os valores relacionados à expressão dessas proteínas foram comparados e nos períodos de 15 e 30 dias, para RANK-L, apresentaram diferença estatística quando confrontado com o 60 dias, sendo que esses períodos iniciais se mantiveram constantes com níveis de imunomarcações positivas, já o tempo final observou-se negativa para as marcações (Figura 17a, 17d e 17g).

No grupo BI, a expressão de RANK-L não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos períodos analisados (Figura 17b, 17e , 17h), todavia, foi observado uma redução gradativa de sua expressão em relação ao aumento do período, variando os níveis de imunomarcações de positivo para superpositivo (Figura 18).

Os níveis de imunomarcações para RANK-L, no grupo BC, foram de negativo a positivo, sendo que em RANK-L a diferença estatística foi confirmada entre os períodos de 30 e 60 dias, com a redução da expressão dessa proteína no tempo final (Figura 17c, 17f, 17i e 18).

Na comparação entre os grupos, a expressão de RANK-L para o período de 15 dias, mostrou-se maior estatisticamente no grupo BI quando comparada aos grupos CO e BC. Já no período de 30 dias não houve diferença estatística, mantendo um equilíbrio

da expressão dessa proteína entre os grupos. No período de 60 dias o grupo BI apresentou a expressão de RANK-L estatisticamente maior que o grupo CO (Figura 18).

A razão RANK-L/OPG não apresentou diferenças estatística entre os grupos. No entanto, o grupo BC apresentou uma tendência à menores valores dessa razão em relação aos outros grupos estudados, nos períodos analisados (Tabela 02).

#### 4.3.5 FOSFATASE ÁCIDA TARTARATO-RESISTENTE – (TRAP)

Em relação à TRAP, no período de 60 dias, grupo CO apresentou uma tendência ao aumento de sua expressão, de negativa para positiva, o que indica uma maior tendência à reabsorção do que a neoformação óssea. No entanto, não apresentou diferença estatisticamente significativa, mantendo a expressão para essa proteína em equilíbrio (Figuras 19a, 19d e 19g).

A expressão da TRAP, no grupo BI, mostrou-se em equilíbrio, não apresentando diferença estatística na comparação entre os períodos estudados. Contudo, pela avaliação gráfica pode-se notar um discreto aumento da expressão dessa proteína no período de 30 dias em relação aos outros (Figura 19b, 19e, 19h e 20). Em relação ao grupo BC estes não houve diferença estatística, porém no período e 60 dias houve uma tendência ao aumento de sua expressão (Figura 19c, 19f, 19i).

No balanço da expressão da TRAP, pela avaliação estatística não foi encontrada diferença entre os grupos nos períodos estudados (Figura 20).

*DISCUSSÃO*



## 5. Discussão

Pesquisas realizadas para avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos peri-implantares preenchidos com biomateriais, são amplas na literatura, tanto com modelo experimental animal (Botticelli et al. 2003; Araújo et al. 2011; Park et al. 2011), como em humanos (Zerbo et al. 2001; Botticelli et al. 2008). Essa reconstrução pode ser avaliada através do comportamento clínico, histológico, imaginológico e pela técnica de imunoistoquímica. Neste estudo, optou-se por coelhos, como modelo experimental, sendo utilizada a porção medial da tíbia direita do coelho como área receptora, pois essa área está localizada distante do centro de crescimento, a metáfise tibial.

O tratamento para alvéolos frescos, isto é, defeitos ósseos de 5 paredes, é realizado de forma satisfatória com a manutenção do coágulo sanguíneo na região (Martin & Burr, 1989). Todavia, o preenchimento desses alvéolos com biomaterial é indicado com o objetivo de preservar as dimensões do rebordo alveolar e promover o reparo (Mardas et al. 2010). Além disso, os biomateriais colocados simultaneamente à instalação dos implantes dentários podem favorecer a restauração funcional e estética do sistema estomatognático.

Devido à sua conicidade intrínseca, após a extração dentária, o alvéolo frequentemente apresenta dimensões maiores que o diâmetro de um implante, formando um espaço entre a região cervical do implante e o tecido ósseo. Estudos avaliam esse *gap* marginal, associado ou não ao biomaterial (Botticelli et al. 2008; Araújo et al. 2011; Queiroz et al. 2012). Akimoto et al., em 1999, demonstraram que o diâmetro do defeito ósseo influencia diretamente a porcentagem do contato osso/implante, destacando a importância da utilização dos biomateriais para o preenchimento desses defeitos. Dessa forma o intuito desse trabalho foi analisar o processo de reparo ósseo ao redor do

implante dentário em áreas preenchidas com coágulo sanguíneo, Bio-Oss<sup>®</sup> e Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen.

Schenk & Willenegger, realizaram um estudo em coelhos, e relataram comprometimento na formação óssea em defeitos peri-implantares acima de 1 milímetro. No mesmo modelo experimental, Carlsson et al., 1988, concluíram que os *gaps* residuais permanecem em defeitos de 0,85 mm Corroborando com as pesquisas supracitadas nesse trabalho foi confeccionado um defeito peri-implantar cujo diâmetro cervical foi 1 milímetro maior que o diâmetro do implante, simulando assim a instalação de um implante dentário em um alvéolo fresco de extração. A ausência da observação de osso neoformado nas áreas cervicais e médias (medulares), no grupo coágulo sanguíneo, nos períodos estudados, confirmou que os *gaps* residuais permaneceram.

Nos grupos BI e BC, no período de 15 e 30 dias do pós-operatório, observou a neoformação óssea significativa na área de contato osso/implante com a presença do biomaterial. Porém aos 60 dias pós-operatórios, nota-se no grupo BI, a presença do biomaterial acelular envolto por tecido conjuntivo. Corroborando com essa pesquisa, Carmagnola e colaboradores (2000), avaliaram as reações teciduais ao redor de implantes utilizando Bio-Oss<sup>®</sup> e concluíram que o osso bovino não se integrou com o osso hospedeiro, após 4 meses, fato que os autores sugerem ser devido a área do defeito ósseo criado ser ampla e profunda. No modelo experimental estudado, o leito receptor foi a tíbia do coelho, essa área apresenta uma região medular, na qual há ausência de trabéculas ósseas, caracterizando a falta de arcabouço ósseo para prover suporte ao biomaterial. Em outro estudo, Carmagnola et al., em 2003, realizou uma pesquisa em humanos e afirmou que o Bio-Oss<sup>®</sup> possui uma lenta reabsorção e reparo com encapsulamento de fibras fato que acarreta em aumento no tempo remodelação óssea.

Essa evidencia também foi confirmada em estudos experimentais por Artzi et al., em 2000 e 2001, os autores comprovaram a presença de partículas de biomaterial não reabsorvidas envoltas por tecido conjuntivo.

No entanto, Araújo e colaboradores, em 2011, realizaram um estudo em cães para avaliar o processo de reparo de defeitos peri-implantares utilizando Bio-Oss® Collagen, após 6 meses as biopsias foram coletadas e a análise histológica realizada. Os autores concluíram que o Bio-Oss® Collagen inserido no *gap* peri-implantar modificou o processo de cicatrização do tecido duro, favorecendo a região de contato osso/implante. Corroborando, Han (2011) realizou um estudo em cães e notou no período de 8 semanas que as partículas de Bio-Oss® e do Bio-Oss® Collagen mostraram a completa integração e contato direto com o tecido ósseo.

A estabilidade primária está diretamente relacionada ao sucesso da terapia com implante dentário, pois é essencial para o processo da osseointegração (Ivanoff et al. 1996; Nkenke et al. 2003). Os implantes não estáveis podem gerar a formação de tecido conjuntivo fibroso ao seu redor (Lioubavina-Hack et al. 2006). A análise biomecânica da osseointegração em animais é realizada normalmente por meio das forças de torque de reverso, sendo diretamente proporcional a porcentagem de contato entre osso/implante (Klokkevold et al. 2001; Moriya et al. 2006).

Nesse estudo, o teste biomecânico foi realizado para analisar a qualidade física de embricamento da superfície do implante com o tecido ósseo, nos grupos: CO, BI e BC, por meio da aplicação de uma força de torque reverso nos implantes, sendo o movimento de contra torque interrompido imediatamente após a ruptura da interface osso-implante. Por meio dessa análise foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa no grupo Bio-Oss® Collagen quando comparado os períodos de 15 e 30 dias.

Na comparação entre os grupos CO e BC, pela análise biomecânica, no período de 30 dias, o grupo BC apresentou, estatisticamente, maiores valores de torque de remoção. Acredita-se que esse fato ocorra, pois o colágeno é reabsorvido rapidamente e as partículas de Bio-Oss<sup>®</sup> permanecem e atuam como um arcabouço favorecendo a mineralização ao redor dos grânulos de enquanto que o grupo CO não possui esse arcabouço (Wong & Rabie 2010).

Nos grupos BI e BC, há uma tendência a diminuir o torque no período de 60 dias, mas não há diferença estatística. Esse resultado da análise biomecânica está de acordo com os resultados histológicos nos grupos BI e BC, pois nota-se a presença de tecido conjuntivo ao redor do biomaterial no período de 60 dias. Concordando com o estudo realizado por Antunes e colaboradores, em 2011, no qual avaliaram a diferença no processo de reparo em defeitos peri-implantares e concluíram que implantes associados com o Bio-Oss<sup>®</sup> possuíam baixa estabilidade, no período de 2 meses. Outro fator que pode influenciar a análise biomecânica é o implante não receber carga mecânica, pois o carregamento pode gerar um efeito positivo sobre o contato osso/implante em regiões de defeitos peri-implantares preenchidas ou não com enxertos (Zambon, et al. 2012).

A análise imunoistoquímica fornece importantes informações em relação ao comportamento celular, de acordo com a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo ósseo durante o processo de osseointegração. As proteínas analisadas neste estudo foram OC, RUNX2, OPG, RANKL e TRAP.

A RUNX 2 é um fator de transcrição pertencente à família de genes Runt (Xiao et al. 1998) encontrada nos pré-osteoblastos e osteoblastos jovens. Essa proteína regula a diferenciação dos osteoblastos, a formação da matriz extracelular e a mineralização óssea (Ducy et al. 2000), possuindo assim um papel essencial na formação e

desenvolvimento do tecido ósseo. Sua ação pode ocorrer por meio de ligações com regiões específicas do DNA ou pela ativação de uma reação em cascata recrutando enzimas que vão catalisar a transcrição de genes osteoblásticos (Drissi et al. 1998). Nessa pesquisa a expressão da proteína RUNX 2 para o grupo BI no período de 15 dias foi menor estatisticamente quando comparada aos grupos CO e BC, isto ocorre pois o Bio-Oss<sup>®</sup> é um material osteocondutor e possui maior volume de partículas não reabsorvíveis, contendo pequeno espaço entre essas partículas para a neoformação óssea. Já o grupo no BC o colágeno é degradado rapidamente (Araújo et al. 2010), gerando maior espaço para a neoformação óssea apresentando assim uma maior expressão de RUNX 2. Nos períodos de 30 e 60 dias o padrão das imunomarcações manteve-se em equilíbrio.

Outra proteína estudada foi a osteocalcina que é expressa por osteoblastos e na matriz óssea liga-se à hidroxiapatita. (Thorwarth et al. 2005). Participa da maturação da parte mineral do osso, sendo expressa somente após os osteoblastos terem cessado a atividade proliferativa (Boskey 1998), estabelecendo um estado diferenciado e maduro dessas células (Hauschka et al. 1983). Sua atuação ocorre nos estágios iniciais do reparo ósseo, sendo essencial na regulação da atividade osteoblástica (Chenu et al. 1994). Nesse trabalho a expressão de osteocalcina, no período de 15 dias, foi maior estatisticamente no grupo BC quando comparado ao CO, esse resultado está associado com a alta expressão de RUNX 2 para o grupo BC. No período de 60 dias, o grupo CO apresentou maior expressão de osteocalcina em relação BI e BC. Esse fato ocorre, pois a mineralização óssea ocorre antes dos 60 dias devido ao turn over do coelho ser de aproximadamente 42 dias (Currey 1984, Martin 1989).

A osteoprotegerina é considerada uma proteína reguladora da formação e atividade de osteoclastos. Sua presença está envolvida com a inibição da reabsorção

óssea (Woo et al. 2002; Crotti et al. 2004). O padrão da expressão dessa proteína manteve-se similar nos 3 grupos no período de 15 e 30 dias, porém nos 60 dias o grupo BI apresentou uma maior expressão de osteoprotegerina comparado ao grupo CO. Em contrapartida, a expressão da proteína RANK-L está envolvida com a ativação da reabsorção óssea. Os resultados dessa pesquisa mostraram que nos períodos de 15 e 60 dias o grupo BI apresentou maior quantidade de imunomarcações em relação ao grupo CO.

Considerando que OPG e RANK-L têm funções opostas, a análise da expressão relativa das mesmas permite avaliar a influência a remodelação óssea (Suda et al. 1999). Dessa forma foi realizada a razão RANK-L/OPG para todos os grupos. Sendo que o grupo BC apresentou uma tendência à menores valores dessa razão em relação aos outros grupos estudados, nos períodos analisados. Dessa forma o Bio-Oss® Collagen possui uma maior tendência a inibição da reabsorção óssea.

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é uma proteína que está relacionada com a reabsorção óssea, sendo utilizada como importante marcador da atividade osteoclástica (Schwarz & O'Keefe, 2000). Os resultados dessa pesquisa mostram equilíbrio entre os grupos na expressão dessa proteína, indicando uma resposta de ativação de reabsorção semelhante entre eles.

A partir dos resultados imunoistoquímicos obtidos, foi possível observar que há uma resposta de formação óssea especialmente importante no grupo BC, como pôde ser observado com as imunomarcações para RUNX2 e Osteocalcina. A imunomarcação para osteoprotegerina também corrobora com esta observação. No entanto, é importante destacar que a reabsorção óssea, caracterizada pelas imunomarcações de RANKL e TRAP, evidenciam os osteoclastos em atividade, indicando que ao longo dos períodos

estudados, esta resposta foi constante, e que o *turnover* ósseo ao longo dos períodos analisados manteve-se constante.

Embora os resultados desta pesquisa tenham sido encorajadores, novos estudos estão sendo realizados para avaliar o comportamento histométrico do Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen, e assim comprovar os benefícios.

*CONCLUSÃO*



## **6. Conclusão**

Baseado na metodologia estudada pode-se concluir que o Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen, é um biomaterial com propriedades osteocondutoras satisfatórias.

## *REFERÊNCIAS*

## Referências Bibliográficas

1. Akimoto, K., Becker, W., Persson, R., Baker, D.A., Rohrer, M.D. & O'Neal, R.B. (1999) Evaluation of titanium implants placed into simulated extraction sockets: a study in dogs. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **14**: 351-360.
2. Antunes, A.A., Oliveira Neto, P., de Santis, E., Caneva, M., Botticelli, D. & Salata, L.A. (2011) Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 135–142.
3. Araújo, M.G., Liljenberg, B. & Linder, J. (2010) Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 55–64.
4. Araújo, M.G., Linder, E. & Lindhe, J. (2011) Bio-Oss Collagen in the gap at immediate implants: 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 1–8.
5. Artzi, Z., Tal, H. & Dayan, D. (2000) Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *Journal of Periodontology* **72**: 1015–1023.
6. Artzi, Z., Tal, H. & Dayan, D. (2001) Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 2: histochemical observations at 9 months. *Journal of Periodontology* **72**: 152–159.
7. Becker, W. & Becker, B.E. (1990) Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques

- and case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **10**: 376–391.
8. Becker, W., Becker, B.E. & Cafesse, R.A. (1994) Comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *Journal Periodontology* **65**: 1128-1133.
  9. Becker, B.E., Becker, W., Ricci, A. & Geurs, N. (1998) A prospective clinical trial of endosseous screw-shaped implants placed at the time of tooth extraction without augmentation. *Journal of Periodontology* **69**: 920–926.
  10. Berglundh, T. & Lindhe, J. (1997). Healing around implants placed in bone defects treated with Bio- Oss. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 117–124.
  11. Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducy, P. & Karsenty, G. (1998) Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bone of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* **23**:187-196.
  12. Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D. & Lindhe, J. (2003) The jumping distance revisited. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 35–42.
  13. Botticelli, D., Renzi, A., Lindhe, J. & Berglundh, T. (2008) Implants in fresh extraction sockets: a prospective 5-year follow-up clinical study. *Clinical Oral Implant Research* **19**: 1226-1232.
  14. Brägger, U., Hämmerle, C.H.F. & Lang, N.P. (1996) Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration (II). A cross-sectional

- study comparing the clinical outcome 1 year after immediate to standard implant placement. *Clinical Oral Implant Research* **7**: 268–276.
15. Brkovic, B.M., Prasad, H.S., Rohrer, M.D., Konandreas, G., Agrogiannis, G., Antunovic, D. & Sándor, G.K. (2012) Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. *Clinical Oral Investigation* **16**: 581-590.
  16. Buser, D., Dula, K., Hirt, H.P. & Schenk, R.K. (1996) Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* **54**:420–432.
  17. Carlsson, L., Röstlund, T., Albrektsson, B. & Albrektsson, T. (1988) Implant fixation improved by close fit. Cylindrical implant–bone interface studied in rabbits. *Acta Orthopædica Scandinavica* **59**: 272–275.
  18. Carmagnola, D., Berglundh, T., Araújo, M, Albrektsson, T. & Lindhe, J. (2000) Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *Journal Clinical Periodontology* **27**: 799–805.
  19. Carmagnola, D., Adriaens, P. & Berglundh, T. (2003) Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 137–143.
  20. Chen, S.T., Wilson, T.G. Jr. & Hammerle, C.H.F. (2004) Immediate or early placement of implants following tooth extraction: Review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *The International Journal Oral Maxillofacial Implants* **19**:12–25.

21. Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P.D. & Zallone, A.Z. (1994) Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *Journal Cell Biology* **127**:1149-1158.
22. 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.
23. Currey, J.D. The mechanical adaptations of bones, Princeton, NJ, 1984, Princeton. University Press.
24. Drissens, F.C., Planell, J.A., Boltong, M.G., Khairoun, I. & Ginebra, M.P. (1998) Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution Mechanical Engineers* **212**:427-435.
25. Ducy, P., Schinke, T. & Karsenty, G. (2000) The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**: 1501-1504.
26. Froum, S., Cho, S.C., Rosenberg, F., Rohrer, M. & Tarnow, D. (2002) Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *Journal of Periodontology* **73**:94–102.

27. Gelb, D.A. (1993) Immediate implant surgery: three-year retrospective evaluation of 50 consecutive cases. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **8**:388–399.
28. Gher, M.E., Quintero, G., Assad, D., Monaco, E. & Richardson, A.C. (1994) Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. *Journal of Periodontology* **65**: 881–891.
29. Gotfredsen, K. Warrer, K., Hjorting-Hansen, E. & Karring, T. (1991) Effect of membranes and hydroxyapatite on healing in bone defects around titanium implants. An experimental study in monkeys. *Clinical Oral Implant Research* **2**: 172-178.
30. Grunder, U., Polizzi, G., Goene, R., Hatano, N., Henry, P., Jackson, W.J., Kawamura, K., Kohler, S., Renouard, F., Rosenberg, R., Triplett, G., Werbitt, M. & Lithner, B. (1999) A 3-year prospective multicenter follow-up report on the immediate and delayed-immediate placement of implants. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **14**: 210–216.
31. Han, J.H., Shin, S., Herr, Y., Kwon, Y.H., & Chung, J.H. (2011). The effects of bone grafting material and a collagen membrane in the ridge splitting technique: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **22**: I391-I398.
32. Hauschka, P.V., Frenkel, J., De Muth, R. & Gundberg, C.M. (1983) Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *Journal Biology Chemical* **258**:176-182.

33. Heinemann, F., Hasan, I., Schwahn, C., Bourauel, C. & Mundt, T. (2011) Bone level change of extraction sockets with Bio-Oss collagen and implant placement: A clinical study. *Annals anatomy* **194**: 508-512.
34. Hurzeler, M.B., Quinones, C.R., Kirsch, A., Gloker, C., Schupbach, P., Strub, J.R. & Caffesse, R.G. (1997) Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovinederived bone matrix. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 476–486.
35. Ivanoff, C.J., Sennerby, L. & Lekholm, U. (1996) Influence of mono-and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **24**: 229-235.
36. Klokkevold, P.R., Johnson, P., Dadgostari, S., Caputo, A., Davies, J.E. & Nishimura, R.D. (2001) Early endosseous integration enhanced by dual acid 70 etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 350-357.
37. Lang, N.P., Brägger, U., Hämmerle, C.H. & Sutter, F. (1994) Immediate transmucosal implants using the principle of guided tissue regeneration. I Rationale, clinical procedures and 30-month results. *Clinical Oral Implants Research* **5**: 154–163.
38. Lazzara, R.J. (1989) Immediate implant placement into extraction sites: surgical and restorative advantages. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **9**: 332–343.



39. Lioubavina-Hack, N., Lang, N.P. & Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 244-250.
40. Mardas, N., Chadha, V. & Donos, N. (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clinical Oral Implant Research* **21**: 688–698.
41. Martin, R.B. & Burr, D.B. Structure, function and adaption of compact bone, New York, 1989, Raven Press.
42. Moriya, K., Maruo, Y. & Minagi, S. (2006) Does rotational strain at screw tightening affect the attainment or maintenance of osseointegration? *Clinical Oral Implants Research* **17**: 451-458.
43. Nemcovsky, C.E., Artzi, Z. & Moses, O. (1999) Rotated split palatal flap for soft tissue primary coverage over extraction sites with immediate implant placement. Description of the surgical procedure and clinical results. *Journal of Periodontology* **70**: 926–934.
44. Nevins, M., Camelo, M., de Paoli, S., Friedland, B., Schenk, R.K., Parma-Benfenati, S., Simion, M., Tinti, C. & Wagenberg, B. (2006) A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **26**: 19–29.
45. Nijweide, P. J., Burger, E. H. & Feyen, J. H. (1986) Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiology Review* **66**: 855-886.

46. Norton, M.R., Odell, E.W., Thompson, I.D. & Cook, R.J. (2003) Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 775–783.
47. Nkenke, E., Hahn, M., Weinzierl, K., Radespiel-Troger, M., Neukam, F.W. & Engelke, K. (2003) Implant stability and histomorphometry: a correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 601-609.
48. Nyman, S., Lang, N.P., Buser, D. & Brägger, U. (1990) Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **5**: 9–14.
49. Park, I.P., Kim, S.K. & Lee, J.H. (2011) The relationship between initial implant stability quotient values and bone implant contact ratio in the rabbit tibia. *Journal Advanced Prosthodontic* **3**:76-80.
50. Piattelli, A., Podda, G. & Scarano, A. (1997) Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials* **18**: 623-627.
51. Piattelli, M., Favero, G., Scarano, A., Orsini, G. & Piatteli, A. (1999) Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic longterm report of 20 cases in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 835–840.
52. Queiroz, T.P., Souza, F.A., Okamoto, R., Margonar, R., Pereira-Filho, V.A., Garcia-Jr, I. R. & Hochuli Vieira, E. (2008). Evaluation of immediate bone-cell

- viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* **66**: 1233-1240.
53. Queiroz, T. P., Souza, F. A., Okamoto, R., Luvizuto, E. R., Margonar, R., Garcia, I. R., Jr. & Hochuli Vieira, E. (2012) Compromised primary implant stability. *Journal Craniofacial Surgery* **23**: e524-528.
54. 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 Orthopedic Research*, **22**:1025-1034. United States.
55. Rogers, A. & Eastell, R. (2005) Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kB ligant: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**: 6323-6331.
56. Rosenquist, B. & Grenthe, B. (1996) Immediate placement of implants into extraction sockets: implant survival. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**: 205–209.
57. Schenk, R. & Willenegger, H. (1977) Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgrösse. *Unfallheilkunde* **80**: 155.
58. Schropp, L., Wenzel, A., Kostopoulos, L. & Karring, T. (2003) Bone healing and soft tissue contour changes following single tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *International Journal Periodontics Restorative Dentistry* **23**:313–323.

59. Schulte, W. & Heimke, G. (1976). The tubinger immediate implant. *Quintessence* **27**: 17 - 23.
60. Schwartz-Arad, D. & Chaushu, G. (1997) Placement of implants into fresh extraction sites: 4–7 years retrospective evaluation of 95 immediate implants. *Journal of Periodontology* **68**: 1110–1116.
61. Schwarz, E.M. & O`Keefe, R.J. (2000) Breakthrough in bone: the molecule mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed. *Current Opinion in Orthopaedics* **11**(5): 329-335.
62. Shi, B., Zhou, Y., Wang, Y.N. & Cheng, X.R. (2007) Alveolar ridge preservation prior to implant placement with surgical-grade calcium sulfate and platelet-rich plasma: a pilot study in a canine model. *Journal Oral Maxillofacial Implants* **22**:656–665.
63. 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.
64. 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.
65. Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, E., Wiltfang, J. & 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.

66. Trejo, P.M., Weltman, R. & Cafesse, R. (2000) Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. *Journal Periodontology* **71**: 1852-1861.
67. Woo, K.M., Choi, Y., Ko, S.-H., Oh, K.O. & Kim, K.K. (2002) Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Experimental and Molecular Medicine* **34**: 347-352.
68. Wong, R.W.K. & Rabie, A.B.M. (2010) Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen Matrix on Bone Formation. *The Open Biomedical Engineering Journal* **4**: 71-76.
69. Yildirim, M., Spiekermann, H., Biesterfeld, S. & Edelhoff D. (2000) Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio- Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clinical Oral Implants Research* **11**: 217–229.
70. Xiao, Z.S., Thomas, R., Hinson, T.K. & Quarles, L.D. (1998) Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene* **214**:187-197.
71. Zambon, R., Mardas, N., Horvath, A., Petrie, A., Dard, M. & Donos, N. (2012) The effect of loading in regenerated bone in dehiscence defects following a combined approach of bone grafting. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 591-601.

72. Zerbo, I.R., Bronckers, A.L.J.J., de Lange, G.L., van Beek, G.J. & Burger, E.H. (2001) Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. *Clinical Oral Implants Research* **12**:379–384.

***FIGURAS***



Figura 01 – Incisão na porção medial da tíbia do coelho.

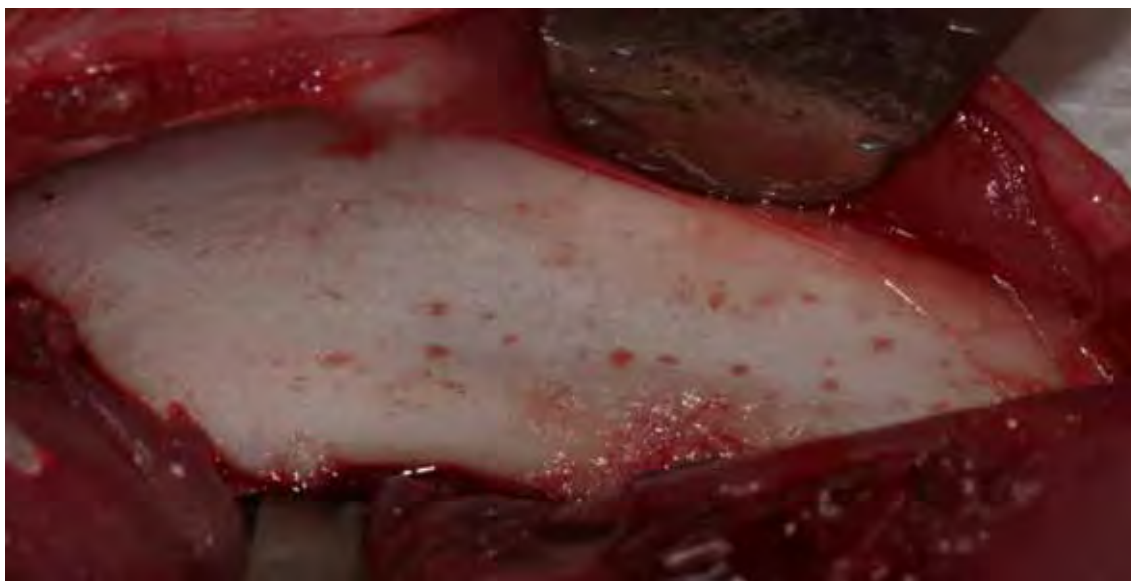


Figura 02 - Acesso cirúrgico à cortical superior da tíbia do coelho.





Figura 03 - Trefina de 6.1 milímetros para delimitar a localização dos implantes e remover a primeira cortical óssea.

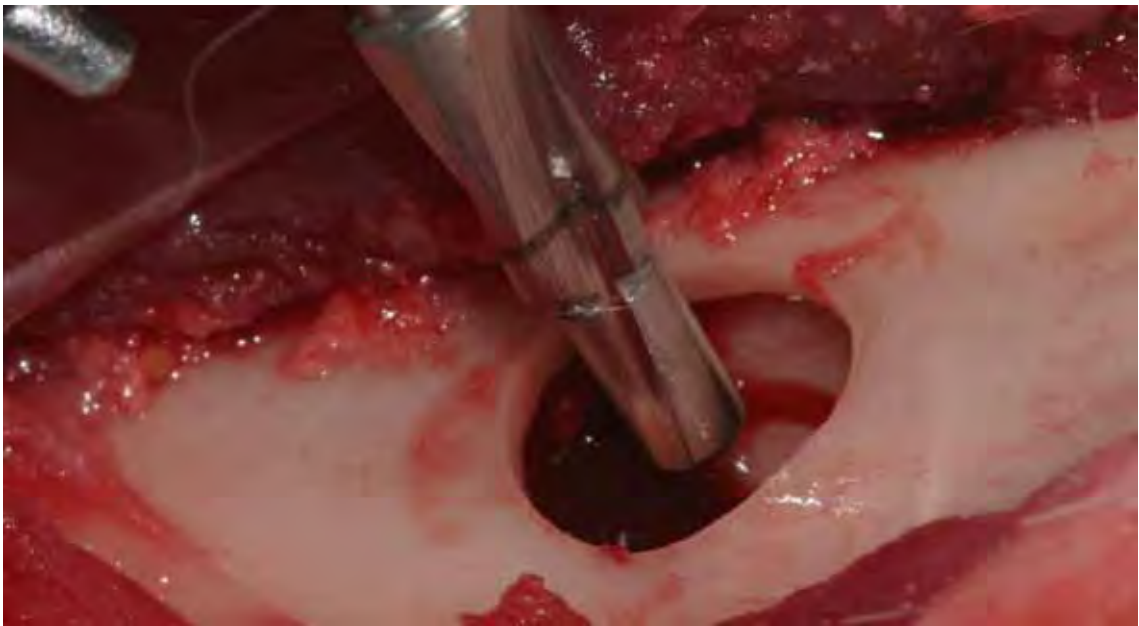


Figura 04 - Broca piloto utilizada para alargar o orifício na segunda cortical de 2 para 3 milímetros.

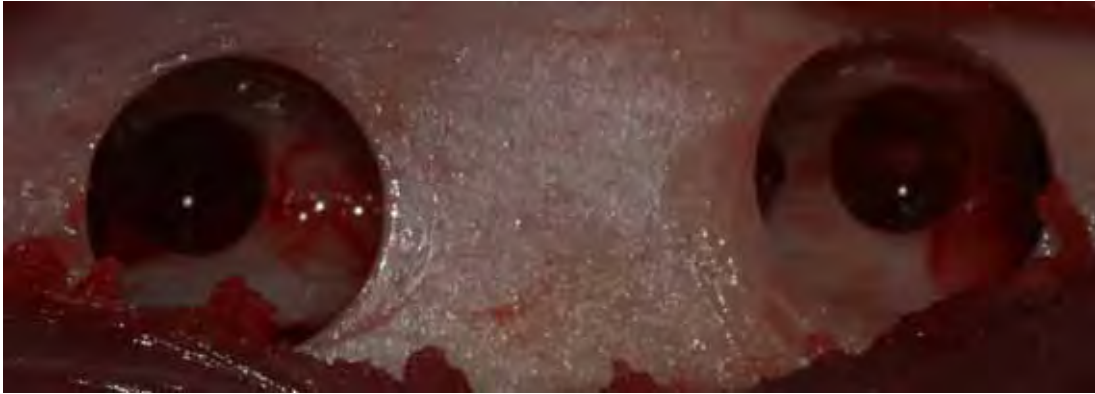


Figura 05 - Os dois defeitos confeccionados, com 6.1 milímetros na primeira cortical e 3 milímetros na segunda cortical.



Figura 06 – Instalação do implante.

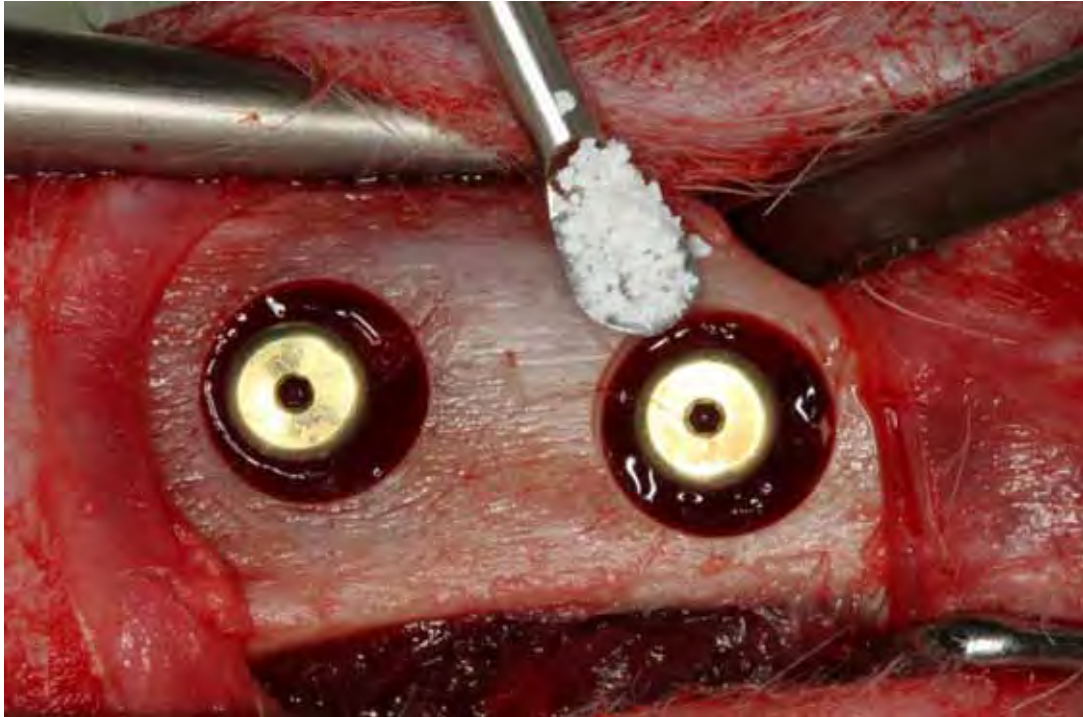


Figura 07 - Preenchimento do defeito peri-implantar com biomaterial.

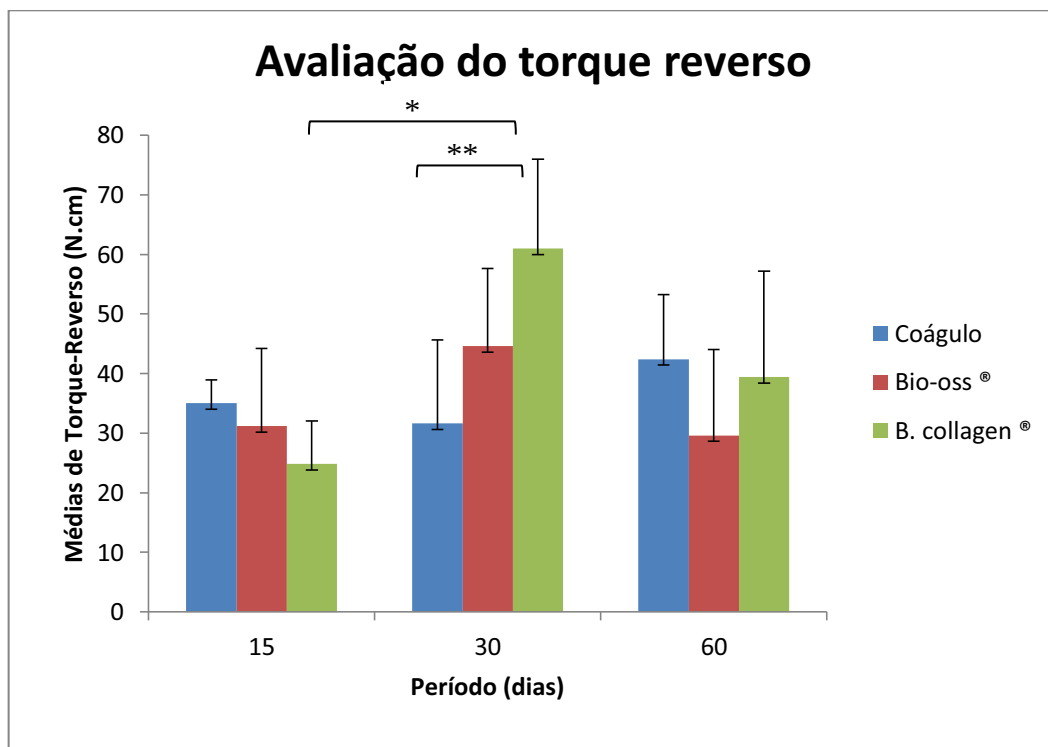


Figura 08: Representação gráfica de médias e desvio padrão do torque reverso (colunas), em N.cm, em relação aos períodos (dias). (ANOVA e Teste de Tukey -  $p < 0,05$ ). No grupo BC: \* 15dias  $\neq$  30dias. No período de 30 dias: \*\* CO  $\neq$  BC.



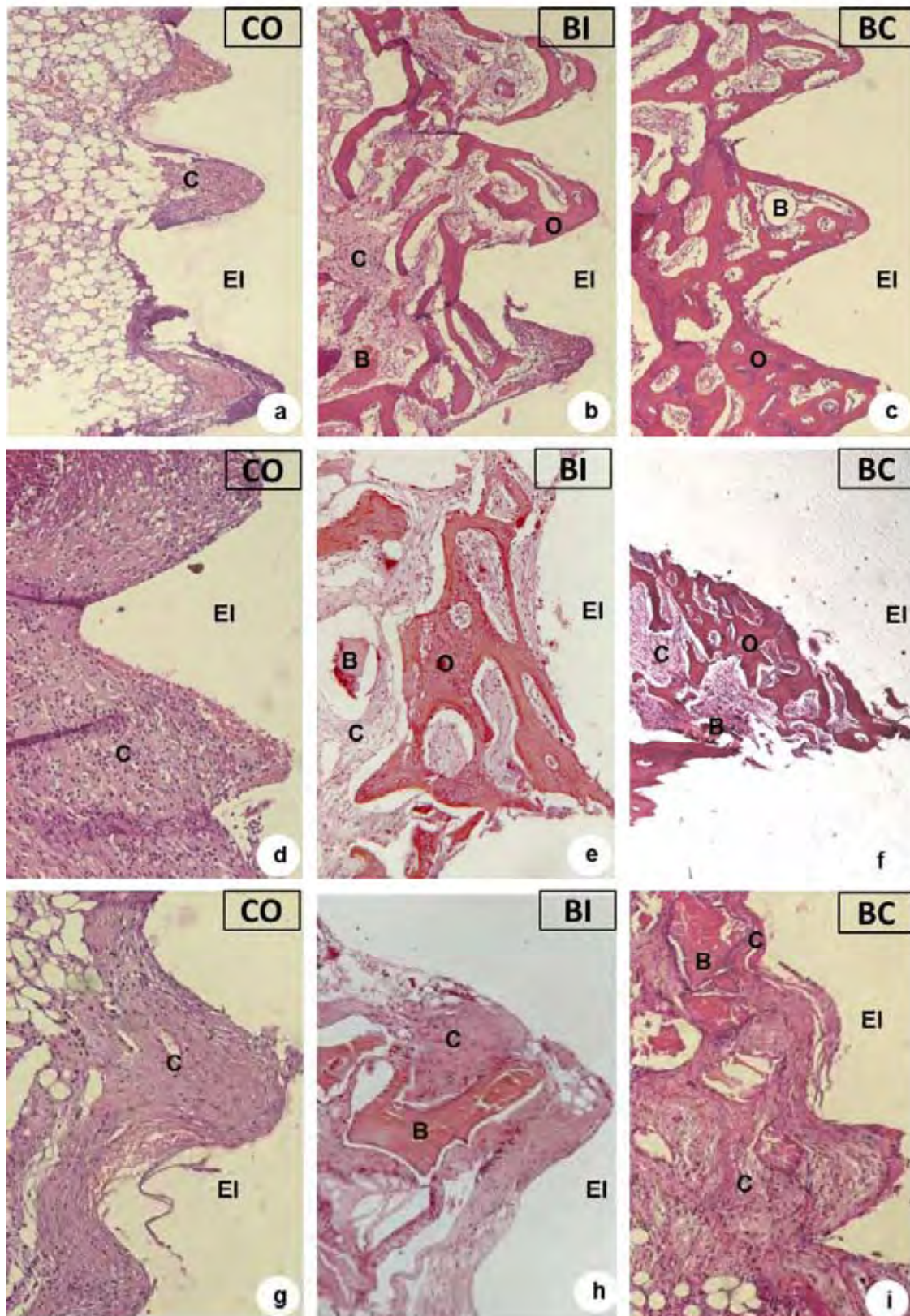


Figura 09: Fotomicrografias de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), contendo porções de tecido previamente localizadas entre as espiras dos implantes (EI) nos grupos CO (9a, 9d e 9g), BI (9b, 9e e 9h) e BC (9c, 9f e 9i), nos períodos de 15 (9a-9c), 30 (9d-9f) e 60 dias (9g-9h). Aumento original: 120x. No período de 15 dias, é possível observar a presença de trabéculas ósseas (O) nos grupos BI e BC, com predominância no BC. No Grupo CO observa-se tecido conjuntivo fibroso (C) em todos os períodos investigados (9a, 9d e 9g). Aos 30 dias ainda é possível observar trabéculas ósseas (O) no BI e BC (9e e 9f, respectivamente). Em todos os períodos observa-se a presença de biomaterial (B) nos grupos BI e BC. No período de 60 dias (9g, 9f e 9i), observa-se nitidamente, nos grupos BI e BC, o tecido conjuntivo (C) envolvendo o biomaterial (B).



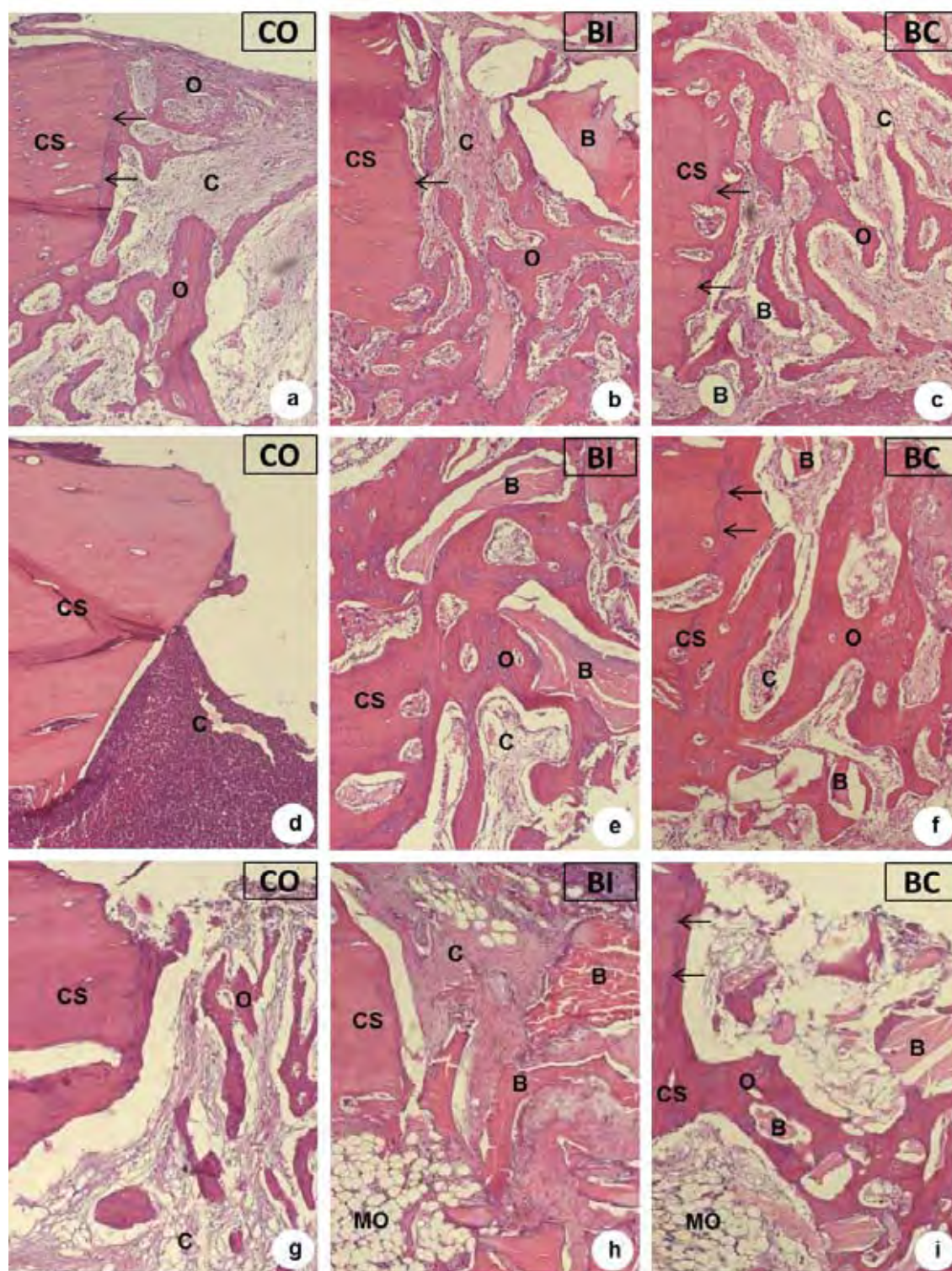


Figura 10: Fotomicrografias de cortes corados com HE, contendo porções de cortical superior (CS) e do defeito ósseo criado nos grupos CO (10a, 10d e 10g), BI (10b, 10e e 10h) e BC (10c, 10f e 10i), nos períodos de 15 (10a-10c), 30 (10d-10f) e 60 dias (10g-10i). Aumento original: 120x. Aos 15 dias, em todos os grupos observa-se linha cementante (setas), demarcando as áreas em que tecido ósseo (O) neoformado encontra-se em contato com o tecido ósseo da cortical superior (CS). Trabéculas ósseas (O), aparentemente estão presentes em maior número e volume nos grupos BI e BC. Nos grupos BI e BC é possível visualizar a presença dos biomateriais (B) (10b e 10c), respectivamente. Aos 30 dias nos grupos BI e BC observa-se a presença de biomateriais envolvidos por tecido ósseo (10e e 10f, respectivamente). No período de 60 dias, observa-se presença de tecido conjuntivo (C) envolvendo o biomaterial (B) no grupo BI (10h). Trabéculas ósseas (O) e de medula óssea (MO) são encontrados no grupo BC (10i).



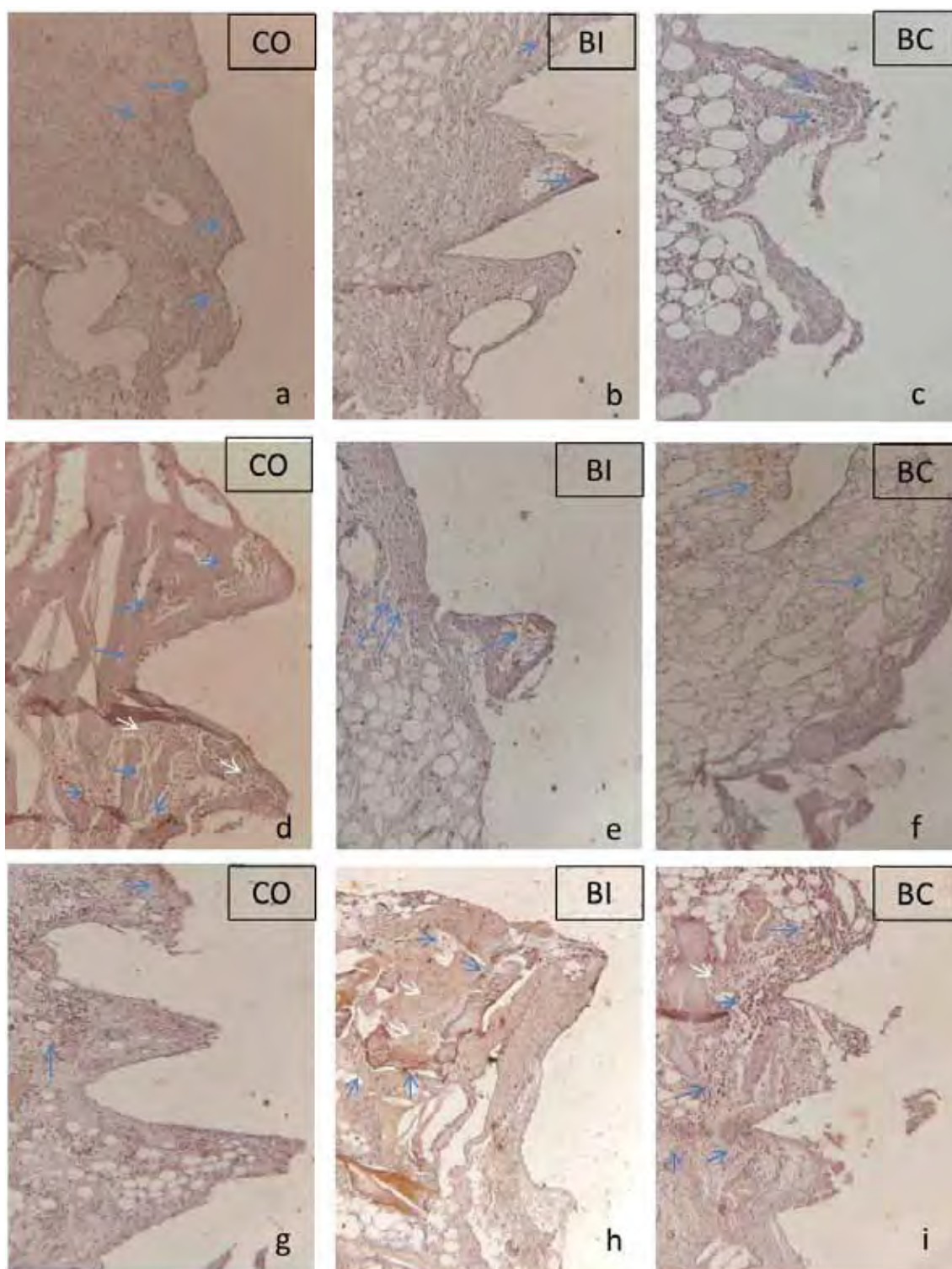


Figura 11: Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (11a, 11d e 11g), BI (11b, 11e e 11h) e BC (11c, 11f e 11i), nos períodos de 15 (11a-11c), 30 (11d-11f) e 60 dias (11g-11h). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

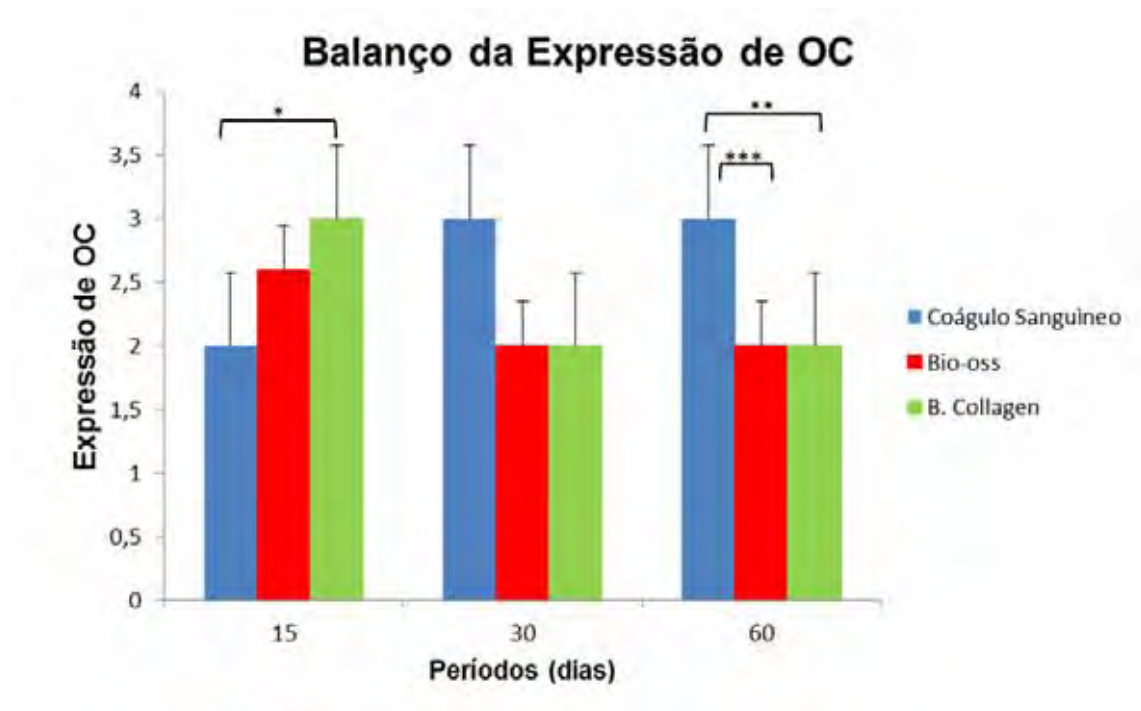


Figura 12: Representação gráfica do balanço da expressão de OC pelo período de tempo.

(Kruskal-Wallis e Mann-Whitney –  $p < 0,05$ ). 15 dias: \* CO  $\neq$  BC. 60 dias: \*\*CO  $\neq$  BC e

\*\*\*CO  $\neq$  BI.

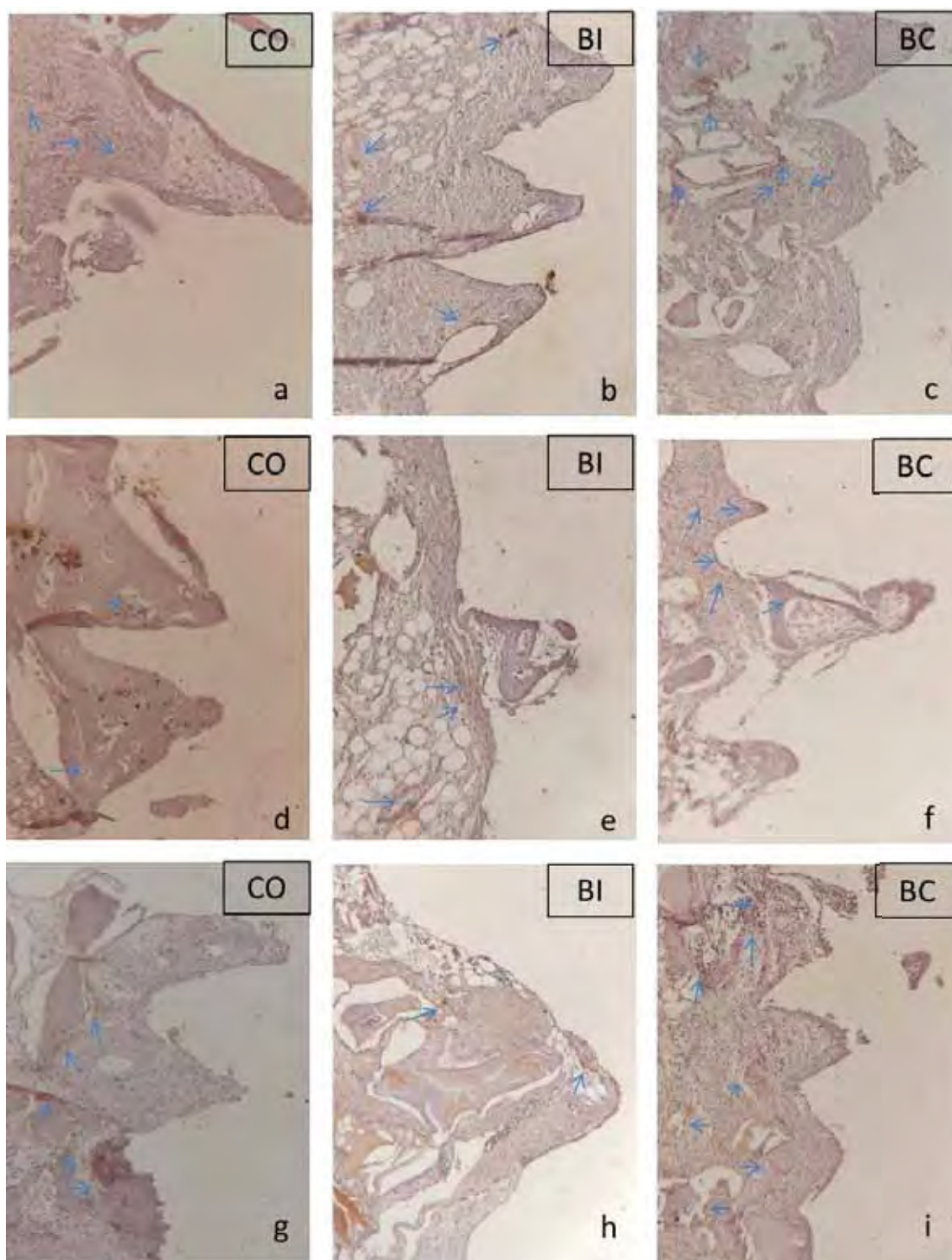


Figura 13: Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de Runx2, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (13a, 13d e 13g), BI (13b, 13e e 13h) e BC (13c, 13f e 13i), nos períodos de 15 (13a-13c), 30 (13d-13f) e 60 (13g-13i) dias. (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.



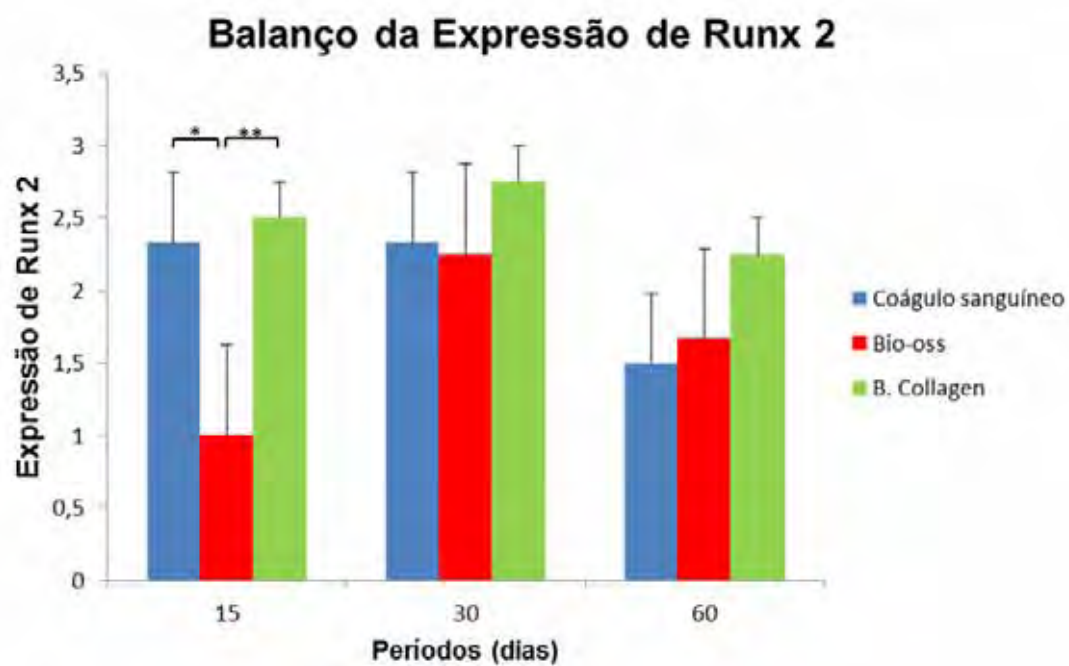


Figura 14: Representação gráfica do balanço da expressão de Runx2 pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney –  $p < 0,05$ ). 15 dias: \*CO  $\neq$  BI ; \*\*BI  $\neq$  BC.

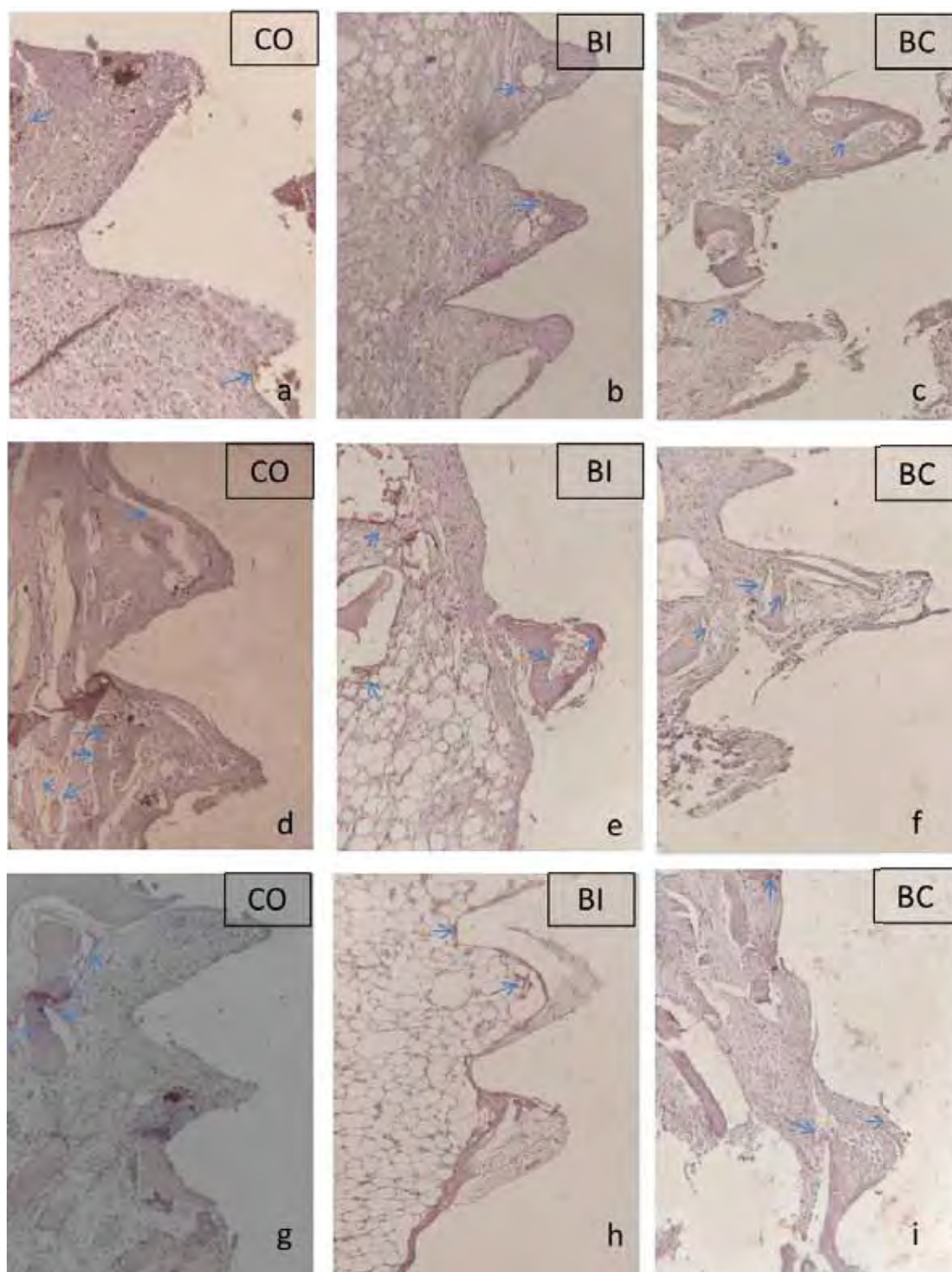


Figura 15: Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de OPG, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (15a, 15d e 15g), BI (15b, 15e e 15h) e BC (15c, 15f e 15i), nos períodos de 15 (15a-15c), 30(15d-15f) e 60 dias (15g-15i). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.

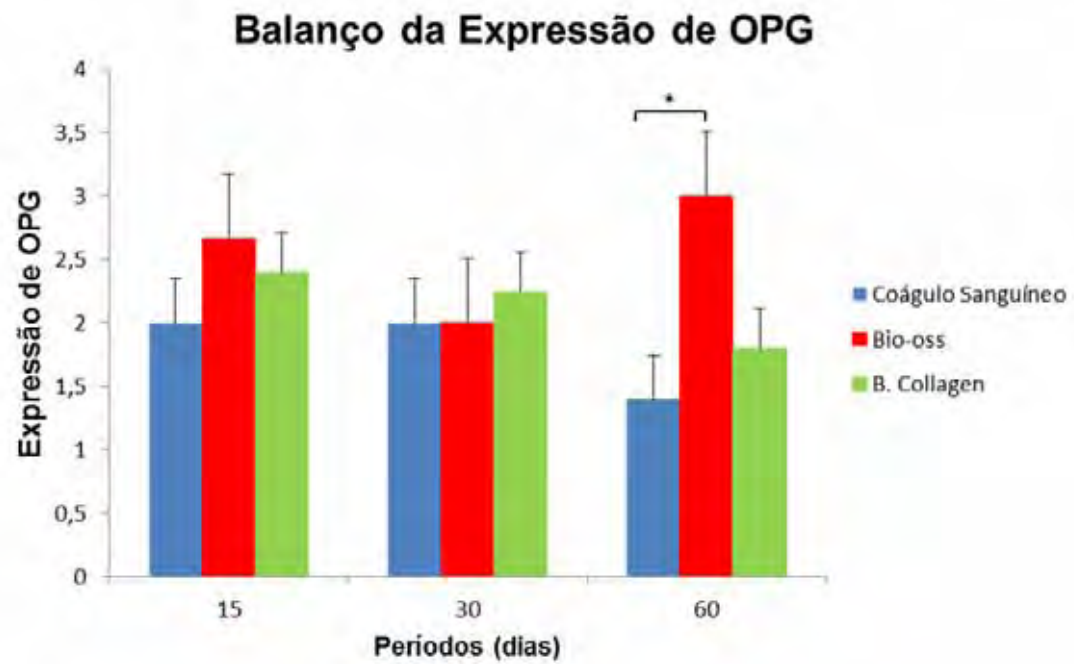


Figura 16: Representação gráfica do balanço da expressão de OPG pelo período de tempo. (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney –  $p < 0,05$ ). 60 dias: \*CO  $\neq$  BI

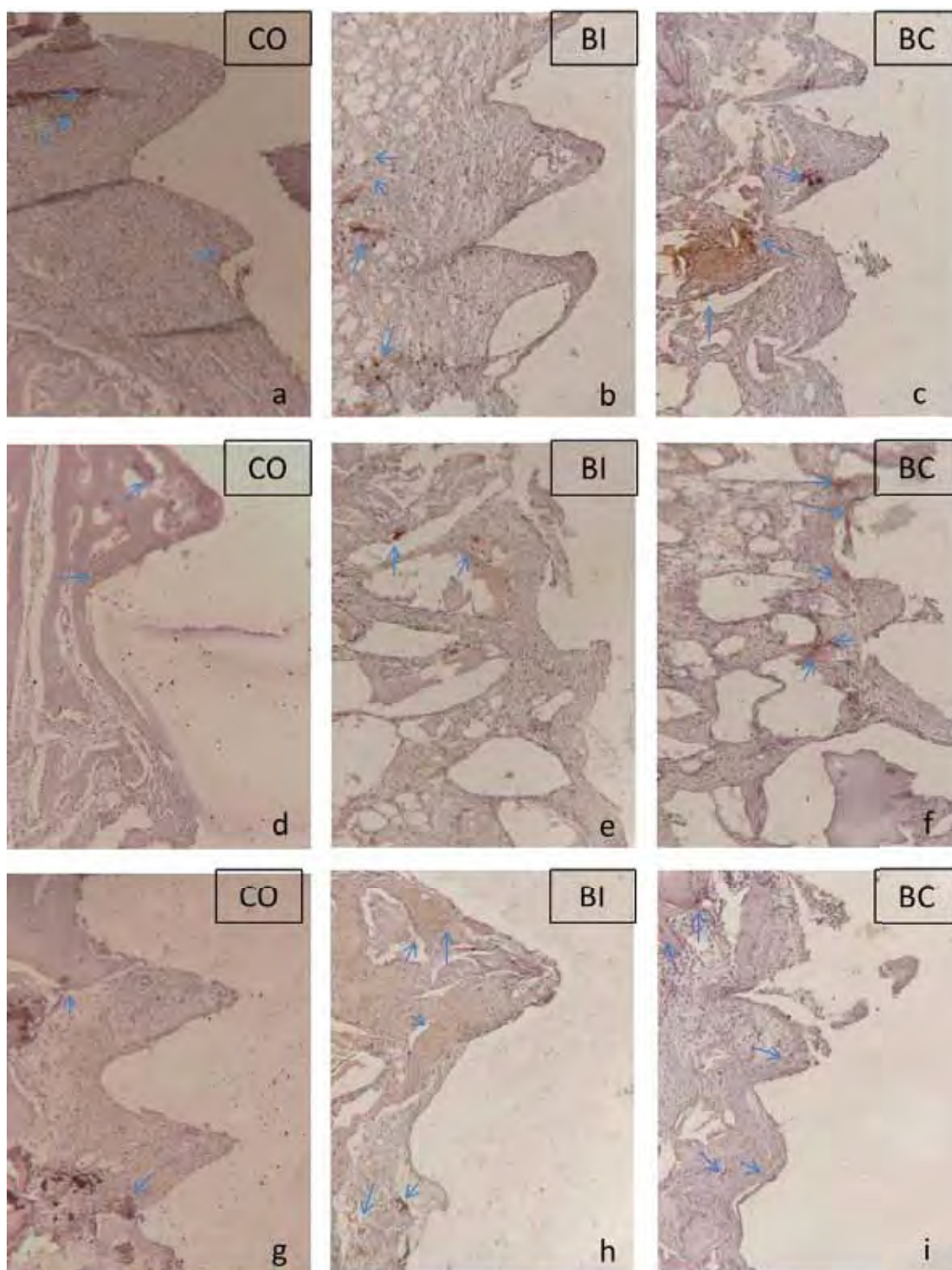


Figura 17: Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de RANK-L, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (17a, 17d e 17g), BI (17b, 17e e 17h) e BC (17c, 17f e 17i), nos períodos de 15 (17a-17c), 30 (17d-17f) e 60 dias (17g-17i). (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma.

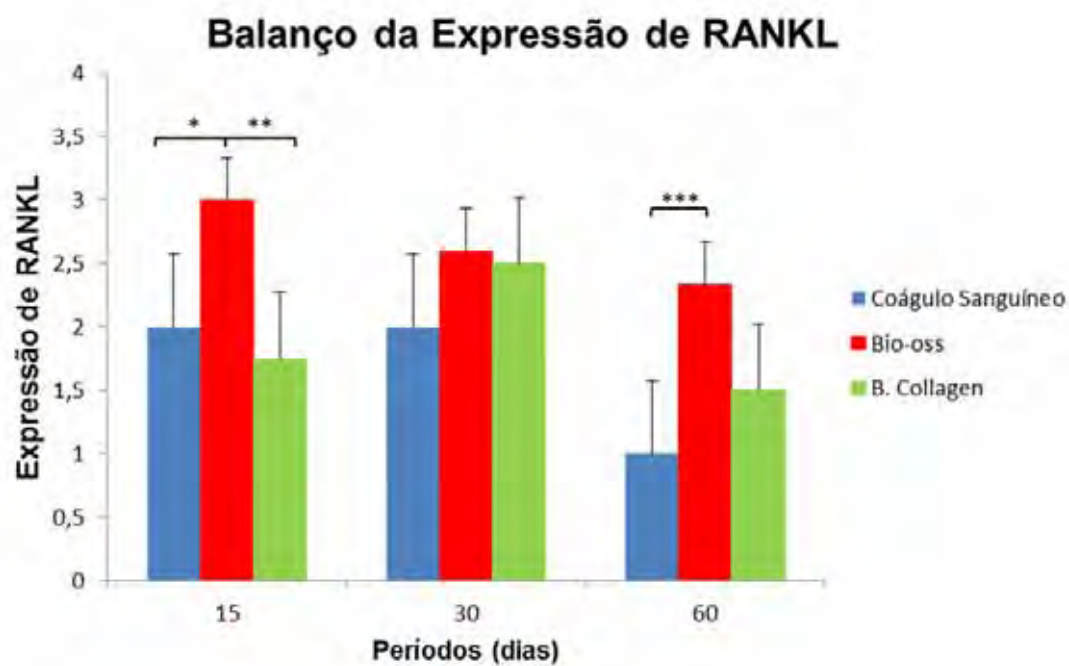


Figura 18: Representação gráfica do balanço da expressão de RANK-L pelo período de tempo.

(Kruskal-Wallis e Mann-Whitney –  $p < 0,05$ ). 15 dias: \*CO  $\neq$  BI; \*\*BI  $\neq$  BC. 60 dias: \*\*\*CO  $\neq$  BI.



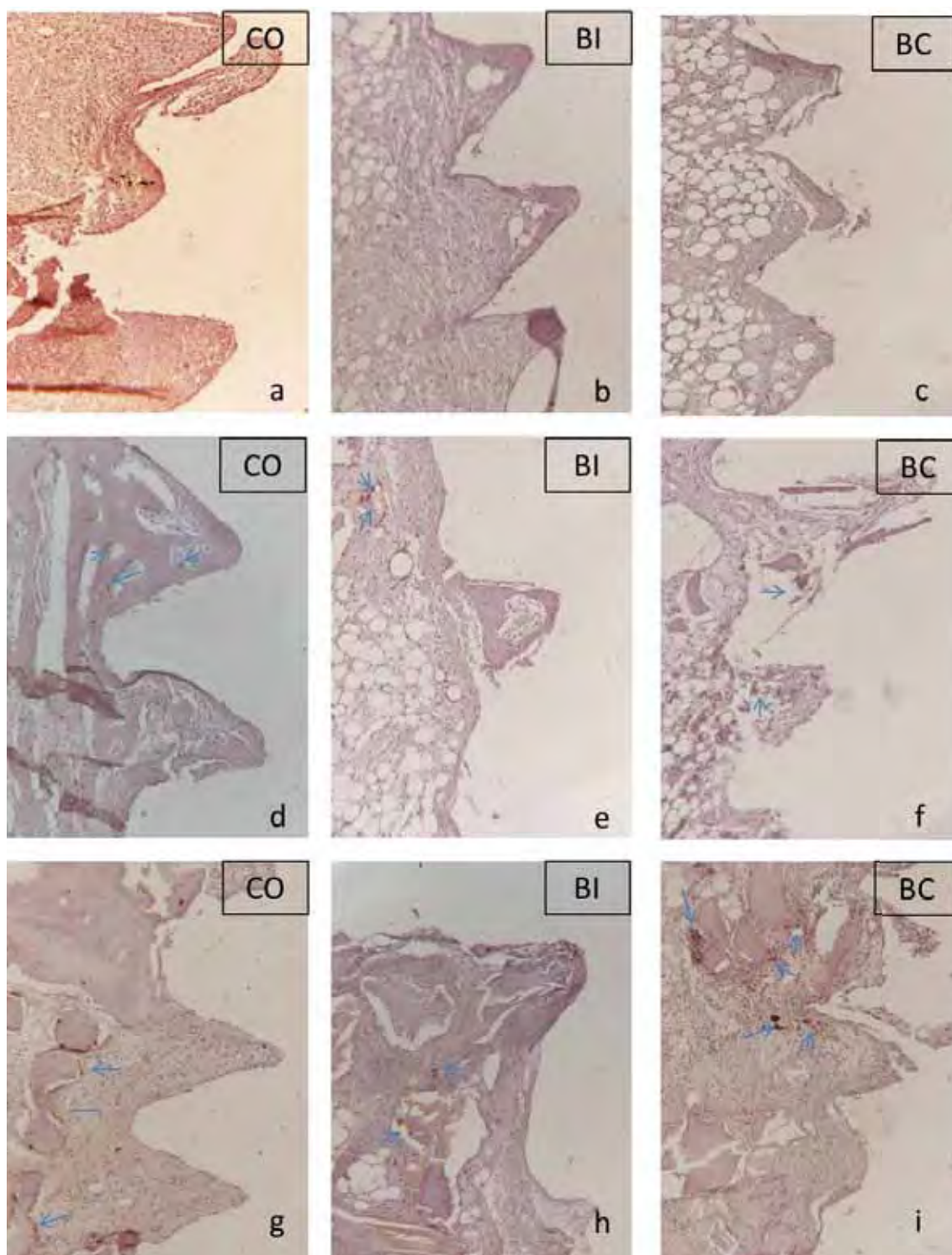


Figura 19: Fotomicrografias de cortes imunoistoquímicos representando a expressão de TRAP, contendo porções de regiões previamente localizadas entre as espiras dos implantes nos grupos CO (19a, 19d e 19g), BI (19b, 19e e 19h) e BC (19c, 19f e 19i), nos períodos de 15 (19a-19c), 30 (19d-19f) e 60 (19g-19i) dias. (aumento de 160 X). Setas azuis: marcação em citoplasma; Setas brancas: marcação de fundo.

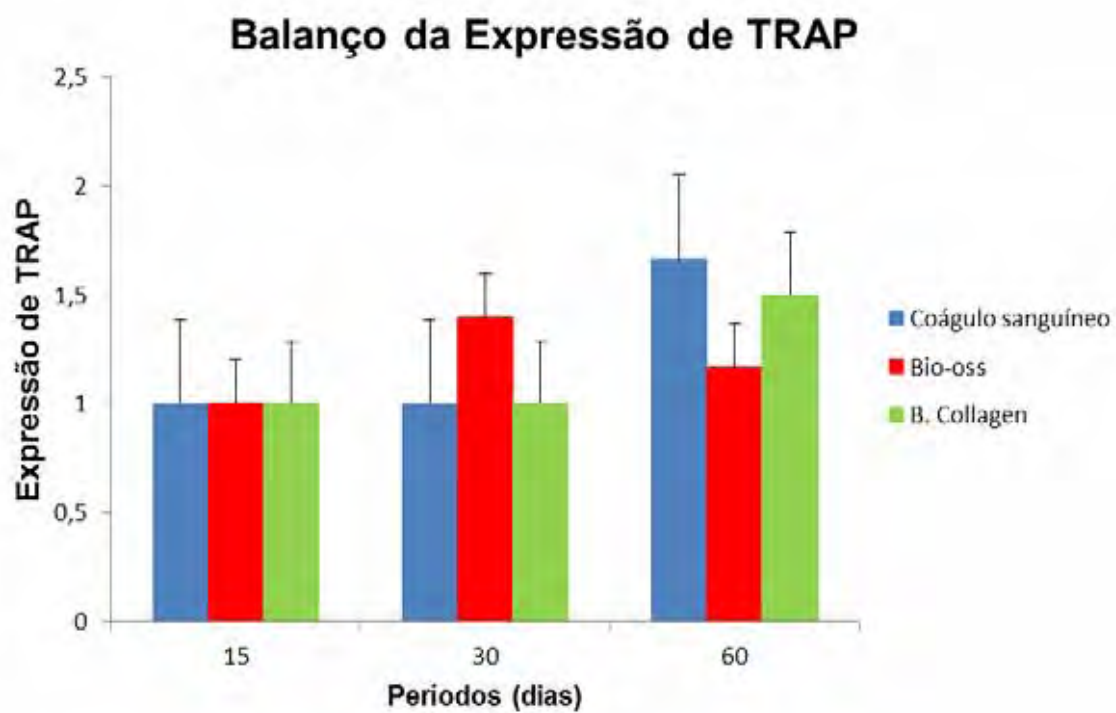


Figura 20: Representação gráfica do balanço da expressão de TRAP pelo período de tempo.

*TABELAS*



Tabela 1 – Valores, médias e desvios-padrão de torque-reverso, em N.cm, para os grupos estudados, de acordo com o período de avaliação.

|            | Períodos  |              |             |              |              |            |              |              |              |
|------------|-----------|--------------|-------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| Coelho     | 15 dias   |              |             | 30 dias      |              |            | 60 dias      |              |              |
|            | CO        | BI           | BC          | CO           | BI           | BC         | CO           | BI           | BC           |
| 1          | 34        | 15           | 23          | 36           | 25           | 74         | 30           | 11           | 35           |
| 2          | 30        | 36           | 37          | 50           | 54           | 50         | 3            | 25           | 49           |
| 3          | 41        | 47           | 19          | 10           | 39           | 51         | 51           | 24           | 10           |
| 4          | 35        | 20           | 20          | 30           | 58           | 81         | 55           | 41           | 53           |
| 5          | 35        | 38           | 25          | 32           | 47           | 49         | 43           | 47           | 50           |
| Média ± DP | 35 ± 3,94 | 31,2 ± 13,29 | 24,8 ± 7,22 | 31,6 ± 14,38 | 44,6 ± 13,12 | 61 ± 15,28 | 42,4 ± 10,90 | 29,6 ± 14,41 | 39,4 ± 17,84 |

Tabela 2 – Razão entre RANK-L: OPG

|         | CO   | BI  | BC   |
|---------|------|-----|------|
| 15 dias | 1,0  | 1,0 | 0,71 |
| 30 dias | 1,13 | 1,3 | 0,76 |
| 60 dias | 1,0  | 1,1 | 0,83 |



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**

**Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba**

**Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**



# ANEXOS

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

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

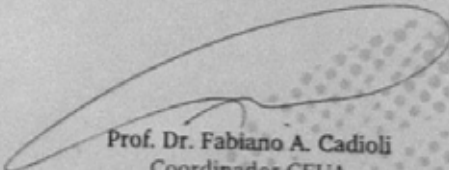
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "Avaliação de substitutos ósseos para reconstrução de defeitos peri-implantares em coelhos" sob responsabilidade do Pesquisador IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR e colaboração de Pâmela Leticia dos Santos e Thallita Pereira Queiroz está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 02388-2011.

**CERTIFICATE**

We certify that the research "Use of bone substitutes for reconstruction of defects created in rabbits", process number 02388-2011, under responsibility of IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR and with collaboration of Pâmela Leticia dos Santos and Thallita Pereira Queiroz agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

  
Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli  
Coordenador CEUA  
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Rua Cláudia Pereira, 793 CEP 14605-400 Araçatuba – SP  
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabiano.cadioli@fcmv.unesp.br

**ANEXO B – Normas para publicação na Revista 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:

### 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 exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as 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.

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.