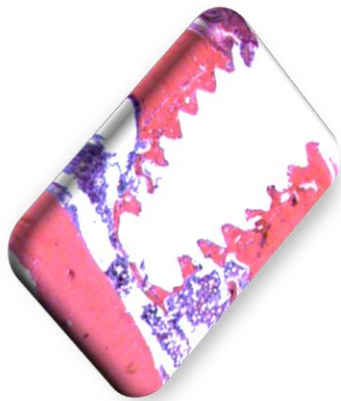




Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada



Juliana Zorzi Coléte

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA INTERFACE
OSSO/IMPLANTE EM RATAS COM DEFICIÊNCIA DE
ESTRÓGENO TRATADAS COM OPG-FC HUMANO OU
RANELATO DE ESTRÔNCIO. ANÁLISE HISTOMÉTRICA,
IMUNOISTOQUÍMICA, BIOMECÂNICA, POR
MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E
MICROSCOPIA CONFOCAL**

**EVALUATION OF BONE REPAIR AT THE BONE /
IMPLANT INTERFACE IN ESTROGEN DEFICIENT RATS
TREATED WITH HUMAN OPG-FC OR ESTRONTIUM
RANELATE. HISTOMETRIC, IMUNOISTOCHEMISTRY,
BIOMECHANICS, COMPUTERIZED
MICROTOMOGRAPHY AND CONFOCAL MICROSCOPY
ANALYSIS**

2018

Juliana Zorzi Coléte

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO NA INTERFACE
OSSO/IMPLANTE EM RATAS COM DEFICIÊNCIA DE
ESTRÓGENO TRATADAS COM OPG-FC HUMANO OU
RANELATO DE ESTRÔNCIO. ANÁLISE HISTOMÉTRICA,
IMUNOISTOQUÍMICA, BIOMECÂNICA, POR
MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E
MICROSCOPIA CONFOCAL**

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

Orientadora: Prof.^a. Adj. Roberta Okamoto

Coorientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba-SP

2018

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

C694a Colete, Juliana Zorzi.
Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrógeno tratadas com OPG-Fc humano ou ranelato de estrôncio : análise histométrica imunoistoquímica, biomecânica, por microtomografia computadorizada e microscopia confocal / Juliana Zorzi Colete.- Araçatuba, 2018
108 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Osteoporose 2. Regeneração óssea 3. Implantação dentária 4. Osteoprotegerina 5. Imuno-histoquímica I. T.

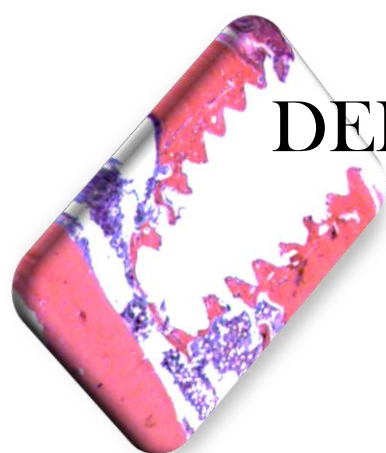
Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto
CRB-8/5550

ERRATA

COLÉTE, Juliana Zorzi, **Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrógeno tratadas com opg-fc humano ou ranelato de estrôncio. Análise histométrica, imunoistoquímica, biomecânica, por microtomografia computadorizada e microscopia confocal** 2018. 108 f Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
22	11		“Agradecemos ao laboratório de multiusuários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP pela utilização do microtomógrafo computadorizado ((processo 01.12.0530.00 FINEP/Proinfra 01/2011))”.



DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos grandes amores da minha vida, aqueles que são o real motivo para que eu tenha garra e determinação para seguir em frente lutando pelos meus sonhos: **a minha família.**

Ao meu pai *Oswaldo Coléte Junior,*

Agradeço o amor incondicional, incentivo e toda participação durante o transcorrer desta jornada. O senhor sempre me apoiou em tudo, e me incentivou a continuar lutando para ir cada vez mais longe, e se hoje eu estou realizando este sonho, se conquistei meu objetivo, é porque tenho o senhor como alicerce e exemplo de luta e dignidade. Obrigada por ser meu herói e me proteger sempre. Amo-te muito meu pai.

A minha mãe *Fátima Aparecida Zorzi Coléte,*

Por todo incentivo, amor, carinho e dedicação, a senhora com seu infinito amor de mãe acreditou desde o princípio que esse sonho poderia ser realizado. Nunca poupou esforços para me dar suporte nos momentos difíceis, sempre estava plenamente presente me dando força, me escutando, me encorajando a continuar e a lutar pelos meus sonhos. Amo muito a senhora. Obrigada por sempre cuidar de mim.

Ao meu irmão *Oswaldo Coléte Neto,*

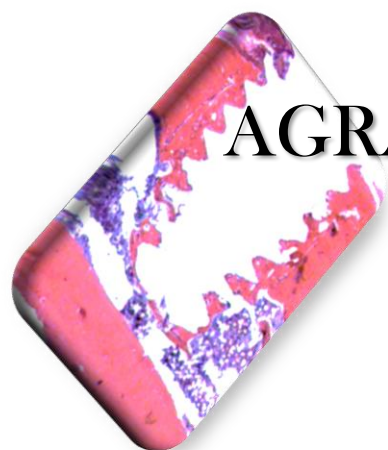
Por todo amor que sempre me dedicou. E principalmente por ter me dado o melhor presente da vida, minha sobrinha Ana Clara Arroyo Colete. Esta

pequena é um pedaço de mim, e esse amor incondicional é o que dá sentido a vida. Amo vocês com todas as forças do meu coração.

À minha tia **Edina Lúcia Zorzi**,

Por ser minha melhor amiga, minha melhor companhia. Arriscaria lhe chamar de alma-gêmea, pois é assim que me sinto com relação à senhora. Sempre me ensinou a olhar as dificuldades da vida pelo lado bom, a responder ofensas com palavras de amor, a ter compaixão daqueles que precisam humilhar ao próximo para se exaltar ou se sentir superior. A senhora me fez acreditar que eu posso alcançar tudo que eu desejar, basta que eu lute por isso. Seu amor me dá forças para continuar sempre em busca dos meus sonhos. Amo a senhora tia.

À minha prima **Jhenifer Zorzi**, que é um dos melhores presentes que Deus me deu, minha irmã de alma e coração. Agradeço todos os dias por ter você em minha vida, esse anjo de luz, capaz de me acalmar nos momentos mais difíceis que já passei. Ao seu lado me sinto protegida e amparada. Amo a sua vida e amo a vida que você acabou de gerar, nossa princesa Sophie. Lembro-me como se fosse hoje a primeira vez que te segurei no colo, e quando tive agora a oportunidade de segurar em meus braços a sua filha, entendi a verdadeira força do amor incondicional. Você é minha amiga, confidente, parceira e irmã. Amo vocês de todo o meu coração. Obrigada por me permitir sentir essa felicidade em meu peito.



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

Por estar hoje aqui realizando este sonho. Passei por momentos muito felizes, mas também por momentos difíceis, de decepções, medos e incertezas, mas o Senhor nunca me abandonou e sempre segurou a minha mão. Gratidão é a palavra que resume o maior sentimento neste momento. Gratidão pela vida, pela família, pelos amigos e por esta conquista profissional. Obrigada senhor por me permitir viver momentos inimagináveis, por conhecer lugares incríveis, encontrar pessoas que mudariam a minha vida e a forma de ver o mundo. Nesta caminhada aprendi a não revidar ofensas, não afrontar quem me afrontava, não pagar com a mesma moeda quem me fez mal. Pois o tempo de Deus sempre chega e a sua justiça também. O Senhor não age do nosso jeito, mas tudo que faz por nós é justo e perfeito.

A minha orientadora Prof.^a Dr^a Roberta Okamoto

Pelo carinho, apoio, inestimável ajuda e paciência. Aprendi com a senhora a ser uma pessoa mais forte e determinada nos meus propósitos. A senhora me fez acreditar no meu potencial, acreditar que eu posso alcançar todos os meus sonhos e principalmente que posso suportar as batalhas que a vida me apresenta. O seu sorriso consegue transmitir toda paz que existe em seu coração. A senhora tem uma luz própria que contagia todos ao seu redor, uma verdadeira guerreira, que nos ensina diariamente com seus exemplos de luta, dignidade, honestidade e amor. Aprendi a importância de sermos unidos, mais que um grupo de pesquisa, uma verdadeira família. Tenho pela senhora um amor imenso. Obrigada pela convivência adorável, pelas conversas, pelas risadas, por ouvir meus desabafos e me aconselhar com tanto amor, pela

alegria, entusiasmo, por ser amável e cuidar de nós, seus orientados com tanto carinho. O mesmo amor que tenho pela senhora trago na lembrança por seu pai, o professor Tetuo Okamoto, que me deixou uma lição de vida que jamais esquecerei. Espero ter lhe dado orgulho durante todo período que fui sua orientada, e que ainda possamos realizar muitos trabalhos juntas, para que eu possa aprender sempre ao seu lado. Muito obrigada por cuidar de mim com tanto amor.

*Ao meu coorientador **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior,***

Agradeço a Deus por ter lhe colocado no meu caminho, e por ter tido o imenso prazer de conviver ao seu lado, e poder aprender com o senhor. Palavras nunca serão suficientes para expressar a gratidão, admiração e carinho que tenho pelo senhor, que durante todo o tempo, me tratou como uma filha. Admiro lhe pela sua humanidade, humildade, competência e carinho para conduzir as diversas situações do dia a dia. Mais que um grande professor, o senhor se tornou para mim um exemplo. Obrigada por todos os ensinamentos científicos, carinho, amizade, paciência, ajuda profissional e pessoal, conselhos e principalmente por acreditar em mim e no meu potencial. Jamais esquecerei quão boa foi a nossa convivência. O senhor conquistou a minha eterna admiração e respeito.

Aos professores membros da Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisley Ávila Souza,

Um ser humano incrível. Bondoso, carinhoso, brincalhão, responsável e justo. Agradeço todos os ensinamentos e oportunidades que o senhor me deu durante a minha graduação e pós graduação. O senhor estava ao meu lado no dia da minha primeira cirurgia na graduação, e me ensinou com muito carinho e dedicação. Se hoje estou concretizando este sonho, devo muito aos meus mestres, e o senhor é um dos que me incentivou a seguir carreira na especialidade de cirurgia. Obrigada pela convivência adorável e principalmente por acreditar no meu potencial.

Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani,

Agradeço a Deus por sua vida. E principalmente pelo presente de ter um amigo tão especial como você. Admiro sua garra, seus talentos, humildade, generosidade e carisma. Você é uma pessoa muito fácil de amar, pois nos cativa no primeiro instante. Sempre me espelhei no seu comportamento como docente e principalmente como ser humano. Passamos diversos momentos da vida juntos, e eu nunca vou esquecê-los. Obrigada por toda ajuda que sempre me deu, tanto na vida profissional como na vida pessoal. Você mora no meu coração, e a nossa amizade é pra vida toda.

Prof. Dr. Nicolas Homsí,

O prazer de ter o senhor hoje aqui fazendo parte da minha banca de doutorado é indescritível, pois tenho pelo senhor uma admiração e carinho imensos. Tive o prazer de conhecê-lo no meu terceiro ano de graduação, quando me tornei monitora da clínica de cirurgia. E minha primeira vez no hospital acompanhando uma cirurgia foi ao seu lado. Nunca vou me esquecer dos seus ensinamentos, carinho e dedicação a mim prestados. Agradeço à Deus por poder ter amigos tão especiais, que me proporcionam esses momentos de gratidão. Sei o quanto sua vida é corrida e tê-lo hoje aqui comigo neste momento tão especial é o maior presente que poderias me dar. Muito obrigada meu querido.

Prof. Dr. Gabriel Ramalho Ferreira

Um profissional e ser humano exemplar. Admiro sua competência, garra e dedicação ao que faz. Meu primeiro plantão no mestrado foi ao seu lado como doutorando, e eu tive o prazer de poder aprender e operar um paciente sob a sua orientação. Agradeço toda paciência e dedicação ao me ensinar. Que Deus lhe proteja e ilumine sempre seu caminho.

Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho,

Pelo exemplo de professor, cirurgião e pessoa. Obrigada por todo carinho, amizade, sinceridade em nossas conversas e principalmente por todo conhecimento compartilhado durante os momentos que convivemos juntos.

Sua alegria é contagiante, e seu exemplo será levado comigo. Jamais me esquecerei do quão especial o senhor foi para a minha vida e para minha formação profissional. Que Deus lhe abençoe.

Prof.^a. Dr.^a. Thallita Pereira Queiroz

Pela simplicidade e simpatia em todos os momentos que nos encontramos. Admiro muito a sua competência e dedicação à Cirurgia e Traumatologia Bucal Maxilo Facial. Obrigada pelo carinho com que sempre me tratou, pelo incentivo e disponibilidade.

Prof.^a. Dr.^a. Elisa Mattias Sartori

Agradeço a convivência adorável durante a minha pós graduação. Admiro sua competência e dedicação aos seus alunos. Foi um prazer imenso poder assistir suas aulas e aprender com você. Obrigada por colaborar sempre com os trabalhos do nosso grupo com seu conhecimento. É uma satisfação ser sua amiga e poder aprender sempre com você. Deus lhe abençoe e guie seus passos sempre rumo ao sucesso.

Aos meus queridos professores

Prof. Dr. Wilson Roberto Poi,

Meu primeiro orientador na graduação, alguém por quem trago uma admiração imensurável, tenho no senhor um pai, um exemplo de humildade e dignidade, com quem aprendi e despertei a filosofia de “*ser professor*”. Um exemplo que sempre lembrarei e citarei quando me referir a um verdadeiro mestre. Muito obrigado por tudo! Levarei seu exemplo de ser humano comigo, para onde quer que eu vá! Que Deus lhe abençoe e proteja.

Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega,

Professora formidável, sempre gentil e alegre. Admiro muito a sua inteligência e capacidade de conduzir as mais diversas situações com garra e serenidade. Uma verdadeira líder e idealizadora de sonhos e projetos. Sua luta e determinação pela nossa universidade é digna de admiração e respeito. Obrigada por fazer parte de vários momentos da minha graduação e pós-graduação e me ensinar com sua experiência. Que a senhora continue sendo esta guerreira que toma frente das dificuldades, pois sabe a força intelectual que possui. O mundo precisa de mais pessoa assim, que lutam por seus semelhantes.

Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin,

Pela disponibilidade em sempre me ajudar em tudo que foi preciso, por sua competência como docente e pesquisador. Aprendo muito ao seu lado.

Agradeço por todo carinho, simpatia, ajuda em minhas aulas e momentos agradáveis juntos. Deus lhe abençoe.

Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda,

Agradeço pelos momentos em que prontamente me recebeu em sua sala, concedendo-me valiosos ensinamentos. O senhor é um grande exemplo de mestre. Obrigada por todo carinho e por todo aprendizado. Admiro muito o senhor.

Prof. Dr. José Américo de Oliveira,

Agradeço a oportunidade de ter sido sua aluna na graduação e poder aprender com sua experiência. O senhor coloca muito amor em tudo que faz e isso é admirável. Obrigada pelos momentos adoráveis de conversas, e por estar sempre disposto a ajudar. É uma grande honra poder contar com a sua amizade.

A minha querida família

Minhas avós Felicidade e Joana, meus avôs Oswaldo e Alcindo (in memoriam), minhas tias Carmem, Mirian, Eliane, Rita, Angelina, meus tios Valdir, Jair e Fernando, minhas primas Aline, Andréa, Tatiana, Vanessa, Jéssica, Jamile, Júlia, Roberta, meus primos Fernandinho, Juninho, Diego, Julinho, Rogers, Renan, André e Kleber. E aos mais novos integrantes da família, meus priminhos Sophie e Benício. Amo muito todos vocês, e mesmo estando longe dos meus olhos, vocês jamais estiveram longe do meu coração.

Ao meu querido amigo **Luis Fernando Gonçalves**, agradeço por todo carinho e dedicação durante esses anos de amizade. Conheci você no início de todo este sonho, e você com seu carisma, alegria e positividade me ajudou a superar vários momentos difíceis aos quais tive que passar. Agradeço a Deus por ter conhecido uma pessoa tão iluminada, doce e alto astral como você. Desejo que você seja muito feliz e que Deus abençoe sua vida grandemente. Obrigada por tudo.

A minha amada amiga **Fernanda Ramos “boneca”**, falar de você é quase uma missão impossível para mim, pois eu passaria dias inteiros aqui escrevendo as suas qualidades. Em resumo você é aquela amiga irmã, que não nasceu da barriga da minha mãe, mas tem a alma irmã gêmea da minha.

Ao seu lado eu já vivi os momentos mais felizes e intensos da minha vida, e sei que ainda viverei muitos. Obrigada por ser a minha pessoa, meu ombro amigo, minha confidente, e principalmente por me amar com tal intensidade, que mesmo morando tão longe dos meus olhos, você consegue sempre tocar o meu coração, e todas as vezes que nos encontramos, é como se não tivéssemos passado nem ao menos um dia sequer sem se ver. E é disso que a vida é feita... AMOR!!!!!! E eu amo você minha amiga.

Ao meu querido amigo **Gustavo Momesso “preferido”** Agradeço a Deus pelo presente da sua amizade. Poder acompanhar seu crescimento e suas conquistas foi para mim enriquecedor. Você é um menino que vale ouro, tens um coração enorme e todas as bençãos alcançadas em sua vida são frutos deste coração puro que você tem. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins, por me ensinar, aconselhar e acima de tudo me incentivar e ir sempre além. Que Deus abençoe seu caminho e você conquiste todos os seus sonhos, e saiba que eu estarei sempre ao seu lado, para lhe aplaudir de pé.

A minha querida amiga **Sabrina Ferreira “Sassá”** Você é daquelas pessoas tão especiais, que palavras se tornam pouco para agradecer tamanha gratidão que sinto por você. Esteve sempre ao meu lado me ajudando e me encorajando nas mais diversas situações. Você tem um coração bondoso e cheio de amor, e esta sempre disposta a ajudar todos ao seu redor, e isso te faz ser este ser humano iluminado e abençoado que és. Obrigada minha

amiga, por toda força que você sempre me deu. Desejo que você continue alcançando seus sonhos, e levanto este seu sorriso farto para onde quer que vá. Nunca esquecerei quão adorável foi nossa convivência e estarei sempre esperando as oportunidades da vida para nos encontrarmos e dar continuidade as nossas conversas intermináveis e sempre adoráveis. Deus lhe abençoe e proteja.

Ao meu querido amigo **Gabriel Mulinari**, agradeço a Deus por nossa amizade, cumplicidade e companheirismo. Você é daqueles seres humanos que exalam amor e luz por onde passam. A vida cruzou nossos caminhos de uma maneira doce e feliz, e é exatamente assim que eu me sinto em sua companhia. Ao seu lado aprendi o valor da frase “Nada é por acaso”. Desejo que todos os nossos objetivos profissionais se concretizem e que juntos possamos fazer a diferença para a humanidade com nossos ideais e projetos para o futuro. Você é meu parceiro e tenho por você o mais profundo respeito, carinho e admiração.

Ao meu querido amigo **Sormani Queiroz**, um dos maiores presentes que a pós-graduação trouxe para a minha vida. Agradeço todas as oportunidades de trabalhar ao seu lado e de aprender com você. Admiro o seu potencial como cirurgião e a sua bondade como pessoa. E me sinto honrada de poder participar de projetos e concretizar metas ao seu lado. Admiro sua competência, garra, disponibilidade e amor pelo que faz. Que possamos juntos realizar todos os nossos projetos profissionais. Deus lhe abençoe

A minha amiga **Raquel Parra**, agradeço a convivência e parceria. Tornamo-nos amigas a pouco tempo, mas o suficiente para lhe admirar como pessoa e profissional. Seu sorriso e alegria são contagiantes, e isso torna a convivência ao seu lado muito agradável. Obrigada por toda ajuda nesta reta final. Deus proteja sua vida e ilumine seu caminho.

Aos meus queridos amigos, Maria Angélica Pacce, Adrielle Melero, Jessica Andrade, Simoni Ribas, Eduardo Stefanone, Claudia Stefanone, Ariane Jamile Gallo, Cristiane Scarparo, Maurício Shimada, Nathalia Januário, Ariercílio Gonçalves, Ana Julia Gasparini, Kátia Gonçalves, Cibebe Dib, Helen Perini. Obrigada por todo carinho e amor que vocês me dedicam, sem vocês meus amigos, minha felicidade jamais estaria completa.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Na pessoa do diretor **Prof. Wilson Roberto Poi** e do vice-diretor **Prof. João Eduardo Gomes Filho pela**, e do Coordenador do programa de pós-graduação **Prof. André Luiz Fraga Briso**, pela oportunidade de realização do curso de Graduação, Mestrado e Doutorado. Por lutar arduamente para que a tríade ensino, pesquisa e extensão universitária sejam o maior lema desta instituição.

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de doutorado (Processo 2015/13712-4) e pelo auxílio regular em pesquisa concedido à nossa equipe em nome da minha orientadora Prof^a Roberta Okamoto (2015/14688-0), indispensável para a realização deste estudo.

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

Ao Departamento de Ciências Básicas, representado pelos docentes Prof. Dr Cláudio Aparecido Casatti, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof^a. Dra. Alaíde Gonçalves e Prof^a. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, Prof. Dr José Américo de Oliveira, Prof. Dr Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof^a. Dra. Roberta Okamoto. Obrigada pelo acolhimento e convívio adorável. Fui acolhida por este departamento e foi um prazer imenso conviver ao lado de pessoas tão especiais.

As alunas de Iniciação Científica do departamento de Ciências Básicas, Ana Naara Monteiro, Maria Isabela Gandolfo, Jaqueline Hassumi, Elisa Furquim,

Paula Frigério e Jaqueline Silva. Agradeço muito a vocês por todo apoio, parceria e momentos agradáveis.

Em especial, gostaria de agradecer a querida Ana Claudia Ervolino, que com carinho e dedicação esteve ao meu lado durante a execução deste projeto, sempre muito prestativa, alegre e disposta. E a minha querida amiga Letícia Pitol, pelas horas e horas de conversas intermináveis, agradeço a Deus por ter sua amizade e sua parceria. Que Deus abençoe a vida de vocês para que alcancem todos os seus sonhos. Jamais esquecerei vocês.

Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, representado pelos docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza e Prof. Dr. Leonardo Faverani, por serem excelentes docentes e por me acolherem com tanto carinho durante toda a minha graduação e pós-graduação. Vocês são meus maiores exemplos.

Aos meus amigos de pós-graduação, André Fabris, Sabrina Ferreira, Fernanda Boos, Patricia Bermejo, Tarik Polo, Igor Puttini, Fábio Batista, Pedro Henrique Ferreira, Breno Fernandes, Pedro Ivo, Carlos Alberto Timóteo, Lamis Meorin, Rodrigo Pereira, Geraldo Grizza, Bianca Bravim, Maria Del Pilar, Gustavo Grossi, Mônica Munhoz, Tárík Polo, Lara Cervantes, Yasmin Bantim, Luara Colombo, Rodrigo Capalbo, Leonardo Freitas, Erick Neiva, Valthierre

Nunes, Ciro Duailibe, Ricardo Jacob, Willian Ricardo, Fernanda Yogui, Fernando Isquerdo. Sou muito grata a todos vocês pela adorável convivência.

A todos os colegas do Mestrado e Doutorado,

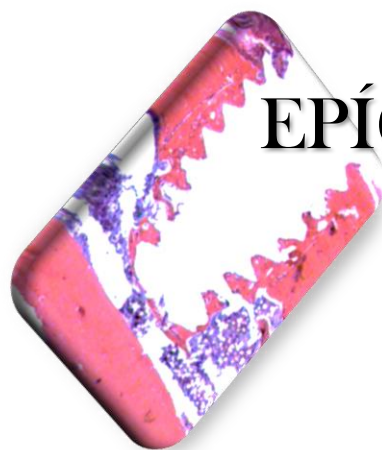
Pelos momentos agradáveis que passamos juntos na pós-graduação.

Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,

Que com tanto carinho me receberam. Pelo trabalho extremamente competente que desempenharam. A vocês o meu carinho e eterna admiração.

Aos funcionários da Pós-graduação: Valéria, Lilian e Cristiane,

Pela disponibilidade, atenção e educação. Obrigada por me ajudarem com tanta dedicação e competência.



ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Gostaria de dizer que vale a pena amar. Se você não é amado não é importante, importante é quando ama. Não se preocupe com os inimigos, todos nós temos inimigos, mas isso é secundário, o importante é não ser inimigo de ninguém. Se alguém não gosta de você, o problema é dele, mas quando você não gosta de alguém o problema é seu, então ame. Seja qual for a circunstância o amor é o sublime elixir da plenitude, para quem o esparge e para quem é dirigido. Então como disse Jesus, amar a Deus acima de todas as coisas e ao próximo como a si mesmo. Ame-se também, quando você se ama, você se instrui, você se cuida, você se prepara para uma vida feliz. E somente quando você se ama que você é capaz de amar a outrem, porque amando-se, você pode perceber as dificuldades que existem para o indivíduo abandonar as suas imperfeições, as suas mazelas e torna-se a tolerância, a compreensão, a fraternidade, por fim o amor, o amor é a alma da vida”

Divaldo Franco

Colete JZ. Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrógeno tratadas com opg-fc humano ou ranelato de estrôncio. Análise histométrica, imunoistoquímica, biomecânica, por microtomografia computadorizada e microscopia confocal. [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

Resumo

Objetivo: Avaliar o reparo ósseo periimplantar em ratas submetidas à ovariectomia e tratadas com Ranelato de Estrôncio (625mg/kg/dia) ou OPG-Fc (10mg/Kg/2 vezes por semana). **Material e Método:** Sessenta e quatro ratas, com peso aproximado de 300 gramas, divididas em 4 grupos experimentais conforme tratamento medicamentoso e análises: SHAM; OVX; OVX/RE; OVX/OPG-Fc. Cada animal recebeu 2 implantes sendo 1 em cada metáfise tibial. A eutanásia foi realizada aos 42 e 60 dias após a instalação dos implantes. Foram realizadas as análises de microtomografia computadorizada (micro CT), biomecânica (torque reverso) histométrica, por microscopia confocal a laser, análise da expressão gênica por PCR em tempo real, histológica e imunoistoquímica. Os resultados histológicos evidenciaram para o grupo OVX-RE aspecto de neoformação óssea melhorada, com trabéculas mais espessas e baixa presença de tecido conjuntivo, comparado ao grupo OVX. Os resultados imunoistoquímicos demonstraram intensa marcação de OPG para o grupo OVX-RE e intensa marcação de RANKL para o grupo OVX. Já a análise por microscopia confocal evidenciou que o grupo OVX-RE obteve marcação superior para vermelho de alizarina comparado aos outros dois grupos (Tukey test – $P < 0,05$). Para os parâmetros BV/TV, Tb.Th, o grupo OVX/RE apresentou os maiores valores em relação aos demais grupos. Para

Tb.Sp o grupo OVX/OPG-Fc apresentou o melhor resultado (OVX: $p<0,05$ e OVX/RE: $p>0,05$), e Tb.N, houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos resultados entre os grupos OVX e OVX/OPG-Fc ($p<0,05$). Para MAR e avaliação dos fluorocromos, OVX/RE mostrou melhor turnover ósseo periimplantar, para AON, o grupo SHAM apresentou os maiores resultados (OVX: $p<0,05$), e para ELCOI o grupo OVX/RE apresentou os melhores resultados. Concluiu-se que o tratamento com ranelato de estrôncio ou OPG-Fc humano melhora significativamente a reparação óssea periimplantar de ratas osteopênicas por inibição da atividade osteoclástica exacerbada, promovendo um equilíbrio entre OPG/RANKL, apresentando essa característica melhorada nos animais tratados com ranelato de estrôncio.

Palavras chaves: Osteoporose, Regeneração Óssea, Implantação dentária, Osteoprotegerina, Imuno-histoquímica.

Coléte JZ. Evaluation of bone repair at the bone/implant interface in estrogen deficient rats treated with human opg-fc or strontium ranelate. Histometric, immunohistochemistry, biomechanics, computerized microtomography and confocal microscopy analysis. [Thesis]. Araçatuba: School of Dentistry, State University of São Paulo; 2018.

Abstract

Objectives: Evaluate the peri-implant bone repair in rats submitted to ovariectomy and treated with Strontium Ranelate (625mg/kg/day) or OPG-Fc (10mg/kg/2 times per week). Material and Method: sixty-four rats weighing about 300 grams, they were divided into 4 experimental groups according with the treatment and analysis: SHAM; OVX; OVX/RE; OVX/OPG-Fc. Each animal received 2 implants, 1 in each tibial metaphysis. Euthanasia was performed 42 and 60 days after implant installation. Computed micro-tomography (micro-CT), biomechanical (reverse torque), histometrical, laser confocal microscopy, real-time gene expression (RT-PCR), histology and immunohistochemiscal analysis. The histological results revealed for the OVX-RE group a better bone neoformation with thicker trabeculae and low connective tissue compared to OVX group. The immunohistochemical results showed intense labeling of OPG to the OVX-RE group and intense labeling of RANKL to the OVX group. Confocal microscopy analysis exhibited that the OVX-RE group obtained a greater red alizarin marking compared to the others two groups (Tukey test - $p < 0.05$). For the parameters BV/TV, Tb.Th, the OVX/RE group showed the larger values in relation to the other groups. For Tb.Sp the OVX/OPG-Fc group presented the best result (OVX: $p < 0.05$ and OVX/RE: $p > 0.05$), and the Tb.N exhibited a statistical significant difference in the combination of results between

the OVX and OVX / OPG-Fc groups ($p<0.05$). For the MAR and fluorochromes evaluation, OVX/RE group showed a better peri-implant bone turnover, for the AON, the SHAM group presented the higher results (OVX: $p<0.05$), and for the ELCOI, the OVX/RE group presented the best results. It is concluded that the treatment with strontium ranelate or OPG-Fc human improve significantly the peri-implant bone repair of osteopenic rats by inhibiting the exacerbated osteoclast activity, promoting a balance between the OPG/RANKL, it showing this improved characteristic in the animals treated with the strontium ranch.

Keywords: Osteoporosis, Bone Regeneration, Dental Implantation, Osteoprotegerin, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procedimento de ovariectomia	77
Figura 2: Tratamento medicamentoso com Ranelato de estrôncio.....	77
Figura 3: Tratamento medicamentoso com OPG-Fc Humano	77
Figura 4: Sequência cirúrgica para instalação de implantes.....	78
Figura 5: Fotomicrografia dos cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), grupos SHAM, OVX e OVX/RE Aumento original de 12,5x e 40x	78
Figura 6: Fotomicrografia da imunoistoquímica para proteína OPG	79
Figura 7: Fotomicrografia da imunoistoquímica para proteína RANKL.....	79
Figura 8: Fotomicrografia da imunoistoquímica para proteína TRAP.....	79
Figura 9: Fotomicrografia da imunoistoquímica para proteína WNT.....	80
Figura 10: Preparo dos fluorocromos calceína e alizarina.....	80
Figura 11: Fotomicrografia dos fluorocromos calceína e alizarina em sobreposição.....	80
Figura 12: Torquímetro digital.....	81
Figura 13: Escaneamento das peças através SkyScan.....	81
Figura 14: Sequência de softwares para reconstrução microtomográfica.....	81

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Grupos experimentais de acordo com as análises nos dois períodos de eutanásia.....	83
Tabela 2: Interações estatísticas entre os grupos experimentais.....	83
Tabela 3: Scores representativos da análise imunoistoquímica.....	83
Gráfico 1: Valores de absorbância nos grupos experimentais.....	84
Gráfico 2: Área óssea periimplantar (μm^2).....	84
Gráfico 3: Taxa de aposição mineral por dia (μm).....	85
Gráfico 4: Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI).....	85
Gráfico 5: Área de osso neoformada (AON).....	86
Gráfico 6: Quantificação do volume ósseo.....	86
Gráfico 7: Quantificação do percentual de volume ósseo.....	87
Gráfico 8: Quantificação da espessura trabecular.....	87
Gráfico 9: Quantificação da separação de trabéculas.....	88
Gráfico 10: Quantificação do número de trabéculas.....	88
Gráfico 11: Gráfico representativo da análise biomecânica (torque reverso).....	89
Gráfico 12: Gráfico da expressão relativa do gene para Osteoprotegerina.....	89
Gráfico 13: Gráfico da expressão relativa do gene para RANKL	90
Gráfico 14: Gráfico da expressão relativa do gene para Osteocalcina.....	90
Gráfico 15: Gráfico da expressão relativa do gene para ALP.....	

Gráfico 16: Gráfico da expressão relativa do gene para a Ratio RANKL/OPG.....	91
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

% = porcentagem

< = menor

> = maior

µm = micrômetro

µm² = micrômetros quadrado

ALP = fosfatase alcalina

AON = área óssea neoformada

BV = volume ósseo

BV/TV = porcentagem de volume ósseo

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

Cm² = centímetros quadrados

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

ELCOI = extensão linear de contato entre osso e implante

FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g = gramas

HE = hematoxilina-eosina

LSMT = laboratório para estudo de tecido mineralizado

M = molar

mg/Kg = miligramas por quilograma

ml/Kg = mililitros por quilograma

ml = mililitros

mm = milímetros

mm² = milímetros quadrados

mm³ = milímetros cúbicos

Nº = número

OPG = osteoprotegerina

PBS = tampão fosfato salino

pH = potencial hidrogeniônico

RANKL = receptor ativador do fator nuclear kappa-β ligante

Tb.N = número de trabéculas

Tb.Sp = separação entre trabéculas

Tb.Th = espessura trabecular

TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

vs = versus

x = vezes

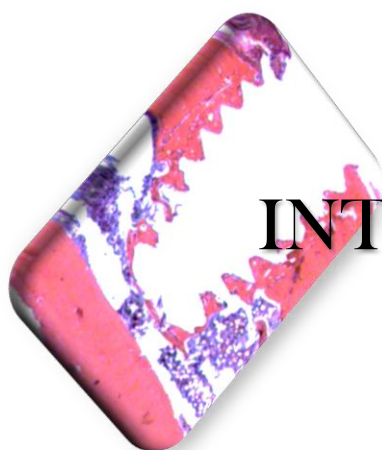
RE = ranelato de estrôncio

OPG-Fc Human = Osteoprotegerina humana

OVX = Ovariectomizada

SUMÁRIO

1. Introdução	32
2. Proposição	38
3. Material e Método	40
3.1. Delineamento Experimental	41
3.1.1 Ciclo estral.....	41
3.1.2 Castração Bilateral – Cirurgia de ovariectomia.....	41
3.1.3 Tratamento medicamentoso – Ranelato de estrôncio.....	42
3.1.4 Tratamento medicamentoso – OPG-Fc Humano.....	42
3.1.5 Cirurgia de instalação dos implantes.....	42
3.1.6 Aplicação dos fluorocromos.....	44
3.1.7 Análises histológica, imunoistoquímica: tíbias descalcificadas.....	45
3.1.8 Análise histométrica – tíbias calcificadas.....	47
4. Resultados	54
4.1. Teste Elisa	54
4.2. Análise histológica.....	54
4.3. Análise imunoistoquímica.....	54
4.4. Análise por microscopia confocal à laser.....	56
4.5. Análise microtomográfica.....	58
4.6. Análise biomecânica.....	58
4.7. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	59
5. Discussão	63
6. Conclusão	69
7. Referências Bibliográficas.....	71
Figuras.....	78
Tabelas e Graficos.....	84
Anexos.....	94



INTRODUÇÃO

1. Introdução

O fenômeno da osseointegração que corresponde à conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo e o implante (Branemark et al. 1985; Albrektson, 1989) promoveu grande avanço no tratamento para a reabilitação bucal, com um prognóstico de sucesso próximo de 100% (Chiapasco et al. 2011; Annibali et al. 2012; Peñarrocha-Diago et al 2012).

Para que ocorra uma adequada integração do implante dentário, a qualidade do tecido ósseo é um fator fundamental, tendo em vista que as características da microarquitetura óssea influenciam na habilidade do osso em suportar a transmissão e distribuição de forças fisiológicas (Leung et al. 2001; Isidor, 2006; Tabata et al. 2011). Neste contexto, quando o osso adquire uma estrutura cortical e/ou trabecular com menor densidade, a interface osso/implante é comprometida (Shapurian et al. 2006; Drage et al. 2007).

Como consequência da menopausa, a deficiência de estrógeno é uma das causas da osteopenia em dois terços das mulheres. Desta forma, a osteoporose é ocasionada pela deficiência estrogênica associada ao envelhecimento da população (Kribbs 1990, Amugongo et al., 2014).

O denosumab trata-se um anticorpo monoclonal totalmente humano que atua inibindo RANKL, sendo um dos principais moduladores da osteoclastogênese (Cummings SR et. al 2009; Stopeck AT et. al 2010). Em humanos, sua administração é realizada via subcutânea em doses de 60 mg a cada 6 meses para o tratamento de osteoporose e tumores metastáticos desencadeando significativa redução da reabsorção e turnover ósseo associado a notável aumento na densidade mineral óssea (DMO), bem como na absorciometria por dupla emissão de raio-x (ADX) (Bekker PJ et. al 2004;

Brown JP et. al 2009). Ensaios clínicos foram realizados e evidenciaram que o uso de denosumab (60mg/6meses – via subcutânea) em mulheres com osteoporose pós-menopáusicas resultou em aumento da DMO e reduziu de forma significativa o risco de fraturas vertebrais, não vertebrais e de quadril (Cummings SR et. al 2009; Papapoulos S et. al 2012; Austin M et. al 2012).

Estudos recentes demonstraram que o Denosumab, um anticorpo monoclonal totalmente humano, não manifesta nenhum efeito aparente em ratos e camundongos, por não reconhecer o RANKL murino. Por este motivo os autores utilizaram modelo animal de camundongos nocaute (geneticamente modificados), expressando uma forma quimérica de RANKL exclusiva (humano/murino) capaz de manter a reabsorção óssea no animal respondendo ao tratamento com denosumab (Kostenuik et al., 2009; Gerstenfeld et al, 2009). Estes autores avaliaram o efeito do Denosumab no reparo de fraturas femorais. Atualmente os estudos são escassos acerca dos efeitos da inibição da RANKL na arquitetura óssea trabecular e cortical em modelo experimental de ratas ovariectomizadas (OVX), que representam o modelo de eleição para estudos pré-clínicos de osteoporose pós-menopáusica. Foi observado por alguns autores que a inibição da RANKL pela OPG previne a perda de volume ósseo esponjoso além de aumentar a densidade mineral óssea em ratas OVX (Kostenuik, 2009).

Estudos de Ominsky e colaboradores (2008), onde utilizaram modelo experimental de ratas OVX tratadas com OPG-Fc humano, uma vez que a OPG é antagonista natural da RANKL nos animais que receberam o anticorpo humano houve significativa redução da perda óssea e aumento da densidade óssea mineral em comparação aos grupos controles. Desta forma, a eficácia da

OPG-Fc na supressão da reabsorção óssea em animais foi comprovada. Este anticorpo quando associado a um fragmento Fc permite meia vida mais longa no organismo, sendo uma alternativa para a investigação da inibição da RANKL em murinos. Desta feita, o modelo experimental adotado para este estudo será semelhante ao do estudo de Ominsky e colaboradores (2008), utilizando ratas OVX, com indução de osteoporose e posteriormente tratadas com OPG-Fc humano, aproximando-se do efeito do denosumab clinicamente, no entanto, para avaliar o reparo ósseo periimplantar, como sugerido por Yiming Liu et al. (2017), uma vez que há pouco estudos sobre esta região óssea envolvendo este medicamento.

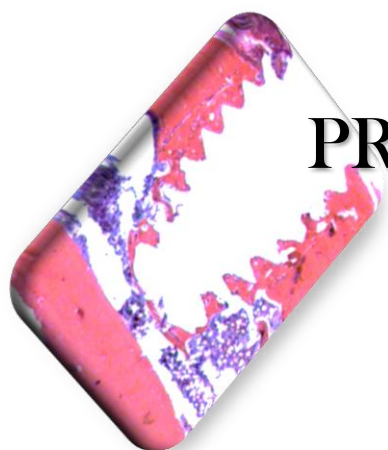
O ranelato de estrôncio é um fármaco desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopáusia (Brennan T et al. 2009). Consiste em dois átomos de estrôncio estáveis e uma porção orgânica (ácido ranélico). Sua atuação consiste em estimular a neoformação e suprimir a reabsorção óssea (Marie P et al. 2001). Com relação ao seu mecanismo de ação, ainda existem dúvidas (Marie PJ 2006). Hurtel et al. 2009, acredita que o medicamento atua através da ativação do receptor sensível de cálcio e ocasiona aumento da OPG e diminuição do RANKL. Acredita-se que ocorra desacoplamento do processo de remodelação óssea agindo positivamente na arquitetura e força do osso. Foram observados em alguns estudos experimentais que o ranelato de estrôncio preveniu perda óssea em ratas ovariectomizadas, aumentou a massa óssea em animais osteopênicos e a resistência óssea em animais normais (Grynpas M et al. 1990; Marie PJ et al. 2005).

Sabe-se dos benefícios inerentes destes fármacos no tratamento da osteoporose e de outras desordens esqueléticas, porém estes podem resultar

em efeitos adversos. A osteonecrose de mandíbula associada ao uso de bifosfonatos (OMAB) foi primeiramente descrita por Marx RE 2003, como condição em que há exposição óssea na cavidade oral persistente por mais de oito semanas em paciente que faz uso de bifosfonatos e não apresenta história prévia de radioterapia na região de cabeça e pescoço (Ruggiero SL et al. 2014). Alguns relatos clínicos e experimentais evidenciaram a relação do uso de denosumab e o desenvolvimento de osteonecrose mandibular (Kyrgidis A, et al. 2011; Otto S et al. 2013; Neuprez A et al. 2014; Williams DW et al. 2014). Denosumab e bifosfonatos são antirreabsortivos com mecanismos de ação distintos utilizados no tratamento de desordens esqueléticas. Saad et al. 2011 demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de osteonecrose em grupos submetidos a tratamento com BP's ou denosumab. No entanto segundo os autores, pacientes com osteonecrose mandibular por uso de denosumab apresentaram resolução mais rápida em relação ao grupo que utilizaram BP's. Uma importante distinção entre os dois medicamentos é o fato de que o denosumab não se incorpora à matriz óssea mineralizada permanecendo menor tempo no organismo. Este fato sugere o porquê do efeito menos agressivo deste medicamento frente à osteonecrose mandibular (Rogers MJ et al. 2000; Boyle WJ et al. 2003).

Um processo natural de envelhecimento ocorre na população e em decorrência disto, um aumento na procura por reabilitação maxilo-facial em clínicas odontológicas, seja para instalação de implantes dentários ou outros procedimentos envolvendo osso. A maior parte destes pacientes apresenta algum tipo de desordem sistêmica, a maioria delas acometendo tecido ósseo, como a osteoporose. Dentro dessa realidade, para que se consiga atingir um

processo de reabilitação desejável faz-se necessário o conhecimento do tipo de interferência sistêmica que o paciente apresenta, além da terapia medicamentosa utilizada no tratamento, no intuito de se obter uma reabilitação satisfatória e com tecido ósseo de melhor qualidade. Sendo assim, propomos utilizar modelo animal osteoporótico através da ovariectomia em ratas jovens (3 meses), como já preconizado na literatura (Ha BJ 2004; Muthusami S et al. 2005; Oztekin E et al. 2006; Folwarczna J et al. 2010), para avaliar o processo de reparo periimplantar de ratas submetidas ao tratamento com OPG-Fc humano e ranelato de estrôncio.



PROPOSIÇÃO

2. Proposição

O presente projeto tem como proposta avaliar o processo de reparo ósseo na interface osso/implante em ratas submetidas à ovariectomia, tratadas com OPG-Fc humano ou ranelato de estrôncio.



MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Método

Para a realização do presente estudo, o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00685-2015) (Anexo 1). Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela ARRIVE Guidelines (KILKENNY et al. 2010). Para a realização do experimento, 64 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, adultas, com peso corporal de 300 gramas, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP foram divididas em 4 grupos experimentais. Grupo controle negativo (SHAM) realizada cirurgia fictícia de ovariectomia; grupo controle positivo (OVX) realizada cirurgia de ovariectomia para indução de osteopenia, grupo (OVX/RE) submetido à ovariectomia e tratado com ranelato de estrôncio e grupo (OVX/OPG-Fc) submetido à ovariectomia e tratado com OPG-Fc Humano, simulando o mecanismo de ação do denosumab. Dessa forma, a distribuição dos animais de acordo com os grupos e períodos experimentais conforme demonstrado na **(Tabela 1)**.

Os grupos SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc foram divididos em dois subgrupos A e B de 42 e 60 dias correspondentes às análises pós instalação dos implantes. Cada subgrupo composto de 8 ratas (16/grupo, considerando os 2 períodos), sendo que, do n= 8 animais serão destinados às análises histológica, histométrica, e imunoistoquímica e 8 animais destinados às análises por μ CT, fluorocromos, biomecânica e análises de expressão gênica.

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Ciclo estral

Para garantir que as ratas utilizadas no experimento estavam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foi introduzido no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico e, em seguida, aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata (técnica de Evans e Long, 1922) para reconhecimento das fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares.

3.1.2 Castração Bilateral – Cirurgia de Ovariectomia

As 64 ratas foram anestesiadas com 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e, a seguir, realizadas incisões em ambos os flancos, com a exposição dos ovários e remoção cirúrgica dos mesmos. Para os grupos SHAM, 16 ratas foram submetidas somente ao acesso aos ovários, sem a remoção, com o intuito de submeter às ratas ao mesmo estresse cirúrgico, como as ovariectomizadas (**Figura 1**).

3.1.3 Tratamento Medicamentoso – Ranelato de Estrôncio

Passados 30 dias da ovariectomia, as ratas do grupo OVX/RE foram submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio. O medicamento foi administrado para as ratas diariamente na dose de 625mg/kg/dia dissolvido em solução aquosa por meio de gavagem oral com auxílio de uma agulha de gavagem para ratos corroborando com os estudos de Bain et al. 2009 e Zacchetti et al. 2014 (Figura 2). Esta medicação permaneceu até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 42 e 60 dias de administração, respectivamente.

3.1.4 Tratamento Medicamentoso – OPG-Fc Humano

Passados 30 dias da ovariectomia, as ratas do grupo OVX/OPG-Fc foram submetidas ao tratamento com OPG-Fc Humano. O medicamento foi administrado duas vezes por semana, através de injeção subcutânea, na dose de 10mg/Kg corroborando com o modelo experimental descrito por Ominsky e colaboradores 2008 (Figura 3). Esta medicação permaneceu até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 42 e 60 dias de administração, respectivamente.

Foi realizada análise por ELISA para observarmos a mensuração dos níveis séricos de OPG e RANKL nos grupos relacionados ao tratamento com OPG-Fc humano.

O estudo desta terapia medicamentosa foi realizado a partir de menor quantidade de análises em relação ao ranelato de estrôncio. Portanto, os dados do tratamento com opg fc são referentes a microtomografia computadorizada, contra torque e PCR tempo real.

3.1.5 Cirurgia de instalação dos implantes

Após 30 dias do início do tratamento medicamentoso 64 ratas foram submetidas à instalação dos implantes nas tíbias. Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e hemostasia do campo operatório.

Após a sedação dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região a ser incisada, com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) realizou-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial e o tecido mole foi divulsionado em espessura total, afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Foram instalados 128 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 1,5 mm e altura de 3,5 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação abundante com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®,

Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0mm, com travamento e estabilidade inicial.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. A sutura dos tecidos foi em planos utilizando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais superficial (Figura 4).

Cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) no pós-operatório imediato. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

3.1.6 Aplicação dos fluorocromos

Para a análise de epifluorescência e histometria (**Figura 10**), 14 dias após a instalação dos implantes, no grupo tecidos calcificados, foi administrado pela via intramuscular 20mg/kg do fluorocromo calceína (Luvizuto et al., 2011; Ramalho-Ferreira et al., 2015). Passados mais 28 dias (42 dias após a instalação dos implantes), foi administrado o fluorocromo vermelho de alizarina, na dose de 20 mg/kg para cada animal (Luvizuto et al., 2011; Ramalho-Ferreira

et al., 2015). A eutanásia destes animais foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes (18 dias após a administração da alizarina).

3.1.7 Análises Histológica e Imunoistoquímica: tíbias descalcificadas

GRUPO A

As tíbias direitas dos animais eutanasiados as 42 dias, pertencentes aos 4 grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc), foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas em xilol. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6 µm de espessura, para serem montadas em lâminas histológicas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras para as reações de imunoistoquímica.

Previamente a realização das análises histológica e imunoistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecia a qual grupo pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

Análise Histológica

Para análise histológica, foram analisadas de forma qualitativa a presença de células e a evolução do reparo ósseo na interface osso/ implante.

Análise Imunoistoquímica

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Em seguida, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra TRAP, OPG, RANKL bem como a via WNT (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (via WNT).

Foi utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Utilizando o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “escores” de acordo com o número de células imunomarcadas. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), atribuídos escores onde considera-se a área com marcação positiva, sendo marcação leve (escore 1), quando até 25% da área de interesse apresenta marcação positiva para a proteína avaliada; marcação moderada (escore 2), quando até 50% da área de interesse apresenta marcação positiva para a proteína avaliada;

marcação intensa (escore 3), quando até 75% da área de interesse apresenta marcação positiva para a proteína avaliada (Manrique et al. 2015, Faverani et al. 2017).

3.1.8 Análise Histométrica – tíbias calcificadas

GRUPO B

Análise Biomecânica

Para a análise biomecânica dos 4 grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc), após a sedação com cloridrato de quetamina e xilazina, aos 60 dias após a instalação dos implantes, as metáfises das tíbias esquerdas foram reabertas para exposição dos implantes e realizada a análise do torque reverso. Um monta-implante (Conexão, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital, acoplado ao monta-implante (**Figura 12**).

Desta maneira foi aplicado movimento anti-horário aumentando-se 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).

Análise Molecular

Para análise RT-PCR dos 4 grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc), 42 dias após a instalação dos implantes, os animais foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil). Após a realização da análise de torque reverso, o osso da tíbia na região de remoção do implante foi coletado e armazenado e congelado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A reação em cadeia da polimerase transcrita reversa (RT-PCR) foi realizada para avaliar a expressão de Osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANKL), osteocalcina (OC), (ALP) fosfatase alcalina. Os seguintes genes de ratos e os ensaios de expressão gênica de TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) dos conjuntos primer / probe utilizados foram: OPG (Tnfrsf11b, Rn00563499_m1), RANKL (Tnfrsf11, Rn00589289_m1), OC (Bglap, Rn0056386_g1).

Depois de determinar a integridade, pureza e concentração do RNA, o cDNA foi feito usando 1µg de RNA em uma reação de transcriptase reversa (transcriptase reversa M-MLV; Promega Corporation, Madison, WI, EUA). A RT-PCR foi realizada utilizando um sistema de detecção para RT-PCR Step One Plus (Laboratórios Bio-Rad, Filadélfia, PA, EUA) com o sistema TagMan (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) sob as condições: 50 ° C (2 min), 95 (10 min) e 40 ciclos de 95 (15 s), 60 (1 min), seguido por uma curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à

expressão de proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizou a expressão gênica do osso alveolar nos diferentes períodos experimentais (método $\Delta\Delta CT$). Os ensaios foram realizados e quadruplicados.

Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Após a eutanásia dos animais, as tíbias dos 4 grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc) foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica.

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) (**Figura13**), as peças foram escaneadas utilizando cortes de 6 μ m de espessura (90Kv e 111 μ A), com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.5mm, tamanho do pixel de 2016x1344 μ m e com tempo de aquisição de 1h e 32min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 1, correção dos anéis de artefato de 8, correção de Beam Hardening de 24% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) (**Figura 14**), as imagens foram reconstruídas, sendo observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0) foi avaliada a região

entre a 3ª e 5ª espira dos implantes em 100 slices contados da sua porção mais central (Glosel et al., 2010), sendo assim definidos, o volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), (Bouxsein et al., 2010) para então realizar a reconstrução em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

Microscopia confocal a laser

As tíbias do lado direito dos animais dos 3 grupos experimentais (SHAM, OVX e OVX/RE) após removidas e reduzidas, foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a análise microtomográfica, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir de uma sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas.

Ao término da desidratação, as peças foram imersas em uma mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilizasse apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, fotopolimerizadas e submetidas ao protocolo para processamento do Exakt (Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha).

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

Foram obtidos cortes longitudinais na região de interface osso/implante correspondentes à terceira, quarta e quinta espiras dos implantes. Estes cortes foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Obtendo assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados, para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR).

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

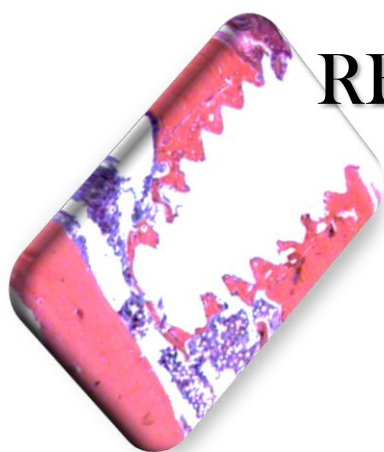
Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta straight foram traçadas 5 medidas estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 28, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados (Dempster et al., 2013).

Histometria

Para calcular a extensão linear do contato osso/implante contato (ELCOI), o perímetro em micrômetros da interface periimplantar na região entre a terceira e quinta espiras dos implantes, foi padronizado para todos os grupos (Figura 3). E o cálculo da área de osso neoformada (AON) foi realizado na região correspondente entre a terceira e quarta espira (Figura 4). Utilizou-se o programa de análise de imagens - Imagem J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá) para esta finalidade. Portanto, somente as linhas fluorescentes verdes (calceína) e vermelhas (alizarina), que foram precipitadas na interface periimplantar, foram mensuradas.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 7.0 (San Jose, CA, EUA). A análise da homocedasticidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos do micro-CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), foi utilizado o teste ANOVA 1 fator e pós-teste Holm-Sidak. Para os parâmetros não paramétricos relacionados a MAR e AON, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Tukey. Para os dados paramétricos, relacionados à área de fluorocromos foi aplicado o teste ANOVA 2 fatores, e para os valores de ELCOI, o teste ANOVA 1 fator foi empregado. Estes dois últimos, quando identificada significância estatística, o pós teste Tukey foi aplicado. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$ para todos os testes.



RESULTADOS

4- Resultados

4.1 Teste Elisa

Foi realizada análise por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou ensaio de imunoabsorção enzimática, compreendendo um teste imunoenzimático que permitindo a detecção de anticorpos específicos para observarmos a mensuração dos níveis séricos de OPG e RANKL nos grupos relacionados ao tratamento com OPG-Fc humano. Comprovando desta maneira a eficácia desta medicação quando aplicada em murinos, como observado através dos valores de absorbância mostrados no gráfico (**Gráfico1**)

Para os animais pertencentes ao grupo OPG-Fc foram instituídas as análises de toque reverso, PCR e microtomografia computadorizada.

GRUPO A

Análises histológicas e imunoistoquímica: tíbias descalcificadas

4.2 - Análise histológica

Na interface osso/implante dos grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE) aos 42 dias foi possível observar osso neoformado ao redor da grande maioria das espiras especialmente nos grupos SHAM e OVX/RE. Para o grupo OVX, observou-se formação de tecido ósseo na interface osso/implante, porém com maior quantidade de medula óssea, rica em tecido adiposo (**Figura 5**).

4.3 - Análise imunoistoquímica

Foram avaliadas as proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo, como os novos membros dos fatores de necrose tumoral, OPG e RANKL. Ambas as proteínas apresentam um padrão de marcação semelhante, no entanto, por ser um “decoy receptor”, a osteoprotegerina apresenta um padrão de marcação menos marcante, quando comparado a RANKL. Ambos apresentam-se marcados em células semelhantes a osteoblastos. A avaliação comparativa do padrão de marcação dessas duas proteínas sinaliza um padrão de resposta onde há predomínio de reabsorção (maior escore para RANKL) ou predomínio de formação óssea (maior escore para OPG) (**Tabela 3**).

Observa-se para a proteína OPG (**Figura 6**) que os grupos SHAM, OVX e OVX/RE, áreas de imunomarcação com intensidade variando de moderada a intensa (setas).

Para a proteína RANKL (**Figura 7**) nos grupos SHAM e OVX/RE, notaram-se áreas de imunomarcação com intensidade moderada (setas) enquanto que para o grupo OVX foi observada imunomarcação intensa (setas).

A Wnt é a proteína chave da via Wnt, descrita recentemente e relacionada à atividade de formação óssea a partir da sinalização parácrina entre osteócitos e osteoblastos, portanto está ligada a resposta de formação óssea, apresentando-se especialmente marcada em células da linhagem osteoblástica, nos grupos SHAM e OVX/RE observa-se uma imunomarcação moderada (setas) enquanto para o grupo OVX a marcação foi de moderada-intensa (setas) (**Figura 8**).

A TRAP é uma enzima presente no lisossomo de osteoclastos em atividade de reabsorção. Portanto, marca osteoclastos em atividade de reabsorção, podendo estar avaliada em conjunto com OPG e RANKL (proteínas ligadas a via de reabsorção óssea), apresentando no grupo SHAM e OVX/RE marcação leve e OVX marcação moderada (setas) **(Figura 9)**.

Grupo B

Análise histométrica – tíbias calcificadas

4.4 Análise por microscopia confocal à laser

A representação do turnover ósseo periimplantar pode ser observada na **Figura 11 A, B e C**. A precipitação de cálcio na matriz orgânica evidenciou a marcação da fluorescência, tanto pela calceína (coloração esverdeada), quanto pela alizarina (coloração vermelha). As linhas fluorescentes verdes mostram expressão de osso antigo, enquanto as linhas vermelhas de osso novo.

Para a avaliação intergrupos, ficou evidente o maior turnover ósseo (precipitação dos fluorocromos) no grupo OVX/RE (teste de Tukey, $p > 0,05$), em comparação aos grupos SHAM e OVX (teste de Tukey, $p < 0,05$). Entretanto, foi possível notar para o grupo OVX/RE uma tendência de maior precipitação para o vermelho de alizarina em detrimento da calceína. Em contrapartida, houve tendência de menor precipitação de alizarina e maior para calceína no grupo OVX. **(Gráfico 2)**

Em relação a taxa de aposição mineral (MAR) por dia de avaliação do reparo ósseo, os maiores valores foram encontrados no grupo OVX/RE com

deposição mineral de 1,9111 $\mu\text{m}/\text{dia}$ e os menores no grupo OVX com 0,45 $\mu\text{m}/\text{dia}$ (Kruskal-Wallis, $p<0,05$), **(Gráfico 3)**

Para a extensão linear de contato osso/implante (ELCOI), o grupo OVX apresentou os menores valores de perímetro (134,07) ($p<0,05$) em comparação aos grupos SHAM e OVX/RE, Já os maiores valores foram encontrados nos grupos OVX/RE (337,12) e SHAM (245,6). **(Gráfico 4)**

Para a área de osso neoformada (AON), os maiores valores foram observados nos grupos SHAM e OVX/RE, com valores médios de 8188,19 μm^2 e 7099,41 μm^2 ($p<0,05$) respectivamente e os menores valores para o grupo OVX com área média de 1281,41 μm^2 . **(Gráfico 5)**

4.5 - Análise microtomográfica (MICRO-CT)

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente à medida do volume ósseo (BV) obtivemos no grupo SHAM média, 0,04174 mm^3 , no grupo OVX 0,039537 mm^3 , no grupo RE 0,040058 mm^3 , e no grupo OPG-Fc 0,04521 mm^3 , em que o volume se apresentou maior no grupo OPG-Fc, porém não houve diferença estatística entre os 4 grupos com ($p>0,05$, Holm-Sidak) **(Gráfico 6)**. Quando avaliada a porcentagem de volume ósseo (BV/TV) obtivemos para SHAM (39,92%), OVX (37,81%), RE (39,17%) e OPG-Fc (31,05%) onde o grupo OPG-Fc mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre todos os grupos estudados. ($p>0,05$ Holm-Sidak) **(Gráfico 7)**.

Referente às trabéculas ósseas periimplantares, a espessura trabecular (Tb.Th) mostrou resultados semelhantes entre os grupos SHAM (0,0880 mm) e

RE (0,0985 mm), os quais apresentaram resultados melhores em comparação ao grupo OVX (0,0692 mm), Já o grupo OPG-Fc (0,0904 mm) apresentou valor maior comparado aos grupos SHAM e OVX, e valor menor comparado ao grupo RE, porém sem diferença estatística ($p>0,05$, Holm-Sidak) **(Gráfico 8)**.

Seguindo este mesmo padrão, a separação de trabéculas (Tb.Sp) apresentou valores médios aproximados do grupo SHAM (0,128 mm) , RE (0,130 mm) e OPG-Fc (0,151 mm), com diminuição para o grupo OVX (0,109 mm), com estatística significativa na comparação entre OPG-Fc e todos os grupos **(Gráfico 9)**. Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido uma média de (4,652 mm) para SHAM, tendo valor próximo ao grupo RE (3,983 mm), já um aumento no número de trabéculas para o grupo OVX, com (5,551 mm) apresentando diferença estatística quando comparado ao grupo OPG-Fc (3,765 mm) ($p=0,0292$, ANOVA) **(Gráfico 10)**.

4.6 - Análise biomecânica

Na comparação entre os grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE e OVX/OPG-Fc) para o parâmetro biomecânico notou-se diferença estatística significativa entre o grupo OVX/RE e todos os outros grupos estudados, sendo o grupo OVX/RE o que apresentou o maior registro de torque reverso **(Figura 13 e Gráfico 11)**.

4.7 - Análise da expressão gênica por pcr em tempo real

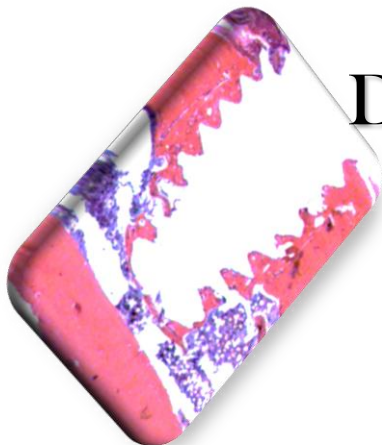
A expressão gênica relativa da osteoprotegerina OPG por meio da PCR em tempo real mostrou diferença estatística significativa na comparação entre os grupos estudados ($p < 0.05$, Kruskal Wallis), com exceção do grupo OVX x OPG-Fc o qual não demonstrou diferença estatística significativa, mostrando que a expressão do RNA mensageiro que codifica esta proteína permaneceu em níveis basais durante todo o processo de reparo ósseo. **(Gráfico 12)**. A proteína RANKL, um receptor transmembrana de pré osteoclastos manteve-se em níveis semelhantes (OVX, RE e OPG-Fc), apresentando-se mais elevada no grupo SHAM. Apresentado diferença estatística significativa na comparação do grupo SHAM e os demais grupos ($p < 0.05$, Kruskal Wallis), sendo que o grupo OPG-Fc não apresentou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos OVX e RE **(Gráfico 13)**.

A osteocalcina OC é a proteína não colágena de maior predomínio na matriz extracelular mineralizada, considerada um marcador da mineralização óssea. Liga-se ao cálcio durante a sua precipitação sobre a matriz colágena observando-se os seus maiores valores de expressão relativa nos grupos OVX e OPG-Fc, ($p < 0.05$, Kruskal Wallis) na comparação entre todos os grupos estudados **(Gráfico 14)**.

A Fosfatase alcalina ALP é uma enzima que comanda a precipitação de fosfato sobre a matriz, sendo inicial no processo de formação óssea. Apresentou diferença estatística significativa entre todos os grupos estudados ($p < 0.05$, Kruskal Wallis), com exceção do grupo SHAM quando comparado ao grupo OVX, apresentando seus maiores valores para RE **(Gráfico 15)**.

A avaliação comparativa do padrão de expressão gênica dessas duas proteínas sinaliza um padrão de resposta onde há predomínio de reabsorção (RANKL) ou predomínio de formação óssea (OPG). No entanto, este padrão de resposta caracteriza-se melhor quando se faz a RATIO RANKL/OPG a partir da expressão gênica desses dois fatores por PCR tempo real, sendo que no experimento ratio podemos observar o grupo onde predomina a resposta de reabsorção óssea, sendo que na comparação entre os 4 grupos estudados, não obtivemos diferença estatística significativa ($p < 0.05$, Kruskal Wallis) **(Gráfico 16)**.

Os resultados obtidos quanto à expressão gênica dos marcadores de remodelação óssea OPG e RANKL trazem informações bastante interessantes quanto aos eventos moleculares envolvidos no processo de reparação óssea periimplantar em ratas osteopênicas.



DISCUSSÃO

5. Discussão

Observamos neste estudo que o tratamento com ranelato de estrôncio durante 6 semanas, promoveu melhora significativa na remodelação óssea periimplantar de ratas osteopênicas aos 60 dias após instalação dos implantes em tíbia, o que representa a microestrutura óssea final em seu período de remodelação. O tratamento com ranelato de estrôncio mostrou-se capaz de aumentar a renovação óssea e os parâmetros da microestrutura óssea referentes à atividade celular relacionada à formação óssea e melhorar as características histológicas quando comparado com ratas osteopênicas não tratadas (SHAM) ou tratadas com OPG-Fc humano.

Para que ocorra a remodelação óssea adequada, há necessidade que atividades de reabsorção e formação atuem de forma acoplada e equilibrada. E o caminho para que ocorra este equilíbrio é a sinalização de RANK controlada na proporção entre OPG e RANKL, uma vez que RANKL liga-se a seu receptor RANK para induzir a ativação, função e diferenciação de osteoclastos, enquanto que OPG atua como um receptor para RANKL, inibindo assim a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea (Trouvin AP e Liu C. 2010).

A proporção RANKL/OPG esperada na homeostase é caracterizada por um equilíbrio entre reabsorção e formação óssea, onde não podemos observar formação, nem perda óssea. Já na condição sistêmica da osteoporose em mulheres, observa-se um aumento de RANKL em relação à OPG, caracterizando aumento da reabsorção óssea, consequentemente da proporção RANKL/OPG, como encontrado neste estudo no grupo OVX.

Com o aumento da perspectiva de vida e consequente envelhecimento da população, hoje em dia é comum receber pacientes com osteoporose em

busca de tratamento cirúrgico odontológico. O ranelato de estrôncio tem-se mostrado uma droga eficaz no tratamento da osteoporose, uma vez que diminui significativamente o risco de fraturas ósseas vertebrais e não vertebrais, pois promove um aumento da densidade óssea mineral (Seeman et al. 2006). Diante desta informação, estudos buscam conhecer os efeitos desta medicação na reparação óssea periimplantar. Neste estudo, pudemos observar no osso ao redor dos implantes no grupo RE uma intensa expressão de OPG com diminuição da marcação de RANKL. Enquanto no grupo OPG-Fc essa expressão foi menos intensa, porém apresentando-se maior para OPG em comparação a RANKL. Já as ratas do grupo OVX apresentaram marcação moderada para OPG e intensa expressão de RANKL, sugerindo que tanto Ranelato de estrôncio quanto OPG-Fc estimulam a formação de osso periimplantar e inibem sua reabsorção, dados esses que corroboram com os estudos de Marie et al. 2005, que sugeriu uma ação anabólica do ranelato de estroncio, inibindo a osteoclastogênese por meio da diminuição da expressão de RANKL e estimulando a osteoblastogênese, e corroboram também com os estudos de Yiming Liu et al. 2017 onde foi observada a inibição de reabsorção óssea excessiva ao redor do implante, especialmente no osso osteoporótico, sendo importante na estabilização inicial e sucesso a longo prazo do implante.

Sabe-se que a avaliação microtomográfica é a modalidade padrão ouro para avaliar os parâmetros ósseos como densidade óssea (Manolagas 2013), volume ósseo e porcentagem de osso trabecular, fundamentais na taxa de sucesso no que se diz respeito à osseointegração dos implantes dentários (Shapurian et al. 2006).

Este estudo demonstrou uma melhora nos aspectos histomorfométricos de consolidação óssea reparacional após seis semanas de terapia com ranelato de estrôncio em ratas osteopênicas. Foi possível observar nas lâminas histológicas o maior padrão de osso trabecular com mínima presença de tecido conjuntivo para o grupo RE, mostrando-se superior até mesmo aos animais saudáveis (grupo SHAM).

Além disso, o tratamento com RE aumenta a densidade óssea mineral como visto nos estudos de (Meunier et al. 2009, Morabito et al. 2016), o que poderia explicar essas melhorias nos dados de micro-CT superiores aos dados do OPG-Fc humano. Estes resultados do RE são corroborados especialmente pela imunomarcagem positiva para Wnt, uma proteína relacionada ao aumento da densidade óssea, bem como relacionada a respostas anabólicas do tecido ósseo. Vale destacar que genes para fosfatase alcalina e osteocalcina encontram-se elevados em relação aos animais OVX, quando na terapia com RE.

A análise pelos fluorocromos consiste numa ferramenta de grande valia quando se objetiva caracterizar aspectos dinâmicos da precipitação de cálcio e fosfato sobre a matriz orgânica do tecido ósseo. A avaliação de parâmetros, como a área de fluorocromos e a aposição mineral diária reforçam a característica do RE como sendo um fármaco com ações anabolizantes do tecido ósseo, com resultados superiores aos do grupo SHAM. Assim, do ponto de vista funcional e biológico, o RE exerce um efeito superior quanto ao metabolismo do tecido ósseo. A dinâmica do tecido ósseo, caracterizada pela análise dos fluorocromos é respaldada pela expressão gênica de RANKL e OPG, onde menores valores desta proporção caracterizam uma melhor taxa de

formação óssea. Estes resultados foram observados no grupo RE e corroboram com os achados da histometria dinâmica.

Vários tratamentos para a osteoporose estão sendo propostos e estudados na atualidade. Embora à longo prazo, o Alendronato possa desenvolver osteonecrose da mandíbula, ele ainda sim é o fármaco mais utilizado para tratamento da osteoporose e promove ótimos resultados em relação à prevenção de fraturas ósseas e do quadril vertebral, bem como o aumento da deposição mineral óssea (Wells et al. 2008).

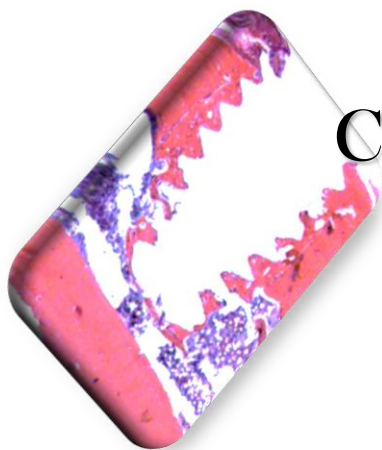
Uma nova terapia proposta para o tratamento da osteoporose é o denosumab, também relacionado a casos de desenvolvimento de necrose óssea dos maxilares (Ruggiero et al. 2014), porém mostrando sua melhora significativa na densidade óssea como nos estudos de Bernhardsson 2015. O raloxifeno, outra droga que tem sido amplamente estudada, tem demonstrado em estudos pré-clínicos que tem um efeito maior sobre a cicatrização óssea peri-implantar(Ramalho-Ferreira et al. 2015). No entanto, o raloxifeno não é bem aceito na clínica médica, devido à falta de efeito para reduzir fraturas não vertebrais (Gallacher e Dixon 2010). Por outro lado, está bem estabelecido que o ranelato de estrôncio promove um efeito positivo na redução de fraturas vertebrais e não vertebrais, bem como o aumento da densidade mineral óssea, não estando correlacionado nestes estudos a casos de osteonecrose (Seeman et al. 2006, Reginster et al. 2005).

Com relação a OPG-Fc mimetizando a ação do Denosumab na terapia anti-osteoporose, as análises realizadas mostram que esta substância tem um efeito positivo sobre a inibição da reabsorção óssea. Esta característica permitiu que a utilização da OPG-Fc promovesse uma melhora parcial quanto

aos parâmetros avaliados, na comparação entre todos os grupos experimentais deste estudo. Apesar desta substância inibir a liberação de RANKL, em função da dinâmica entre RANKL e OPG e a ação acoplada destas duas citocinas, o bloqueio de uma prejudica a liberação da outra. Neste estudo, este aspecto é ilustrado pelos resultados inferiores da OPG-Fc em relação ao RE para parâmetros como torque de remoção e parâmetros da micro-arquitetura do tecido ósseo peri-implantar. No entanto, vale destacar que a expressão aumentada de genes para osteocalcina e fosfatase alcalina nesse grupo parecem estar relacionados à melhora parcial da quantidade de osso formado no grupo OPG-Fc em relação ao grupo OVX. Mais análises necessitam ser realizadas com o intuito de melhor caracterizar o tecido ósseo reparacional frente a terapia com esta substância durante a condição de deficiência de estrógeno.

Deve-se reconhecer que este estudo pré-clínico apresenta várias limitações sobre o efeito da terapia com ranelato de estrôncio e OPG-Fc humano, na reparação óssea periimplantar. No entanto, os resultados observados mostram que biologicamente e funcionalmente, o tratamento com RE consegue reverter de forma mais eficaz, quando comparado a OPG Fc, as propriedades prejudicadas do metabolismo ósseo frente à osteopenia. Outros estudos já estão sendo desenvolvidos pelo nosso grupo a fim de encontrar respostas para encontrar respostas sobre a ação destes fármacos na cicatrização óssea peri-implantar, conhecer suas propriedades mecânicas e biológicas.

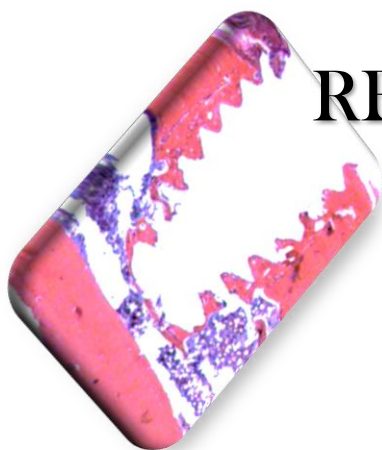
.



CONCLUSÃO

6. Conclusão

Conclui-se que o tratamento com ranelato de estrôncio ou OPG-Fc humano melhora significativamente a reparação óssea periimplantar de ratas osteopênicas por inibição da atividade osteoclástica exacerbada, promovendo um equilíbrio entre RANKL/OPG, apresentando essa característica melhorada nos animais tratados com ranelato de estrôncio.



REFERÊNCIAS

7. Referências Bibliográficas

1. Albrektson T. The Branemark osseointegrated implant. Chicago: Quintessence, 1989. 262p.
2. Amugongo SK1, Yao W1, Jia J1, Dai W1, Lay YA1, Jiang L1, Harvey D2, Zimmermann EA3, Schaible E4, Dave N3, Ritchie RO5, Kimmel DB6, Lane NE7. Effect of sequential treatments with alendronate, parathyroid hormone (1-34) and raloxifene on cortical bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone*. 2014 Oct;67:257-68.
3. Annibali S, Cristalli MP, Dell'aquila D, Bignozzi I, La Monaca G, Pilloni A. Short dental implants: a systematic review. *J Dent Res*. 2012 Jan; 91: 25-32.
4. Austin M, Yang YC, Vittinghoff E, Adami S, Boonen S, Bauer DC, et al. Relationship between bone mineral density changes with denosumab treatment and risk reduction for vertebral and nonvertebral fractures. *J Bone Miner Res*. 2012;27(3):687-93.
5. Bain S, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int*. 2009;20(8):1417-28.
6. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2004;19(7):1059-66.
7. Bernhardsson M, Sandberg O, Aspenberg P. Anti-RANKL treatment improves screw fixation in cancellous bone in rats. *Injury* 2015; 46: 990-5.
8. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
9. Branemark PI, Zarb GA, Albrektson T. tissue integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence Co., 1985, 350p.
10. Brennan T, Rybchyn M, Green W, Atwa S, Conigrave A, Mason R. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol*. 2009;157(7):1291-300.

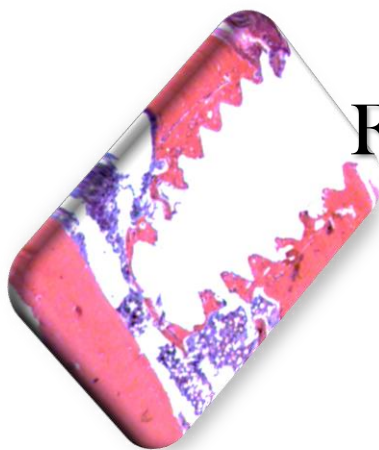
11. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):153-61.
12. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M, Corsi E. Evaluation of peri-implant bone resorption around Straumann Bone Level(®) implants placed in areas reconstructed with autogenous vertical onlay bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Aug 9.
13. Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2009;361(8):756-65.
14. Drage NA, Palmer RM, Blake G, Wilson R, Crane F, Fofelman I. A comparison of bone mineral density in the spine, hip and jaws of edentulous subjects. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 496-500.
15. Evans HM, Long JA. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1922:38-9.
16. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018 Jan;22(1):255-265.
17. Folwarczna J, Zych M, Trzeciak HI. Effects of curcumin on the skeletal system in rats. *Pharmacol Rep*. 2010;62(5):900-9.
18. Gallacher, S. J., and T. Dixon. 2010. "Impact of treatments for postmenopausal osteoporosis (bisphosphonates, parathyroid hormone, strontium ranelate, and denosumab) on bone quality: a systematic review." *Calcif Tissue Int* 87 (6):469-84.
19. Gerstenfeld LC, Sacks DJ, Pelis M, Mason ZD, Graves DT, Barrero M, et al. Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):196-208.
20. Grynpas M, Marie P. Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. *Bone*. 1990;11(5):313-9.
21. Ha BJ. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. *Arch Pharm Res*. 2004;27(8):867-72.
22. Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, Cournarie F, Wattel A, Kamel S, et al. The Calcium-sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-induced Osteoclast Apoptosis new insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem*. 2009;284(1):575-84.

23. Isidor F. Influence of forces on peri-implant bone. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 Suppl 2:8-18.
24. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. 2010 *PLoS biology*, v. 8, n. 6, p. e1000412.
25. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):182-95.
26. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J. Prosthet. Dent*. 1990; 63: 218–222.
27. Kyrgidis A, Toulis K. Denosumab-related osteonecrosis of the jaws. *Osteoporos Int*. 2011;22(1):369-70.
28. Leung KC, Chow TW, Wat PY, Comfort MB. Peri-implant bone loss: management of a patient. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:273-277.
29. Liu C, Walter TS, Huang P, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol* 2010; 184: 6910-9.
30. Luvizuto, E. R., S. S. Dias, T. Okamoto, R. C. Dornelles, and R. Okamoto. 2011. "Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats." *Arch Oral Biol* 56 (10):984-90
31. Manolagas, S. C., C. A. O'Brien, and M. Almeida. 2013. "The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease." *Nat Rev Endocrinol* 9 (12):699-712.
32. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig*. 2015 Jul;19(6):1319-27.
33. Marie P, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(3):121-9.
34. Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, et al. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res*. 2005;20(6):1065-74.
35. Marie PJ. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:S11-S5.

36. Meunier, P. J., C. Roux, S. Ortolani, M. Diaz-Curiel, J. Compston, P. Marquis, C. Cormier, G. Isaia, J. Badurski, J. D. Wark, J. Collette, and J. Y. Reginster. 2009. "Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis." *Osteoporos Int* 20 (10):1663-73.
37. Morabito, N., A. Catalano, A. Gaudio, E. Morini, L. M. Bruno, G. Basile, E. Tsiantouli, F. Bellone, R. M. Agostino, B. Piraino, M. A. La Rosa, C. Salpietro, and A. Lasco. 2016. "Effects of strontium ranelate on bone mass and bone turnover in women with thalassemia major-related osteoporosis." *J Bone Miner Metab* 34 (5):540-6.
38. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta*. 2005;360(1):81-6.
39. Neuprez A, Coste S, Rompen E, Crielaard J-M, Reginster J-Y. Osteonecrosis of the jaw in a male osteoporotic patient treated with denosumab. *Osteoporos Int*. 2014;25(1):393-5.
40. Ominsky MS, Xiaodong L, Asuncion FJ, Barrero M, Warmington KS, Dwyer D, Stolina M, et al. RANKL Inhibition With Osteoprotegerin Increases Bone Strength by Improving Cortical and Trabecular Bone Architecture in Ovariectomized Rats. *J Bone Miner Res*. 2008;23(5) doi: 10.1359/JBMR.080109.
41. Otto S, Baumann S, Ehrenfeld M, Pautke C. Successful surgical management of osteonecrosis of the jaw due to RANK-ligand inhibitor treatment using fluorescence guided bone resection. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2013;41(7):694-8.
42. Oztekin E, Mogulkoc R, Baltaci A, Tiftik A. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF- α levels in ovariectomized and pinealectomized rats. *Acta Biol Hung*. 2006;57(3):275-81.
43. Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C, Brandi ML, Brown JP, Czerwiński E, et al. Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res*. 2012;27(3):694-701.
44. Peñarrocha-Diago MA, Galán-Gil S, Carrillo-García C, Peñarrocha-Diago D, Peñarrocha-Diago M. Transcrestal sinus lift and implant placement using the sinus balloon technique. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Jan 2012; 17: 122-8.
45. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics*. 2015;20(3).
46. Ramalho-Ferreira, G., L. P. Faverani, F. B. Prado, I. R. Garcia, and R. Okamoto. 2015. "Raloxifene enhances peri-implant bone healing in

- osteoporotic rats." *International journal of oral and maxillofacial surgery* 44 (6):798-805.
47. Reginster, J. Y., E. Seeman, M. C. De Vernejoul, S. Adami, J. Compston, C. Phenekos, J. P. Devogelaer, M. D. Curiel, A. Sawicki, S. Goemaere, O. H. Sorensen, D. Felsenberg, and P. J. Meunier. 2005. "Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study." *J Clin Endocrinol Metab* 90 (5):2816-22. doi: 10.1210/jc.2004-1774.
 48. Rogers MJ, Gordon S, Benford H, Coxon F, Luckman S, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000;88(S12):2961-78.
 49. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 10//;72(10):1938-56.
 50. Ruggiero, Salvatore L., Thomas B. Dodson, John Fantasia, Reginald Goodday, Tara Aghaloo, Bhoomi Mehrotra, and Felice O'Ryan. 2014. "American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update." *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 72 (10):1938-1956.
 51. Saad F, Brown J, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer S, Stopeck A, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol*. 2011:mdr435.
 52. Seeman, E., B. Vellas, C. Benhamou, J. P. Aquino, J. Semler, J. M. Kaufman, K. Hoszowski, A. R. Varela, C. Fiore, K. Brixen, J. Y. Reginster, and S. Boonen. 2006. "Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older." *J Bone Miner Res* 21 (7):1113-20.
 53. Shapurian T, Damoulis P, Reiser GM, Griffin TJ, Rand WM. Quantitative evaluation of bone density using Hounsfield Index. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:290-297.
 54. Shapurian, T., P. D. Damoulis, G. M. Reiser, T. J. Griffin, and W. M. Rand. 2006. "Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index." *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (2):290-7.
 55. Stopeck AT, Lipton A, Body J-J, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*. 2010;28(35):5132-9.
 56. Tabata LF, Rocha EP, Barao VA, Assuncao WG. Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:482-491.

57. Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010; 5: 345-54.
58. Wells, G. A., A. Cranney, J. Peterson, M. Boucher, B. Shea, V. Robinson, D. Coyle, and P. Tugwell. 2008. "Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women." *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD001155
59. Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, et al. Impaired Bone Resorption and Woven Bone Formation Are Associated with Development of Osteonecrosis of the Jaw-Like Lesions by Bisphosphonate and Anti-Receptor Activator of NF-κB Ligand Antibody in Mice. *The American journal of pathology*. 2014;184(11):3084-93.
60. Yiming Liu, Jing Hu, Biao Liu, Xiliang Jiang, Yunfeng Li. 2017 "The effect of osteoprotegerin on implant osseointegration in ovariectomized rats" *Arch Med Sci* (13), 2: 489-495.
61. Zacchetti G, Dayer R, Rizzoli R, Ammann P. Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. *BioMed research international*. 2014;2014.



FIGURAS

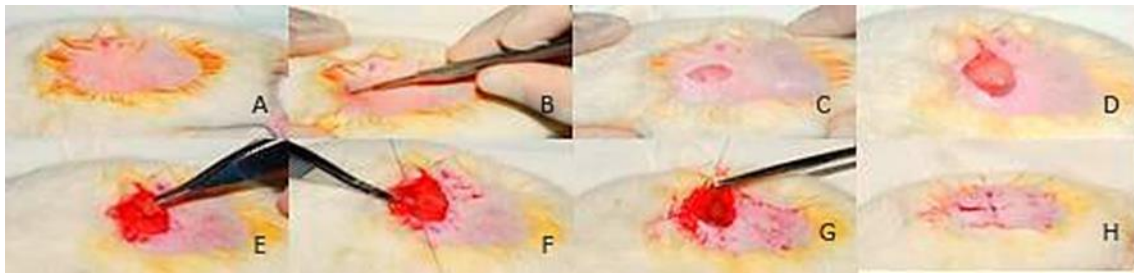


Figura 1 - Sequência do trans-operatório do procedimento de ovariectomia: A: Região do flanco da rata tricotomizada e realizada antissepsia com PVPI tópico; B: Incisão da mesma região envolvendo pele e tecido subcutâneo; C: Exposição do musculo abdominal; D: Localização da gordura branca que envolve o ovário; E: Identificação do ovário; F: Laqueamento do corno uterino; G: Remoção do ovário; H: Sutura por planos.

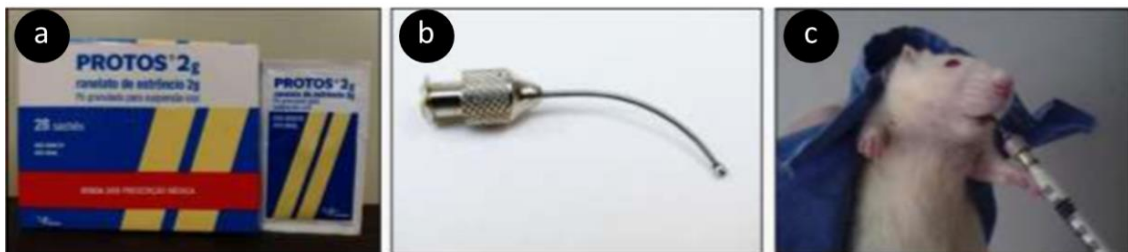


Figura 2 - (a): ranelato de estrôncio disponível comercialmente; (b): agulha de gavagem para ratos; (c): gavagem oral com ranelato de estrôncio.

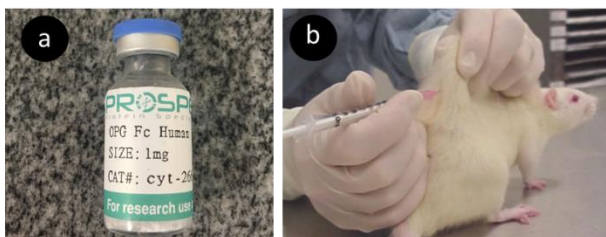


Figura 3 - (a): OPG Fc Humano disponível comercialmente; (b): administração subcutânea de OPG Fc Humano.

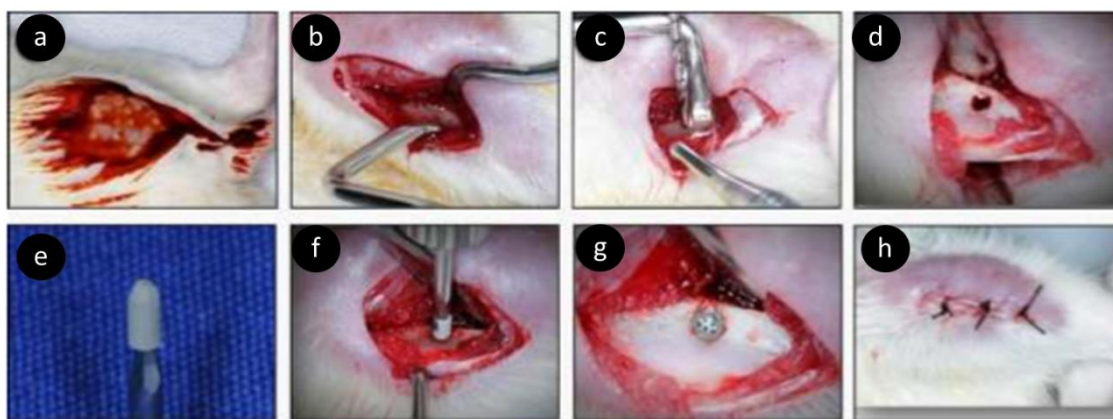


Figura 4 - (a): tricotomia na metáfise tibial e antissepsia com polivinilpirrolidona; (b-c): acesso e exposição da metáfise tibial; (d): leito receptor do implante; (e): Implante de titânio com superfície tratada por duplo ataque ácido; (f): Instalação do implante com chave digital; (g) implante em posição (h): sutura por planos.

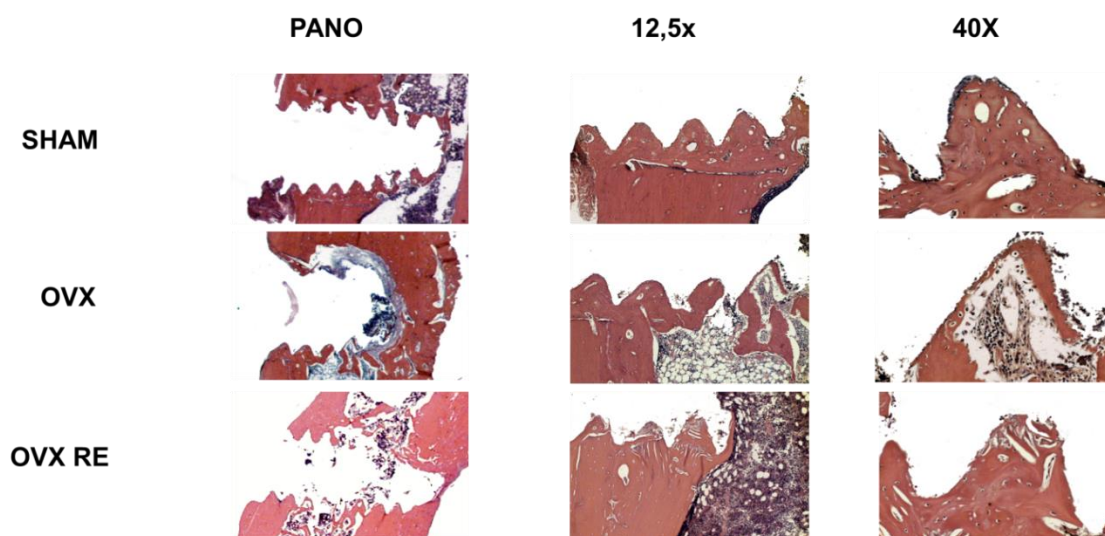


Figura 5 - (Coloração hematoxilina e eosina HE. Imagens panorâmicas, aumentos originais de 12,5x e 40x).

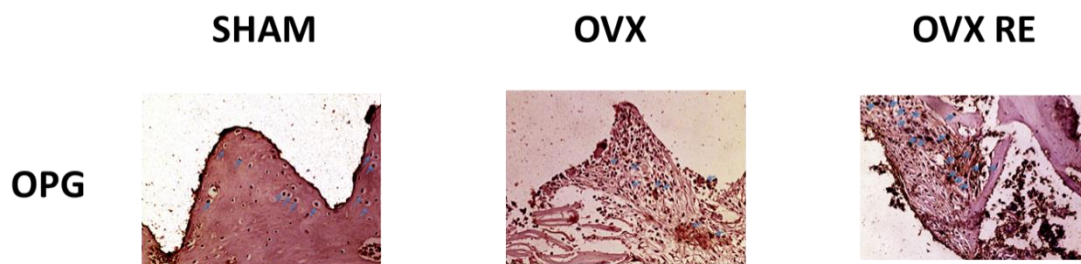


Figura 6 - Imagens representativas da imunoistoquímica na interface osso/implante para a proteína OPG nos grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE). Contra coloração por hematoxilina de Harris, aumento original 40X.

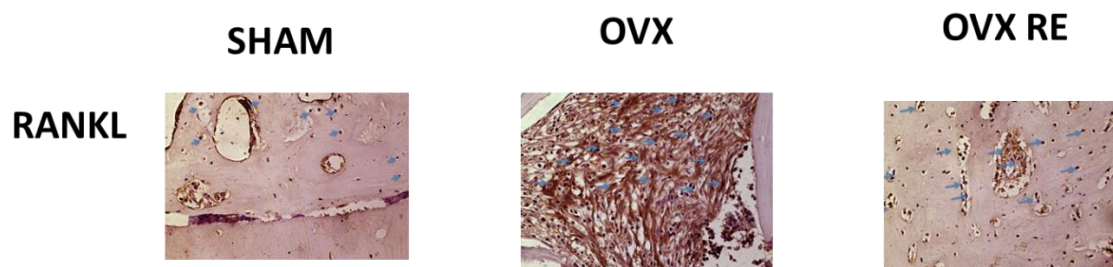


Figura 7 - Imagens representativas da imunoistoquímica na interface osso/implante para a proteína RANKL nos grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE). Contra coloração por hematoxilina de Harris, aumento original 40X.

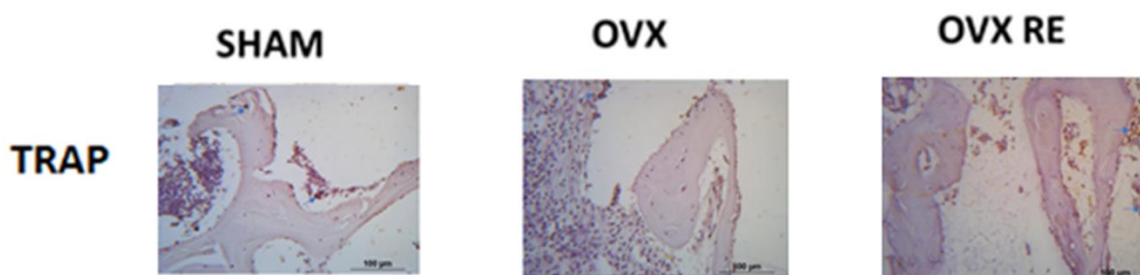


Figura 8 - Imagens representativas da imunoistoquímica na interface osso/implante para a proteína TRAP nos grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE). Contra coloração por hematoxilina de Harris, aumento original 40X.

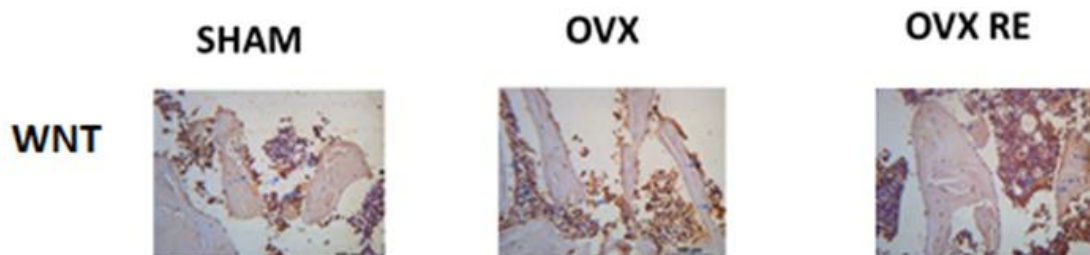


Figura 9 - Imagens representativas da imunoistoquímica na interface osso/implante para a proteína WNT nos grupos experimentais (SHAM, OVX, OVX/RE). Contra coloração por hematoxilina de Harris, aumento original 40X.

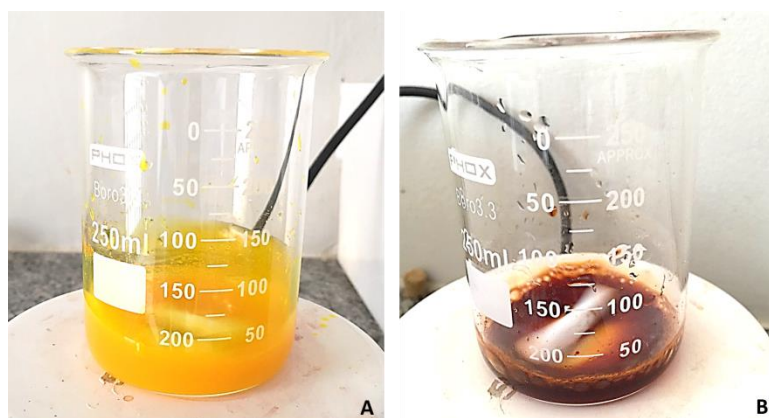


Figura 10 – **A:** Preparo do fluorocromo calceína, administrado 14 dias após instalação do implante; **B:** Preparo do fluorocromo vermelho de alizarina, administrado 42 dias após instalação do implante.

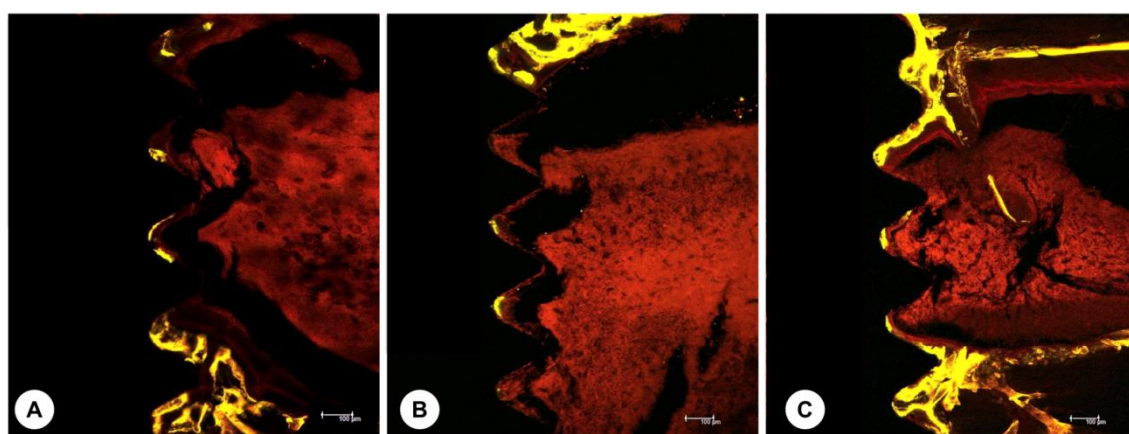


Figura 11 - Marcação das linhas fluorescentes na matriz de cálcio pela calceína (verde) e alizarina (vermelho) sobrepostas, evidenciando a dinâmica do osso periimplantar dos grupos experimentais: (A) – SHAM; (B) – OVX e (C) – OVX/RE.



Figura 12 - Torquímetro Digital e monta implante utilizados para análise biomecânica.



Figura 13– Escaneamento das peças através do aparelho e *software* SkyScan.

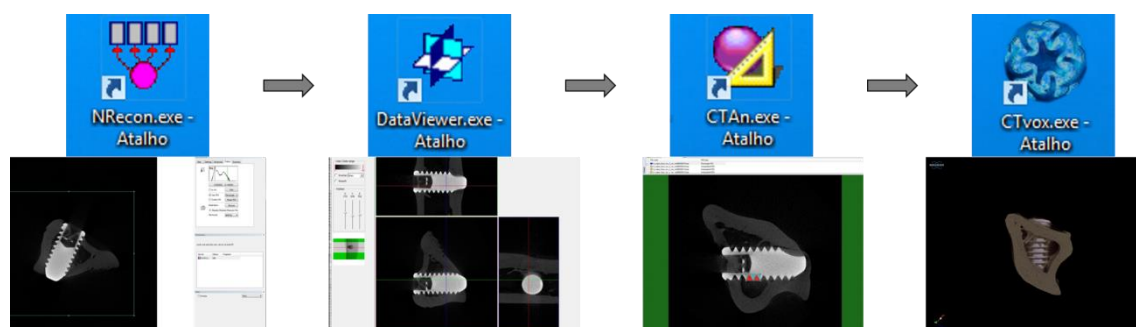
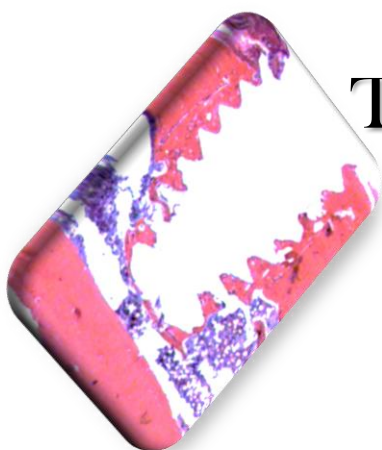


Figura 14– Sequência dos *softwares* utilizados para reconstrução das imagens e realização das análises.



TABELAS E GRÁFICOS

	Grupos experimentais	Grupo A Tecidos descalcificados	Grupo B Tecidos calcificados	Nº ratas
Grupo I	SHAM	42 dias	60 dias	n=16
Grupo II	OVX	42 dias	60 dias	n=16
Grupo III	OVX/RE	42 dias	60 dias	n=16
Grupo IV	OVX/OPG-Fc	42 dias	60 dias	n=16

Tabela 1: Grupos experimentais de acordo com as análises nos dois períodos de eutanásia.

Interações estatísticas entre os grupos	Valores de P*
SHAM x OVX	0,0660
SHAM x RE	0,0195*
SHAM x OPG-Fc	0,9120
OVX x RE	0,0003*
OVX x OPG/Fc	0,1729
RE x OPG/Fc	0,0072*

Tabela 2 – Interações estatísticas entre os grupos experimentais.

Scores/grupos	SHAM	OVX	OVX/RE
OPG	2-3	2-3	2-3
RANKL	2	3	2
TRAP	1	2	1
WNT	2	2-3	2

Tabela 3 - Scores representativos da análise imunoistoquímica.

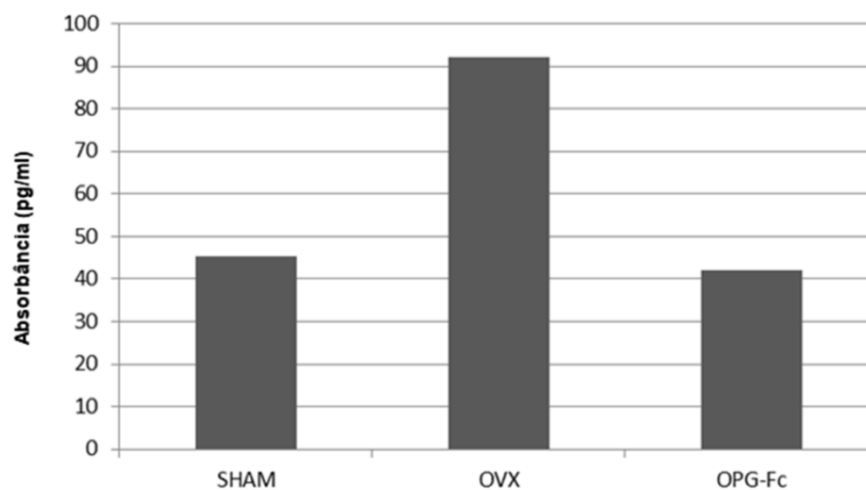


Gráfico 1 – Valores de absorbância nos grupos experimentais (SHAM, OVX e OPG-Fc).

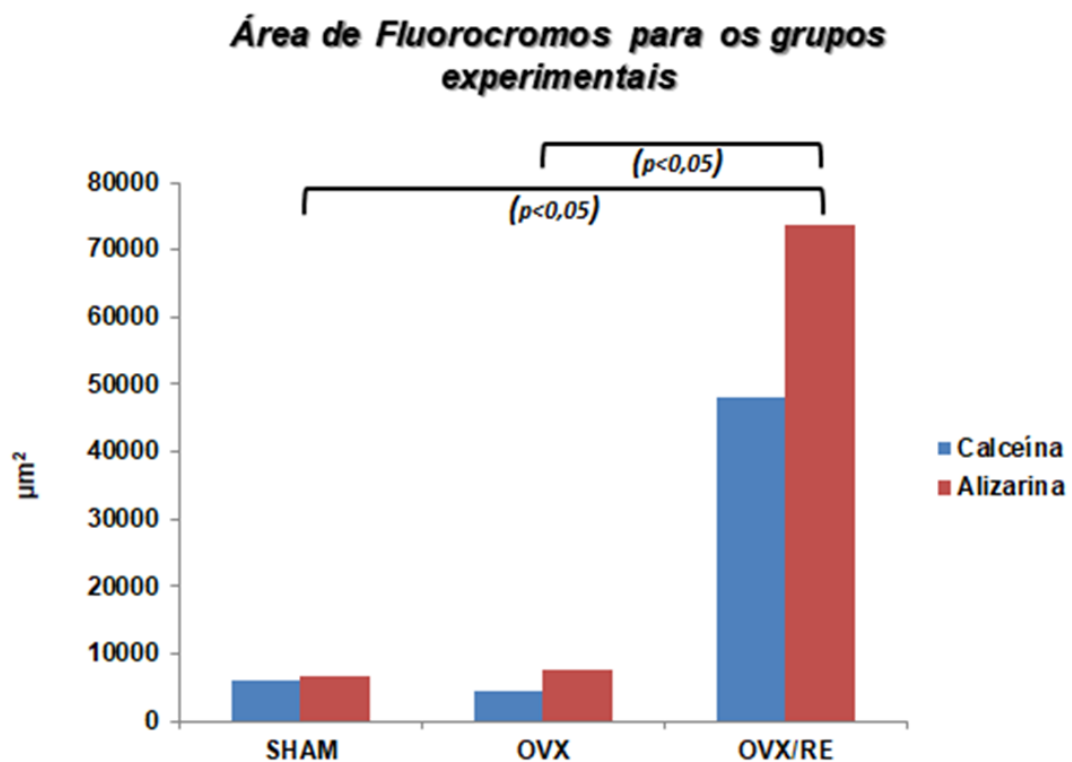


Gráfico 2- Área óssea peri implantar (µm²) dos grupos SHAM, OVX e OVX/RE, pelas expressões de calceína e alizarina. (comparações intergrupos).

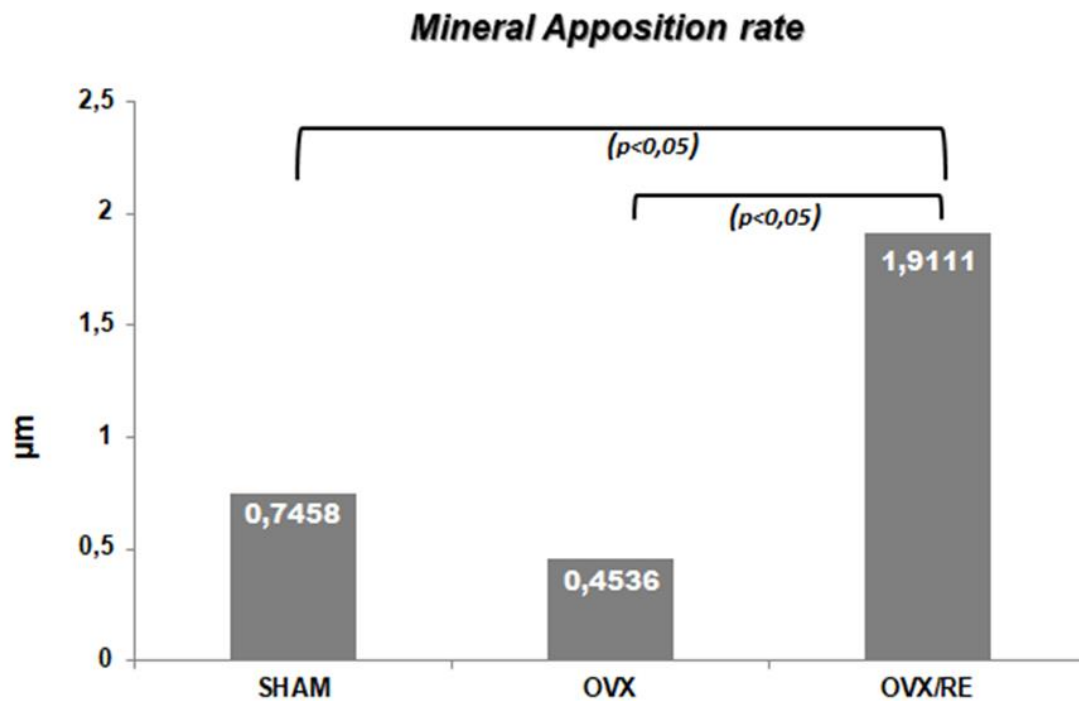


Gráfico 3- Taxa de aposição mineral por dia (μm) dos grupos SHAM, OVX e OVX/RE, avaliada linearmente.

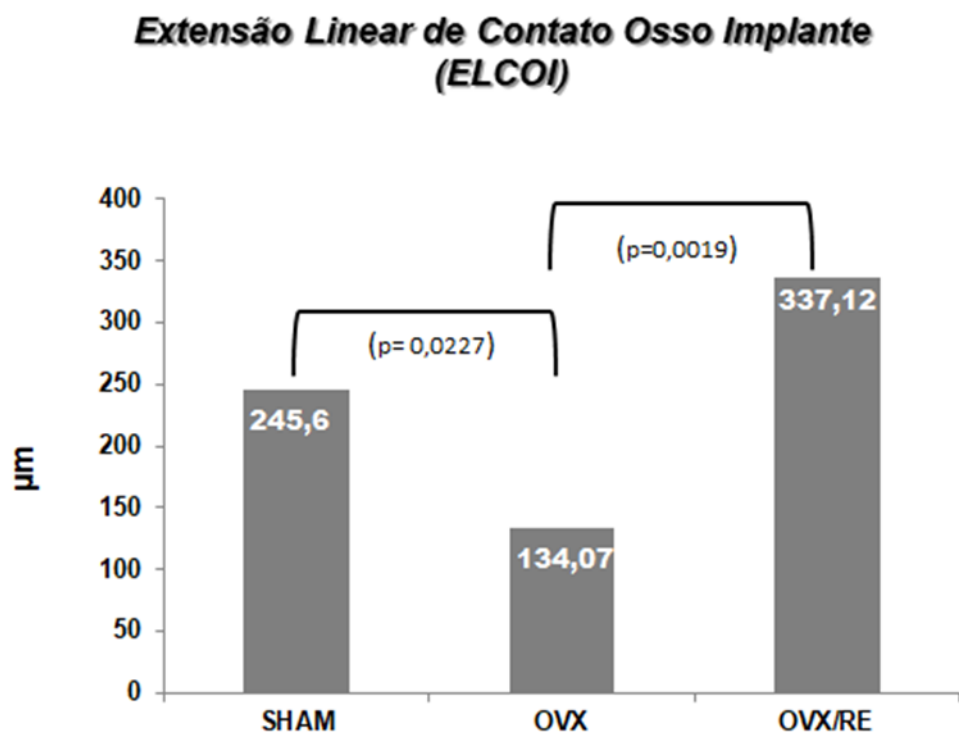


Gráfico 4 - Extensão linear de contato osso/implante (ELCOI) (μm) dos grupos SHAM, OVX e OVX/RE, avaliação do perímetro.

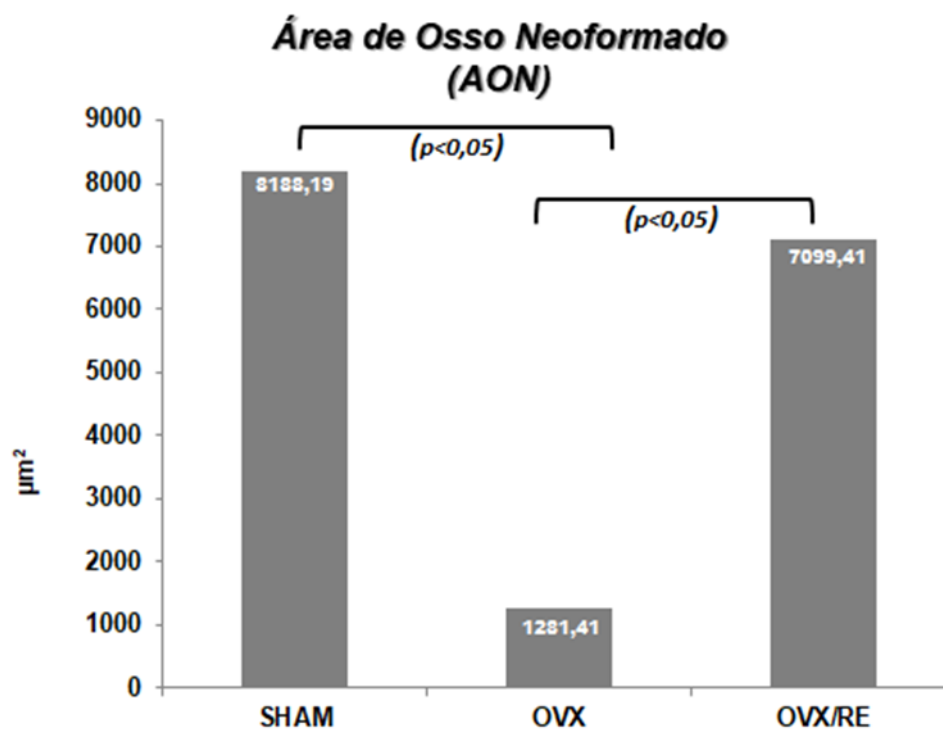


Gráfico 5 - Área de osso neoformada (AON) em μm^2 dos grupos SHAM, OVX e OVX/RE.

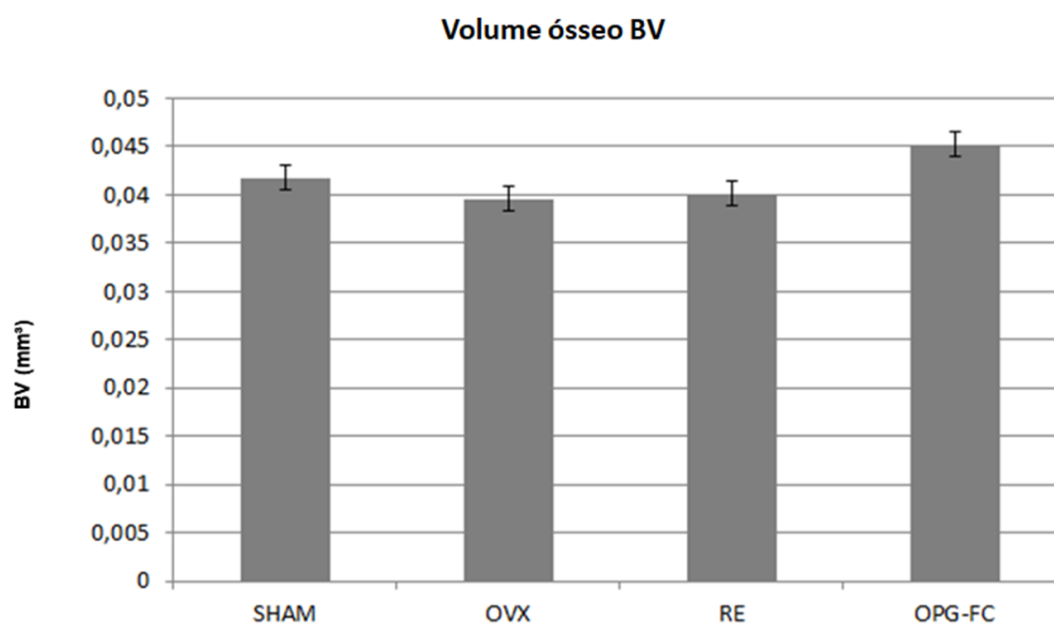


Gráfico 6 - Quantificação do volume ósseo. Volume maior para o grupo OPG-Fc seguido do grupo SHAM, RE e OVX.

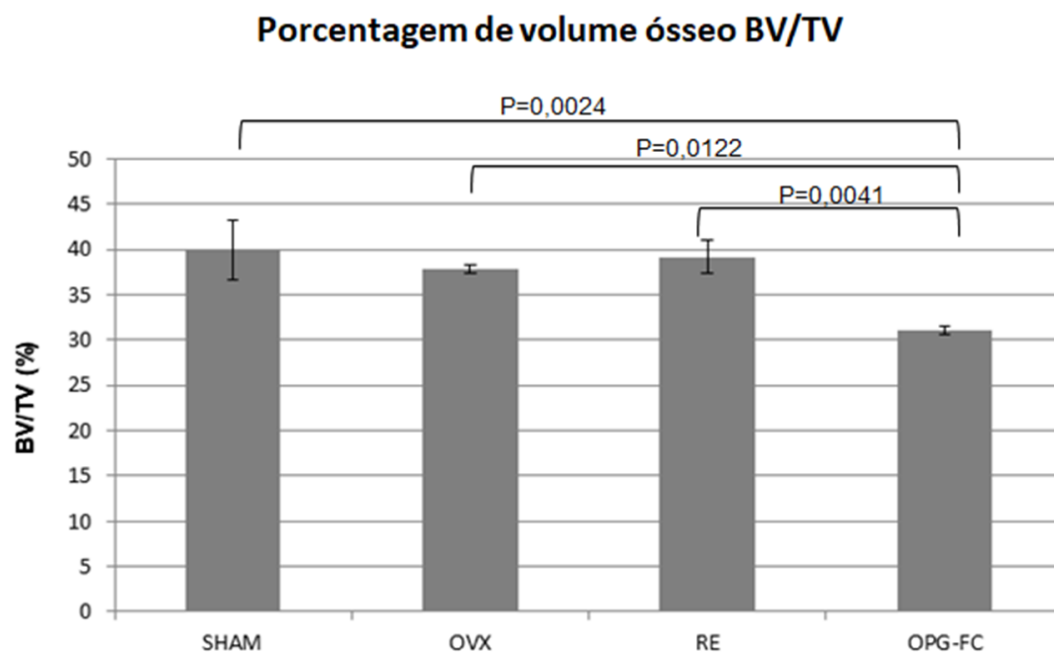


Gráfico 7 – Quantificação do percentual de volume ósseo. Percentuais aproximados do OVX e RE e maior para o grupo SHAM, sendo o grupo OPG-Fc o menor valor entre todos os grupos estudados ($p>0,05$)

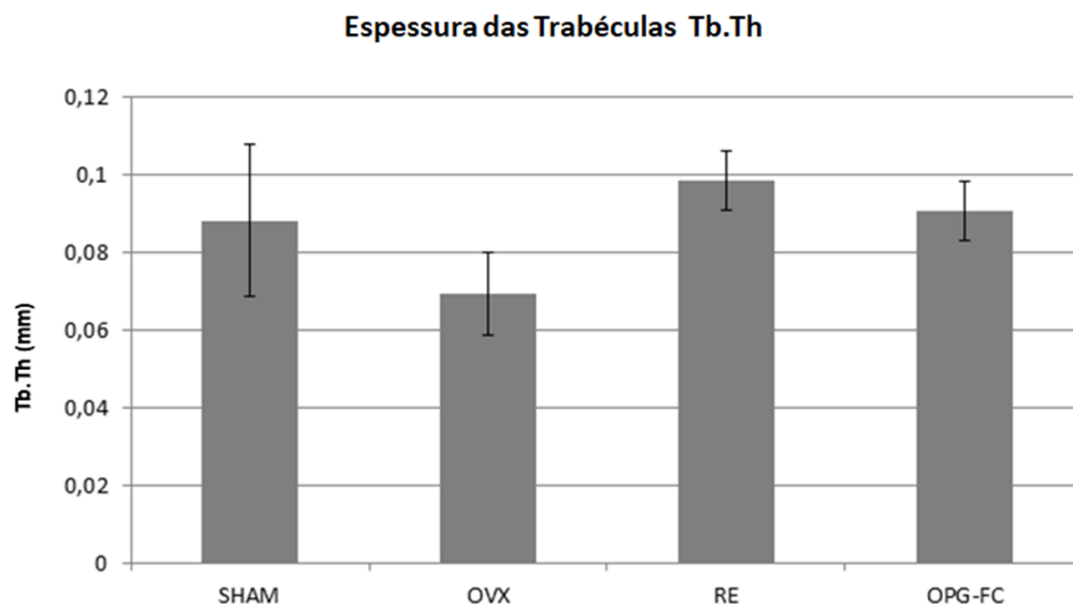


Gráfico 8 – Quantificação da espessura trabecular. Valores similares do SHAM e OPG-Fc, menor para o grupo OVX ($p>0,05$) e maior valor para o grupo RE.

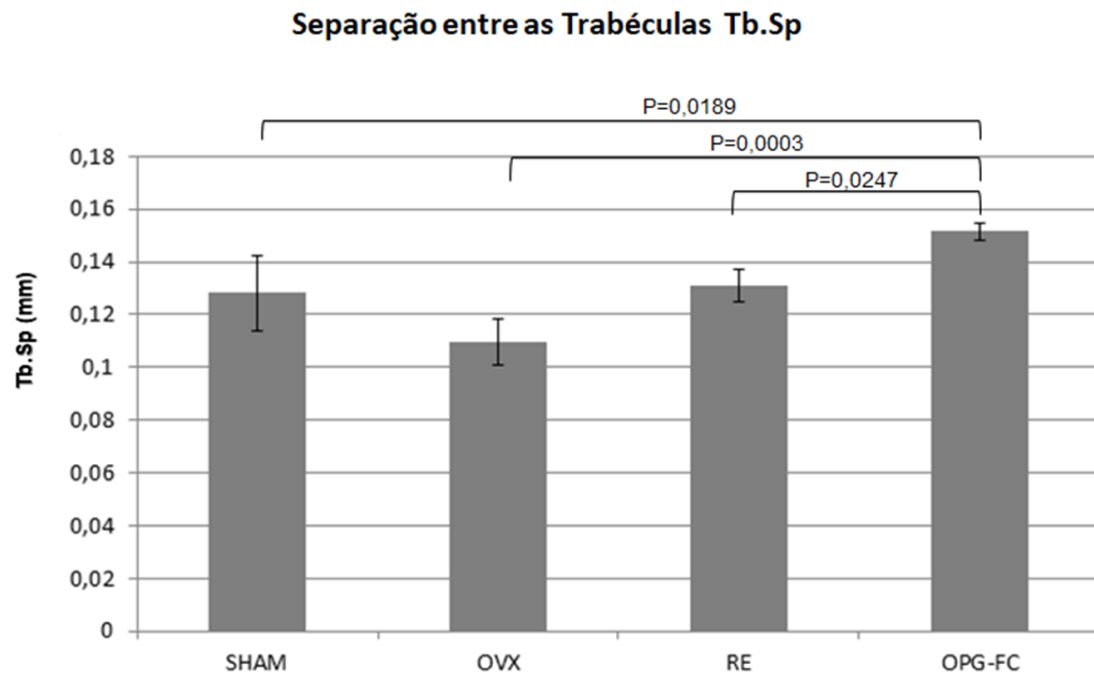


Gráfico 9 – Quantificação da separação de trabéculas. Valor maior para OPG-Fc ($p>0,05$) e menor para o grupo OVX, com diferença estatística significativa na comparação OPG-Fc e todos os grupos.

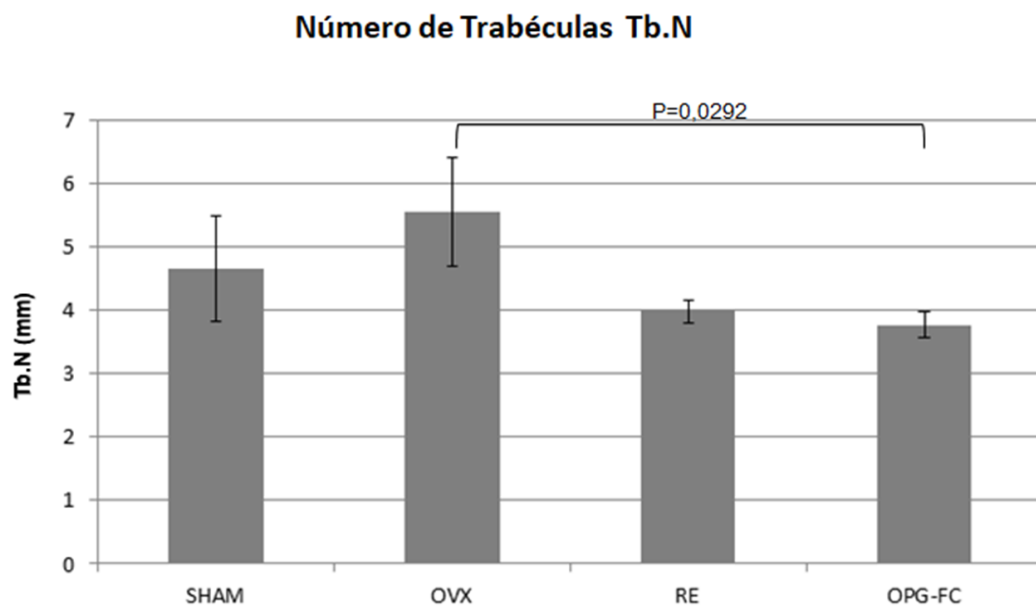


Gráfico 10 – Quantificação do número de trabéculas. Valor maior para OVX e menor para OPG-Fc ($p>0,05$).

Análise Biomecânica

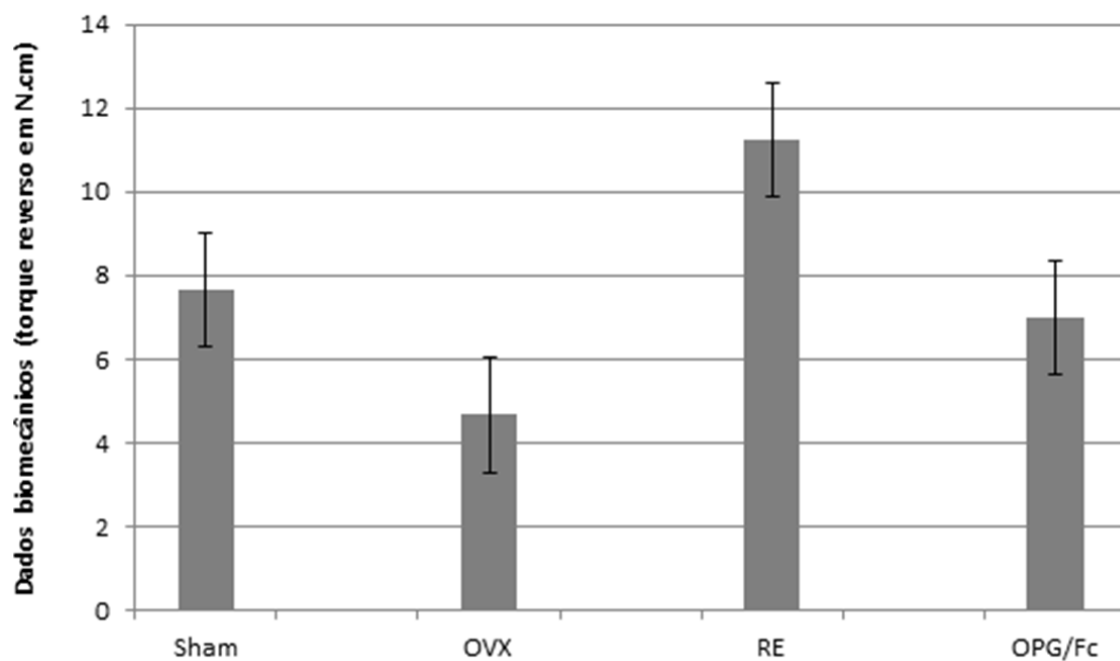


Gráfico 11 - Gráfico representativo dos valores médios e desvio padrão da análise biomecânica (torque reverso) dos grupos experimentais (SHAM, OVX, RE, OPG/Fc).

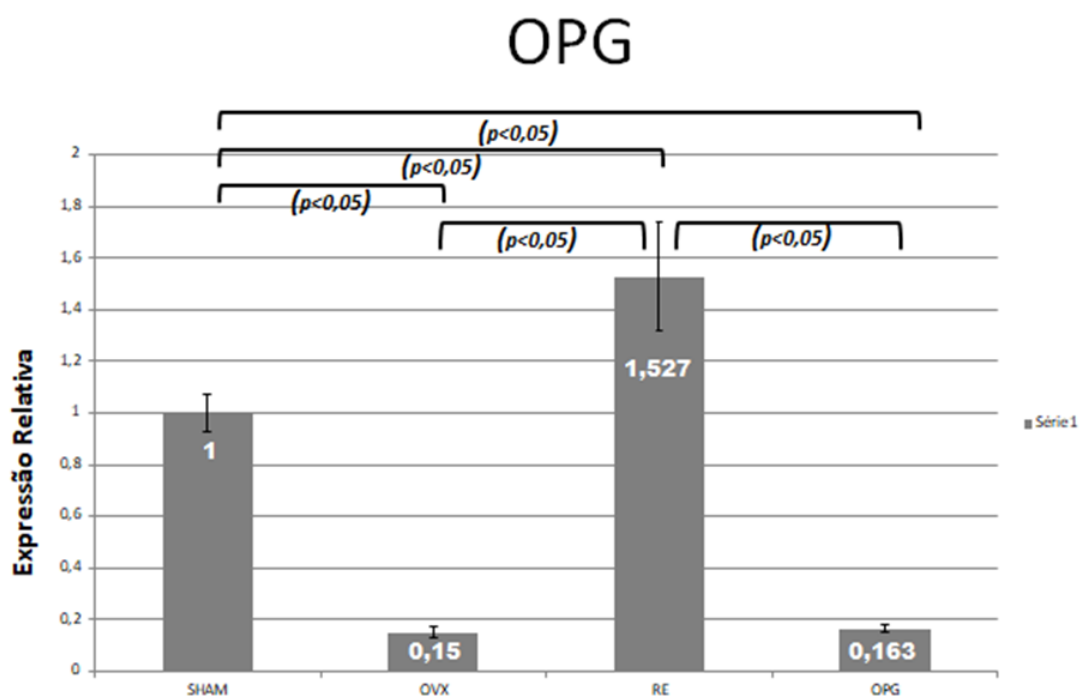


Gráfico 12 - Gráfico mostrando a expressão relativa do gene para Osteoprotegerina nos grupos SHAM, OVX, RE e OPF-Fc.

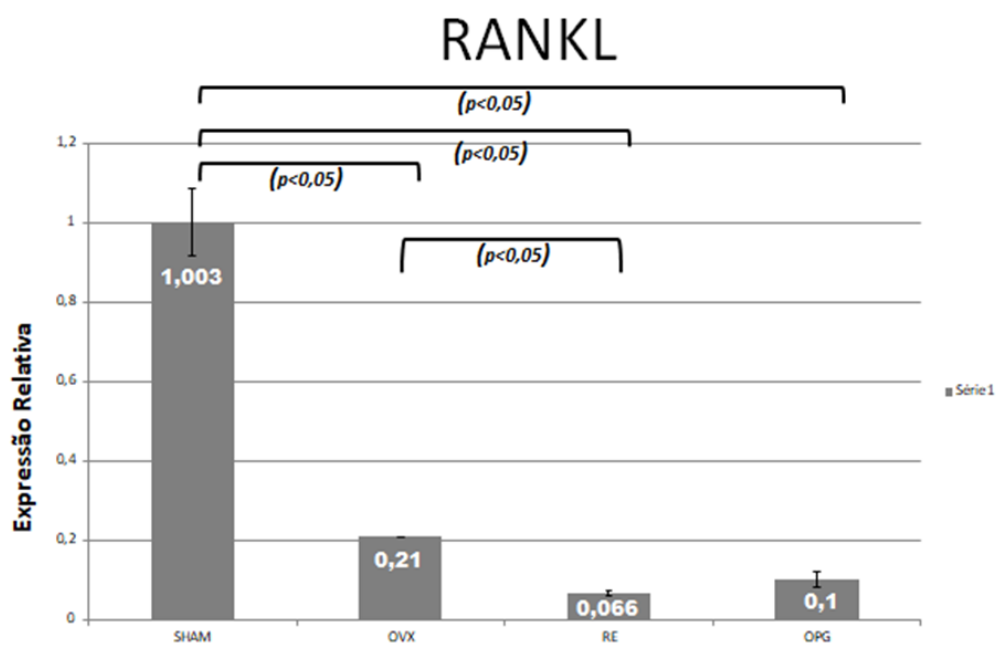


Gráfico 13 - Gráfico mostrando a expressão relativa do gene para RANKL nos grupos SHAM, OVX, RE e OPF-Fc.

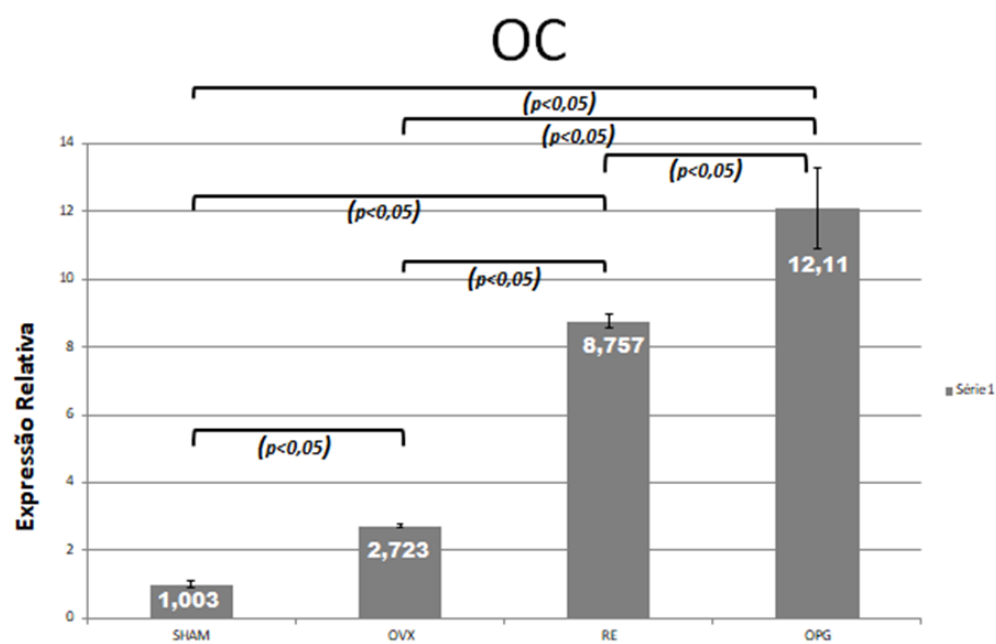


Gráfico 14 - Gráfico mostrando a expressão relativa do gene para Osteocalcina nos grupos SHAM, OVX, RE e OPF-Fc.

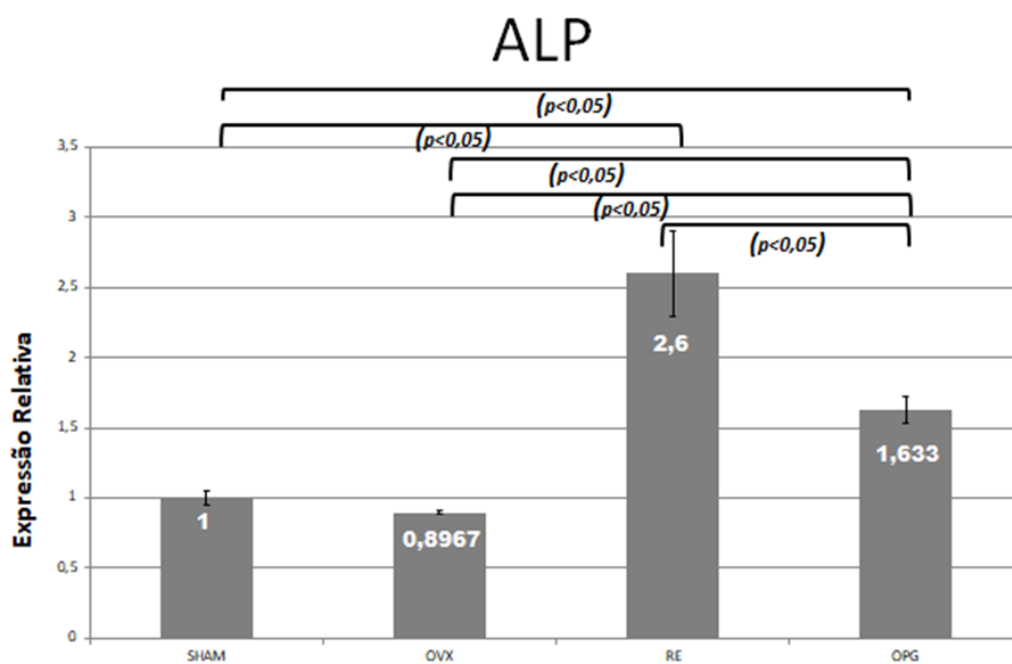


Gráfico 15 - Gráfico mostrando a expressão relativa do gene para ALP nos grupos SHAM, OVX, RE e OPF-Fc.

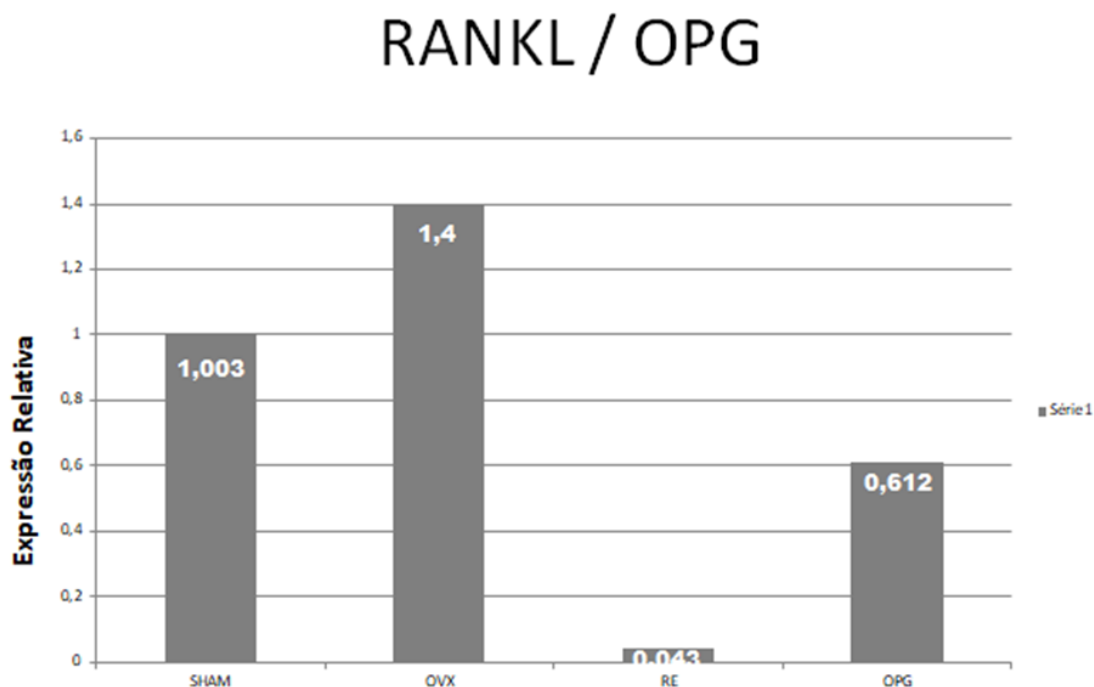
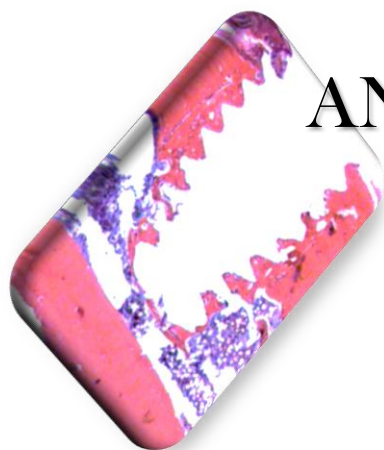


Gráfico 16 - Gráfico mostrando a expressão relativa do gene para a Ratio RANKL/OPG nos grupos SHAM, OVX, RE e OPF-Fc.



ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do processo de reparo alveolar de ratas com deficiência de estrógeno tratadas com denosumab ou ranelato de estrôncio. Análise histométrica, imunoistoquímica, por microtomografia computadorizada e microscopia confocal**", Processo FOA nº 00685-2015, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de março de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Julho de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Agosto de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the wound healing process in estrogen deficiency rats treated with denosumab or strontim ranelate. Histometric, immunohistochemistry, computed microtomography and confocal microscopy analysis**", Protocol FOA nº 00685-2015, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 24, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 26, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 26, 2017.


Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO 2 – 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, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the

procedure after a manuscript has been accepted for publication in Clinical Oral Implants Research. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

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

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

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

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. 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 . Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-

oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by

the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

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

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Author Services

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