

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ANDREA DE CASTRO PEREIRA

**SÍTIOS IMPLANTÁVEIS DA MAXILA E MANDÍBULA:
CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICO-RADIOGRÁFICOS
E HISTOMORFOMÉTRICO-MOLECULARES**

**Goiânia
2011**

ANDREA DE CASTRO PEREIRA

**SÍTIOS IMPLANTÁVEIS DA MAXILA E MANDÍBULA:
CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICO-RADIOGRÁFICOS
E HISTOMORFOMÉTRICO-MOLECULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta
Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho Batista

**Goiânia
2011**

Dedico este trabalho...

*Primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Aos meus pais
Silvana e Mauro e meu irmão Rodrigo; pelo apoio, dedicação e
compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.*

*E em especial, ao meu grande amigo Guilherme,
gratidão pela amizade verdadeira.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta, pela troca de conhecimento e experiências vivenciadas nos últimos anos, que me incentivou a trilhar os caminhos da pós-graduação e pela imensurável contribuição na minha formação tanto pessoal quanto profissional;

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho Batista, por sua importante participação neste trabalho, que me ensinou os primeiros passos no laboratório de patologia, pela paciência em responder minhas dúvidas e por todo tempo dedicado ao desenvolvimento desse estudo;

A todos os alunos de graduação e pós-graduação envolvidos no “PQO”: enquanto trabalhamos juntos os limites foram superados com mais facilidade;

A Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva pela grande contribuição neste trabalho;

Aos colegas, Pedro Paulo Chaves de Souza e João Antonio Chaves de Souza por ter me recebido tão bem em Araraquara e pela parceria estabelecida na execução deste trabalho;

Ao Professor Carlos Alberto de Souza Costa que gentilmente permitiu que as reações de RT-PCR fossem realizadas em seu laboratório (Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”);

À Profa Dra. Christina Lindh por ter acreditado neste projeto tão ousado e pelo apoio que rompe a distância física;

Aos professores Cláudio Rodrigues Leles, Elismauro Francisco Mendonça, Maria Alves Garcia Santos Silva e Vânia Cristina Marcelo, meus sinceros agradecimentos;

À colaboradora do CGDB, Claudinha, pois palavras não seriam suficientes para expressar sua dedicação incondicional ao funcionamento deste importante centro;

Ao técnico do Laboratório de Patologia Bucal, Erildo, pela paciência em me auxiliar naquilo que precisava dentro do laboratório e pela pronta disposição em priorizar o desenvolvimento do meu trabalho;

À minha amiga, Luciana Pimenta Machado, pela amizade verdadeira iniciada durante o mestrado e pelo apoio sem medidas a todas as barreiras encontradas nessa trajetória;

Aos colegas de mestrado Inara, Ludmila, Michele e Roberto, pela amizade e companherismo;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de mestrado e por permitir através do projeto aprovado (processo n. 301029/2007-5) em Edital Universal/2009 comprar vários anticorpos e reagentes para as reações de imunoistoquímica;

As parcerias com a FAPEG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás), FUNAPE (Fundação de Apoio a Pesquisa – UFG) e NEODENT, que nos subsidiaram financeiramente e acreditaram no nosso projeto.

SUMÁRIO

FIGURAS E TABELAS	viii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURA	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	14
2. OBJETIVOS	18
3. MÉTODOS	20
3.1 Seleção e caracterização da amostra	20
3.1.1 Exame clínico	20
3.1.2 Exame radiográfico	21
3.1.3 Exames laboratoriais	21
3.2 Classificação clínico-radiográfica dos sítios ósseos	23
3.2.1 Avaliação óssea subjetiva baseada em radiografias associadas ou não à percepção tátil do cirurgião (Lekholm & Zarb, 1985)	23
3.2.2 Avaliação óssea subjetiva baseada no padrão trabecular de radiografias periapicais (LINDH et al., 1996)	25
3.3 Instalação dos implantes	26
3.4 Técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina) e análise microscópica ...	27
3.5 Técnica da Imunoistoquímica	29
3.6 Análise dos dados	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
4. RESULTADOS/ PUBLICAÇÃO	36
5. CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
ANEXOS	60

FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Fluxograma do processo de seleção da amostra.
Figura 2	Cartão de calibração usado pelo examinador para realização da classificação radiográfica (PP e L&Z) dos sítios ósseos.
Figura 3	Imagens de referência utilizadas pelos examinadores na interpretação do padrão ósseo trabecular dos sítios implantáveis (Com autorização dos autores LINDH et al., 1996).
Figura 4	Perfuração exploratória do sítio implantável com trefina.
Figura 5	Câmera digital acoplada ao microscópio óptico utilizados na captura das imagens para a avaliação histomorfométrica.
Figura 6	Fotomicroscopias de espécimes ósseos de sítios classificados como tipo 1(A) e 4(B) segundo PP e L&Z (Hematoxilina e Eosina / Aumento original de x5). (A) Osso normal com predomínio de osso trabecular e presença de pequenos espaços medulares. (B) Osso normal com grandes espaços medulares preenchidos com medula óssea amarela. Registro das medidas da área óssea total (trabéculas) em preto e área total da secção (trabéculas + medula) em vermelho (software Axiovision Release 4.7).
Figura 7	Células responsáveis pela remodelação óssea.
Tabela 1	Sistema de símbolos das medidas morfométricas bi e tridimensionais, proposto por Parfitt et al. em 1983 e 1987, respectivamente.
Tabela 2	Anticorpos utilizados
Publicação	
Table 1	Descriptive statistics of the histomorphometric parameters.
Table 2	Descriptive analyses of the cellular/molecular parameters.
Table 3	Spearman's correlation coefficients of the association between histomorphometric variables and the 3 classification systems.

- Figure 1 Histomorphometric parameters of bone specimens from sites classified as type 1 (A) and 4 (B) according to PP and L&Z (Hematoxylin and Eosin/ Original magnification x5). (A) “Normal” bone with a predominance of trabecular bone and the presence of small marrow spaces. (B) “Normal” bone with large marrow spaces filled by yellow bone marrow. Measurements record of total bone area (trabecular bone) in black and total section area (trabecular bone + bone marrow) in red. (Axiovision 4.7 software)
- Figure 2 Comparisons among subjective bone classifications (PP, L&Z, Lindh) and histomorphometric parameters. (A) Bone classification X BV/TV; (B) Bone classifications X BS/BV; (C) Bone classifications X Tb.Th; (D) Bone classification X Tb.Sp (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The asterisk (*) and inequality symbol ($\neq$) mark where the differences occurred within each classification (Dunn’s test, $p < 0.05$). The asterisk marks the bone types that differ regarding to bone type 1; the inequality symbol marks the bone types that differ between themselves. (BV/TV= bone volume density; BS/BV= bone specific surface; Tb.Th= trabecular thickness; Tb.Sp= trabecular separation)
- Figure 3 Representative immunohistochemical expression of bone remodeling markers– (A) RANK; (B) RANKL; (C) Osteocalcin and (D) OPG– in bone type 2, according to L&Z classification system (Immunohistochemical staining, original magnification X40).
- Figure 4 Comparisons among subjective bone classifications (PP, L&Z, Lindh) and cellular/molecular parameters. (A) Bone classification X OPG+ osteoblasts density; (B) Bone classifications X OPG+ osteocytes density; (C) Bone classifications X OC+ osteocytes density; (D) Bone classification X Percentage of RANKL+osteoblasts (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The asterisk (*) and inequality symbol ($\neq$) mark where the differences occurred within each classification (Dunn’s test, $p < 0.05$). The asterisk marks the bone types that differ regarding to bone type 1; the inequality symbol marks the bone types that differ between themselves.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A_B	Total bone area (área óssea total)
A_t	Total section area (área total da secção)
BS/BV	Bone surface density (área de superfície óssea trabecular pelo volume ósseo)
BS/TV	Bone surface (fração de superfície óssea)
BV/TV	Bone volume density (fração de volume ósseo)
CT	Computed tomography
L&Z	Classificação óssea subjetiva proposta por Lekholm e Zarb (1985) estabelecida a partir de radiografias panorâmica e periapical em associação com a percepção tátil do cirurgião durante a perfuração do sítio implantável, baseada na relação entre osso cortical e trabecular.
Lindh	Classificação óssea subjetiva proposta por Lindh e colaboradores (1996), estabelecida a partir de radiografias periapicais, baseadas apenas no padrão ósseo trabecular.
microTC	Microtomografia computadorizada
MTPD	Média de densidade trabecular
MTPS	Média de separação trabecular
MTPT	Média de espessura trabecular
OC	Osteocalcin (osteocalcina)
OPG	Osteoprotegerin (osteoprotegerina)
P_B	Total bone perimeter length (perímetro ósseo total)
PP	Classificação de Lekholm e Zarb (1985) modificada, estabelecida apenas a partir de radiografias panorâmica e periapical.

RT-PCR	Real time- Polymerase Chain Reaction
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B (receptor ativador do fator nuclear kappa B)
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B Ligand (RANK ligante)
S_v	Superfície óssea por volume tecidual
S/V	Superfície óssea por volume ósseo
TBV	Volume ósseo trabecular
Tb.Th	Trabecular thickness (espessura trabecular)
Tb.N	Trabecular number (número de trabéculas)
Tb.Sp	Trabecular separation (separação trabecular)
TC	Tomografia Computadorizada

RESUMO

O estudo da microarquitetura óssea e dos seus aspectos moleculares podem trazer novas informações para a melhor compreensão da “qualidade óssea”. A histomorfometria é um método de referência recomendado para análise óssea bidimensional. A nível molecular, possíveis alterações das vias de reabsorção e formação óssea ainda não foram estudadas nos diferentes padrões de osso “normal”. **Objetivo:** Analisar a correlação entre aspectos clínico-radiográficos e histomorfométrico-moleculares de sítios ósseos para implantes dentários em humanos. **Material e métodos:** A amostra foi composta por 44 sítios implantáveis de 32 voluntários. Estes sítios foram classificados de acordo com 3 diferentes métodos: uma classificação baseada somente em imagens periapical e panorâmica (PP); a classificação de Lekholm e Zarb, baseada em métodos de diagnóstico por imagens em conjunto com a percepção tátil do cirurgião durante a cirurgia e a classificação de Lindh. Os espécimes ósseos foram removidos com o uso da trefina durante a primeira perfuração do sítio para colocação dos implantes dentários. As amostras foram submetidas à técnica de coloração com hematoxilina-eosina e análise histomorfométrica para obtenção dos seguintes parâmetros histomorfométricos: espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas, fração de volume ósseo (BV/TV), área de superfície óssea trabecular pelo volume ósseo (BS/BV), fração de superfície óssea e separação trabecular (Tb.Sp). Também foi realizada a técnica da imunoistoquímica para análise das proteínas RANK, RANKL, OPG e Osteocalcina (OC) nas amostras de tecido ósseo. **Resultados:** As classificações PP e L&Z apresentaram correlação com BV/TV, BS/BV, Tb.Th e Tb.Sp. A classificação de Lindh não apresentou correlação com nenhum parâmetro histomorfométrico. L&Z demonstrou diferença entre os tipos ósseos quando comparado a BV/TV, BS/BV, Tb.Th e Tb.Sp. Foi encontrada uma fraca correlação entre as classificações PP/L&Z e a expressão dos reguladores do metabolismo ósseo (RANK, RANKL, OPG e OC). **Conclusões:** Pode-se concluir que as classificações subjetivas dos tipos ósseos são influenciadas pelos aspectos histomorfométricos e que as moléculas reguladoras da remodelação óssea parecem não exercer influência nos aspectos morfológicos da maxila e mandíbula.

Palavras-chave: implantes dentários, qualidade óssea, histomorfometria, imunoistoquímica.

ABSTRACT

The study of bone microarchitecture and its molecular aspects may provide new information for better understanding of "bone quality". Histomorphometry is a recommended reference method for two-dimensional bone analysis. At the molecular level, possible changes in the bone resorption and formation vias has not been studied in different patterns of "normal" bone. **Objective:** To evaluate the correlations between clinical-radiographic aspects and histomorphometric-molecular parameters of endosseous dental implant sites in humans. **Material and Methods:** The study sample consisted of 44 bone implant sites from the jawbones of 32 volunteers, which were classified according to three different systems: (1) based only on periapical and panoramic images (PP); (2) as proposed by Lekholm & Zarb (L&Z); and (3) as proposed by Lindh and coworkers. Bone biopsies were removed using a trephine during the first drilling for implant placement. Samples were stained with hematoxylin-eosin and histomorphometric analysis was performed to obtain the following parameters: trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number, bone volume density (BV/TV), bone specific surface (BS/BV), bone surface density and trabecular separation (Tb.Sp). In addition, immunohistochemistry analysis was performed on bone tissue samples for the proteins, RANK, RANKL, OPG and Osteocalcin (OC). **Results:** PP and L&Z classification systems revealed a correlation with BV/TV, BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp, while no correlations with histomorphometric parameters were found using Lindh's classification system. L&Z's system identified differences among bone types when compared with BV/TV, BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp. A weak correlation between PP/L&Z classifications and the expression of bone metabolism regulators (RANK, RANKL, OPG e OC) was found. **Conclusions:** It is possible to conclude that the subjective classifications of bone types are related to histomorphometric aspects. This data may contribute to the validation of these classifications. Bone remodeling regulatory molecules seem not influence morphological aspects of the jawbone.

Keywords: dental implants, bone quality, histomorphometry, immunohistochemistry.

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O sucesso e insucesso/falha do tratamento com implantes dentários podem ser vistos sob diferentes aspectos. O sucesso pode ser alcançado sob o ponto de vista fisiológico (presença e manutenção da osseointegração, ausência de dor e outros processos patológicos), da sua função como parte de um sistema orgânico (capacidade de mastigar) e satisfação do usuário (estética e ausência de desconforto) (ESPOSITO et al., 1998a).

Sob o ponto de vista fisiológico, vários fatores têm sido relacionados ao insucesso precoce (ex. qualidade, quantidade e densidade ósseas; trauma cirúrgico, carga prematura) ou tardio (ex. carga excessiva; infecção marginal crônica progressiva; saúde geral do paciente) do tratamento com implantes dentários (ESPOSITO et al., 1998a; 1998b).

A quantidade e qualidade do tecido ósseo são apontadas como fatores importantes no resultado do tratamento (LINDH; OBRANT; PETERSSON, 2004). Entretanto, não há evidências na literatura sobre o real impacto dessas variáveis ou características ósseas no sucesso terapêutico. A fisiopatologia das falhas na osseointegração de implantes não está totalmente esclarecida.

O termo qualidade óssea é complexo, compreendendo vários parâmetros microscópicos, morfológicos e moleculares (LINDH; OBRANT; PETERSSON, 2004), sem uma definição consensual na literatura e na prática clínica (RIBEIRO-ROTTA; LINDH; ROHLIN, 2007; RIBEIRO-ROTTA et al., 2010a, 2010b). Porém, esse termo é utilizado em diferentes classificações clínicas subjetivas (MISCH, 1990; LEKHOLM & ZARB, 1985) para o planejamento e prognóstico do tratamento com implantes. A análise da qualidade óssea, sob o ponto de vista molecular, ainda não foi estudada e tem potencial para contribuir para um melhor entendimento da característica óssea.

Diferentes classificações têm sido propostas para descrever as características ósseas da maxila e mandíbula, sendo que a mais amplamente utilizada é aquela proposta por Lekholm e Zarb (1985), apesar de nunca ter

sido validada. Os autores categorizaram o osso em quatro grupos quanto à qualidade óssea e cinco grupos quanto à quantidade óssea, baseando-se em uma avaliação subjetiva clínico-radiográfica (exame físico; radiografias periapicais, panorâmicas, cefalométricas e, eventualmente, oclusais e tomogramas; associado ou não à percepção tátil do cirurgião durante a perfuração do sítio):

- Quanto à qualidade óssea: Tipo 1 – osso residual formado por osso cortical homogêneo; Tipo 2 – osso residual formado por uma camada espessa de osso cortical circundando osso esponjoso denso; Tipo 3 – osso residual formado por uma camada fina de osso cortical circundando osso esponjoso denso; Tipo 4 – osso residual formado por uma camada fina de osso cortical circundando osso esponjoso de baixa densidade.

- Quanto à quantidade óssea: Tipo A – presença de grande parte da crista alveolar; Tipo B – reabsorção óssea residual moderada; Tipo C - reabsorção óssea residual avançada; Tipo D – osso basal com pequena reabsorção; Tipo E – osso basal com reabsorção avançada.

A partir dessa classificação, utilizando metodologia padronizada e imagens de referência, Lindh e colaboradores (1996) estabeleceram três categorias para o osso da maxila/mandíbula, porém apenas o osso trabecular foi considerado, sendo o tipo 1, osso de padrão trabecular homogeneamente denso; 2, osso de padrão trabecular heterogêneo e 3, osso de padrão trabecular homogeneamente esparso. A utilização dessas classificações, ainda que subjetivas, sugerem a busca por parâmetros mais objetivos para o planejamento da terapêutica com implantes na prática clínica.

Vários métodos têm sido sugeridos para avaliar a qualidade óssea durante o planejamento do tratamento com implantes dentários: percepção tátil subjetiva durante a perfuração do sítio para colocação do implante (TRISI; RAO, 1999), torque de inserção, perioteste, frequência de ressonância (FRIBERG et al., 1999; NKENKE et al., 2003), métodos de diagnóstico por imagem – radiografia convencional (LINDH et al., 1996b; TAGUCHI et al., 1997) e tomografia computadorizada (TC) (LINDH et al., 1996a), histomorfometria (TRISI; RAO, 1999) absorciometria de feixe duplo (DEXA) (CHOËL et al., 2003). Porém a evidência da eficácia desses métodos clínicos ainda é escassa (RIBEIRO-ROTTA; LINDH; ROHLIN, 2007). Isso enfatiza a

necessidade de estudos que validem os parâmetros clínicos através dos métodos de referência ou padrão-ouro.

A histomorfometria tem se destacado como um método de referência para estudos do tecido ósseo, permitindo uma análise bidimensional da microarquitetura óssea. Este método oferece uma imagem de alta resolução espacial e alto contraste, porém demanda muito tempo. Dentre os vários parâmetros passíveis de serem analisados pela histomorfometria incluem-se: espessura trabecular, densidade trabecular, volume ósseo trabecular, separação trabecular (PARFITT et al 1983; MÜLLER et al.,1998; TRISI; RAO, 1999; NKENKE et al., 2003; DALLE CARBONARE et al., 2005).

Por outro lado, eventos biológicos e moleculares do metabolismo ósseo podem influenciar a microarquitetura óssea (Kearns et al. 2008). Neste contexto, a identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea pode contribuir para a investigação da fisiopatologia óssea em sítios implantáveis e pode, em associação aos exames por imagem, caracterizar melhor a chamada “qualidade óssea”. Porém, até o momento, não há estudos que avaliem a relação de ativadores e inibidores da reabsorção e formação óssea com os diferentes tipos ósseos da maxila e mandíbula.

Uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos envolve o sistema recentemente descoberto, RANK-RANKL-OPG. O receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) está presente na superfície das células precursoras de osteoclastos, o RANK ligante (RANKL) é expresso vinculado à membrana ou na forma solúvel em diferentes células como osteoblastos, fibroblastos, células T e outras; e a osteoprotegerina (OPG) é um receptor para RANKL produzida pelos osteoblastos e outros tipos de células (AMORIM et al., 2008; ANDRADE et al., 2008).

O RANKL quando ligado ao RANK exerce seus efeitos indutores da osteoclastogênese, induzindo assim a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros. Por outro lado, a OPG bloqueia a reabsorção óssea, pois ao se ligar ao RANKL impede a sua ligação ao seu receptor (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; AMORIM et al., 2008; ANDRADE et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008). O desequilíbrio desse sistema RANK/RANKL/OPG é observado na osteoporose, artrite reumatóide e doença periodontal (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; AMORIM et al., 2008).

Outra proteína importante relacionada ao metabolismo ósseo é a Osteocalcina (OC). Esta é uma proteína sintetizada pelos osteoblastos e uma de suas funções está relacionada à ligação do cálcio à matriz óssea, por isso, pode ser utilizada como um marcador bioquímico da formação óssea. O papel exato desta proteína na remodelação óssea não está completamente elucidado, no entanto, mostrou tratar-se de uma via importante na ativação da formação óssea através do seu efeito sobre os osteoblastos (HAN et al., 2008).

O desequilíbrio do sistema RANK-RANKL-OPG em lesões fibro-ósseas da maxila e mandíbula foi demonstrado em um estudo recente de membros do nosso grupo de pesquisa (ELIAS et al., 2010), porém a expressão dessas moléculas nos diferentes padrões de osso “normal” ainda não foi estudada. Nossa hipótese é que essas proteínas envolvidas no metabolismo ósseo podem influenciar a microarquitetura óssea, o que, por sua vez, poderia estar associado aos diferentes tipos ósseos.

2 OBJETIVOS

Tomando-se como base que:

1. A qualidade óssea tem sido apontada como um fator importante para o resultado do tratamento com implantes dentários (LINDH; OBRANT; PETERSSON, 2004) e a necessidade da busca de evidências sobre o real impacto dessas características ósseas no sucesso terapêutico;
2. O conhecimento do osso em sua plenitude estrutural e mecânica se faz primordial para o diagnóstico, prognóstico e evolução do tratamento reabilitador por meio de implantes osseointegrados;
3. A necessidade de comparação dos métodos clínicos utilizados na avaliação da qualidade óssea com métodos de referência, para comprovação da eficácia de diagnóstico;
4. A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea pode contribuir para a investigação da fisiopatologia óssea em sítios implantáveis e pode, em associação aos exames por imagem, caracterizar melhor a qualidade óssea;
5. A ausência de estudos na literatura sobre a expressão de RANK-RANKL-OPG e OC nos diferentes tipos ósseos da maxila e mandíbula.

Este estudo tem como objetivo geral:

Analisar a relação entre aspectos clínico-radiográficos e histomorfométrico-moleculares de sítios ósseos para implantes dentários.

Objetivos específicos:

1. Correlacionar as classificações clínico-radiográficas com as medidas histomorfométricas;
2. Identificar e quantificar a expressão das moléculas reguladoras da reabsorção óssea RANK, RANKL, OPG e da formação óssea OC em sítios implantáveis da maxila e mandíbula;
3. Correlacionar a expressão dessas proteínas com os parâmetros histomorfométricos, bem como com os parâmetros clínico-radiográficos obtidos nas etapas anteriores do projeto original;

3 MÉTODOS

3.1 Seleção e caracterização da amostra

A amostra do presente estudo foi composta por 44 espécimes ósseos obtidos por biópsias realizadas durante o preparo dos sítios implantáveis, da maxila e mandíbula, de 32 pacientes com indicação para tratamento com implantes dentários. Esses pacientes integram a amostra do projeto "AVALIAÇÃO CLÍNICA, RADIOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE SÍTIOS PARA IMPLANTES DA MAXILA E MANDÍBULA", submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG) (Parecer n.114/2007) e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Pareceres n.418/2008 e 860/2009), sendo que todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS 1 e 2). A pesquisa foi contemplada pelo edital da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), chamada 002-2007 e pelo programa de apoio a pesquisa do ILAPEO - Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, possuindo parceria com o Departamento de Radiologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de Malmö, Suécia.

A seleção dos voluntários foi realizada em três etapas: exame clínico, exame radiográfico e exames laboratoriais.

3.1.1 Exame clínico

Um prontuário foi desenvolvido especificamente para este estudo. Os indivíduos foram submetidos a exame clínico (anamnese e exame físico) e aqueles com boas condições de saúde geral, parcialmente desdentados foram incluídos na amostra. Os indivíduos com história de diabetes ou qualquer outra doença sistêmica que comprometesse o processo de cicatrização ou osseointegração foram excluídos da amostra, bem como aqueles com severa reabsorção óssea (rebordo em "lâmina de faca"), apresentando

altura/espessura inadequadas para o posicionamento dos implantes. Nessa etapa, o exame físico e moldagem das arcadas dentárias para obtenção de modelos de estudo superior e inferior foram importantes para avaliação dos potenciais sítios para implantes.

3.1.2 Exame radiográfico

Os pacientes selecionados pelo exame clínico foram submetidos a radiografias periapicais e panorâmica. A TC foi realizada apenas nos pacientes que, nas radiografias convencionais, revelaram boas condições ósseas e dimensões mínimas para a instalação de um implante de 3,75 mm de diâmetro por 9,0 mm de comprimento, sendo este mais um critério de inclusão. Todos os exames radiográficos foram realizados de acordo com protocolo e parâmetros baseados em padrões científicos bem estabelecidos, previamente testados, tendo sido adotado critérios de controle de qualidade do processamento radiográfico.

3.1.3 Exames laboratoriais

Os exames pré-operatórios hemograma completo, coagulograma e glicemia em jejum foram realizados em todos os pacientes selecionados a partir do exame clínico e radiográfico. Aqueles pacientes cujos resultados dos exames mostraram padrões de normalidade compuseram a amostra desse estudo.

Todos os exames foram realizados sem ônus para o paciente, por meio de uma parceria entre o Centro Goiano de Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia com a Faculdade de Farmácia e Faculdade de Medicina da UFG.

Uma vez selecionado a amostra do estudo (Figura 1), procedeu-se as avaliações clínico- radiográficas subjetivas e quantitativas dos sítios ósseos implantáveis.

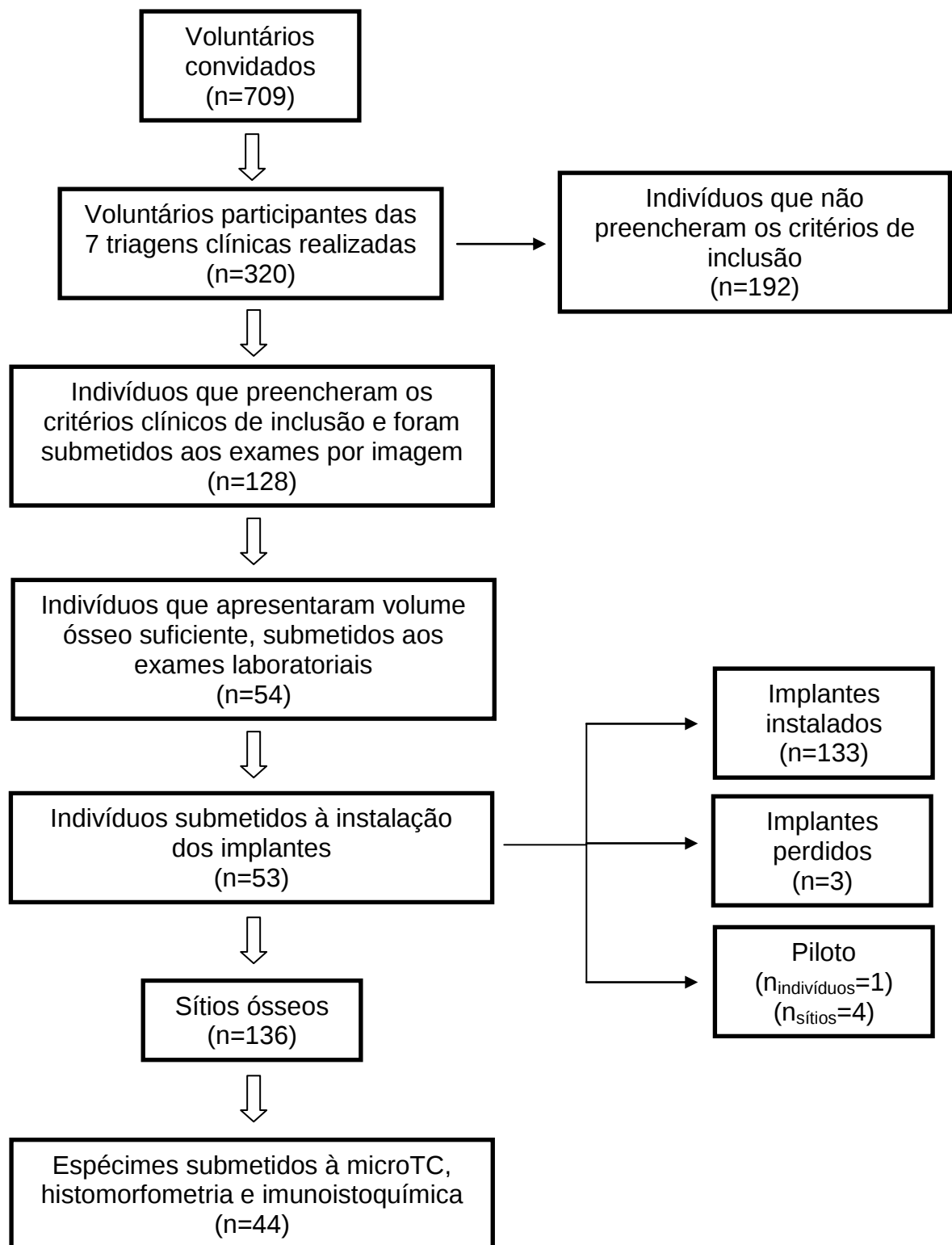


Figura 1. Fluxograma do processo de seleção da amostra.

3.2 Classificação clínico-radiográfica dos sítios ósseos

Após calibração, realizada com os três examinadores (cirurgiões) reunidos para análise, simulação em mandíbula suína e discussão da metodologia a ser empregada, cada examinador avaliou, individual e separadamente, os exames por imagem. A avaliação subjetiva do tecido ósseo, previamente e durante as cirurgias fizeram parte do planejamento. Cada cirurgião interpretou apenas os sítios a serem operados por ele, utilizando as três classificações subjetivas descritas a seguir, pois para uma delas era requerida a associação da interpretação radiográfica com a percepção tátil do cirurgião durante a perfuração do sítio ósseo, o que impossibilitava a realização dessa classificação por mais de um cirurgião.

Para a interpretação radiográfica foi utilizado um negatoscópio Apollo Portable Light Box Model LB 100 15 W (Ronkon Koma, Nova Iorque) e máscaras negras de papel cartão, adequadas para as radiografias panorâmicas e periapicais, com a finalidade de bloquear o excesso de luz ao redor do filme radiográfico. O negatoscópio foi colocado em ambiente adequado para interpretação de radiografias (luz ambiente reduzida, luminância inferior a 40 lux) e apresentava uma luminância média de 3.500 lux, estando de acordo com recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, MS). Esta medida foi obtida com luxímetro digital (Digital Lux Meter MLM-1332, Minipa) previamente à utilização do referido negatoscópio.

3.2.1 Avaliação óssea subjetiva baseada em radiografias associadas ou não à percepção tátil do cirurgião (Lekholm & Zarb, 1985)

A interpretação das imagens foi realizada pelo cirurgião minutos antes de cada cirurgia, sendo que o mesmo recebeu um cartão de calibração com um desenho esquemático e descrição dos quatro tipos ósseos de acordo Lekholm & Zarb (1985) (Figura 2), o qual serviu como referência durante a análise das imagens dos pacientes. A classificação foi estabelecida com base nas radiografias panorâmica e periapical de cada sítio implantável e registrada em formulário específico do prontuário do paciente. Esse método foi identificado nesse estudo como classificação periapical-panorâmica (PP), ou modificada de

Lekholm & Zarb, pois não inclui a percepção tátil do cirurgião obtida durante a perfuração óssea, como na descrição original dos referidos autores.

No ato cirúrgico, tendo em mente a classificação PP realizada por meio das radiografias, o cirurgião classificou o tipo ósseo durante a perfuração exploratória do sítio implantável, realizada com broca tipo trefina (Neodent, Curitiba, PR). Por meio da associação das duas informações subjetivas pré e transcirúrgicas, a classificação óssea final de cada sítio implantável foi estabelecida e registrada no prontuário do paciente. Esse método foi nomeado, neste estudo, de Lekholm e Zarb original (L&Z), visto que foi executado o mais próximo possível da descrição dos autores (LEKHOLM; ZARB, 1985).

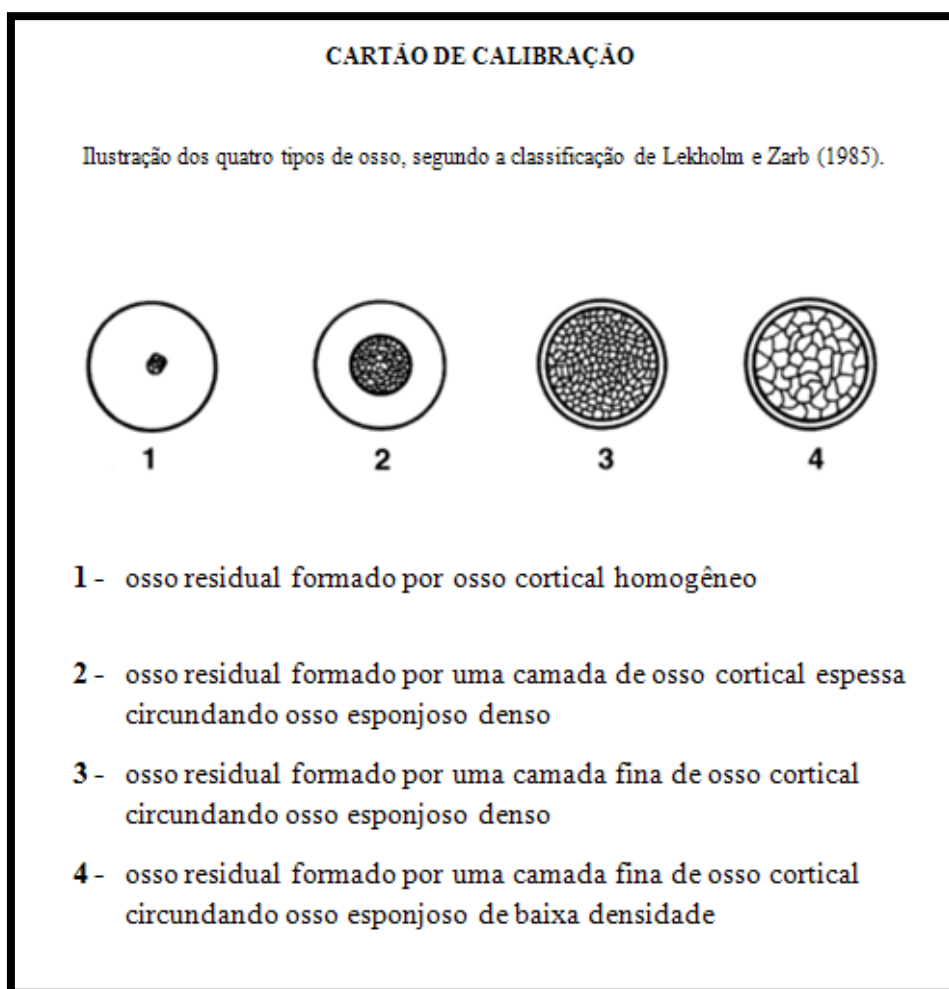


Figura 2. Cartão de calibração usado pelo examinador para realização da classificação radiográfica (PP e L&Z) dos sítios ósseos.

3.2.2 Avaliação óssea subjetiva baseada no padrão trabecular de radiografias periapicais (LINDH et al., 1996)

As interpretações das radiografias periapicais dos pacientes foram realizadas utilizando imagens radiográficas periapicais de referência dos três padrões ósseos trabeculares, em maxila e mandíbula, publicadas no estudo de Lindh e colaboradores (1996) (Figura 3). Essas imagens foram apresentadas em um monitor 15,6" (Placa de vídeo Móvil Intel R 945GM Express Chipset Family) de um microcomputador laptop (Inspiron 640m, Dell, EUA), posicionado ao lado do negatoscópio com o exame de cada paciente, em local com luz ambiente reduzida. Os examinadores passaram por calibração e discussão das características das imagens e diferenças no padrão trabecular entre os três grupos.

O padrão ósseo trabecular dos sítios implantáveis foi classificado pelos examinadores em um dos três grupos (padrão trabecular denso homogêneo, padrão trabecular heterogêneo e padrão trabecular esparso) propostos por Lindh et al. (1996), e registrados no prontuário do paciente. Essa classificação foi nomeada nesse estudo de Lindh.

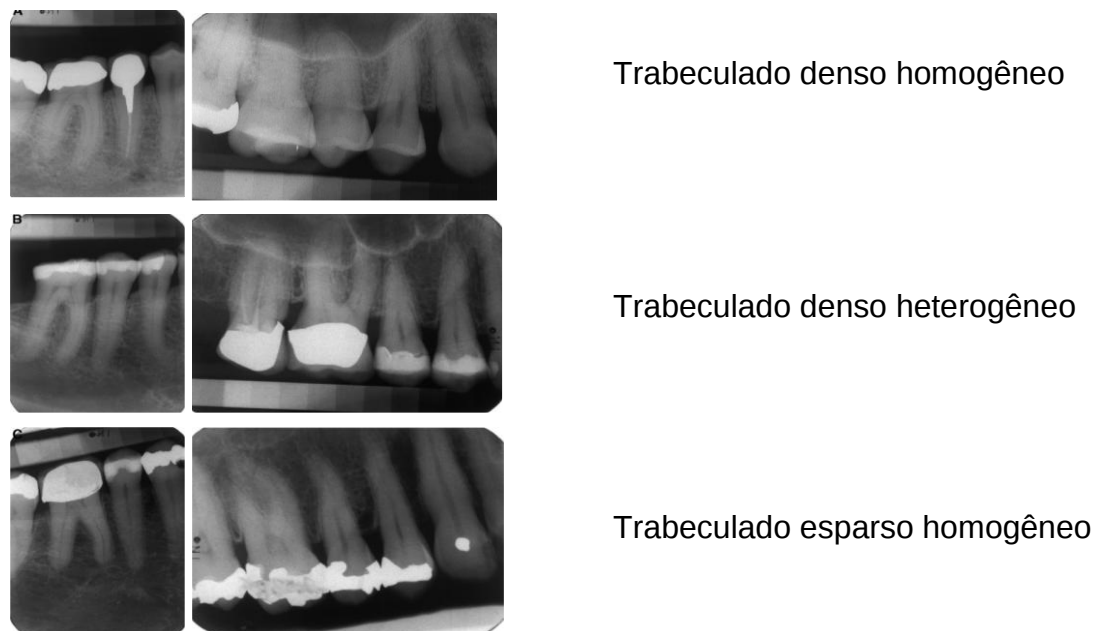


Figura 3. Imagens de referência utilizadas pelos examinadores na interpretação do padrão ósseo trabecular dos sítios implantáveis (Com autorização dos autores LINDH et al., 1996).

3.3 Instalação dos implantes

Os implantes foram instalados conforme protocolo tradicional de dois estágios cirúrgicos (Branemark et al., 1969), que consiste na instalação do implante e manutenção do mesmo submerso ao tecido gengival por um intervalo de cerca de 4 meses para mandíbula e 6 meses para maxila, quando então os mesmos são reabertos para fase de reabilitação.

Como pré-operatório, os pacientes foram instruídos a tomar um grama de amoxicilina uma hora antes da cirurgia e realizar bochecho com solução de gluconato de clorexidina 0,12% previamente ao procedimento cirúrgico. Para o pós-operatório foi prescrito analgésico em caso de dor.

A intervenção cirúrgica consistiu de anestesia local (Mepivacaína 2% adrenalina 1:100000) e incisão sobre a crista, seguida de descolamento do mucoperiósteo e posicionamento do guia cirúrgico. Todas as perfurações e inserção dos implantes foram realizadas usando o motor BLM 600 Plus (Driller, São Paulo, SP, Brasil), com controle de torque e contra ângulo 20:1 (Kavo, São Paulo, SP, Brasil).

Uma broca tipo trefina de 3.0mm/diâmetro externo X 2,7mm/diâmetro interno (Neodent, Curitiba, PR), especialmente desenvolvida para a pesquisa, serviu como broca inicial do preparo do alvéolo cirúrgico (Figura 4) para colocação do implante, permitindo assim a obtenção dos espécimes ósseos, cujas dimensões variaram de 2,5mmX2,7mm a 13mmX2,7mm (média 7mmX2,7mm). Estes, logo após a remoção, foram irrigados com soro fisiológico e divididos ao meio. A parte superior do espécime (porção relacionada à crista alveolar) foi fixada em formol 10% tamponado para ser utilizada no estudo microtomográfico (parte dos resultados prévios do projeto original), histomorfométrico e imunoistoquímico. A parte apical do espécime foi acondicionada em trizol e encaminhada para congelamento em Freezer -80 °C para aguardar estudo molecular (RT-PCR – Real time- Polymerase Chain Reaction).

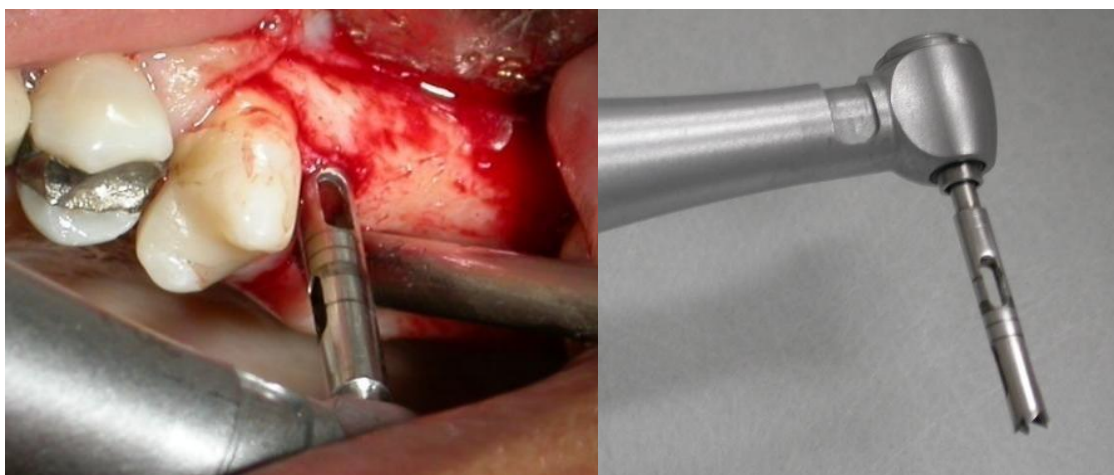


Figura 4. Perfuração exploratória do sítio implantável com trefina

3.4 Técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina) e análise microscópica

O material foi selecionado, desmineralizado em solução de EDTA (pH 7,0) por uma semana sob homogenização (M114, Nova Ética, São Paulo, Brasil) processado em histotécnico automático (OMA DM-20, M20090257, São Paulo), cortado longitudinalmente em dois pedaços, incluído em parafina e seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 μ m, que foram colocados sobre duas lâminas histológicas e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica e histomorfométrica das amostras.

A captura das imagens foi realizada com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Axio Scope. A1, Carl Zeiss, 3322000179, Göttingen, Germany) (Figura 5), na objetiva de 5x, devidamente calibrado para o estudo histomorfométrico. Cada espécime gerou uma lâmina e no máximo quatro campos foram analisados em cada uma delas, a depender do tamanho do espécime. Medidas da área óssea total (A_B) (trabéculas), área total da secção (A_T) (trabéculas + medula) e perímetro ósseo total (P_B) foram realizados em todos os campos com o auxílio do software Axiovision Release 4.7 (Carl Zeiss) (Figuras 6A e 6B). Para obtenção dos parâmetros histomorfométricos foram utilizados os cálculos propostos por Parfitt em 1983 (Tabela 1). Considerando-se que estes parâmetros são correspondentes aos parâmetros microtomográficos e que serão, futuramente, correlacionados a eles, optou-se

por utilizar a denominação proposta por Parfitt em 1987 a qual já compreende os parâmetros morfométricos tridimensionais obtidos pela microTC.



Figura 5. Câmera digital acoplada ao microscópio óptico utilizados na captura das imagens para a avaliação histomorfométrica.

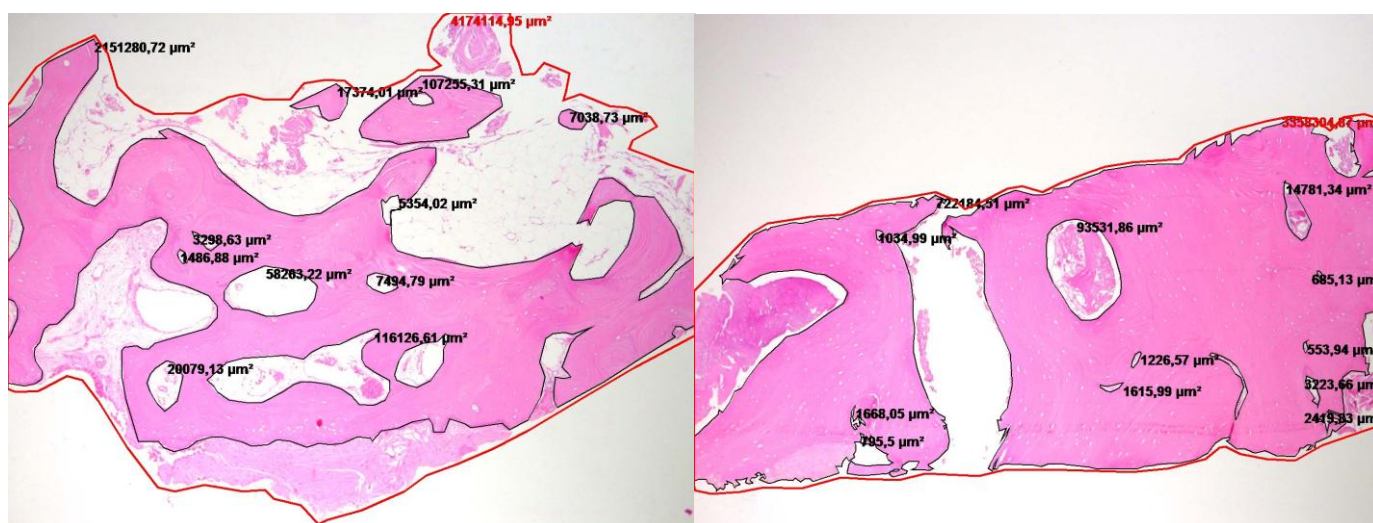


Figura 6 (A e B). Fotomicroscopias de espécimes ósseos de sítios classificados como tipo 1(A) e 4(B) segundo PP e L&Z (Hematoxilina e Eosina / Aumento original de x5). (A) Osso normal com predomínio de osso trabecular e presença de pequenos espaços medulares. (B) Osso normal com grandes espaços medulares preenchidos com medula óssea amarela. Registro das medidas da área óssea total (trabéculas) em preto e área total da secção (trabéculas + medula) em vermelho (software Axiovision 4.7).

Tabela 1 - Sistema de símbolos das medidas morfométricas bi e tridimensionais, proposto por Parfitt et al. em 1983 e 1987, respectivamente.

PARAMETROS BIDIMENSIONAIS (HISTOMORFOMÉTRICOS) (Parfitt et al, 1983)				PARAMETROS TRIDIMENSIONAIS (MICROTOMOGRÁFICOS) (Parfitt et al, 1987)		
Nome	Símbolo	Unidade	Cálculo	Nome	Símbolo	Unidade
Média de espessura trabecular	MTPT	μm	$(2/1,199)(A_B/P_B)$	Espessura trabecular	<i>Tb.Th</i>	mm
Média de densidade trabecular	MTPD	/mm	$(1,199/2)(P_B/A_T)$	Número de trabéculas	<i>Tb.N</i>	/mm
Volume ósseo trabecular	TBV	%	$(A_B/A_T)100$	Fração de volume ósseo	<i>BV/TV</i>	%
Área de superfície óssea trabecular pelo volume ósseo	<i>S/V</i>	mm^{-1}	$(P_B/A_B)1,199$	Área de superfície óssea trabecular pelo volume ósseo	<i>BS/BV</i>	mm^{-1}
Fração de superfície óssea	<i>S_v</i>	mm^{-1}	$(P_B/A_T) 1,199$	Fração de superfície óssea	<i>BS/TV</i>	mm^{-1}
Média de separação trabecular	MTPS	μm	$(2/1,199)(A_T-A_B)/P_B$	Separção trabecular	<i>TB.Sp</i>	mm

3.5 Técnica da Imunoistoquímica

Cortes seriados de $3\mu\text{m}$ foram obtidos e recolhidos por lâminas de vidro silanizadas com 3-aminopropiltietilsilano a 2% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) e submetidos à técnica da imunoistoquímica por meio do método da imunoperoxidase (estreptavidina-biotina-peroxidase) para a identificação de RANKL e OPG e utilizando o método do polímero para identificação de RANK e OC. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados e hidratados por meio de: 1-xilol, 3 vezes, 10 minutos cada vez; 2-álcool absoluto, 3 vezes, 2 minutos cada vez; 3-álcool etílico 95% 1 vez, 2 minutos; 4-solução salina tamponada de Tris (TBS), pH=7.2- 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% com metanol, por 40 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. Imediatamente, as lâminas foram novamente lavadas com TBS e, em seguida, foram incubadas em solução TBS-BSA por 20 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Novamente as lâminas foram

lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2), por 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. As diluições dos anticorpos foram determinadas em etapa de padronização. Após o período de 18 horas, foram realizadas lavagens consecutivas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos biotinilados anti-IgG de coelho/camundongo/cabras por 30 minutos, à temperatura de 22 a 25°C, seguido pela incubação da streptavidina marcada com peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente (kit LSAB+, Peroxidase- Universal- K0690, DAKO, Carpinteria, CA) para os anticorpos RANKL e OPG. As lâminas foram incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongo e coelho ligados a polímero (EnVision + Dual Link System-HRP, K4061, DAKO) durante 90 minutos para os anticorpos RANK e OC. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e foi realizada a revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (K3468, DAKO), por 2 a 3 minutos para RANK, RANKL e OPG e 15 segundos para OC, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina por 15 segundos, à temperatura ambiente. Após lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck). Em todas as reações realizadas foram utilizadas amostras de lesão central de células gigantes como controles positivos para os anticorpos RANK, RANKL e OPG e amostras de rim como controle positivo para o anticorpo OC. Em adição, as amostras que não foram incubadas com anticorpo primário e/ou substituído por soro de coelho (X0902, DAKO) ou cabra (X0907, DAKO) foram utilizadas como controles negativos.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados

Anticorpos	Descrição	Diluição	Código	Fabricante
RANK	Policlonais de coelho anti-RANK	1:50	H-300, sc9072	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
RANKL	Policlonais de cabra anti-RANKL	1:50	N-19, sc7628	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
OPG	Policlonais de cabra anti-OPG	1:50	N-20, sc 8468	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Osteocalcina	Policlonais de coelho anti-OC	1:50	FL-100, sc30044	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

A análise quantitativa da expressão dos marcadores foi realizada nos osteócitos, osteoblastos, osteoclastos e na medula (Figura 7), por meio de microscópio óptico na objetiva de 40x:

- **Osteócitos e osteoblastos:** para identificação das células positivas e negativas foi utilizado um retículo de integração em rede quadrada (474068000000-Netzmik-rometer 12.5x, Carl Zeiss), acoplado na objetiva do microscópio, cuja área no aumento de 40 corresponde a 0,0961 mm². A densidade (mm²) e a porcentagem de cada amostra foram calculadas, tendo sido analisados até 10 campos microscópicos consecutivos para cada amostra, a depender do seu tamanho;
- **Osteoclastos:** O número total de células positivas e negativas foi obtido por meio da análise de toda a extensão da amostra;
- **Medula:** A proporção de células marcadas positivamente por RANKL, OPG e OC em relação ao conjunto de todas as células do campo foi avaliada utilizando-se um sistema de gradação proposto por Tóbon-Arroyave (2005) modificado: 1- <25% das células marcadas; 2- 25-50% das células marcadas; 3- 51-75% das células marcadas e 4- >75% das células marcadas. A classificação foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, sendo que os resultados discordantes foram definidos por consenso. Foram analisados até 10

campos microscópicos para cada amostra, a depender do seu tamanho.

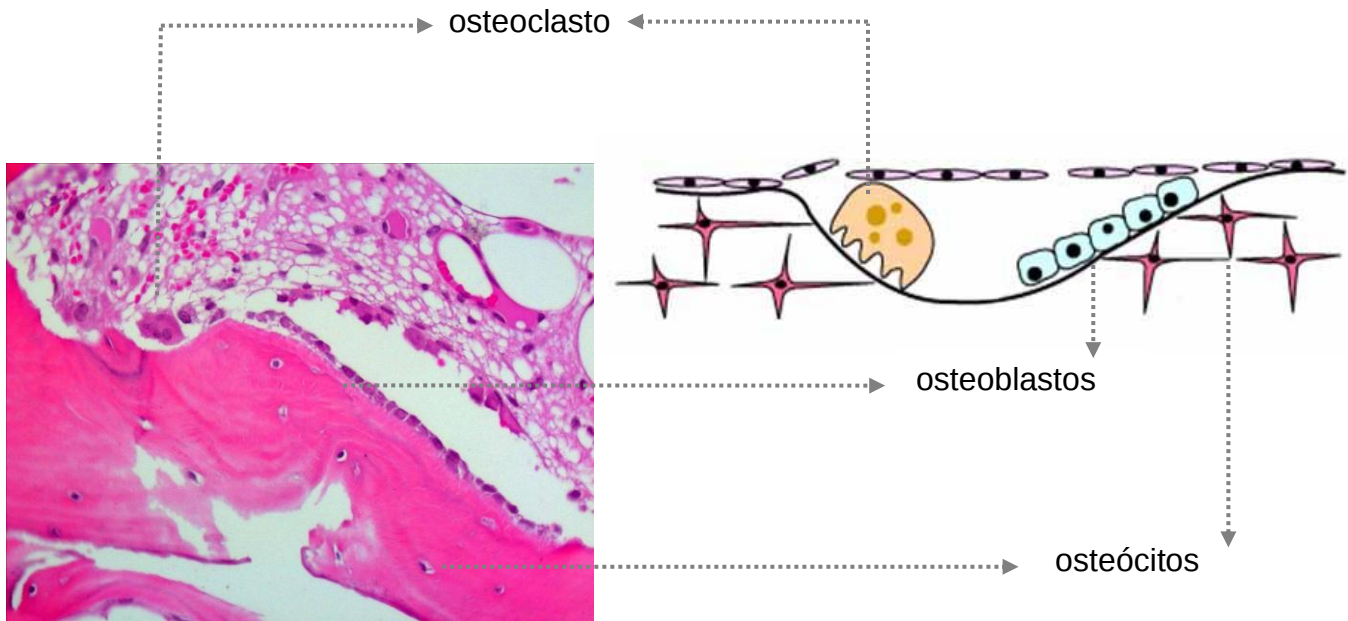


Figura 7. Células responsáveis pela remodelação óssea.

3.6 Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada por meio de estatística descritiva expressa em valores mínimos e máximos, média e desvio padrão e os seguintes testes não-paramétricos: a) Correlação de Spearman para a associação dos parâmetros clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares; b) Teste de Kruskal-Wallis para comparação dos tipos ósseos das classificações subjetivas com os parâmetros histomorfométricos e moleculares e o c) Teste de Dunn, realizado posteriormente ao de Kruskal-Wallis, para identificar a posição das diferenças estatisticamente significantes. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0.05$. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 17.0 for Windows (Chicago, IL, USA). Os gráficos foram realizados no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM, F.P.L.G. et al. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. **J Mol Hist**, v. 39, p. 401-8, 2008.
2. ANDRADE, F.R. et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, p. 548-55, 2008.
3. BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, may. 2003.
4. BRANEMARK P-I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I Experimental studies, Scandinaviam. **J Plastic Reconstructive Surg**, v. 3, p. 81-100, 1969.
5. CHOËL, L. et al. Trabecular alveolar bone in the human mandible: A dual-energy x-ray absorptiometry study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, p. 364–370, 2003.
6. DALLE CARBONARE, L. et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**, v. 36, p. 609-16, 2005.
7. ELIAS, L.S.A. et al. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 110, p. 624-31, 2010.
8. ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. Part I: Success criteria and epidemiology. **Eur J Oral Sci**, v. 106, p. 527-551, 1998a.
9. ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. **Eur J Oral Sci**, v. 106, n. 3, p. 721-64, jun 1998b.

10. FRIBERG, B. et al. A comparison between cutting torque and resonance frequency measurements of maxillary implants. A 20-month clinical study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 28, p. 297-303, 1999.
11. HAN, X-L. et al. Expression of osteocalcin during surgically assisted rapid orthodontic tooth movement in beagle dogs. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 12, p. 2467-75, 2008.
12. KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P.J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 155-92, 2008.
13. LEKHOLM, U.; ZARB, G. Patient selection and preparation. In: BRÅNEMARK, P-I.; ZARB, G.; ALBREKTSSON, T. **Tissue-Integrated Prosthesis: Osseointegration in Clinical Dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985. p. 199-209.
14. LINDH, C. et al. Quantitative computed tomography of trabecular bone in the mandible. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 25, p. 146-50, 1996a.
15. LINDH, C.; OBRANT, K.; PETERSSON, A. Maxillary bone mineral density and its relationship to the bone mineral density of the lumbar spine and hip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, p. 102-9, 2004.
16. LINDH, C.; PETERSSON, A.; ROHLIN, M. Assessment of the trabecular pattern prior to endosseous implant treatment. Diagnostic outcome of periapical radiography in the mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 82, p. 335-43, 1996b.
17. MISCH, C.E. Density of bone – Effect on treatment plans, surgical approach, and progressive loading. **Int J Implant**, v. 6, p. 23-31, 1990.
18. MÜLLER, R. et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. **Bone**, v. 23, p. 59-66, 1998.
19. NKENKE, E. et al. Implant stability and histomorphometry: A correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, p. 601-9, 2003.
20. PARFITT, A.M. et al. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis.

- Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. **J Clin Invest**, v. 72, n. 4, p. 1396-409, 1983.
21. QUEIROZ, T.P. et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, p. 1233-1240, 2008.
22. RIBEIRO-ROTTA, R.F. et al. Ambiguity in bone tissue characteristics as presented in studies on dental implant planning and placement: a systemic literature review. **Clin Oral Implants Res**, 2010(b). doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02041.x. Aceito para publicação em 07 de julho de 2010(b).
23. RIBEIRO-ROTTA, R.F. et al. An exploratory survey of diagnostic methods for bone quality assessment used by Brazilian dental implant specialists. **J Oral Rehabil**, v. 37, n. 9, p. 698-703, 2010(a).
24. RIBEIRO-ROTTA, R.F.; LINDH, C.; ROHLIN, M. Efficacy of clinical methods to assess jawbone tissue prior to and during endosseous dental implant placement: a systemic literature review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.22, p.289-300, 2007.
25. TAGUCHI, A. et al. Trabecular bone pattern of the mandible. Comparison of panoramic radiography with computed tomography. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 26, p. 85-9, 1997.
26. TÓBON-ARROYAVE, S.I. et al. Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Oncol**, v. 41, p.480-488, 2005.
27. TRISI, P.; RAO, W. Bone classification: Clinical-histomorphometric comparison. **Clin Oral Implants Res**, v. 10, p. 1-7, 1999.

4 RESULTADOS / PUBLICAÇÃO

Título - Histomorphometric and molecular evaluation of endosseous dental implant sites in humans: correlation with clinical and radiographic aspects

Formatação da publicação seguindo as normas da revista Clinical Oral Implants Research (Anexo 3)

Histomorphometric and molecular evaluation of endosseous dental implants sites in humans: correlation with clinical and radiographic aspects

- (1) Andrea Castro Pereira
- (2) Pedro Paulo Chaves de Souza
- (3) Joao Antonio Chaves de Souza
- (4) Tarcília Aparecida da Silva
- (5) Aline Carvalho Batista
- (6) Rejane Faria Ribeiro-Rotta

Correspondence to:

Rejane Faria Ribeiro-Rotta
Rua C-235, N. 1323, Apto. 1501 Nova Suiça
Goiânia-GO 74280-130
Brazil
Phone/Fax: +55 62 32593766
E-mail: rejanefrr@gmail.com

Abstract

Objective: To evaluate the correlations between clinical-radiographic aspects and histomorphometric-molecular parameters of endosseous dental implant sites in humans. **Material and Methods:** The study sample consisted of bone implant sites from the jawbones of 32 volunteers, which were classified according to three different systems: (1) based only on periapical and panoramic images (PP); (2) as proposed by Lekholm & Zarb (L&Z); and (3) as proposed by Lindh and coworkers. Bone biopsies were removed using a trephine during the first drilling for implant placement. Samples were stained with hematoxylin-eosin and histomorphometric analysis was performed to obtain the following parameters: trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number, bone volume density (BV/TV), bone specific surface (BS/BV), bone surface density and trabecular separation (Tb.Sp). In addition, immunohistochemistry analysis was performed on bone tissue samples for the proteins, RANK, RANKL, OPG and Osteocalcin (OC). **Results:** PP and L&Z classification systems revealed a correlation with BV/TV, BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp, while no correlations with histomorphometric parameters were found using Lindh's classification system. L&Z's system identified differences among bone types when BV/TV, BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp were compared. A weak correlation between PP/L&Z classifications and the expression of bone metabolism regulators (RANK, RANKL, OPG e OC) was found. **Conclusions:** Our results suggest that PP and L&Z subjective bone type classification systems are related to histomorphometric aspects. This data may contribute to the validation of these classifications. Bone remodelling regulatory molecules seem not influence morphological aspects of the jawbone. **Keywords:** dental implants, bone density, histomorphometry, immunohistochemistry.

Introduction

Several characteristics of bone tissue have been identified as important factors for dental implant treatment outcome. The term bone quality is complex, and includes microscopic, morphological and molecular parameters (Lindh et al. 2004). Thus, no consensus definition of bone quality has been reached in the literature or implemented in the clinical setting (Ribeiro-Rotta et al. 2007, 2010a, 2010b).

Different clinical classifications have been proposed to describe the bone characteristics of the maxillae and mandible prior to implant treatment, which suggests a requirement for objective parameters for implant treatment planning in clinical practice. The most widely used classification system is that proposed by Lekholm & Zarb in 1985, although it has never been validated (Ribeiro-Rotta et al. 2007, 2010a, 2010b). Lekholm & Zarb's system is based on radiographic images coupled with the surgeon's tactile perception. The classification system proposed by Lindh et al. (1996) established three jawbone categories using standard methodology and reference images based on trabecular bone periapical x-ray images, only.

Although several methods are used for the assessment of bone quality during implant treatment planning, the evidence for the efficacy of these clinical methods is sparse (Ribeiro-Rotta et al. 2007): highlighting the need of studies that validate clinical parameters by using gold standards or reference methods.

Histomorphometry is the gold standard method for evaluation of bone microarchitecture (Müller et al. 1998), and allows two-dimensional analysis, where structural parameters are either inspected visually or measured from sections. Although histomorphometry offers a high spatial resolution and a high image contrast, it is a time-consuming technique (Müller et al. 1998; Trisi & Rao 1999; Dalle Carbonare et al. 2005; Brandi 2009).

Besides the histomorphometric aspects, biological or molecular events involved in bone metabolism may influence the bone microarchitecture (Kearns et al. 2008). In this context bone remodeling process occurs at discrete sites on cortical and trabecular bone surfaces and involves the integrated and sequential actions of osteoclasts and osteoblasts (Kearns et al. 2008). On a cellular and molecular level, the receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), RANK ligand

(RANKL) and osteoprotegerin (OPG) have been implicated in osteoblast–osteoclast cross-talk, which is crucial during bone remodelling. RANK, that is expressed by osteoclast precursor cells and also by mature osteoclasts, belongs to the tumour necrosis factor receptor superfamily, and is activated by RANKL, which is expressed in membrane-bound and/or soluble forms by different cell types. The secreted, soluble receptor osteoprotegerin (OPG) interrupts RANK activation by binding directly to RANKL (Boyle et al. 2003; Eriksen et al. 2007; Amorim et al. 2008; Silva et al. 2008).

Another important protein related to bone metabolism is Osteocalcin (OC). It is a protein found in calcifying and calcified tissue, which is synthesised by osteoblasts and odontoblasts in bone and dentin, respectively. Because the majority of osteocalcin secreted by osteoblasts is deposited in the extracellular bone matrix, it can be used as a biochemical marker of bone formation (Han et al. 2008).

Up-regulation of RANKL and down-regulation of OPG have been implicated in a variety of human diseases, including osteoporosis, rheumatoid arthritis, and periodontal diseases. Although a recent study demonstrated that the RANK-RANKL-OPG system is imbalanced in fibro-osseous lesions (Elias et al. 2010), the expression of these molecules in different “normal” bone patterns remains to be elucidated. However, we hypothesise that these proteins involved in bone metabolism may influence the bone microarchitecture, which in turn could be associated with different bone type classification systems.

The aim of the present study was to evaluate the correlation between clinical and radiographic aspects of human dental implant sites with histomorphometric and molecular parameters of bone cores taken from these sites.

Material and Methods

This study was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Goiás and National Ethics Committee (Brazil).

Study Sample

The study sample consisted of 32 volunteers with indications for implant treatment, who were selected based on inclusion and exclusion criteria in three steps: 1) clinical examination: non-smoker volunteers (for at least 10 years) in good systemic health, with no allergies or metabolic diseases such as diabetes, reasonable amounts of alveolar bone, no complex oral rehabilitation needs and good oral hygiene care were included; 2) radiographic images: periapical and panoramic radiographs and computed tomography (CT) were performed to evaluate if the bone sites had the minimal volume necessary to receive a 3.75x9 mm implant (Neodent, Curitiba, Brazil); and 3) blood tests: haemogram and fasting glucose level tests were conducted to evaluate if conditions were favourable for the surgical procedure.

Preoperative radiographic evaluation

Three experienced calibrated surgeons classified the bone sites during treatment planning using three subjective classification systems: (1) a modification of Lekholm & Zarb's classification system, based only on periapical and panoramic images (PP); (2) the original classification system proposed by Lekholm & Zarb (1985) (L&Z), based on periapical, panoramic and the surgeon's tactile perception during drilling; (3) the classification system recommended by Lindh et al. (1996), which categorises three groups of bone types (homogeneous dense, heterogeneous or homogeneous sparse) based only on periapical images of the trabecular bone. In contrast, classification methods (1) and (2) categorise bone types into four groups: 1, 2, 3 and 4, according to the distribution of cortical and trabecular bone

Implants placement

All implants were placed according to the classical two-stage Brånemark surgical protocol. Implants used in this study were Titamax TI Cortical implants (Neodent, Curitiba, Brazil). A 2.7x15 mm trephine was especially designed for this study (Neodent, Curitiba, Brazil), and was used as a first drill to obtain the

bone specimen from each site. Specimens were maintained in a 10% buffered formalin solution for histomorphometric evaluation.

Histomorphometry

Specimens were demineralised in 15% EDTA solution (pH 7.0) for one week under homogenization (M114, Nova Ética, São Paulo, Brazil), automatically processed (OMA DM-20, M20090257, São Paulo), embedded in paraffin, cut with a microtome (Leica RM2165) in 5µm slices and stained using routine hematoxylin/eosin (HE) techniques. Digital images were obtained using a digital camera connected to an optical microscope (x5) (Axio Scope. A1, Carl Zeiss, 3322000179, Göttingen, Germany), which had been previously calibrated for the histomorphometric study. Two fields in average were analyzed in each bone specimen. Measurements of total bone perimeter length (P_B), total bone area (A_B) and total section area (A_T) were performed using the Axiovision Release 4.7 software (Carl Zeiss) (Figure 1). Histomorphometric parameters were obtained using the formulas proposed by Parfitt et al. (1983):

- Bone volume density (BV/TV) in %: Bone volume density or trabecular bone volume is defined as the fraction of trabecular bone in the total tissue volume (Fanuscu & Chang 2004).
- Bone surface density (BS/BV) in mm^{-1} : is the ratio of bone surface area (BS) to the total bone volume (Moon et al. 2004).
- Bone surface (BS/TV) in mm^{-1} : is the ratio of BS to total tissue volume (TV) (Fanuscu & Chang 2004).
- Trabecular thickness (Tb.Th) in µm: is the thickness of the trabeculae. Its calculation requires assumptions about the nature of the structure, parallel plate, cylinder rod and the sphere model. Consequently, a diverse trabecular configuration can be found in each specimen (Moon et al. 2004).
- Trabecular separation (Tb.Sp) in µm: is defined as the distance between adjacent the edges of the trabeculae (Parfitt et al. 1983).
- Trabecular number (Tb.N) per mm: is defined as the density of the trabeculae (Moon et al. 2004).

Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N describe the basic relationships between space and the trabecular network, and are expressed in terms of volume instead of area, even though they are evaluated in two-dimensional sections, because they offer an inferred estimation of the spatial organization of the trabecular net configuration (Parfitt et al. 1987).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were sectioned (3 µm) and collected in series on glass slides coated with 2% 3-aminopropyltriethsilane (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The sections were deparaffinised by immersion in xylene, after which they were immersed in alcohol and then incubated with 3% hydrogen peroxide for 40 minutes. Sections were blocked by incubation with Tris-Buffered Saline – Bovine Serum Albumin for 20 minutes. The sections were immediately incubated with the following primary rabbit and goat polyclonal antibodies: anti-RANK (H-300, sc9072, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); anti-RANKL (N-19, sc7628, Santa Cruz Biotechnology); anti-OPG (N-20, sc8468, Santa Cruz Biotechnology); anti-osteocalcin (FL-100, sc30044, Santa Cruz Biotechnology); diluted 1:50, at 4°C, overnight, in a humidified chamber. After washing in Tris-Buffered Saline, the sections were treated using a labelled streptavidin-biotin (LSAB) kit (K0690, DAKO, Carpinteria, CA) for anti-RANKL and anti-OPG, and with an EnVision + Dual-Link System HRP kit (K4061, DAKO) for anti-RANK and anti-osteocalcin antibodies. Sections were then incubated in 3.3'-Diaminobenzidine (K3468, DAKO) for 15 seconds (osteocalcin) or 3 minutes (other antibodies), and stained with Mayer's haematoxylin. Specimens of central giant cell lesions were used as positive controls for RANK, RANKL and OPG markers; and human kidney tissue was used as a positive control for osteocalcin antibody. Negative controls were obtained by omission of the primary antibodies, which were substituted with 1% Tris-Buffered Saline – Bovine Serum Albumin and by non-immune rabbit (X0902, DAKO) and goat (X0907, DAKO) serum.

Cell counting

Staining analyses was evaluated considering the following cell types: osteocytes, osteoblasts, osteoclasts and bone marrow cells. The number of positive and negative cells was counted in 10 consecutive microscopic high-power fields (x40) using an integration graticule (4740680000000-Netzmikrometer 12.5x, Carl Zeiss). At this magnification, each field of integration graticule had a corresponding area of 0.0961 mm². Analyses of osteocytes and osteoblasts were expressed in terms of density and the percentage of cells positive for RANKL, OPG and OC. For osteoclast evaluations, the total number of RANK positive and negative cells in each sample was obtained. In bone marrow, the proportion of stained cells (RANKL, OPG and OC) was scored as follows: 1, < 25% stained cells; 2, 25-50% stained cells; 3, 51-75% stained cells and 4, > 75% stained cells, according to a method modified from Tobón-Arroyave et al. (2005).

Statistical analysis

Descriptive analyses performed for histomorphometric and molecular parameters were expressed as minimum and maximum values, along with the mean and standard deviation. Spearman's correlation was used to evaluate the relationships between the three subjective bone classifications and histomorphometric and molecular variables. To compare independent groups of bone classifications with histomorphometric and molecular parameters, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Dunn's Test was performed after the Kruskal-Wallis' test to identify the location of statistically significant differences. SPSS 17.0 for Windows (Chicago, IL, USA) was used for data analysis and the statistical significance was set at $P < 0.05$. Graphs were created using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

Results

A total of 44 samples from 32 patients (14 men and 18 women, age ranging from 25 to 67 years old, mean age of 42 years old) were analysed by histomorphometry and immunohistochemistry. Twenty-six implants were inserted into the posterior mandible region, 9 into anterior maxillary region and 9 into posterior maxillary region previously classified according to the three subjective methodologies. All patients with edentulous anterior mandibles did not meet the study inclusion criteria.

A descriptive analysis of histomorphometric and cellular/molecular parameters is presented in Tables 1 and 2, respectively.

According to PP and L&Z classifications, a majority of the samples were classified as bone types 2 and 3. Using the PP classification system: 5 sites were classified as type 1; 13 sites as type 2; 20 sites as type 3; and 6 sites as type 4. When the L&Z was used: 8 sites were classified as type 1; 12 sites as type 2; 14 as type 3; and 10 as type 4. According to Lindh's classification system: 15 sites were classified as trabecular homogeneous dense; 24 as trabecular heterogeneous; and 5 as trabecular homogeneous sparse.

The analysis of correlation between histomorphometric parameters and the above clinical classifications revealed a negative correlation between BV/TV and PP (-0.465 , $p < 0.01$); and BV/TV and L&Z (-0.623 , $p < 0.01$). Other variables, such as BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp, were also found to significantly correlate with PP and L&Z. In contrast, Lindh's classification system did not identify any significant correlations with histomorphometric parameters (Table 3).

When Kruskal-Wallis test was used, PP showed differences among the bone types considering BV/TV and Tb.Sp (Figure 2A, 2D). When L&Z was used, differences between bone types were observed when evaluating BV/TV, BS/BV, Tb.Th and Tb.Sp (Figure 2A to 2D). As above, analysis of Lindh's classification system did not identify differences among bone types when compared with histomorphometric variables. In a detailed analysis, PP and L&Z classification systems showed:

- An increase of bone volume density (BV/TV) in bone types 1 and 2 (Figure 2A), which are clinically considered as denser bones;

- Higher values of trabecular separation (Tb.Sp) associated with less dense bone types 3 and 4 (Figure 2D).

In addition, L&Z classification system revealed:

- Higher values of bone surface density (BS/BV) in bone types 3 and 4 (Figure 2B)
- Thicker trabeculae (Tb.Th) in bone types 1 and 2 (Figure 2C).

Dunn's test revealed that four histomorphometric parameters (BV/TV, BS/BV, Tb.Th, Tb.Sp) presented significant differences between bone types 1 and 3, and 1 and 4 when the L&Z classification was used (Figure 2A to 2D). In addition, when the PP and L&Z classifications were used, bone volume density (BV/TV) and trabecular separation (Tb.Sp) showed significant differences between bone types 2 and 3 (Figure 2A and 2D).

The expression of bone remodeling markers is shown in Figure 3. A weak correlation ($r \approx 0.3$, $p < 0.05$) between these markers and bone type classification systems was observed:

- PP presented a positive correlation with osteoblasts density evaluated in HE ($r = 0.353$, $p < 0.05$) and OC+ osteoblasts density ($r = 0.320$, $p < 0.05$).
- L&Z showed a positive correlation with the same markers as PP ($r = 0.346$ and $r = 0.347$, respectively, $p < 0.05$), and negative correlation with OPG+ osteocytes density, OC+ osteocytes density.
- Lindh's classification only correlated negatively with OPG+ osteocytes density.

From the 19 cellular/molecular parameters (Table 2) only 4 showed significant difference when compared with L&Z classification system (Kruskal-Wallis test): OPG+ osteoblasts density, OPG+ osteocytes density, OC+ osteocytes density and percentage of RANKL+ osteoblasts (Figure 4A to 4D). The higher values of OPG+ and OC+ osteocytes density in bone types 1 and 2 can be observed in Figures 4B and 4C, respectively. The increase of OPG+ osteoblasts density in bone type 2 and of percentage of RANKL+ osteoblasts in bone type 1 are shown in Figures 4A and 4D, respectively.

Dunn's test revealed that the above differences were between bone types 1 and 2, and 1 and 4 when OPG+ osteoblast density and the percentage

of RANKL+ osteoblasts were compared (Figure 4A and 4D). However, when OPG+ osteocyte density was compared, differences were found between bone types 2 and 3, and 2 and 4 (Figure 4B). Finally, when comparing OC+ osteocyte density, a difference was observed between bone types 2 and 4 (Figure 4C).

A correlation between histomorphometric parameters and specific cellular/molecular variables was also observed: the strongest correlation was found between the percentage of RANKL+ osteoblasts and Tb.Th ($r \approx 0.5$, $p < 0.01$).

Discussion

Subjective bone classifications X histomorphometric parameters

The PP and L&Z classification systems were better able to identify differences among the bone types when compared with histomorphometric parameters. However, to date, there is still no scientific evidence of the real impact of these analyses on treatment success. To address this, longitudinal clinical trials are underway as part of a larger project that includes the present study.

The fact that BV/TV was found to negatively correlate with PP and L&Z, suggests that bone types 1 or 2 (which are considered to be more dense and to contain larger amounts of cortical bone) correlate with higher BV/TV values, while bone types 3 or 4 (which are less dense, with a thin band of cortical bone) correlate with lower BV/TV values. This negative correlation between BV/TV and the subjective bone classifications may be understood by remembering that BV/TV values represent the amount of trabecular bone within the cancellous space.

The other correlations found between BS/BV, Tb.Th, Tb.Sp and L&Z are in accordance with bone type definitions proposed by Lekholm and Zarb (1985). For example, bone types 1 or 2 may be associated with lower BS/BV, higher Tb.Th and lower Tb.Sp, because these bones are more compact, with smaller (or less) marrow spaces. In fact, Moon et al. (2004) suggested that higher BV/TV with lower BS/BV correlates with thicker trabeculae, or bone consisting mostly of wide, plate-like structures. Although this is an important inference to

validate L&Z classification, we cannot consider it to be a rule, since each bone specimen tends to show a specific trabecular organization, as demonstrated by other studies (Fanuscu & Chang 2004, Moon et al. 2004, De Oliveira et al. 2008).

There are other studies in the literature (Trisi & Rao 1999; Nkenke et al. 2003; Aksoy et al. 2009) that correlated histomorphometric and clinical parameters, but none have performed a correlation between the classifications assessed in this study and histomorphometric measures. Trisi & Rao (1999) compared histomorphometric variables with Misch's classification system, which classifies bone quality into classes D1, D2, D3 and D4 based on the surgeon's tactile perception of drilling resistance. These authors found that tactile perception allowed the surgeon to distinguish, with statically significant confidence, between D1 and D4 bone, but enable discrimination between intermediate classes of bone quality. Nkenke et al. (2003) correlated histomorphometry with implant stability measured by peak insertion torque, periotest and resonance frequency analysis. In their study, the resonance frequency analysis was superior to the Periotest at assessing implant stability as a predictor of histomorphometric data. However, non-invasive determination of implant stability must be improved to yield a more comprehensive prediction of bone characteristics at the implant site. Aksoy et al. (2009) correlated BV/TV with CT, resonance frequency analysis and tactile sense. Their results showed no correlation between BV/TV with the clinical parameters tested: unit of CT density (Hounsfield units - HU values), resonance frequency and tactile sense.

Subjective bone classifications X immunoistochemistry / molecular parameters

The weak correlation observed in the present study between bone metabolism markers and bone types, may be due to the fact that analyses were performed on "normal" bone, suggesting that these markers do not influence morphometric aspects of the jawbone. This further suggests the presence of a control process responsible for maintaining jaw integrity, in which bone remodelling proteins that regulate bone resorption are in equilibrium.

The higher OPG values observed in denser bone types are in agreement with Simonet et al. (1997) who suggested a positive association between OPG

overexpression and increased cortical and trabecular bone mass. An association between bone less dense and reduction of RANKL was found in this study, but literature review suggests that this type of bone, with increased bone turnover, reduced matrix mineralization, reduced in trabecular bone volume, increased cortical porosity, reduced bone strength and reduced trabecular connectivity, is associated with an increase of RANKL (Kearns et al. 2008).

Because of the timing and sequence of bone resorption and bone formation, the two processes rarely occur in the same area (Eriksen et al. 2007). Thus, an imbalance between RANKL-OPG does not necessarily characterise better or worse bone quality, since this imbalance may also result from the specific state of the remodelling cycle.

In contrast with our results, a recent study developed by some members of our research team (Elias et al. 2010) found an imbalance in RANK-RANKL-OPG and OC in fibrous-osseous lesions. These authors reported lower expression of RANKL and higher expression of OPG and OC in fibrous dysplasia, demonstrating that there is decreased bone resorptive activity in this lesion. On the other hand, central giant cell lesions displayed higher expression of RANKL than OPG.

Characterisation of these molecules and their role in the bone remodelling process can contribute to the development of other drugs with the ability to modulate bone resorption pathways, as Denosumab, a fully human monoclonal antibody that binds and inhibits RANKL (Kearns et al. 2008). However, well designed experimental studies are necessary to contribute to the specific field of dental implant. The present study is particularly relevant, because it is one of the first to investigate the relationship between clinical classifications (PP, L&Z and Lindh) and biopsy sampling methods, including a reference method of bone assessment. Our results also underpin the need for further studies with a more homogeneous and larger sample, in order to understand the morphologic variances among jaw bones and their impact on implant treatment outcomes.

Conclusions

Based on the results of this original study, two main conclusions can be made. (1) The correlation identified between histomorphometric parameters and the L&Z classification system indicates that L&Z is the best classification system, and is clearly able to differentiate between bone types. Our data may thus contribute to the validation of this classification. (2) Bone remodelling proteins seem not influence morphometric aspects of the jawbone.

Acknowledgments: This study was supported by a grant from FAPEG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás, Brazil, CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil and ILAPEO – Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, Curitiba, Brazil.

References

1. Aksoy, U., Eratalay, K. & Tozum, T.F. (2009) The possible association among bone density values, resonance frequency measurements, tactile sense, and histomorphometric evaluations of dental implant osteotomy sites: A preliminary study. *Implant Dentistry* **18**:316-325.
2. Amorim, F.P.L.G., Ornelas, S.S., Diniz, S.F., Batista, A.C. & Silva, T.A. (2008) Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetics rats. *Journal of Molecular Histology* **39**: 401-8.
3. Andrade, F.R., Sousa, D.P., Mendonça, E.F., Silva, T.A., Lara, V.S. & Batista, A.C. (2008) Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontics* **106**: 548-555.
4. Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**: 337-342.
5. Brandi, M.L. (2009) Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology* **48**: iv3–iv8.
6. Dalle Carbonare, L., Valenti, M.T., Bertoldo, F., Zanatta, M., Zenari, S., Realdi, G., Cascio, V.L. & Giannini, S. (2005) Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* **36**: 609-616.
7. De Oliveira, R.C.G., Leles, C.R., Normanha, L.M., Lindh, C. & Ribeiro-Rotta, R.F. (2008) Assessments of trabecular bone density at implant sites on CT images. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **105**:231-238.
8. Elias, L.S.A., Costa, R.F., Carvalho, M.A., Batista, A.C., Silva, T.A. Leles, C.R. & Mendonça, E.F. (2010) Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **110**:624-631.
9. Eriksen, E.F., Eghbali-Fatourehchi, G.Z., Khosla, S. (2007) Remodeling and vascular spaces in bone. *Journal of bone and mineral research* **22**: 1-6. Review.
10. Fanuscu, M.I. & Chang, T.L. (2004) Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. *Clinical Oral Implants Research* **15**:213-218.

11. Han, X-L., Meng, Y., Kang, N., Lv, T. & Bai, D. (2008) Expression of osteocalcin during surgically assisted rapid orthodontic tooth movement in beagle dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **66**: 2467-2475.
12. Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J. (2008) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews* **29**: 155-192.
13. Lekholm, U. & Zarb, G.A. (1985) Patient selection and preparation. In: P.-I. Brånemark, G. A. Zarb & T. Albrektsson, eds. *Tissue integrated prostheses: Osseointegration in clinical dentistry*, 199-209. Chicago, IL: Quintessence.
14. Lindh, C., Nilsson, M., Klinge, B. & Petersson, A. (1996) Quantitative computed tomography of trabecular bone in the mandible. *Dentomaxillofacial Radiology* **25**: 146-150.
15. Lindh, C., Öbrant, K. & Petersson, A. (2004) Maxillary bone mineral density and its relationship to the bone mineral density of the lumbar spine and hip. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **98**: 102-109.
16. Moon, H.S., Won, Y.Y., Kim, K.D., Ruprecht, A., Kim, H.J., Kook, H.K. & Chung, M.K. (2004) The three-dimensional microstructure of the trabecular bone in the mandible. *Surgery Radiology Anatomic* **26**:466-473.
17. Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T. & Rü Egsegger, P. (1998) Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* **23**:59-66.
18. Nkenke, E., Hahn, M., Weinzierl, K., Radespiel-Troger, M., Neukam, F.W. & Engelke, K. (2003) Implant stability and histomorphometry: A correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 601-609.
19. Parfitt, A.M., Mathews, C.H.E., Villanueva, A.R., Kleerekoper, M., Frame, B. & Rao, D.S. (1983) Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis: Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *The Journal of clinical investigation* **72**: 1396-1409.
20. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M. & Recker, R.R. (1987) Bone histomorphometry:

standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* **2**:595-610.

21. Ribeiro-Rotta, R.F., Lindh, C. & Rohlin, M. (2007) Efficacy of clinical methods to assess jawbone tissue prior to and during endosseous dental implant placement: A systematic literature review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **22**: 289-300.
22. Ribeiro-Rotta, R.F., Lindh, C., Pereira, A.C. & Rohlin, M. (2010b) Ambiguity in bone tissue characteristics as presented in studies on dental implant planning and placement: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* [Epub ahead of print]
23. Ribeiro-Rotta, R.F., Pereira, A.C., Oliveira, G.H., Freire, M.C., Leles, C.R. & Lindh, C. (2010a) An exploratory survey of diagnostic methods for bone quality assessment used by Brazilian dental implant specialists. *Journal of Oral Rehabilitation* **37**: 698–703.
24. Silva, T.A., Batista, A.C., Medonça, E.F., Leles, C.R., Fukada, S. & Cunha, F.Q. (2008) Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontics* **105**: 333-341.
25. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C., Kelly, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nhuyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliot, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W.J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**:309-319.
26. Tóbon-Arroyave, S.I., Franco-González, L.M., Isaza-Guzmán, D.M., Floréz-Moreno, G.A., Bravo-Vásquez, T., Castañeda-Peláez, D.A., Vieco-Durán, B. (2005) Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Oncology* **41**: 480-488.
27. Trisi, P. & Rao, W. (1999) Bone classification: Clinical-histomorphometric comparison. *Clinical Oral Implants Research* **10**: 1-7.

Table 1. Descriptive statistics of the histomorphometric parameters.

Histomorphometric parameters	Minimum – Maximum	Mean (SD)
BV/TV (%)	17.69 – 82.92	51.68 (16.32)
BS/TV (mm⁻¹)	2.60 – 8.97	4.50 (1.28)
BS/BV (mm⁻¹)	3.71 – 27.57	10.16 (5.60)
Tb.Th (μm)	0.07 – 0.54	0.25 (0.12)
Tb. N (/mm)	1.30 – 4.48	2.25 (0.64)
Tb.S (μm)	0.10 – 0.41	0.22 (0.07)

Table 2. Descriptive analyses of the cellular/molecular parameters.

Cellular/molecular parameters	Minimum – Maximum	Mean (SD)
Osteocytes density in HE (mm ²)	27.06 – 231.01	128.30 (50.26)
Osteoblasts density in HE (mm ²)	10.41 – 129.03	40.26 (21.55)
RANKL expression in bone marrow (scores)	1.00 – 4.00	2.14 (0.98)
OPG expression in bone marrow (scores)	1.00 – 4.00	1.62 (0.91)
OC expression in bone marrow (scores)	1.00 – 4.00	1.99 (1.01)
RANK+ osteoclasts	0 – 40	6.57 (9.47)
RANKL + osteocytes density (mm ²)	59.31 – 233.09	125.14 (42.66)
Percentage of RANKL+ osteocytes (%)	49.35 – 90.91	73.81 (8.38)
RANKL+ Osteoblasts density (mm ²)	22.89 – 186.00	57.07 (34.87)
Percentage of RANKL+ osteoblasts (%)	50.00 – 86.21	72.24 (8.56)
OPG + osteocytes density (mm ²)	36.42 – 228.93	138.61 (47.31)
Percentage of OPG+ osteocytes (%)	58.33 – 90.38	79.44 (7.47)
OPG+ osteoblasts density (mm ²)	3.47 – 190.77	41.09 (32.88)
Percentage of OPG+ osteoblasts (%)	16.67 – 100.00	67.77 (21.72)
OC + osteocytes density (mm ²)	71.11 – 314.26	127.20 (47.79)
Percentage of OC+ osteocytes (%)	64.48 – 91.30	80.36 (5.15)
OC+ osteoblasts density (mm ²)	3.47 – 83.25	28.05 (18.27)
Percentage of OC+ osteoblasts (%)	12.50 – 93.75	52.33 (19.96)
RANKL/OPG	0.54 – 3.68	1.14 (0.52)

Table 3. Spearman's correlation coefficients for the association between histomorphometric variables and the 3 classification systems

Histomorphometric parameters	PP	L&Z	Lindh
BV/TV	-0.465**	-0.623**	-0.180
BS/TV	0.037	0.129	0.051
BS/BV	0.312*	0.492**	0.200
Tb.Th	-0.312*	-0.492**	-0.200
Tb. N	0.037	0.129	0.051
Tb.S	0.439**	0.572**	0.103

* Correlation is significant at p<0.05

** Correlation is significant at p<0.01

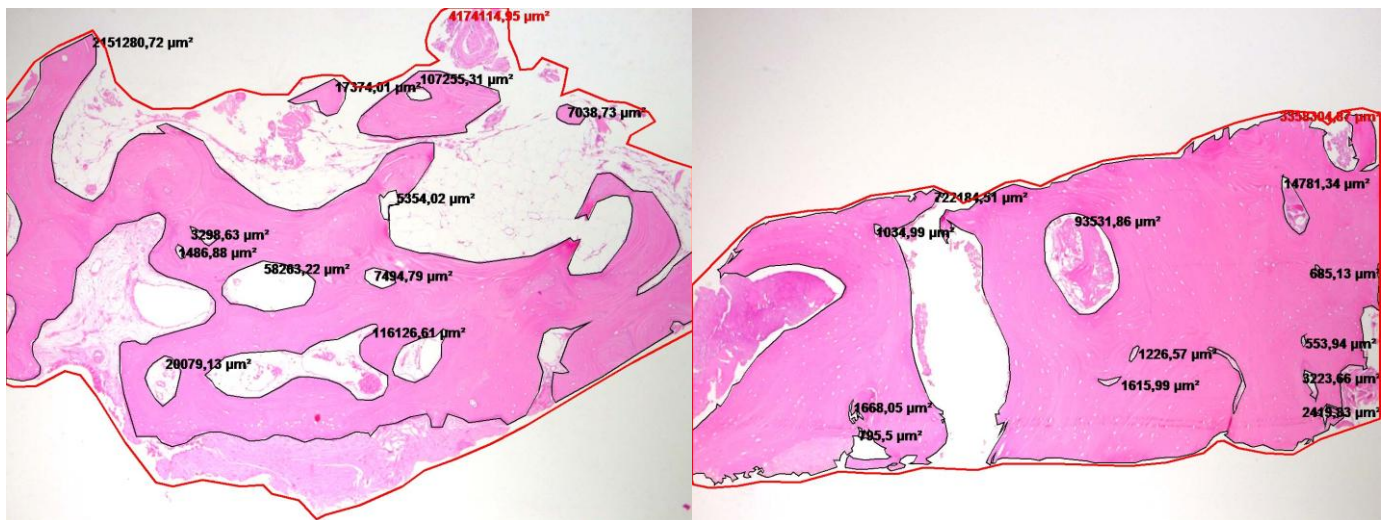


Figure 1 – Histomorphometric parameters of bone specimens from sites classified as type 1 (A) and 4 (B) according to PP and L&Z (Hematoxylin and Eosin / Original magnification x5). (A) “Normal” bone with a predominance of trabecular bone and the presence of small marrow spaces. (B) “Normal” bone with large marrow spaces filled by yellow bone marrow. Measurements show the total bone area (trabecular bone) in black and total section area (trabecular bone + bone marrow) in red. (Axiovision 4.7 software)

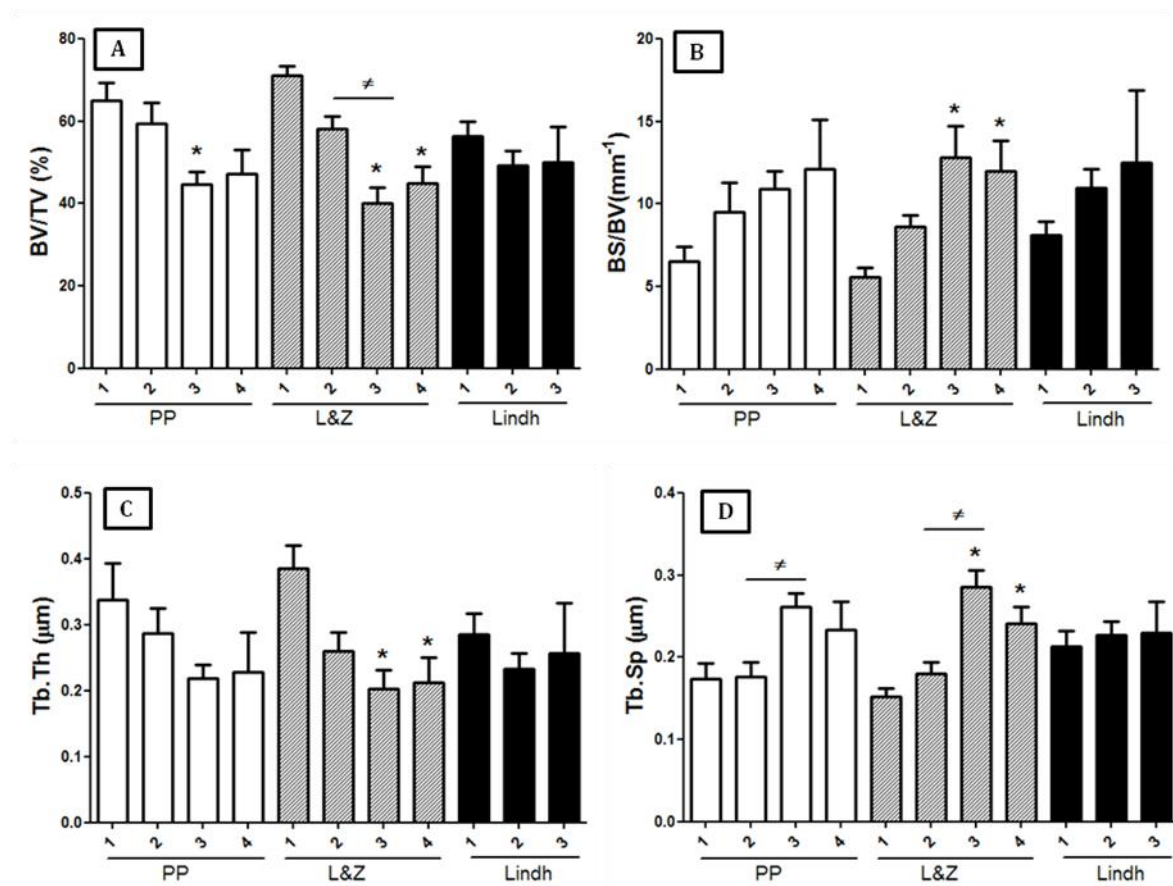


Figure 2 – Comparisons among subjective bone classifications (PP, L&Z, Lindh) and histomorphometric parameters. (A) Bone classification X BV/TV; (B) Bone classifications X BS/BV; (C) Bone classifications X Tb.Th; (D) Bone classification X Tb.Sp (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The asterisk (*) and inequality symbol ($\neq$) mark where differences occurred within each classification (Dunn's test, $p < 0.05$). The asterisk marks bone types that differ regarding to bone type 1; the inequality symbol marks the bone types that differ between themselves. (BV/TV= bone volume density; BS/BV= bone specific surface; Tb.Th= trabecular thickness; Tb.Sp= trabecular separation)

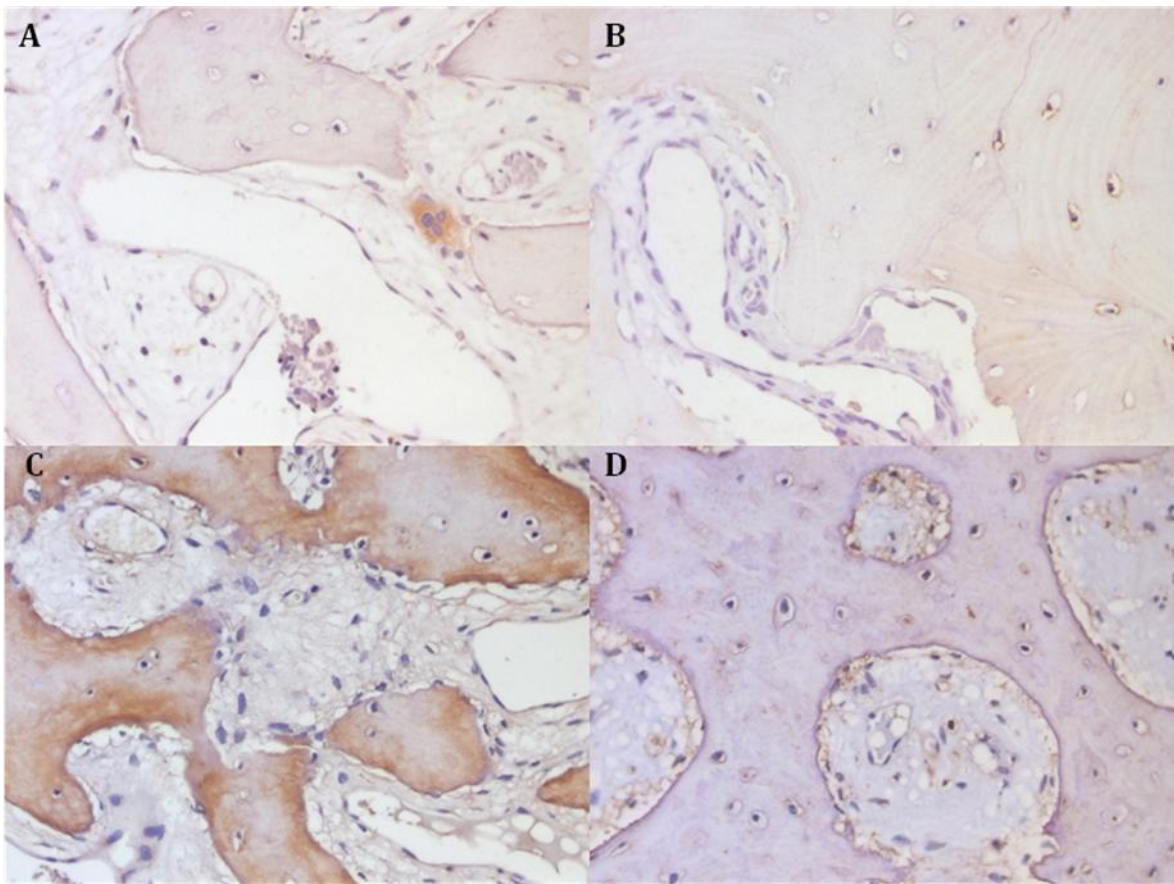


Figure 3 – Representative immunohistochemical expression of bone remodeling markers – (A) RANK; (B) RANKL; (C) Osteocalcin and (D) OPG – in bone type 2, according to the L&Z classification system (Immunohistochemical staining, original magnification X40).

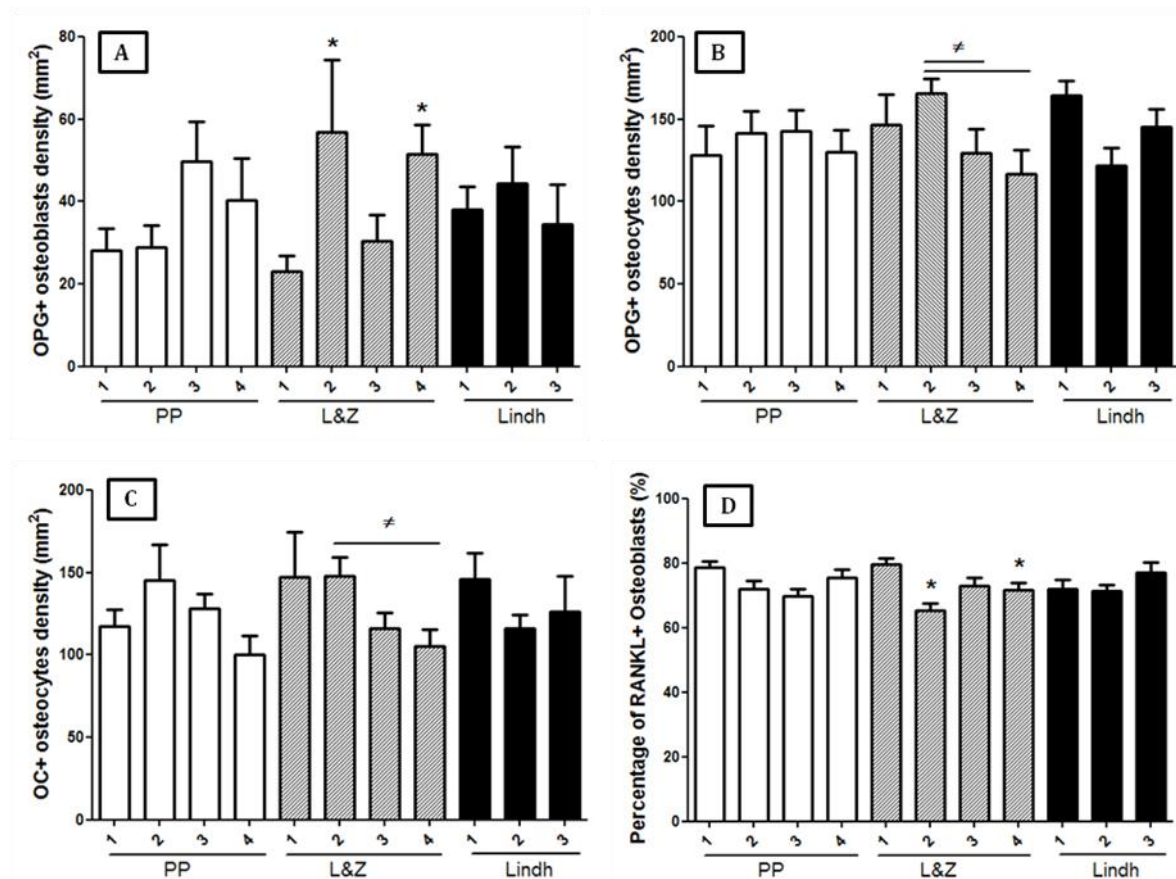


Figure 4 – Comparisons among subjective bone classifications (PP, L&Z, Lindh) and cellular/molecular parameters. (A) Bone classification X OPG+ osteoblasts density; (B) Bone classifications X OPG+ osteocytes density; (C) Bone classifications X OC+ osteocytes density; (D) Bone classification X Percentage of RANKL+osteoblasts (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The asterisk (*) and inequality symbol ($\neq$) mark where the differences occurred within each classification (Dunn's test, $p < 0.05$). The asterisk marks the bone types that differ regarding to bone type 1; the inequality symbol marks the bone types that differ between themselves.

5 CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que as classificações subjetivas dos tipos ósseos são influenciadas pelos aspectos histomorfométricos e que as moléculas reguladoras da remodelação óssea parecem não exercer influência nos aspectos morfológicos da maxila e mandíbula.

Apesar da limitação do tamanho e distribuição da amostra, é um trabalho original, em humanos, que permitiu a correlação de métodos clínicos e subjetivos com um método de referência de alta evidência científica como a histomorfometria. Este estudo é um subprojeto de projeto maior que dentre várias contribuições, pode somar para a validação da classificação óssea subjetiva mais amplamente difundida no contexto do tratamento com implantes dentários – a classificação de Lekholm e Zarb (1985).

Dois aspectos desse estudo também merecem destaque: a) o benefício de um tratamento de alto custo estendido à comunidade de funcionários da UFG e b) a intenção de realização de um estudo longitudinal de 5 a 10 anos, para análise dos índices de sucesso terapêutico e do impacto das diversas variáveis investigadas neste projeto. O primeiro aspecto confere a importância social da pesquisa e o segundo aspecto favorece o preenchimento de uma lacuna na evidência científica e tomada de decisão em implantodontia. Por tratar-se de amostra composta por servidores com cadastro em órgão público, as chances de perdas de acesso aos seus integrantes são menores, fato importante para viabilizar um estudo longitudinal em longo prazo.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás

Anexo 2 – TCLE

Anexo 3 – Norma de publicação do periódico



PARECER Nº 860/2009

Registro CONEP: 14734 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP: 114/2007

Processo nº 25000.050148/2008-81

Projeto de Pesquisa: *"Avaliação clínica, radiográfica, histomorfométrica e molecular de sítios para implantes da maxila e mandíbula"*.

Pesquisador Responsável: Rejane Faria Ribeiro-Rotta

Instituição: Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Goiás

CEP de origem: Universidade Federal de Goiás - UFG

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira

Patrocinador: FAPEG, CNPq e PROAP.

Sumário geral do protocolo

Os implantes dentários têm revolucionado o campo da reabilitação bucomaxilofacial, visto que restauram de forma conservadora e eficiente a fonética, a mastigação, a estética e a auto-estima do indivíduo. Excelentes resultados têm sido associados a implantes instalados em osso de boa qualidade e quantidade. Diferentes classificações têm sido propostas para descrever essas características, sendo que a mais amplamente utilizada é a proposta por Lekholm e Zarb (1985), que é baseada em radiografias convencionais pré-operatórias e a percepção subjetiva do cirurgião durante o preparo do sítio.

Considerando a freqüente associação da qualidade e quantidade óssea aos índices de sucesso e insucesso no tratamento com implantes dentários, a escassez de estudos com evidência de eficácia diagnóstica dos métodos que avaliam o tecido ósseo da maxila/mandíbula previamente ou durante o tratamento com implantes e a necessidade de critérios clínicos objetivos para otimizar seu resultado, este estudo tem como objetivo geral correlacionar aspectos clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares de sítios ósseos da maxila e mandíbula durante planejamento e inserção de implantes dentários.

A amostra desse estudo transversal será composta por servidores da Universidade Federal de Goiás (UFG) com indicação de reabilitação com implantes dentários individuais e múltiplos na maxila e/ou mandíbula (200 amostras no total). Os tipos ósseos dos diferentes sítios serão classificados e correlacionados de acordo com critérios clínicos [sensibilidade tátil do cirurgião/implantodontista durante a inserção do implante; medidas de torque de inserção; análise de freqüência de ressonância (FR) para medidas diretas da estabilidade do implante], radiográficos [radiografias convencionais, densidade óssea obtida por meio de unidades Hounsfield (UH) por tomografia computadorizada (TC)], histomorfométricos e moleculares. Estes dois últimos critérios serão analisados em espécimes obtidos por micro biópsias ósseas realizadas durante o preparo dos sítios implantáveis, que serão submetidos à microTC, procedimento que será executado na Universidade de Malmö, Suécia, para análise tridimensional da sua micro-arquitetura; após o processamento dos espécimes pela técnica de rotina hematoxilina/eosina, a análise histomorfométrica será realizada por contagem em um *grid* retangular com linhas horizontais e verticais. Uma técnica de imunoistoquímica será realizada para a identificação e quantificação de fatores reguladores da reabsorção óssea, o que inclui ativadores (RANK/RANKL) e inibidor (OPG). Testes estatísticos específicos serão utilizados para correlacionar os aspectos clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares dos diferentes sítios implantáveis.

Espera-se com esse estudo contribuir para um repensar da rotina clínica em implantodontia por meio da análise da acurácia diagnóstica de diferentes métodos de acesso à "qualidade óssea" e, em especial, na definição dessa característica óssea e seu impacto no planejamento e resultado do tratamento com implantes dentários. Além disso, este estudo permitirá o estreitamento de laços científicos com grupo de pesquisadores de referência internacional, bem como treinamento em tecnologia de ponta ainda pouco disponível no Brasil.

Apresentação do protocolo

A Folha de Rosto encontra-se devidamente preenchida e assinada.

O *currículo vitae* dos pesquisadores responsáveis e dos participantes (Aline Carvalho Batista, Cláudio Rodrigues Leles, Christina Lindh, Elismauro Francisco de Mendonça, Geovane Miranda Ferreira, Maria Alves Garcia Santos Silva, Rubens Carneiro dos Santos Filho, Gláucia Kelly Silva Barbosa, Rubelisa Cândido de Oliveira) os qualificam para a realização do estudo, demonstrando experiência com a área proposta.

O orçamento está descrito com detalhes e adequado ao estudo.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está em linguagem acessível e adequado à proposta do estudo, cumprindo todas as normas da Resolução CNS 196/96.

Considerações sobre a análise das recomendações ao Parecer CONEP nº 418/2008, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Na Folha de Rosto solicita-se preencher os campos referentes ao patrocinador e ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP.

Resposta: Foi apresentada nova Folha de Rosto, devidamente preenchida.

Análise: Recomendação atendida.

2. O cronograma de execução proposto é viável. Contudo, solicita-se que seja atualizado, uma vez que o estudo continua em análise no sistema CONEP/CEP até a presente data.

Resposta: Foi informado que a seleção de pacientes ocorreu efetivamente em Julho/2008, após emissão de parecer CONEP de aprovado com recomendação, devido a um equívoco do CEP UFG, que entendeu que "as recomendações não seriam impedimento para o início do projeto, considerado o teor das mesmas".

Análise: Dado as falhas do CEP durante a tramitação do presente estudo, ainda que o estudo já tenha iniciado, a CONEP entende que a recomendação foi atendida.

3. No item "Viabilidade para execução da pesquisa", página 30 do protocolo, consta que os pesquisadores contam com a "doação de implantes por parte da Empresa que possui programa de apoio à pesquisa". Solicita-se informar a lista das empresas que doarão os implantes.

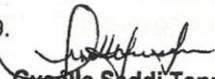
Resposta: Foi esclarecido que a doação de implantes será feita pela empresa NEODENT, que possui programa de apoio à pesquisa.

Análise: Recomendação atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 07 de dezembro de 2009.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

PROTOCOLO: 114/2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

I – Identificação:

- Título do projeto: Avaliação clínica, radiográfica, histomorfométrica e molecular de sítios para implantes de maxila e mandíbula
- Pesquisador responsável: Rejane Faria Ribeiro-Rotta
- Coordenador responsável: Rejane Faria Ribeiro-Rotta
- Instituição onde será realizada: Universidade Federal de Goiás
- Grande área de conhecimento (CNPq): Ciências da Saúde
- Sub-área de conhecimento: Clínica Odontológica
- Odontologia
- Radiologia Odontológica
- Data de apresentação ao COEP: 15/10/2007

II – Folha de rosto COEP/UFG: de acordo

III – Folha de rosto CONEP: de acordo. A pesquisadora corrigiu o quadro 5, áreas temáticas especiais, o quadro 9, sujeitos da pesquisa, o quadro 10, grupos especiais e o quadro 35, projeto multicêntrico. Preencheu o quadro 8.

IV – Descrição da pesquisa

1 – Resumo do projeto de pesquisa: considerando a freqüente associação de qualidade e quantidade óssea aos índices de sucesso e insucesso no tratamento com implantes dentários, a escassez de estudos com evidência de eficácia diagnóstica dos métodos que avaliam o tecido ósseo da maxila / mandíbula, previamente, ou durante o tratamento com implantes, e a necessidade de critérios clínicos objetivos para otimizar seu resultado, este estudo visa contribuir para um repensar da rotina clínica em implantodontia por meio da análise da acurácia diagnóstica de diferentes métodos de acesso à qualidade óssea e, em especial, na definição desta característica óssea e seu impacto no planejamento e resultado do tratamento com implantes dentários.

2 – Objetivos:

Geral:

Correlacionar aspectos clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares de sítios ósseos da maxila e da mandíbula, durante o planejamento e a inserção de implantes dentários.

Específicos:

- a) investigar se a classificação subjetiva da qualidade óssea descrita por Lekholm e Zarb, baseada em radiografias convencionais, se correlaciona com aquela obtida a partir da percepção tátil do cirurgião durante a instalação do implante em cada sítio;
- b) avaliar medidas de torque de inserção no momento da instalação dos implantes e correlacionar essas medidas com a classificação clínica dos sítios implantados;

V – Curriculum Lattes de todos os envolvidos na pesquisa: de acordo

VI – Termo de compromisso dos pesquisadores em cumprirem os termos da Resolução CNS 196/96 e complementares: a pesquisadora responsável assina a folha de rosto da CONEP. O Termo de Compromisso foi feito e incluído no protocolo, conforme solicitado no primeiro parecer consubstanciado, e contém as assinaturas dos demais participantes. O documento da pesquisadora Christina Lindh foi traduzido, conforme solicitado.

VII - Extrato do cadastro do projeto de pesquisa no sistema SAPP: de acordo.

VIII – Certidão da ata de aprovação do projeto de pesquisa pelo Conselho Diretor: de acordo.

IX - Forma de obtenção do termo de consentimento: a seleção da amostra será realizada com o apoio da Pró Reitoria de Assuntos Comunitários da UFG. A pesquisadora informou que o termo de consentimento será obtido pelos próprios pesquisadores.

X – Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: os procedimentos do tratamento estão bem explicados. A reformulação requerida no parecer anterior foi atendida.

XI - Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares: o protocolo é adequado e relevante para a saúde da equipe odontológica e pacientes, e está bem fundamentado quanto à metodologia e a obtenção de resultados.

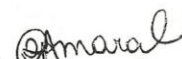
XII - Parecer do COEP: Aprovado. Todas as pendências foram atendidas.

XIII – Data da reunião: 03/03/2008



Assinatura do relator

Assinatura do coordenador/COEP



Rita Goreli Amaral
Coordenadora do CEP/PRPPG/UFG

Anexo 2 - TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), de uma pesquisa que será realizada na Faculdade de Odontologia da UFG. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 0-XX-62-3521-1075 ou 3521-1076.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação clínica, radiográfica, histomorfométrica e molecular de sítios para implantes da maxila e mandíbula.

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta

Telefone para contato: (062) 3209-6067

Pesquisadores participantes e telefones de contato: Aline Carvalho Batista (062 – 32096058), Cláudio Rodrigues Leles (62-32096052), Christina Lindh, Elismauro Francisco de Mendonça (062 – 32096058), Geovane Miranda Ferreira, Maria Alves Garcia Santos Silva (62-32096067), Rubens Carneiro dos Santos Filho, Gláucia Kelly Silva Barbosa, Rubelisa Cândido de Oliveira.

Esta pesquisa tem como finalidade avaliar a correlação entre aspectos clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares de sítios ósseos da maxila e mandíbula durante planejamento e inserção de implantes dentários, tendo como público-alvo funcionários servidores da UFG que apresentam áreas edêntulas individuais e múltiplas na maxila e/ou mandíbula.

Uma área desdentada pode ser tratada por meio da reabilitação por próteses convencionais do tipo removíveis, as chamadas "pontes de grampo" ou próteses fixas, conhecidas popularmente como "pontes fixas". Esses são métodos mais tradicionais e acessíveis, entretanto apresentam menor durabilidade e menor capacidade de resistir a função mastigatória se comparadas aos implantes dentários de titânio.

O seu benefício direto, pela participação no estudo, será a confecção e instalação de próteses dentárias sobre implantes de titânio, seguindo todos os requisitos necessários para o sucesso do tratamento. Os implantes serão realizados após avaliação clínica detalhada bem como de seus exames complementares. O procedimento cirúrgico será realizado em duas etapas. Na primeira, implantes serão instalados no interior do osso da região em que há a

ausência dentária na maxila e/ou mandíbula. Na segunda fase, serão colocados cicatrizadores e ocorrerá após um período de três meses para implantes realizados na mandíbula ou seis meses para a maxila. A prótese será confeccionada trinta dias após esta segunda fase cirúrgica. Dados para a pesquisa serão coletados em todas as etapas do tratamento e incluem: exames de sangue, radiográficos, biópsia durante o preparo do sítio do implante, testes com sensores para avaliar a estabilidade do implante. No procedimento de biópsia, o pequeno fragmento ósseo que será removido para dar lugar ao implante será guardado em condições e recipiente apropriados para estudos por imagem e microscópicos, o que incluirá o seu envio para instituição internacional (Universidade de Malmö, Suécia) participante do projeto, cuja pesquisadora responsável está ciente e disposta a resguardar a não utilização das informações em prejuízo dos participantes da amostra ou seja, assegurar a confidencialidade e a privacidade dos dados coletados.

Você tem a garantia que receberá respostas a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos assuntos relacionados à pesquisa. Os pesquisadores supracitados também assumem o compromisso de fornecer informações atualizadas obtidas durante a realização do estudo, o qual foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos e atende à Resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.

Os riscos e complicações pós-operatórias mais comuns são inchaços, manchas arroxeadas e sensações anormais temporárias ou permanentes de formigamento, queimadura ou picada. Se as recomendações operatórias forem seguidas, dor e infecção são raras. Durante as etapas de realização do tratamento, caso seja observado qualquer risco ou dano à saúde do sujeito participante da pesquisa, conseqüente ao tratamento por meio de implantes dentários, ou o surgimento de um método mais eficaz para reabilitação desses pacientes, o tratamento será suspenso seguido da continuidade por meio do oferecimento do novo método de tratamento mais adequado.

Os exames e procedimentos realizados nesta pesquisa serão exclusivos para fins científicos. Será garantido o sigilo, que assegura sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, bem como a confidencialidade, a qual se refere à responsabilidade sobre as suas informações pessoais e aquelas coletadas em exames. Além disso, fica resguardado o direito de retirar o consentimento em qualquer período da pesquisa sem que haja qualquer tipo de penalidade ao participante, nem interrupção do tratamento iniciado. Todos os exames e informações coletadas serão arquivados e mantidos sob a responsabilidade da pesquisadora responsável no Centro Goiano de Doenças da Boca da FO-UFG.

Profa. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta

Pesquisadora responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Por este instrumento particular declaro, para os devidos efeitos éticos e legais, que eu (nome)

_____,
natural _____ de _____,
profissão _____, rg _____, cpf _____,
residente a _____

_____, na cidade de _____ (estado) _____, concordo com absoluta consciência em participar da pesquisa intitulada: *avaliação clínica, radiográfica e histomorfométrica de sítios para implantes da maxila e mandíbula*, que objetiva correlacionar aspectos clínicos, radiográficos, histomorfométricos e moleculares de sítios ósseos da maxila e mandíbula durante planejamento e inserção de implantes dentários. para isto, passarei por exames complementares necessários ao planejamento para implantes, cirurgia para instalação de implante de titânio, reabilitação protética e sessões de retorno e acompanhamento freqüentes.

Portanto, permito o uso dos meus exames e dados oriundos dos procedimentos realizados neste estudo de acordo com os termos abaixo:

1. Esclareço que recebi todas as informações sobre a minha participação nesse experimento, inclusive a não penalização e sem prejuízo ao meu cuidado em caso de recusa ou desistência em qualquer fase do tratamento.

2. Estou ciente que o uso do material biológico e dos dados e informações coletados serão, única e exclusivamente, para os fins previstos no protocolo. Sendo assim, autorizo a divulgação e publicação dos dados e resultados obtidos durante a pesquisa, bem como o uso e publicação das imagens, desde que respeitados os preceitos éticos que regem a divulgação científica, garantidos meu sigilo e minha privacidade.

3. A equipe executora colocou-se a disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre a metodologia e os procedimentos a qualquer momento da pesquisa.

4. Estou ciente que todas estas normas estão de acordo com o Código de Ética Profissional Odontológico e com a Resolução CNS 196/96 que trata da pesquisa envolvendo seres humanos.

Local e data: Goiânia, ____/____/____.

Nome e assinatura do sujeito responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Anexo 3 – Norma do periódico

Clinical Oral Implants Research

Official publication of the European Association for Osseointegration

Edited by:

Niklaus P. Lang

Print ISSN: 0905-7161

Online ISSN: 1600-0501

Frequency: Monthly

Current Volume: 21 / 2010

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Engineering, Biomedical: 13 / 59;
Dentistry, Oral Surgery & Medicine: 6 / 64

Impact Factor: 2.92

TopAuthor Guidelines

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

Relevant Document: Copyright Transfer Agreement

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

1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

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

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

knowledge.

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the

understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

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

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. 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:

Production Editor
Wiley Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square
Singapore 188778

Alternatively a scanned version of the form can be emailed to clr@oxon.blackwellpublishing.com or faxed to +65 6295 6202 +65 6295 6202. For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#)

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

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).

e) 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; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

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

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . 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