

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRÓTESE DENTÁRIA**

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO LOCAL DE BISFOSFONATO NA
OSSEointegração DE IMPLANTES DE TITÂNIO INSTALADOS EM
TÍBIA DE COELHO**

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

PORTO ALEGRE

2014

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO LOCAL DE BISFOSFONATO NA
OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO INSTALADOS EM
TÍBIA DE COELHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração: Prótese Dentária.

ORIENTADOR: Prof^a Dr^a LUCIANA MAYUMI HIRAKATA MARQUES

PORTO ALEGRE

2014

MAGÁLI BECK GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO LOCAL DE BISFOSFONATO NA
OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO INSTALADOS EM
TÍBIA DE COELHO**

Linha de pesquisa: Técnicas e Aparelhos em Odontologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração: Prótese Dentária.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

Prof. Dr. Diego Segatto Blaya

Prof^a Dr^a Letícia Borges Jacques

Prof^a Dr^a Tatiana Bernardon Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G963i Guimarães, Magáli Beck
Influência da aplicação local de bisfosfonato na
osseointegração de implantes de titânio instalados em tíbia de
coelho / Magáli Beck Guimarães. – Porto Alegre, 2014.
107 f.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de
Odontologia, PUCRS.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Luciana Mayumi Hirakata Marques.

1. Implantodontia. 2. Osseointegração. 3. Remodelação
óssea. 4. Difosfonatos. 5. Coelhos. I. Marques, Luciana
Mayumi Hirakata. II. Título.

CDD 617.69

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Somos todos anjos de uma asa só; e somente podemos voar quando abraçados uns aos outros.”

Luciano de Crescenzo

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Benício.

Você me proporcionou o maior título da vida.
Seu sorriso é motivação diária e permanente para
seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela dádiva da vida. Hoje percebo que todos os obstáculos que surgiram em minha trajetória até aqui foram essenciais para meu crescimento interior, minha autoconfiança e fortalecimento da minha fé. Agradeço imensamente às pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho - com certeza, elas são extensão de Sua mão e benção neste mundo.

À **Profª Drª Luciana Mayumi Hirakata Marques**, pela orientação deste trabalho, pelo exemplo profissional e humano e, sobretudo, pela amizade. Não poderia ter escolhido melhor tutora em minha trajetória de mestrado e doutorado. Devo muito do que sou hoje aos seus ensinamentos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Stricto-Sensu da PUCRS, em nome da **Profª Drª Ana Maria Spohr**, agradeço a oportunidade proporcionada ao me confiar uma vaga no nível de doutorado e o conhecimento adquirido durante o decorrer do curso.

Ao Curso de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo Santana Pacheco**, por viabilizar a realização da parte experimental envolvendo os animais. A disposição em ajudar o próximo é exemplar em sua pessoa.

Ao Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria, na pessoa da **Profª Ione Denardin**, pelo exemplo de amor e respeito aos animais, por ceder o espaço físico para abrigo e cuidado deles e por disponibilizar de seu tempo e sabedoria para condução desta pesquisa. Conhecê-la foi um grande presente que este estudo me proporcionou.

Às Médicas Veterinárias **Luciana Wolle e Gabriele Serafini**, pelo auxílio na condução da anestesia, cirurgia, acompanhamento pós-operatório e eutanásia dos animais. Os conhecimentos técnicos e científicos que me passaram, somados à boa vontade e a disposição para o desenvolvimento deste trabalho foram essenciais para que tudo desse certo.

À Farmácia Escola da Universidade Federal de Santa Maria, através da **Profª Drª Marta Alves** e da Farmacêutica e amiga **Marila Crivellaro Lay Marchiori**, pela elaboração do gel de bisfosfonato, conduzido de forma tão criteriosa e comprometida.

Ao Instituto Bioface, na pessoa do **Prof. Dr. Sérgio Alexandre Gehrke**, pela troca de conhecimentos, pela acolhida calorosa, por dispor dos equipamentos e possibilitar a aplicação da metodologia necessária à realização da análise histomorfométrica deste estudo.

Ao **corpo docente** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS. Agradeço os ensinamentos técnico-científicos de tão alta qualidade recebidos, reflexo da qualidade profissional que o caracteriza.

Aos **funcionários** da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pela presteza e educação sempre presentes no convívio diário.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, por viabilizar a realização deste doutorado através de incentivo financeiro (ProBolsa).

Ao **Centro Universitário Franciscano**, por ter concedido permissão para realização deste doutorado.

Aos **membros da banca**, por disponibilizarem de seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho. O convite é reflexo de minha admiração pelo seu profissionalismo.

À minha **família** de berço e à que adquiri através do meu marido, agradeço imensamente o suporte emocional e toda a ajuda para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Em especial, ao meu marido **Rodrigo**, por auxiliar na parte experimental deste estudo; por ser motivação, compreensão, mão estendida, abraço que acolhe, companhia nas horas difíceis e o aconchego do meu lar. Sua tranqüilidade completa minha inquietação; sua presença equilibra minha vida; seu amor fortalece minha alma.

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar, comparativamente, aspectos relacionados à osseointegração de implantes de titânio, instalados com e sem a aplicação tópica de um bisfosfonato, após 04 semanas *in vivo*. O estudo compreendeu a colocação de 50 implantes de titânio cp. no terço médio da tíbia de 10 coelhos, sendo a tíbia direita usada como controle e a esquerda como teste. No grupo teste procedeu-se a administração local de gel de alendronato de sódio e no grupo controle foi utilizada solução salina estéril. Após a eutanásia, 10 implantes de cada grupo foram destinados à análise de torque máximo de remoção. O restante da amostra foi processada para obtenção de lâminas não descalcificadas de aproximadamente 30 μ m de espessura, onde foram realizadas análises histomorfológica e histomorfométrica de contato osso-implante (%BIC). Os dados foram analisados com nível de significância de 5%. Os valores de torque máximo de remoção do grupo teste foram, em média, metade dos valores do grupo controle. O grupo teste demonstrou menor %BIC, bem como alterações notáveis em qualidade óssea. Conclui-se que os eventos iniciais de osseointegração de implantes de titânio não são favorecidos pela aplicação local de gel de alendronato de sódio em coelhos.

Palavras-chave: Difosfonatos. Osseointegração. Remodelação óssea. Implantes Dentários.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this study was to make a comparative analysis of aspects related to the osseointegration of titanium implants placed with and without local application of a bisphosphonate, after 4 weeks, *in vivo*. The study comprised the placement of 50 cp. titanium implants in the middle third of the tibia of 10 rabbits, with the right tibia being used as control, and the left as test site. In the test group, local administration of sodium alendronate gel was instituted, and in the control group, sterile saline solution was used. After euthanasia, 10 implants from each group were analyzed for maximum removal torque. The remainder of the sample was processed to obtain non decalcified slides with approximately 30 μ m thick, in which histomorphological and histomorphometric analyses of bone-implant contact (%BIC) were performed. Data were analyzed at a level of significance of 5%. The removal torque of the test group, on an average, were half of the values obtained in the control group. The test group showed lower percentage of BIC, and notable changes in bone quality. It was concluded that the initial events of osseointegration of titanium implants are not favored by the local application of sodium alendronate gel in rabbits.

Keywords: Diphosphonates. Osseointegration. Bone remodeling. Dental Implants.

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Monitoramento trans-operatório das funções vitais dos animais.....	42
Figura 2 - Aplicação local do gel de bisfosfonato.....	43
Figura 3 - Instalação dos implantes imediatamente após a aplicação do gel de bisfosfonato.....	44
Figura 4 - Mini implante especialmente projetado para pesquisa científica em modelo animal.....	45
Figura 5 - a) Máquina de torque conectada ao computador (Software Dynaview Torque Standard/Pro M); b) Teste de torque de remoção.....	47
Figura 6 – a) Mensuração do perímetro total do implante e b) das áreas de contato osso-implante para cálculo de BIC.....	48
Figura 7 – Posicionamento dos implantes em cortical e medular tibiana. Magnificação: 20X.	52
Figura 8 – Interface osso-implante do grupo controle na região de osso cortical, demonstrando atividade óssea mais intensa próximo ao corpo do implante, com presença de tecido ósseo recentemente formado (região de coloração mais intensa), osteócitos volumosos em amplas lacunas (-->) e osteoblastos grande e volumosos em contato com a superfície do implante (+). Magnificação: 40X.	53
Figura 9 – Interface osso-implante do grupo teste na região de osso cortical, demonstrando baixa atividade óssea localizada quase que somente em região de topo de espiras e região mais cervical do implante, com presença de tecido granuloso preenchendo o espaço entre as espiras (+). Magnificação: 40X.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Torque máximo de remoção segundo grupos (média \pm dp) e resultado do teste comparativo.....	51
Gráfico 2 - Gráfico de Bland-Altman entre as medidas dos examinadores.....	55
Gráfico 3 - Valores médios de contato osso-implante e respectivos erros padrões segundo grupos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenho experimental	40
Tabela 2 - Torque máximo de remoção (Ncm) segundo grupos e resultado do teste comparativo.....	51
Tabela 3 - Descrição dos percentuais de contato osso-implante para cada examinador e resultado da reprodutibilidade entre os examinadores.....	54
Tabela 4 - Descrição do contato osso-implante segundo grupos e resultado do teste comparativo.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Por cento
°C	-	Graus Celsius
®	-	Marca registrada
±	-	Mais ou menos
<	-	Menor que
µg	-	Micrograma
µm	-	Micrometro
ATP	-	Adenosina Trifosfato
BIC	-	Bone-Implant Contact
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COI	-	Contato Osso-Implante
cm	-	Centímetro
DP	-	Desvio-Padrão
FO	-	Faculdade de Odontologia
g	-	Gramma
h	-	Horas
kg	-	Quilograma
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
n	-	Número da amostra
Nº	-	Número
N.cm	-	Newton centímetro
p	-	Significância
P-C-P	-	Fósforo-Carbono-Fósforo
PO ₃	-	Íon fosfato
PUCRS	-	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
rpm	-	Rotação por minuto
SiC	-	Carbeto de Silício
SPSS	-	Statistical Package for Social Sciences

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria
X - Vezes

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. PROPOSIÇÃO	28
2.1 Problema	29
2.2 Hipóteses nulas	29
3. REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1 Bisfosfonatos	31
3.2 Bisfosfonatos e Osseointegração	33
4. METODOLOGIA	38
4.1 Amostra.....	39
4.2 Grupos experimentais	39
4.3 Procedimento cirúrgico	40
4.4 Morte dos animais	46
4.5 Mensuração do torque de remoção	46
4.6 Análise histomorfológica e histomorfométrica	47
4.7 Análise estatística	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Torque máximo de remoção	51
5.2 Análise histomorfológica	52
5.3 Análise histomorfométrica	54
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	72
A – Aprovação da Comissão Científica e de Ética- FO/PUCRS	73
B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – PUCRS	74
C – Croqui do implante utilizado no estudo	75
D – Artigo científico	76
E – Normas do periódico <i>Int J Oral Maxillofac Surg</i>	100
F – Submissão do artigo científico	107

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a busca pela reposição de dentes perdidos através da terapia com implantes dentários e próteses sobre implantes tem crescido consideravelmente. Isto se deve, entre outras razões, ao fato de que o edentulismo, seja parcial ou total, é uma condição bucal que afeta grande parte das pessoas de faixa etária mais avançada, parcela da população que mais cresce no mundo (MULLER, 2014). Tais pacientes apresentam um perfil de qualidade e quantidade óssea, muitas vezes, afetado por doenças sistêmicas, como diabetes e osteoporose, além de apresentarem menor potencial de regeneração óssea, fatores que podem contribuir para taxas reduzidas de sucesso na terapia com implantes osseointegráveis (TRUHLAR *et al*, 1997). Em contrapartida, o desejo de atingir-se osseointegração mais rapidamente é comum tanto aos profissionais de saúde quanto aos pacientes, motivando pesquisas que busquem melhorias no desenvolvimento de materiais e técnicas relacionados à otimização do processo de remodelação óssea ao redor de implantes osseointegráveis.

Durante a cirurgia de instalação de implantes, a decisão sobre a aplicação ou não de carga imediata é determinada, entre outros aspectos, pela estabilidade primária do implante ao tecido ósseo. Nos casos em que não há estabilidade primária durante a instalação do implante dentário, recomenda-se que o profissional aguarde o período de osseointegração sem aplicação de carga funcional, seguindo protocolo de duas etapas cirúrgicas (MISCH e WANG, 2003). Assim, é nesse cenário que se torna importante a aceleração no processo de osseointegração, a fim de que menos tempo seja necessário entre a cirurgia de instalação de implantes e a reabertura para conexão dos pilares protéticos.

O interesse pelo uso dos bisfosfonatos como biomoduladores ósseos em Implantodontia, surgiu pela conhecida habilidade deste fármaco em inibir a atividade de osteoclastos, motivo pelo qual é amplamente utilizado no tratamento de doenças caracterizadas pelo excesso de reabsorção óssea como osteoporose, hipercalcemia e metástases ósseas (MUNDY e YONEDA, 1998). Além disso, sabe-se que um efeito na formação óssea peri-implantar também pode ser esperado, promovendo uma redução no *turnover* ósseo consideravelmente (ALLGROVE, 1997). Estudos sugerem que os bisfosfonatos podem ter uma influência positiva na formação e remodelação óssea e consequente melhora na fixação de implantes osseointegráveis em humanos (ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2010; ABTAHI, TENGVALL E ASPENBERG, 2012).

Em função dos severos efeitos colaterais que o uso sistêmico desta droga provoca (DE GROEN *et al*, 1996; BEDOGNI *et al*, 2010; GOSS *et al*, 2010; LAZAROVICI *et al*, 2010; VOHRA *et al*, 2014), os estudos têm voltado sua atenção para o desenvolvimento de métodos de entrega local deste fármaco no sítio de interesse (PETER *et al*, 2005; JAKOBSEN *et al*, 2009; LI *et al*, 2013; HARMANKAYA *et al*, 2013; BOBYN *et al*, 2014). A intenção é que o bisfosfonato influencie positivamente a remodelação do tecido ósseo adjacente ao implante, sem promover efeitos colaterais sistêmicos indesejados. Nesse sentido, tem sido proposta a imobilização do bisfosfonato na superfície do implante como forma de entrega local do fármaco (YOSHINARI *et al*, 2001; LEE *et al*, 2011; MOON *et al*, 2012; GUIMARÃES *et al*, 2013; STADLINGER *et al*, 2013) . Entretanto, essa imobilização necessita, muitas vezes, de uma metodologia complexa e equipamentos sofisticados para ser realizada. A aplicação direta do bisfosfonato no alvéolo cirúrgico, imediatamente antes da inserção do implante, parece ser um procedimento mais simples e prático, mas, até agora, pouco testado

(SKOGLUND, HOLMERTZ e ASPENBERG, 2004; JAKOBSEN *et al*, 2007; JAKOBSEN *et al*, 2009; CUAIRÁN *et al*, 2014)

Assim, o objetivo deste trabalho é propor a aplicação local de um bisfosfonato (alendronato de sódio) em forma de gel, diretamente no alvéolo cirúrgico e avaliar, comparativamente, aspectos relacionados à osseointegração de implantes de titânio instalados imediatamente após essa aplicação, *in vivo*.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Problema

Dentro do contexto atual explicitado, surge o questionamento: a osseointegração de implantes de titânio é favorecida pela aplicação local de um gel de bisfosfonato?

2.2 Hipóteses nulas

Duas hipóteses nulas foram testadas:

- 1) Não há diferença no torque de remoção de implantes osseointegráveis instalados com e sem a aplicação local de um gel de alendronato de sódio;
 - 2) Não há diferença na porcentagem de contato osso-implante quando instalados com e sem aplicação local de um gel de alendronato de sódio.
-

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos são compostos farmacologicamente simples, considerados análogos dos pirofosfatos por possuírem uma estrutura fósforo-carbono-fósforo, em comparação com a estrutura fósforo-oxigênio-fósforo do pirofosfato. Uma vez que o pirofosfato sofre rápida degradação enzimática no organismo, o bisfosfonato funciona como um análogo resistente a essa degradação capaz de ter a mesma função frente ao tecido ósseo: controle dos mecanismos de reabsorção óssea (FLEISCH, 1998).

O termo “bisfosfonato” é derivado de sua estrutura farmacológica, a qual possui dois grupos fosfato (PO_3) covalentes ligados a um carbono central. A estrutura P-C-P do bisfosfonato tem uma grande afinidade por hidroxiapatitas e íons de cálcio. Além dos grupamentos fosfato, ligada ao carbono existe uma cadeia química curta, responsável pela ligação do fármaco ao tecido ósseo. Também ligada ao carbono, existe uma cadeia química longa, que determina as propriedades químicas, o modo de ação e a potência do bisfosfonato (OTOMO-CORGEL, 2007).

Tais compostos funcionam como potentes inibidores da reabsorção óssea e têm um largo uso no tratamento de uma variedade de doenças com excesso de reabsorção óssea, como metástase óssea, hipercalcemia, osteoporose e doença de Paget (MUNDY e YONEDA, 1998). Quando administrados oral ou parenteralmente, eles são absorvidos por cristais de hidroxiapatita no mineral ósseo e, uma vez que sua estrutura os torna resistentes a degradação enzimática, eles atuam principalmente inibindo a reabsorção óssea, embora algum efeito na formação óssea também deva ocorrer. O efeito em rede é promover acumulação mineral no osso enquanto, ao mesmo tempo, promover a redução do *turnover* ósseo consideravelmente (ALLGROVE, 1997).

Um estudo afirma que os bisfosfonatos são seletivamente incorporados pelos osteoclastos na matriz óssea contendo hidroxiapatita e têm vários efeitos diretos a nível celular. Eles inibem o recrutamento e diferenciação de precursores de osteoclastos, além de inibir a atividade de reabsorção dos osteoclastos maduros. Somado a isso, os bisfosfonatos induzem a apoptose de macrófagos e osteoclastos maduros. É afirmado que osteoclastos que sofrem influência de bisfosfonatos mostram mudanças morfológicas, tais como deficiência da borda de absorção ou dilaceração do anel de actina (MURAKAMI *et al*, 1995).

Evidências têm demonstrado que alguns efeitos desses compostos nos osteoclastos são mediados diretamente via osteoblastos. Tais efeitos indiretos nos osteoclastos parecem ter a ver com a secreção de fatores pelos osteoblastos, como a interleucina-6, que regulam a diferenciação e ativação de osteoclastos (VITTE, FLEISCH e GUENTHER, 1996). Além disso, bisfosfonatos têm demonstrado capacidade de aumentar a proliferação, diferenciação e atividade ósseo-formadora de osteoblastos diretamente. Assim, tais estudos sugerem que os bisfosfonatos afetam o metabolismo ósseo através de osteoclastos e osteoblastos (GARCIA-MERCO *et al*, 1998).

Atualmente, é considerado que as propriedades de inibição da reabsorção óssea por parte dos bisfosfonatos agem nos osteoclastos por dois mecanismos que são dependentes da presença de nitrogênio na cadeia química longa ligada ao carbono. Assim, os bisfosfonatos são classificados em dois grupos com diferentes mecanismos de ação: (1) os bisfosfonatos nitrogenados e (2) os não-nitrogenados. Os bisfosfonatos que não têm o nitrogênio presente em sua estrutura (etidronato, clodronato e tiludronato) inativam análogos não-hidrolizáveis de ATP, que interferem na energia celular dos osteoclastos, induzindo sua apoptose. Os bisfosfonatos mais potentes, que contém

nitrogênio em sua estrutura (pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato), agem por quatro mecanismos distintos: (1) inativando o ATP; (2) inibindo a síntese de farnesildifosfonato (parte do mecanismo do mevalonato na síntese do colesterol), resultando em desestruturação citoesquelética do osteoclasto, desregulamento do transporte intracelular e inibição da proliferação celular; (3) reduzindo o recrutamento de osteoclastos e (4) induzindo a produção por parte dos osteoblastos de uma enzima de inibição da reabsorção óssea (OTOMO-CORGEL, 2007).

A afinidade de um bisfosfonato pelo tecido ósseo parece ser relacionada à sua estrutura química, uma vez que os bisfosfonatos nitrogenados demonstraram apresentar uma capacidade de inibição da dissolução mineral mais forte. Tais diferenças na afinidade pela hidroxiapatita parecem influenciar no tempo necessário para que a reabsorção óssea deixe de ser afetada pela ação dos bisfosfonatos mesmo após a interrupção da terapia com essa droga (NANCOLLAS *et al*, 2006).

3.2 BISFOSFONATOS E OSSEOINTEGRAÇÃO

Um dos primeiros estudos a pesquisar a influência de bisfosfonatos nos eventos relacionados à osseointegração foi o de Yoshinari e colaboradores (2001). Nesse estudo, os autores modificaram a superfície de placas de titânio com a implantação de íons de cálcio e imobilização de pamidronato. Nessas placas, foram cultivadas células osteoblásticas e avaliada a atividade de fosfatase alcalina dessas células. Os autores demonstraram que o bisfosfonato não teve efeito tóxico sobre os osteoblastos e, ainda, concluíram que tal superfície oferece um micro-ambiente favorável ao crescimento celular, com habilidades osteogênicas.

O mesmo grupo de pesquisa avaliou a resposta óssea a implantes de titânio cobertos com fosfato de cálcio e modificados pela imobilização de pamidronato, instalados em cachorros. A maior porcentagem de contato osso-implante foi encontrada em implantes modificados pela presença de bisfosfonato após 12 semanas de implantação, comparados ao grupo controle (YOSHINARI *et al*, 2002).

Mais tarde, Goto e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade de osteoblastos formarem nódulos calcificados sobre diferentes superfícies de titânio. Dentre essas superfícies estavam titânio puro, impregnado por íons de cálcio, e modificado pela imobilização de dois bisfosfonatos em diferentes concentrações – pamidronato e incadronato. Os autores encontraram resultados quatro vezes melhores no grupo teste do pamidronato em comparação com o controle titânio puro, concluindo que o bisfosfonato pode ser uma alternativa útil na estimulação de formação de tecido mineralizado em implantes de titânio.

Em estudo de Skoglund, Holmertz e Aspenberg (2004), foram avaliados os efeitos da administração sistêmica e da aplicação local de ibandronato na fixação de implantes de aço inoxidável em ratos. A administração sistêmica se dava através de injeção subcutânea diária de ibandronato, enquanto a aplicação tópica deu-se através da injeção de 0,1ml de ibandronato na loja cirúrgica antes da inserção do implante. Os resultados revelaram que a aplicação sistêmica aumentou em 30% a força necessária para arrancar o implante. A administração local aumentou em 60% a força de torque de remoção, e em 68% a força necessária para girar o implante em ¼ de volta. Os autores concluíram que o bisfosfonato administrado de forma sistêmica ou local pode ser de grande valia no aumento da fixação de implantes em estágios iniciais de cicatrização.

Em 2005, Kajiwara e colaboradores analisaram a quantidade de tecido ósseo novo formado ao redor de implantes com superfície modificada pela imobilização de pamidronato, em tíbias de ratos. Após quatro semanas, houve significativamente mais neoformação óssea ao redor dos implantes modificados com bisfosfonato do que naqueles que não receberam esse tratamento, evidenciando que essa superfície estimula a formação óssea ao redor do implante, podendo contribuir para o aumento no sucesso com essa terapia.

Jakobsen e colaboradores (2006) também avaliaram o efeito da aplicação tópica de alendronato na fixação de implantes, mas com técnica cirúrgica de compactação óssea. Os autores encontraram um aumento no contato osso-implante e na densidade total óssea ao redor dos implantes no grupo tratado com bisfosfonato, mas relataram que esse aumento aconteceu basicamente às expensas de osso não-vital, o que atribuem ao efeito inibidor de osteoclastos que o bisfosfonato possui. Os autores sugerem períodos mais longos de observação para avaliar se o efeito preservativo do alendronato sobre osso não-vital poderia aumentar a fixação de implantes por osteocondução.

Avaliando a influência da administração sistêmica de alendronato na osseointegração de implantes de titânio instalados em coelhos, Chacon e colaboradores (2006) não encontraram diferença estatística no torque de remoção entre os grupos teste e controle. Os autores concluíram que a administração de doses de alendronato via oral não teve efeito significativo nos valores de torque de remoção seis semanas após a instalação dos implantes.

Eberhardt e colaboradores (2007) conduziram um estudo pré-clínico em ratos para avaliar se o ibandronato poderia acelerar o processo de osseointegração, resultando em estabilidade secundária mais precoce. Para tanto, os animais do grupo teste

receberam injeções subcutâneas de ibandronato em diferentes concentrações durante os períodos pós-operatórios analisados. Os resultados indicaram que o grupo que recebeu doses mais altas de ibandronato teve o tempo necessário para a osseointegração reduzido em 60% se comparado com o grupo controle. Entretanto, para os grupos que receberam baixas doses, não houve aceleração da osseointegração em comparação ao grupo controle. Os autores concluíram que um tratamento contínuo com 5µg/kg por dia de ibandronato pode ser um potente acelerador da osseointegração e, conseqüentemente, estabilidade secundária mais precoce pode ser esperada.

Aspenberg e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos da cobertura de bisfosfonatos em implantes de aço inoxidável na fixação óssea. Em seus resultados, encontraram que o bisfosfonato foi capaz de aumentar a força de remoção após duas semanas de inserção.

Langhoff e colaboradores (2008) também avaliaram o efeito da cobertura de bisfosfonato em implantes de titânio instalados em ovelhas. Os autores investigaram histomorfometricamente a porcentagem de contato osso-implante nos diferentes grupos. Os resultados apontaram que não houve diferenças estatísticas entre os grupos analisados, embora todos tivessem alcançado resultados comparativamente bons.

Mais recentemente, Abtahi, Tengvall e Aspenberg (2010) realizaram um estudo piloto em cinco pacientes, nos quais foram instalados implantes dentários cobertos com bisfosfonato na maxila. Foram realizadas avaliações radiográficas e de estabilidade do implante através de frequência de ressonância no momento da instalação do implante e após seis meses, na cirurgia de reabertura. Além disso, os implantes cobertos com bisfosfonato foram removidos em blocos em dois pacientes, para fins de avaliação histológica. Em cada paciente, o implante coberto com bisfosfonato mostrou valores

mais altos de frequência de ressonância, teste quantitativo não-invasivo frequentemente utilizado para medir estabilidade de implantes dentários. Histologicamente, não houve anormalidades.

Tsetsenekou e colaboradores (2011) realizaram um estudo com coelhos ovariectomizados a fim de avaliar se a administração sistêmica de alendronato interferia na osseointegração de implantes instalados no fêmur, após seis e doze semanas da inserção. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos controle e teste, indicando que a administração sistêmica de alendronato não afetou a osseointegração de implantes em animais com status hormonal semelhante ao de mulheres em idade pós-menopausa.

4. METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Após aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS (Anexo A) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (Anexo B), 10 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem *New Zealand*, machos, adultos, e peso corporal médio de 4,0kg foram utilizados nesta pesquisa.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, regularmente higienizadas e com serragem estéril, nas dependências do Colégio Politécnico do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), recebendo dieta *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram os princípios da *Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979*, que estabelece normas para a prática didático-científico da vivisseccção de animais e os princípios éticos na experimentação animal, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Um total de 50 implantes foram instalados na amostra, sendo a tibia direita usada como controle e a esquerda como teste (INTERNATIONAL STANDARD ISSO 10993-6, 1994) (Tabela 1). O grupo controle, ou seja, os alvéolos cirúrgicos confeccionados na tibia direita de cada animal, recebeu aplicação de solução salina estéril. O grupo teste, caracterizado pelos alvéolos cirúrgicos confeccionados na tibia esquerda de cada coelho, recebeu a aplicação tópica de 1ml de gel de alendronato de sódio (10mg/g), confeccionado segundo estudo previamente publicado (Reddy e Kumar, 2005). Dos 50 implantes instalados, 20 (n=10/grupo) foram avaliados em teste

de torque máximo de remoção e os 30 restantes (n=15/grupo) foram observados em análises histomorfológica e histomorfométrica.

Tabela 1. Desenho experimental

	Amostra	Grupo	Torque de remoção	%BIC
		G1 – Controle		
10 coelhos	Tíbia direita	(25 implantes)	10 implantes	15 implantes
		G2 – Teste		
	Tíbia esquerda	(25 implantes)	10 implantes	15 implantes

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado, em ambiente de bloco cirúrgico, no Biotério do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os procedimentos relacionados à indução de anestesia geral e posterior recuperação pós-operatória, bem como o monitoramento dos planos anestésicos do animal durante o procedimento cirúrgico foram realizados por dois médicos veterinários. Os procedimentos locais, relacionados à cirurgia de colocação de implantes, foram realizados por um cirurgião-dentista especialista em Implantodontia.

Após a pesagem em balança, os animais receberam medicação pré-anestésica composta por 0,2mg/kg de maleato de acepromazina (Acepran®, Univet, Brasil) e 2mg/kg de sulfato de morfina (Dimorf®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil), ambos por via intramuscular. Transcorridos,

aproximadamente, 10 minutos, canulou-se a veia marginal da orelha do animal para administração de fluidoterapia com solução de Ringer com Lactato (Baxter®, Baxter Hospitalar Ltda, São Paulo, Brasil) e 10mg/kg de enrofloxacin (Baytril®, Bayer S.A., São Paulo, Brasil), 20 minutos antes da cirurgia. Procedeu-se a indução anestésica através da injeção intravenosa de 10mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener Pharmaceutica, São Paulo, Brasil) e 1mg/kg de midazolam (Dormonid® injetável, Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, Brasil). Realizou-se a anestesia epidural com 0,25ml/kg de lidocaína 2% (Lidocaína 2%, Geyer, Porto Alegre, Brasil). Após a indução anestésica, os animais foram tricotomizados na região de tíbia direita e esquerda. Realizou-se antissepsia da perna dos coelhos com digluconato de clorexidina a 2% (Riohex Degermante 2%, Rioquímica, Brasil), incluindo a pelagem adjacente a área tricotomizada.

Então, colocou-se o animal em decúbito dorsal e, sobre a área tricotomizada, foi posicionado um campo fenestrado estéril, com dimensões de 40 X 40 cm, confeccionado para expor a perna do animal e cobrir o restante do corpo, prevenindo eventuais contaminações. Cada cirurgia ocorreu de forma independente, sobre uma bancada térmica com 37°C, coberta com campo cirúrgico estéril descartável.

No trans-operatório, os animais receberam suporte com máscara de oxigênio e o monitoramento dos planos anestésicos dos animais foi realizado analisando-se as funções vitais (frequência cardíaca e respiratória) (Figura 1) e o reflexo de dor. Quando necessário, repetia-se $\frac{1}{4}$ da dose de indução para manutenção anestésica.



Figura 1 – Monitoramento trans-operatório das funções vitais dos animais.

A cirurgia teve início através de uma incisão linear, com lâmina de bisturi n°15 montada em cabo n.º3, medindo cerca de 2cm de extensão, em pele e músculo na superfície diafisária medial da tíbia, sempre com apoio em base óssea. Após esse procedimento, os tecidos moles foram afastados com o auxílio de dois afastadores Senn Müller, permitindo a visualização do periósteo, que subsequenteemente foi incisado, divulsionado com um descolador de Molt e afastado juntamente com os outros tecidos, expondo a superfície externa da tíbia. Com uma seringa descartável de 20 ml foi feita irrigação da região com soro fisiológico a 0,9%, secando-se posteriormente com gaze estéril.

Os locais de confecção das lojas cirúrgicas foram previamente demarcados com o auxílio de uma sonda exploradora. As perfurações foram posicionadas 10 mm abaixo do côndilo da tíbia, com 10mm de distância entre cada perfuração, medida com o auxílio de um instrumento de medição, e confeccionadas com o auxílio de contra-ângulo cirúrgico 16:1 (Contra-ângulo Kavo, Kavo do Brasil, Brasil) conectado ao

micromotor cirúrgico (Kavo Konzept Surg, Kavo do Brasil, Brasil) previamente ajustado para 1.200 rpm e a bomba peristáltica ajustada para o máximo de vazão, sob irrigação abundante de solução fisiológica. A fresagem para instalação dos implantes foi realizada com brocas apropriadas (Kit Cirúrgico, Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil), até a profundidade de 4mm, na sequência broca lança e broca helicoidal 2 mm.

Após a confecção das cavidades, estas foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica para remoção dos resíduos gerados no processo de perfuração. Uma gaze estéril foi introduzida e mantida por compressão no alvéolo cirúrgico por 1 a 2 minutos, com a finalidade de absorver e coibir o sangramento, processo que garantiu que o gel de bisfosfonato entrasse em contato direto com toda a parede do alvéolo, sem a interposição de sangue. A quantidade de 1ml de gel de alendronato de sódio (grupo teste) ou 1ml de solução salina estéril (grupo controle) foi injetada no alvéolo cirúrgico imediatamente antes da inserção do implante (SKOGLUND, HOLMERTZ e ASPENBERG, 2004; JAKOBSEN *et al*, 2006) (Figura 2).

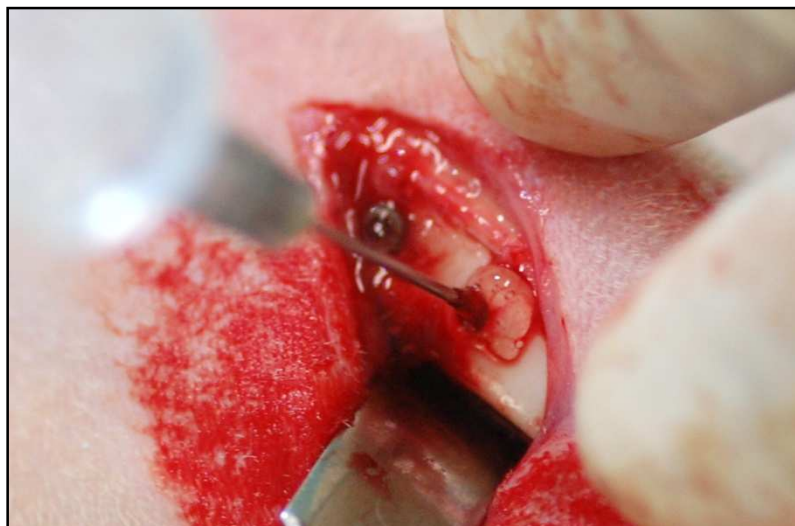


Figura 2 – Aplicação local do gel de bisfosfonato.

Na sequência, foi realizada a inserção dos implantes (Figura 3). Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro com superfície tratada por ácido (Porous Nano; Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil). Os implantes foram instalados com rotação de 35rpm, até que atingissem o nível ósseo. Todos os implantes apresentaram torque de instalação superior a 30Ncm. Tais implantes foram especificamente fabricados para esse estudo (Figura 4), com o diâmetro de 2,2mm e comprimento de 4,0mm (Anexo C).



Figura 3 – Instalação dos implantes imediatamente após a aplicação do gel de bisfosfonato.

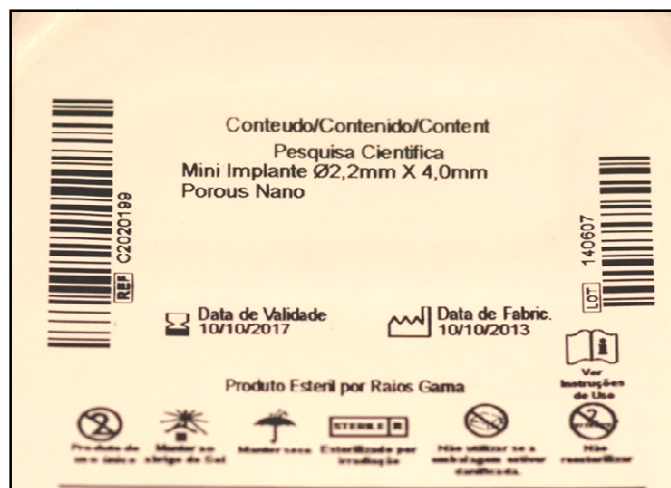


Figura 4 – Mini implante especialmente projetado para pesquisa científica em modelo animal.

Na sequência, realizou-se aproximação muscular e do subcutâneo com suturas contínuas e dermorrafia com suturas simples interrompidas, com o auxílio de um porta-agulha Mayo Hegar e uma pinça Adson Brown, utilizando fio de sutura reabsorvível (Catgut 4.0, Johnson & Johnson/Ethicon, Sommerville, New Jersey). A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos de sangue coagulado, e os animais receberam curativo oclusivo com atadura de gaze. Enfim, os coelhos foram colocados na posição de decúbito ventral em suas gaiolas correspondentes para recuperação da anestesia.

Durante o pós-operatório, cada animal recebeu analgesia através de 2mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramadol®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil), por via subcutânea, a cada 8 horas por 03 dias. A antibioticoterapia foi realizada através de injeção intramuscular de enrofloxacina (Baytril®, Bayer S.A., São Paulo, Brasil) na quantidade de 10mg/kg, a cada 24horas por 7 dias.

4.4 MORTE DOS ANIMAIS

Para eutanásia, cada animal recebeu medicação pré-anestésica composta por 1mg/kg de maleato de acepromazina (Acepran®, Univet, Brasil), 15mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener Pharmaceutica, São Paulo, Brasil) e 2mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer, São Paulo, Brasil), todos por via intramuscular. Em torno de 10 minutos eram necessários até que os reflexos palpebrais, corneal e de dor estivessem ausentes. Com o animal em plano anestésico profundo, administrou-se, por via intravenosa, solução de cloreto de potássio a 10% (Ariston, São Paulo, Brasil) até a parada cardiorrespiratória. A morte dos animais ocorreu após o período de vida pós-operatório previsto de 28 dias.

4.5 MENSURAÇÃO DO TORQUE DE REMOÇÃO

Para mensuração do torque máximo de remoção de cada implante, os espécimes foram processados imediatamente após a remoção da tíbia. Primeiramente foram mantidos em solução de formalina neutra tamponada a 10% e, após 1 hora, foram submetidos ao teste de torque de remoção, não sofrendo, assim, desidratação. A peça anatômica foi cuidadosamente posicionada em equipamento de teste de torque – CME (Técnica Industrial Oswaldo Filizola, Guarulhos, Brasil), o qual é totalmente controlado pelo software DynaView Torque Standard/Pro M (Figura 5), gerando os valores automaticamente com velocidade de 1rpm e medição angular do sistema com resolução de 0.002°. As medições de torque máximo para iniciar a rotação inversa foram registrados e os valores de torque médio foram calculados para cada grupo.

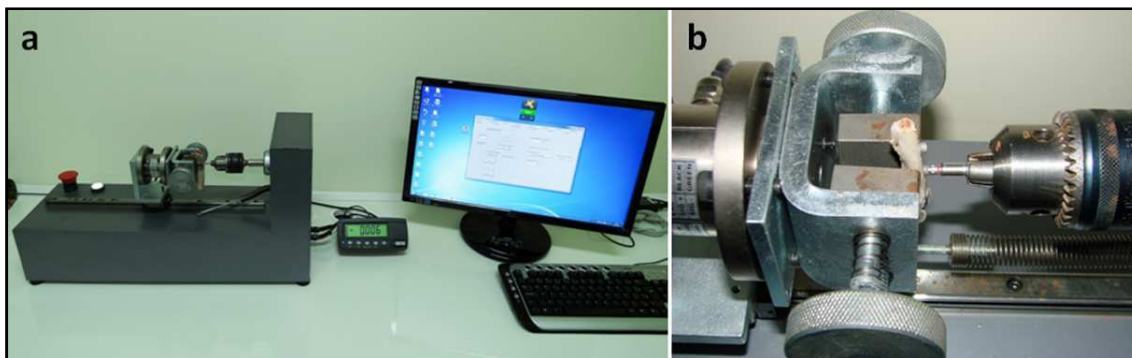


Figura 5 – a) Máquina de torque conectada ao computador (Software Dynaview Torque Standard/Pro M); b) Teste de torque de remoção.

4.6 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Após exame macroscópico local, as peças anatômicas foram imediatamente armazenadas em recipientes de vidro, mergulhados em formalina neutra tamponada a 10%, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem* dos tecidos.

A etapa de confecção e análise das lâminas histológicas foi realizada no Bioface Institute (Santa Maria, RS, Brasil). Os blocos ósseos contendo os implantes foram gradualmente sendo desidratados em concentrações sucessivas de álcool (de 50% a 100%). Após a desidratação, a amostra foi embebida em resina a base de metacrilato (EMBed-812, Embedding Kit, EMS, Hatfield, PA) de acordo com as instruções do fabricante. Os blocos foram, então, cortados em fatias de, aproximadamente 300 μ m de espessura, objetivando o centro do implante no sentido do seu longo eixo, com disco de diamante em cortadeira metalográfica (Modelo DTQTM5, Pantec®, São Paulo, Brasil). A seguir, as amostras foram coladas a uma placa de acrílico com cimento a base de acrilato e deixadas secar por 24h previamente aos processos de desgaste e acabamento. As secções foram reduzidas a espessura final de, aproximadamente, 30 μ m por meio de uma série de lixas d'água abrasivas (400, 600, 800, 1200 e 2400) (3M do Brasil, São

Paulo, Brasil) em uma politriz (Polipan 2, Pantec®, São Paulo, Brasil) sob irrigação com água. Finalmente, a amostra foi corada com fucsina e levada à análise em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

Todos os cortes histológicos de osso-implante foram analisados histomorfologicamente de modo a se estabelecer as características teciduais gerais no processo de osseointegração em cada grupo por meio da observação do tecido ósseo neoformado e seus elementos celulares típicos. Procurou-se registrar as regiões dos implantes com mais forte evidência de osseointegração, bem como avaliar o processo de recobrimento das espiras pelo tecido ósseo.

A análise histomorfométrica foi realizada através do contato osso-implante (%BIC), determinado em uma magnificação de 50-200X por meio de um software (Image Tool® for Windows, versão 5.02). As regiões de contato osso-implante ao longo do perímetro do implante foram subtraídas do perímetro total do implante (Figura 6), e os cálculos foram realizados para determinar a porcentagem de BIC. As medições foram realizadas por dois examinadores, treinados e calibrados. A amostra foi codificada previamente à análise do examinador, caracterizando o processo de cegamento da avaliação.

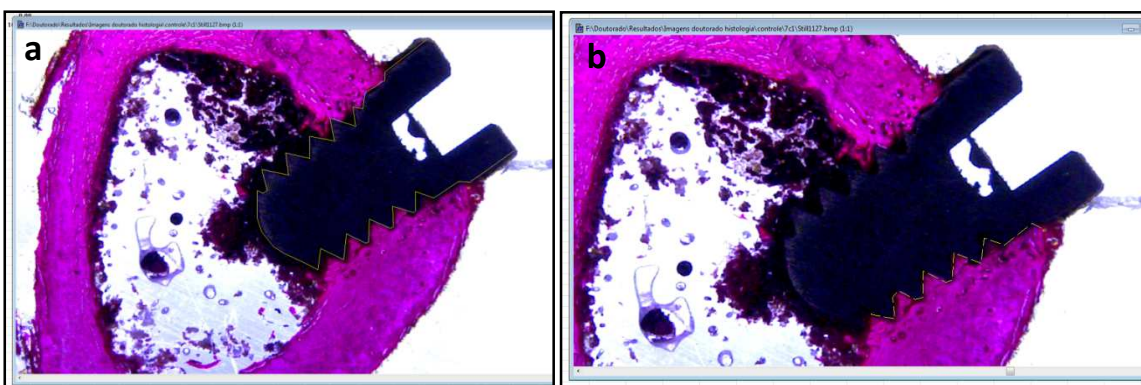


Figura 6 – a) Mensuração do perímetro total do implante e b) das áreas de contato osso-implante para cálculo de BIC.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de torque máximo de remoção foram comparados entre os grupos através de Teste T-Student pareado. Para os resultados de contato osso-implante, primeiramente foram calculados os coeficientes de correlação intraclassa (CCI) (Fleiss, 1986), a fim de que fosse verificada a reprodutibilidade da avaliação (Altman e Bland, 1983). Após, as porcentagens de contato osso-implante foram comparadas entre os grupos com uso de Equações de Estimação Generalizadas (EEGs) com matriz de correlações permutável nas medidas em um mesmo coelho (McCullagh e Nelder, 1989). Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5% (SPSS, Versão 20.0).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

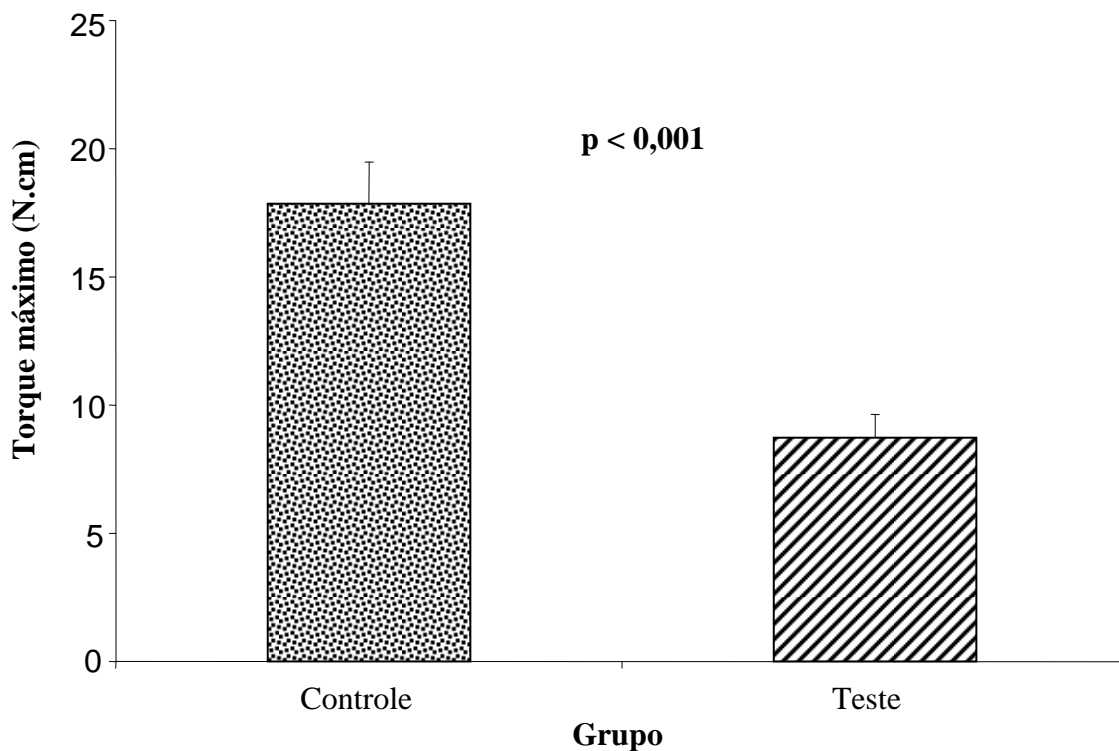
5.1 TORQUE MÁXIMO DE REMOÇÃO

A Tabela 2 e Gráfico 1 mostram que os valores de torque máximo de remoção no grupo teste foi, em média, a metade que no grupo controle ($p < 0,001$).

Tabela 2. Torque máximo de remoção (Ncm) segundo grupos e resultado do teste comparativo.

Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Controle	17,86	5,15	17,9	10,1	25,3	10	<0,001
Teste	8,73	2,86	7,9	5,9	14,2	10	

Gráfico 1. Torque máximo de remoção segundo grupos (média \pm dp) e resultado do teste comparativo.



5.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

A avaliação qualitativa das lâminas histológicas demonstrou que todos os implantes tiveram sua porção mais cervical atravessando a cortical tibiana, e a porção apical em contato com a medular óssea (Figura 7).



Figura 7 – Posicionamento dos implantes em cortical e medular tibiana. Magnificação: 20X.

No grupo controle, a análise histológica mostrou neoformação óssea nas adjacências da superfície dos implantes, com locais de remodelamento ósseo evidenciando arranjo estrutural semelhante ao lamelar. Próximo ao implante, observou-se osteócitos volumosos em grande quantidade localizados dentro de amplas lacunas. Conforme se aproximava do implante, trabéculas ósseas imaturas com inúmeros osteoblastos grandes e volumosos foram observados. A diferença da coloração – áreas mais intensamente coradas – revelam tecido ósseo formado mais recentemente, o que

pode ser constatado principalmente nas regiões entre as espiras dos implantes (Figura 8).

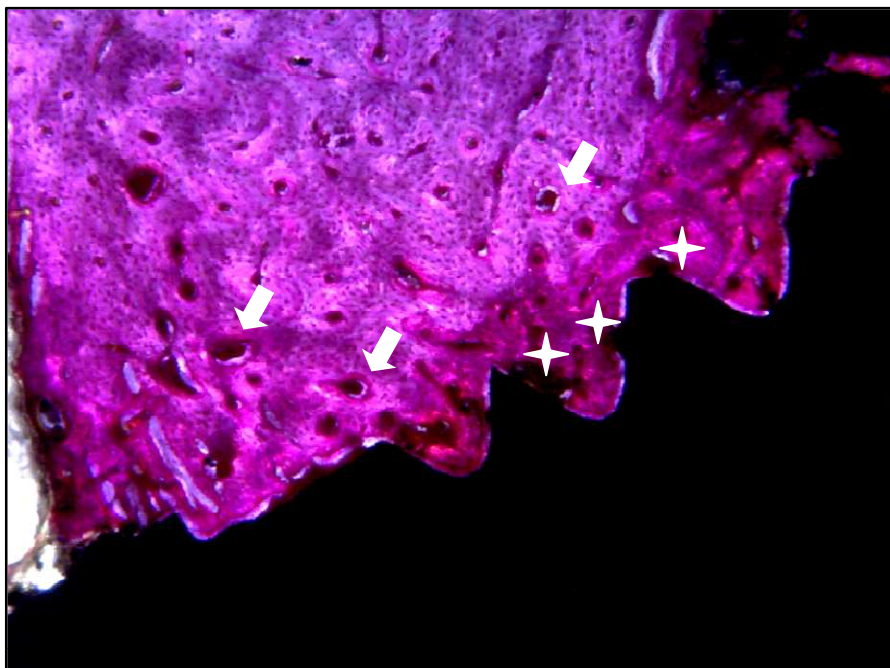


Figura 8 – Interface osso-implante do grupo controle na região de osso cortical, demonstrando atividade óssea mais intensa próximo ao corpo do implante, com presença de tecido ósseo recentemente formado (região de coloração mais intensa), osteócitos volumosos em amplas lacunas (-->) e osteoblastos grandes e volumosos em contato com a superfície do implante (+). Magnificação: 40X.

No grupo teste, a análise histológica mostrou, em sua maioria, ausência de neoformação óssea nas adjacências da superfície dos implantes, com locais de remodelamento ósseo próximo ao topo das espiras e à porção mais cervical do implante. Preenchendo os espaços entre as espiras, observou-se, na maioria das amostras, tecido granular (Figura 9).

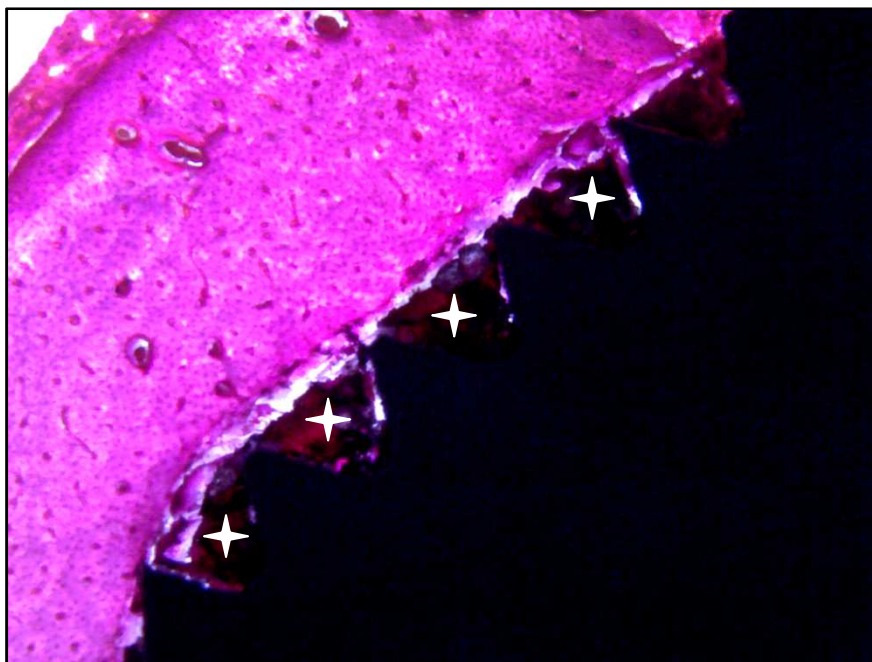


Figura 9 – Interface osso-implante do grupo teste na região de osso cortical, demonstrando baixa atividade óssea localizada quase que somente em região de topo de espiras e região mais cervical do implante, com presença de tecido granular preenchendo o espaço entre as espiras (+). Magnificação: 40X.

5.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

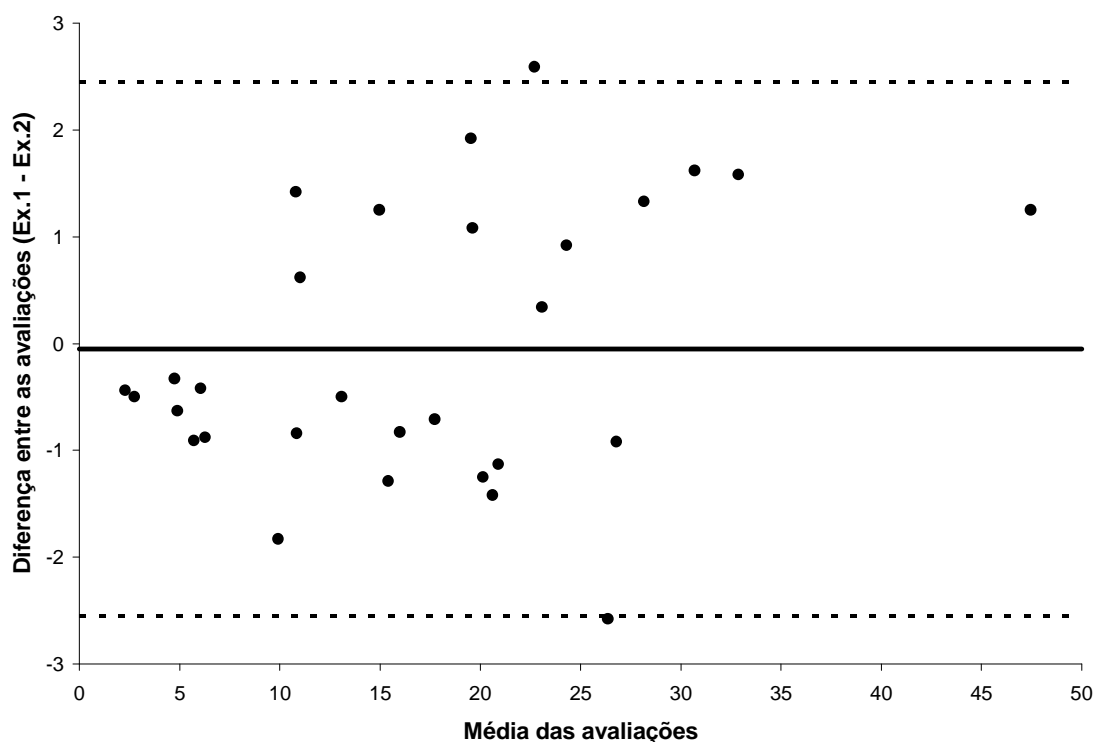
A reprodutibilidade das medidas entre os examinadores foi analisada e demonstrou ser alta, pois o coeficiente de correlação intraclasse apresentou-se muito próxima de 1 (CCI = 0,993), sendo que a repetibilidade (erro) entre os avaliadores foi menor de 1% (0,90%) (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos percentuais de contato osso-implante para cada examinador e resultado da reprodutibilidade entre os examinadores.

Examinador	Média	DP	N	CCI	IC (95%)		Repetibilidade
					Inferior	Superior	
1	17,2	10,6	30	0,993	0,985	0,997	0,90
2	17,2	10,1	30				

O Gráfico 2 confirma o resultado apresentado pela Tabela 2, demonstrando que não há tendência evidente nas diferenças entre as avaliações dos examinadores e que a diferença média entre eles foi bastante próxima de zero.

Gráfico 2. Gráfico de Bland-Altman entre as medidas dos examinadores.

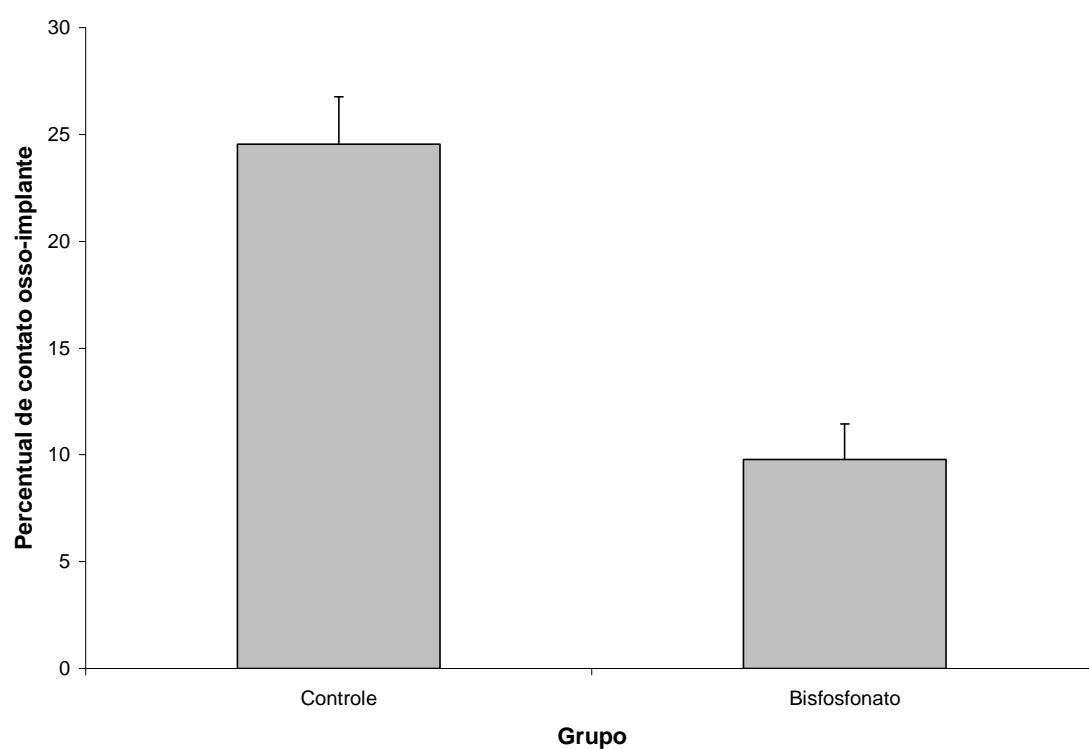


A média dos valores de BIC no grupo controle foi aproximadamente 2,5 vezes maior que do grupo teste, mostrando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabela 4 e Gráfico 3).

Tabela 4. Descrição do contato osso-implante segundo grupos e resultado do teste comparativo.

Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Controle	24,55	8,59	23,25	11,33	48,08	15	<0,001
Teste	9,77	6,53	9,00	2,06	26,33	15	

Gráfico 3. Valores médios de contato osso-implante e respectivos erros padrões segundo grupos.



6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A avaliação de interfaces entre tecido ósseo e implantes osseointegráveis é imprescindível no desenvolvimento de novas técnicas e materiais relacionados à Implantodontia. Resultados de estudos *in vitro* não podem ser extrapolados para a situação *in vivo*; ao mesmo tempo, modelos animais são necessários para testes pré-clínicos destes materiais antes de seu uso em humanos. Seguindo este pensamento, o presente estudo foi delineado em um modelo animal, com objetivo de avaliar parâmetros relacionados à osseointegração de implantes de titânio na presença de um bisfosfonato.

A escolha do coelho como modelo animal partiu da observação de alguns fatos importantes, já reconhecidos no meio científico: facilidade de manuseio, tamanho do animal, maturidade óssea precoce e composição óssea moderadamente similar aos humanos em ossos de crescimento primário (PEARCE *et al*, 2007). Além disso, este modelo animal é tradicionalmente aceito e utilizado para pesquisa de osseointegração (Branemark, 1983).

Nestes animais, o padrão internacional para avaliação biológica de dispositivos médicos recomenda o máximo de 6 implantes (3 controles e 3 testes) por coelho, sendo que estes dispositivos devem ter aproximadamente, no máximo, 2mm de diâmetro e 6mm de comprimento (INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-6, 1994). Tais recomendações foram observadas neste estudo.

Este estudo teve como objetivo avaliar a osseointegração de implantes de titânio instalados com e sem a aplicação local de um bisfosfonato. Os resultados encontrados levaram à rejeição das duas hipóteses nulas admitidas inicialmente, uma vez que houve diferença entre os grupos testados, com melhores resultados para o grupo controle.

A influência do uso de bisfosfonatos em implantodontia vem sendo exaustivamente pesquisada atualmente, tanto através do uso sistêmico (AYAN *et al*, 2012; CHEN *et al*, 2013; DE OLIVEIRA *et al*, 2014), como da uso local, seja por meio de aplicação direta no alvéolo cirúrgico (SKOGLUND, HOLMERTZ e ASPENBERG, 2004; JAKOBSEN *et al*, 2007; JAKOBSEN *et al*, 2009; CUAIRÁN *et al*, 2014) ou através da imobilização na superfície do implante (ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2012; MOON *et al*, 2012; GUIMARÃES *et al*, 2013; HARMANKAYA *et al*, 2013; STADLINGER *et al*, 2013; BOBYN *et al*, 2014). A proposta de aplicação local do bisfosfonato neste estudo justifica-se pela intenção de beneficiar-se de sua influência biomoduladora na osseointegração sem, contudo, sofrer os possíveis efeitos sistêmicos desta droga (DE GROEN *et al*, 1996; BEDOGNI *et al*, 2010; GOSS *et al*, 2010; LAZAROVICI *et al*, 2010; VOHRA *et al*, 2014), uma vez que o bisfosfonato localmente aplicado permanece concentrado nos arredores da aplicação, não sendo distribuído sistemicamente (MCKENZIE *et al*, 2011).

Os implantes teste foram instalados imediatamente após a aplicação local de um gel de bisfosfonato. Alguns estudos realizaram a análise da influência local deste fármaco na osseointegração através de sua aplicação na forma de solução (SKOGLUND, HOLMERTZ e ASPENBERG, 2004; JAKOBSEN *et al*, 2007; JAKOBSEN *et al*, 2009; CUAIRÁN *et al*, 2014). A escolha pela apresentação em gel se deve ao cuidado em conter o fármaco no alvéolo cirúrgico e mantê-lo em contato com as paredes ósseas durante a instalação do implante, evitando que exista um viés no caso do resultado ser igual nos dois grupos: a possibilidade do fármaco não ter sido realmente testado por ter extravasado completamente.

A formulação do gel aplicado nesta pesquisa seguiu minuciosamente a descrita por Reddy e Kumar (2005), a qual teve suas propriedades adequadamente testadas.

Como resultado, os autores relataram que o alendronato de sódio teve distribuição uniforme no conteúdo do gel, não demonstrou interação química com os excipientes da fórmula, o gel apresentou viscosidade adequada para aplicação através de seringas e não proporcionou o crescimento de microorganismos após ser esterilizado. Tal gel, testado em humanos na terapêutica periodontal, demonstrou um potente efeito na inibição da reabsorção óssea e um aumento na neoformação óssea.

Segundo Fleisch (2002), bisfosfonatos não-nitrogenados, como o etidronato e o clodronato, necessitam de doses muito altas para atingir o potencial de inibição de reabsorção, as mesmas doses que prejudicam a mineralização fisiológica. O desenvolvimento dos bifosfonatos nitrogenados, como no caso do alendronato, veio a resolver este problema: tratam-se de compostos até 10.000 vezes mais potentes em reabsorção, mas com grande diferença na inibição da mineralização, mostrando-se mais adequados para finalidades como auxiliar na osseointegração, por exemplo.

Entretanto, em publicação recente, Manzano-Moreno *et al* (2014) afirmam que baixas doses dos bisfosfonatos nitrogenados pesquisados, dentre os quais figura o alendronato, são capazes de exercer seu efeito nos osteoblastos, alterando sua fisiologia e diminuindo sua capacidade de formação óssea através da inibição de sua diferenciação e maturação, o que poderia explicar um prejuízo na capacidade reparadora dessas células. Esse prejuízo na remodelação óssea seria uma explicação para os resultados piores de osseointegração quando da aplicação local do alendronato de sódio visualizados neste estudo.

Além disso, foi demonstrado, através da análise histomorfológica, que os implantes instalados localizavam-se em tecido ósseo cortical, em função das características da tíbia do modelo animal utilizado, que não apresenta osso trabecular. Cuairán *et al* (2014) observaram haver, após 8 semanas, significativamente mais osso

cortical ao redor dos implantes do grupo controle do que naqueles onde o bisfosfonato foi aplicado, ao contrário do observado em osso trabecular. Os autores concluíram que o bisfosfonato teria um efeito positivo no osso trabecular e negativo em osso cortical. Este fato corrobora os resultados negativos de torque de remoção para o grupo bisfosfonato no presente estudo.

Quando implantes osseointegráveis são instalados em tecido ósseo, um dano neste tecido é causado pela utilização das brocas indicadas, e microfraturas e necrose ósseas podem ser geradas em toda área tecidual adjacente. Este tecido ósseo danificado deve ser remodelado através de eventos de reabsorção e neoformação (BERGLUNDH *et al*, 2003). Segundo Russel *et al* (2008), é esperado que o bisfosfonato injetado cause inibição ou restrição da atividade osteoclástica; uma vez que a atividade osteoblástica está intimamente relacionada com a osteoclástica, é razoável assumir que o remodelamento ósseo pode ser prejudicado pela presença do fármaco nestas condições (RUSSEL *et al*, 2008), fato que pode explicar resultados significativamente piores de histomorfometria e visivelmente alterados de histomorfologia encontrados no grupo testado, nesta pesquisa.

Um estudo de Jakobsen *et al* (2010) testou a osseointegração de implantes endósseos instalados com um gap de 2,5mm, o qual foi preenchido com enxerto alógeno embebido em um bisfosfonato, com diferentes concentrações. Em seus resultados, tanto o grupo controle quanto o grupo de baixa concentração do bisfosfonato tiveram melhor fixação do que comparados com os demais grupos; enquanto que o grupo de maior concentração teve o maior potencial inibidor de reabsorção óssea. Assim, um aumento na fração de volume ósseo não pode ser correlacionado com um aumento na fixação biomecânica. Este contraste indica claramente que o efeito benéfico do fármaco é dose-dependente e que a manutenção de tecido ósseo inviável pelo efeito inibidor da

reabsorção pode não resultar no objetivo esperado, uma vez que a remodelação óssea necessita fundamentalmente do efeito de reabsorção para ocorrer.

A literatura concernente, embora vasta, não utiliza metodologia padronizada para comparação de resultados, variando tanto o tipo de bisfosfonato utilizado, como a forma de apresentação, via administrativa, modelo animal, variáveis secundárias e testes avaliativos. É importante ressaltar que Stadelmann *et al* (2009) desenvolveram um modelo de remodelação óssea ao redor de implantes carreadores de bisfosfonatos para liberação local, levando em consideração o estímulo mecânico e o estímulo do fármaco, a fim de obter um resultado previsível. Os autores relataram que, muito embora os resultados científicos atuais sejam baseados em escolhas empíricas, é possível obter-se previsibilidade se for levado em consideração o tipo de bisfosfonato, a dose e o modelo animal adotado.

Visivelmente, há um contraste dos resultados encontrados na literatura atual com aqueles relatados neste estudo. A grande maioria dos estudos que testaram a aplicação local de bisfosfonatos relataram haver melhora na fixação do implante, com aumento da densidade óssea peri-implantar (PETER *et al*, 2005; KAJIWARA *et al*, 2005; LEE *et al*, 2011; MOON *et al*, 2012; STADLINGER *et al*, 2013; HARMANKAYA *et al*, 2013; BOBYN *et al*, 2014; CUAIRÁN *et al*, 2014), resultados positivos para atividade de células osteoblásticas (GOTO *et al*, 2003; BEUVELOT *et al*, 2009), aumento da estabilidade primária (ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2010; ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2012; CUAIRÁN *et al*, 2014) e maior contato osso-implante (YOSHINARI *et al*, 2002; JAKOBSEN *et al*, 2007; STADLINGER *et al*, 2013). Entretanto, acredita-se que isso possa ser devido a um viés de publicação, favorável a resultados positivos ao grupo testado. Faz-se importante que todos os relatos científicos, sem qualquer distinção, baseados em estudos corretamente delineados,

sejam publicados em periódicos de maior fator de impacto, a fim de que todas as informações a respeito de um produto testado possam ser acessadas pelo maior número possível de leitores, facilitando, também, a análise por parte de pesquisadores que busquem a realização de revisões sistemáticas e metanálises sobre este tópico.

Neste estudo, tanto a avaliação de torque de remoção, quanto a análise histomorfométrica e histomorfológica mostraram resultados piores para o grupo que sofreu a intervenção farmacológica. Esta coerência entre os achados biomecânicos e histológicos reforça os resultados como um todo e embasa a conclusão gerada. Além disso, o baixo desvio padrão encontrado na análise estatística demonstra o critério de execução e a confiabilidade nos procedimentos metodológicos, principalmente no que diz respeito ao procedimento cirúrgico, indicando uma padronização adequada da amostra avaliada. Entretanto, é importante ressaltar que se trata de um estudo pré-clínico, em que foi testado somente um tipo de bisfosfonato em uma única concentração, pontualmente após 4 semanas *in vivo*, objetivando a análise da osseointegração nos seus eventos mais iniciais. Ainda há muito o que ser esclarecido a respeito deste tema, principalmente no que diz respeito a aplicabilidade em humanos, uma vez que o cenário clínico ainda é pouco explorado na literatura científica atual (ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2010; ABTAHI, TENGVALL e ASPENBERG, 2012).

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A metodologia empregada na realização deste experimento, a partir das análises realizadas, permite concluir que a aplicação local do gel de alendronato de sódio prejudicou a osseointegração de implantes de titânio instalados em tíbia de coelho, negando as hipóteses nulas. A aplicação local deste fármaco atuou diminuindo a porcentagem de contato osso-implante e os valores de torque máximo de remoção, além de, visivelmente, influenciar negativamente na remodelação óssea ao redor dos implantes instalados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abtahi J, Tengvall P, Aspenberg P. Bisphosphonate coating might improve fixation of dental implants in the maxilla: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:673-677.

Abtahi J, Tengvall P, Aspenberg P. A bisphosphonate-coating improves the fixation of metal implants in human bone. A randomized trial of dental implants. *Bone* 2012;50:1148-1151.

Allgrove J. Bisphosphonates. *Arch Dis Child* 1997;76:73-75.

Altman DG, Bland JM. (1983). Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 1983;32(3):307-317.

Aspenberg P, Wermelin K, Tengwall P, Fahlgren A. Additive effects of PTH and bisphosphonates on the bone healing response to metaphyseal implants in rats. *Acta Orthopaedica* 2008;79(1):111-115.

Ayan M, Dolanmaz D, Mihmanli A, Ayan A, Kurkçu M. The effect of sistemically administrated zoledronic acid on the osseointegration of dental implants. *Oral Diseases* 2012;18:802-808.

Bedogni A, Bettini G, Totola A, Saia G, Nocini PF. Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery: a case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:1662-66.

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implant. *Clin Oral Impl Res* 2003;14(3):251-62.

Beuvelot J, Portet D, Lecollinet G, Moreau MF, Baslé MF, Chappard D, Libouban H. In vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD funtionalized bisphosphonate. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009;90B:873-881.

Bobyn JD, Thompson R, Lim L, Pura JA, Bobyn K, Tanzer M. Local alendronic acid elution increases net periimplant bone formation: a micro-CT analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:687-694.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983;50(3):399-410.

Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck M, McGlumphy EA. Effect of alendronate on endosseous implant integration: An in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1005-1009.

Chen B, Li Y, Yang X, Xu H, Xie D. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 2013;24:2115-2121.

Cuairán C, Campbell PM, Kontogiorgos E, Taylor RW, Melo AC, Buschang PH. Local application of zoledronate enhances miniscrew implant stability in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;145:737-49.

De Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 1996;335(14):1016-21.

De Oliveira MA, Asahi DA, Silveira CAE, Lima LAPA, Glick M, Gallottini M. The effects of zoledronic acid and dexamethasone in osseointegration of endosseous implants: histological and histomorphometrical evaluation in rats. *Clin Oral Impl Res* 2014;0:1-5.

Eberhardt C, Habermann B, Müller S, Schwarz M, Bauss F, Kurth AHA. The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model. *J Orthop Sci* 2007;12:61-66.

Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002;4:30-34.

Fleiss JL. *The design and analysis of clinical experiments*. New York: Wiley. 432p. 1986.

García-Merco C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mallibovsky L, Nogués X, Ballester J, Aubía J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998;22:233-9.

Goss A, Bartold M, Sambrook P, Hawker P. The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: A south australian case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:337-343.

Goto T, Kajiwara H, Yoshinari M, Fukuhara E, Kobayashi S, Tanaka T. In vitro assay of mineralized-tissue formation on titanium using fluorescent staining with calceinblue. *Biomaterials* 2003;24:3885-3892.

Guimarães MB, Bueno RS, Blaya MBG, Hirakata LM, Hubler R. Diphosphonate immobilization on hydroxyapatite-coated titanium – Method Description. *Implant Dent* 2013;22(4):356-359.

Harmankaya N, Karlsson J, Palmquist A, Halvarsson M, Igawa K, Andersson M et al. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta Biomaterialia* 2013;9:7064-7073.

International Standard ISO 10993-6. *Biological evaluation of medical devices – Part 6*. 1994:1-11.

Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. Effect of topical alendronate treatment on fixation of implants inserted with bone compaction. *Clin Orthop Relat Res* 2006;444:229-234.

Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. Local alendronate increases fixation of implants inserted with bone compaction: 12-week canine study. *J Orthop Res* 2007;25:432-441.

Jakobsen T, Baas J, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. Local bisphosphonate treatment increases fixation of hydroxyapatite-coated implants inserted with bone compaction. *J Orthop Res* 2009;27(2):189-194.

Jakobsen T, Baas J, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. The effect of soaking allograft in bisphosphonate. A pilot dose-response study. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:867-874.

Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, Kido MA, Tanaka T. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials* 2005;26:581-587.

Langhoff JD, Voelter K, Scharnweber D, Schnabelrauch M, Schlottig F, Hefti T, Kalchofner K, Nuss K, Von Rechenberg B. Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:1125-1132.

Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Schwartz-Arad D, Peleg O, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:790-796.

Lee SJ, Oh TJ, Bae TS, Lee MH, Soh Y, Kim BI et al. Effect of bisphosphonates on anodized and heat-treated titanium surfaces: an animal experimental study. *J Periodontol* 2011;82:1035-1042.

Li YF, Li XD, Bao CY, Chen QM, Zhang H, Hu j. Promotion of peri-implant bone healing by sistemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporos Int* 2013;24:1063-1071.

Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E, Reyes-Botella C, Ruiz C, García-Martínez O. Nitrogen-containing bisphosphonates modulate the antigenic profile and inhibit the maturation and biomineralization potential of osteoblast-like cells. *Clin Oral Invest* 2014; [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00784-014-1309-z

McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2nd ed. Chapman and Hall: New York, USA. p.511. 1989.

McKenzie K, Bobynd JD, Roberts J, Karabasz D, Tanzer M. Bisphosphonate remains highly localized after elution from porous implants. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:514-522.

Misch CE, Wang HL. Immediate occlusal loading for fixed prostheses in implant dentistry. *Dent Today* 2003;22(8):50-6.

Moon SH, Lee SJ, Park IS, Lee MH, Soh YJ, Bae TS et al. Bioactivity of Ti-6Al-4V alloy implants treated with ibandronate after the formation of the nanotube TiO₂ layer. *J Biomed Mater Res* 2012;100B:2053-2059.

Muller F. Interventions for edentate elders - what is the evidence? *Gerodontology* 2014;31(Suppl.1):44-51.

Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonates as anticancer drugs. *N Engl J Med* 1998;339:398-400.

Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on

osteoclasts: tildronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995;17:137-44.

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;38:617-627.

Otomo-Corgel J. Implants and oral bisphosphonates: Risky Business? *J Periodontol* 2007;78(3):373-6.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.

Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P. et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36:52-60.

Reddy GT, Kumar TMP. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. *Drug Delivery* 2005;12:217-222.

Russel RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733-759.

Skoglund B, Holmertz J, Aspenberg P. Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J Orthop Res* 2004;22:1108-1113.

Stadelmann VA, Terrier A, Gauthier O, Bouler JM, Pioletti DP. Prediction of bone density around orthopedic implants delivering bisphosphonate. *J Biomech* 2009;42:1206-1211.

Stadlinger B, Korn P, Todtmann N, Eckelt U, Range U, Burki A et al. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. *Eur Cell Mater* 2013;25:326-340.

Truhlar RS, Orenstein IH, Morris HF, Ochi S. Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(12):38-45.

Tsetsenekou E, Papadopoulos T, Kalyvas D, Papaioannou N, Tangl S, Watsek G. The influence of alendronate on osseointegration of nanotreated dental implants in New Zealand rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2011;10.1111/j.1600-0501.2011.02189.x.

Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137:2324-33.

Vohra F, Al-Rifaiy MQ, Almas K, Javed F. Efficacy of systemic bisphosphonate delivery on osseointegration of implants under osteoporotic conditions: lessons from animal studies. *Arch Oral Biol* 2014;59:912-920.

Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. *Biomaterials* 2001;22:709-715.

Yoshinari M, Oda Y, Inoue T, Matsuzaka K, Shimono M. Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials* 2002;23:2879-2885.

ANEXO A – Aprovação da Comissão Científica e de Ética – FO/PUCRS



Comissão Científica e de Ética
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 29 de maio de 2013

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0025/13

Intitulado: Influência da aplicação local de bisfosfonato na remodelação óssea ao redor de implantes osseointegráveis instalados em tibia de coelho.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Luciana Mayumi Hirakata

Pesquisadores Associados: Magáli Beck Guimarães

Nível: Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 29 de maio de 2013.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS.

Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – PUCRS.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 89/13 - CEUA

Porto Alegre, 05 de novembro de 2013.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00344, intitulado "Influência da aplicação local de bisfosfonato na remodelação óssea ao redor de implantes osseointegráveis instalados em tibia de coelho".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, esta autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouça), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

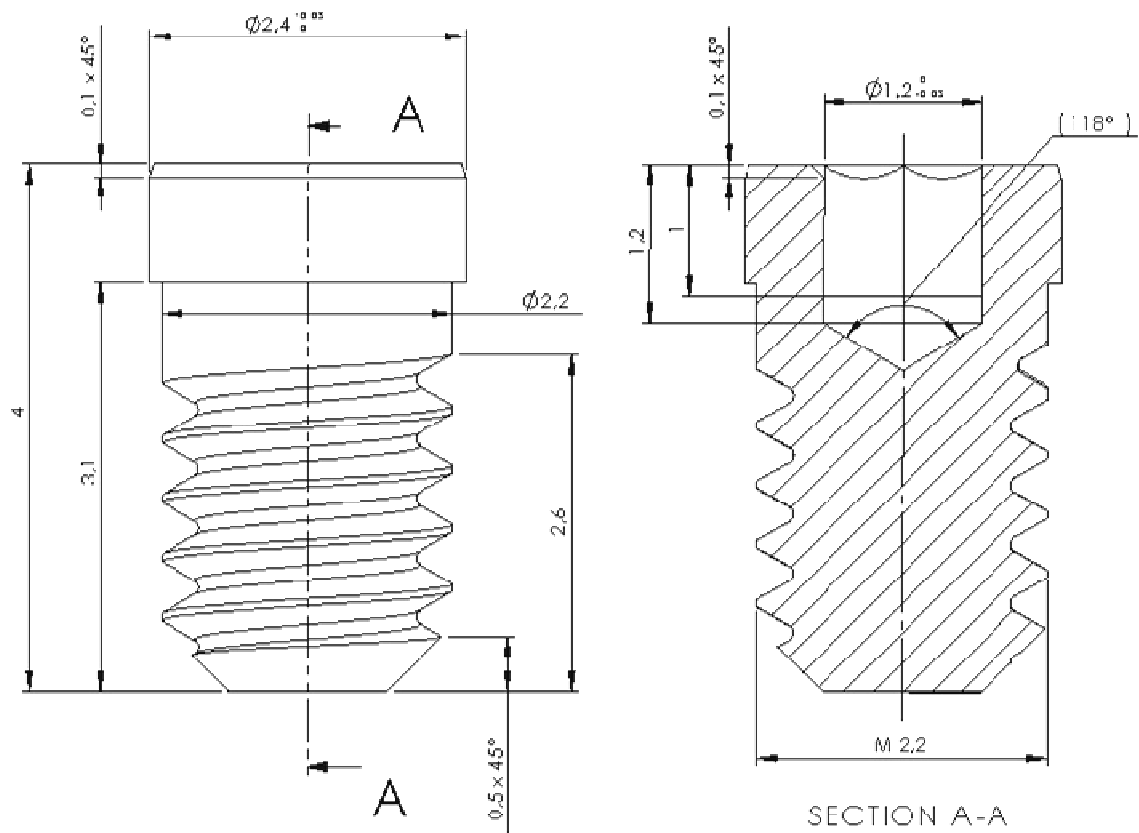
Ilma. Sra.

Profa. Luciana Mayumi Hirakata

FO

Nesta Universidade

ANEXO C – Croqui do implante utilizado.



ANEXO D – Artigo científico

O artigo a seguir intitula-se “*Influência da aplicação local de gel de alendronato de sódio na osseointegração de implantes de titânio*” e foi escrito nas normas do Periódico *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* – Qualis A1 – Fator de Impacto: 1.359 - ISSN: 0901-5027.

INFLUENCE OF LOCAL APPLICATION OF SODIUM ALENDRONATE GEL ON
OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANTS

GUIMARÃES, Magáli Beck; BUENO, Rodrigo Salbego; BLAYA, Micéli Beck
Guimarães; SHINKAI, Rosemary Sadami Arai; MARQUES, Luciana Mayumi
Hirakata.

Department of Prosthodontics. Faculty of Dentistry. Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 6. Zip Code: 90619-900. Porto
Alegre, RS – Brazil.

Corresponding Author:

Magáli Beck Guimarães. Pós-Graduação - Odontologia. Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 6. Zip Code: 90619-
900. Porto Alegre, RS – Brazil. Telephone: +55.51.33203538. Fax: +55.51.33203626.
E-mail: magaliguimaraes@gmail.com

Keywords: Diphosphonates; Osseointegration; Bone remodeling; Dental Implants.

Short Title: Bisphosphonate in Implant Dentistry.

ABSTRACT

The aim of this study was to make a comparative analysis of aspects related to the osseointegration of titanium implants placed with and without local application of a bisphosphonate agent, after 4 weeks, *in vivo*. The study comprised the placement of 50 cp. titanium implants in the middle third of the tibia of 10 rabbits, with the right tibia being used as control, and the left as test site. In the test group, local administration of sodium alendronate gel was instituted, and in the control group, sterile saline solution was used. After euthanasia, 10 implants from each group were analyzed for maximum removal torque. The remainder of the sample was processed to obtain non decalcified slides with approximately 30 μ m thick, in which histomorphological and histomorphometric analyses of bone-implant contact (%BIC) were performed. Data were analyzed at a level of significance of 5%. The removal torque of the test group, on an average, were half of the values obtained in the control group. The test group showed lower percentage of BIC, and notable changes in bone quality. It was concluded that the initial events of osseointegration of titanium implants are not favored by the local application of sodium alendronate gel in rabbits.

INTRODUCTION

Over the last few decades, there has been considerable growth in the demand for replacement of lost teeth by means of therapy with dental implants and implant-supported dentures. Among other reasons, this is due to the fact that either partial or complete edentulism affects a large portion of persons in the more advanced age group, a steadily growing part of the population worldwide. These patients frequently present a profile of bone quality and quantity affected by systemic diseases, such as diabetes and osteoporosis, in addition to presenting lower potential bone regeneration, which may contribute to lower success rates in therapy with dental implants². On the other hand, the desire to attain faster osseointegration is common in both health professionals and patients. This motivates researches that seek improvements in the development of materials and techniques related to optimization of the process of bone remodeling around dental implants.

During implant placement surgery, the decision about whether or not to apply immediate load is determined, among other aspects, by the primary stability of the implant in bone tissue. In cases in which there is no primary stability during dental implant placement, the professional is recommended to wait during the period of osseointegration without application of functional load, following the protocol of two surgical stages³. Therefore, in this scenario it becomes important to accelerate the process of osseointegration, so that less time will be required between implant placement surgery, and re-opening for connection of the prosthetic abutments.

The interest in using bisphosphonates as bone biomodulators in implant dentistry arose by the known ability of this drug to inhibit the activity of osteoclasts, which is why it is widely used in the treatment of diseases characterized by excessive bone resorption, such as osteoporosis, hypercalcemia and bone metastases⁴. Furthermore, it is

known that an effect on bone formation may be expected, promoting a considerable reduction in bone turnover⁵. Studies have suggested that bisphosphonates may have a positive influence on bone formation and remodeling, and consequently an improvement in the fixation of titanium implants in humans^{6,7}.

Because of the severe side effects caused by the systemic use of this drug⁸⁻¹¹, researchers have turned their attention to developing methods of local delivery of this drug to the site of interest¹²⁻¹⁶. The intention is for bisphosphonate to positively influence the remodeling of bone adjacent to the implant, without causing undesirable systemic side effects. In this sense, immobilization of the bisphosphonate on the implant surface has been proposed, as a way of local delivery of the drug¹⁷⁻²¹. However, to perform this immobilization, a complex methodology and sophisticated equipment are frequently required. The direct application of bisphosphonate in the surgical alveolus immediately before implant insertion, appears to be a simpler and more practical procedure, however, up to now, it has not been extensively tested^{13,22,23}.

Therefore, the aim of this study was to propose the local application of a bisphosphonate drug (sodium alendronate) in gel form, directly in the surgical site, and make a comparative evaluation of aspects related to osseointegration of titanium implants inserted immediately after this application, *in vivo*. As a null hypothesis, it was admitted that the local application of sodium alendronate gel did not favor the osseointegration of titanium implants placed in rabbit tibias.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Groups

Ten rabbits of the *Oryctolagus cuniculus* species, *New Zealand* lineage, adult males, with a mean body weight of 4.0kg were used in this research. The study was approved by the ethics committee of the university, and the animals received all the care stipulated by the institution.

A total of 50 implants were inserted in the sample, with the right tibia being used as control, and the left, as test site. In the control group, the surgical alveoli performed in the right tibia of each animal, received an application of sterile saline solution. In the test group, characterized by the surgical alveoli performed according to a previously published study²⁴, in the left tibia of each rabbit, a topical application of 1 ml of sodium alendronate gel (10mg/g) was administered.

Surgical Procedure

After being weighed, the animals received pre-anesthesia medication, composed of acepromazine maleate (0.2mg/kg) and morphine sulphate (2mg/kg), both administered intramuscularly. After approximately 10 minutes had elapsed, the animals' marginal ear vein was cannulated for the administration of fluid therapy with Lactated Ringer solution and Enrofloxacin (10mg/kg), 20 minutes before surgery. Anesthesia was induced by means of intravenous injection of ketamine chloride (10mg/kg) and 1mg midazolam (1mg/kg). Epidural anesthesia was administered with 2% lidocaine (0.25 ml/kg). After anesthesia induction, the animals were trichotomized and antisepsis of the region was performed, including the skin adjacent to the trichotomized area.

Surgery began with a linear incision, measuring approximately 2cm in extension, on the medial diaphysal surface of the tibia. The sites where the surgical recesses were performed were previously demarcated, with the perforations positioned 10 mm below the tibial condyle, with a distance of 10mm between each perforation. Cutting for implant insertion was performed with appropriate burs, under irrigation, up

to a depth of 4 mm, in the sequence of using a 2mm lance-shaped bur and then a helical bur.

After the cavities were prepared, sterile gauze was introduced and kept in the surgical alveolus by compression for 1 to 2 minutes, with the purpose of absorbing and stopping the bleeding. This process guaranteed that the bisphosphonate gel would come into direct contact with the entire wall of the alveolus, without the interposition of blood. The quantity of 1ml of sodium alendronate - test group - was injected in the surgical alveolus immediately before placement of the implant^{22,25} (Figure 1a).

After this, the implants were inserted (Figure 1b). Commercially pure titanium implants were used, with surface treated with acid (Porous Nano; ConexãoSistemas de Prótese, Brazil), 2.2mm in diameter and 4.0mm long, specifically fabricated for this study. The implants were inserted at a speed of 35 rpm, until they reached bone level.

To finalize, the muscle and subcutaneous tissues were approximated with continuous sutures and the skin was approximated with simple, interrupted sutures, using reabsorbable suture thread (Catgut 4.0, Johnson & Johnson/Ethicon, Sommerville, USA). The region was cleaned with gauze dampened with physiological solution, to remove the residues of blood clots, and the animals received an occlusive dressing with a gauze bandage.

During the post-operative period, each animal received analgesic medication with tramadol hydrochloride (2mg/kg) via the subcutaneous pathway, every 8 hours, for 3 hours. Antibiotic therapy was administered via intramuscular injection of enrofloxacin (10mg/kg), every 24 hours for 7 days.

Euthanasia of Animals

To perform euthanasia each animal received pre-anesthetic medication composed of Acepromazine maleate (1 mg/kg) ketamine hydrochloride (15mg/kg), and xylazin hydrochloride, all administered intramuscularly. Passed around 10 minutes, the reflexes such as palpebral, corneal and pain were absent. With the animal in a plane of deep anesthesia, a 10% potassium chloride solution was administered intravenously until cardiorespiratory function ceased. Euthanasia occurred after the pre-established period of post-operative life of 28 days.

Removal Torque Measurement

For measurement of the maximum removal torque of each implant, the specimens were processed immediately after removal of the tibia. Firstly, the tibias were kept in a 10% buffered neutral formalin solution, and after 1 hour, were submitted to the torque removal test, thus they did not become dehydrated. The anatomic part was carefully placed on the torque test equipment– CME (Técnica Industrial Oswaldo Filizola, Guarulhos, Brazil), completely controlled by the software program DynaView Torque Standard/Pro M, generating the values automatically at a speed of 1rpm and angular measurement of the system with a resolution of 0.002°. The maximum torque measurements to begin the inverse rotation were recorded, and the mean torque values were calculated for each group.

Histomorphological and Histomorphometric Analyses

The bone blocks containing the implants were gradually dehydrated in successive concentrations of alcohol, and the sample was imbibed in methacrylate-based resin (EMBed-812, Embedding Kit, EMS, Hatfield, PA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The blocks were then cut into slices approximately 300µm thick. with the center of the implant facing in the direction of its long axis, using a diamond-coated disc in a metallographic cutter (Model DTQTM5, Pantec®, São Paulo,

Brazil). After this, the samples were bonded to an acrylic plate with acrylate-based cement, and left to dry for 24 h before the stripping and finishing processes. The sections were reduced to a final thickness of approximately 30 μ m, with the use of a series of water abrasive papers (400, 600, 800, 1200 and 2400 grit) (3M do Brasil, São Paulo, Brazil) in a polishing machine (Polipan 2, Pantec®, São Paulo, Brazil) under irrigation with water. Finally the sample was stained with fuchsin and taken for analysis under an optical microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

All the bone-implant histological cuts were analyzed histomorphologically, in order to establish the general tissue characteristics in the osseointegration process in each group, by means of observing the neoformed bone tissue and its typical cell elements. An endeavor was made to record the regions of the implants with the strongest evidence of osseointegration and to evaluate the process of covering the implant spirals with bone tissue.

The histomorphometrical analysis was performed according to bone-implant contact (%BIC), determined at 50-200X magnification, by means of a software program (Image Tool® for Windows, version 5.02). The bone implant contact regions along the perimeter of the implant were subtracted from the total implant perimeter, and calculations were made to determine the percentage of BIC.

Statistical Analysis

The maximum removal torque values were compared between the groups by means of the paired Student's-*t* test. For the bone-implant contact results, the intraclass correlation coefficients (ICC) were first calculated, in order to verify the reproducibility of the evaluation. After this, the implant-bone contact percentages were compared between the groups with the use of the Generalized Estimating Equations (GEEs) with

the correlations matrix permutable in the measurements in one and the same rabbit. All the tests were considered with a level of significance of 5% (SPSS, version 20.0).

RESULTS

Maximum Removal Torque

Table 1 shows the maximum removal torque values in the test group were, on an average, half the value they were in the control group ($p < 0.001$).

Histomorphological Analysis

The qualitative evaluation of the histological slides demonstrated that the most cervical portion of all the implants passed through the tibial cortical bone, and the apical portion was in contact with medullary bone (Figure 2).

In the control group, histological analysis showed bone neoformation in the areas adjacent to the implant surfaces, with locations of bone remodeling, showing evidence of a structural arrangement similar to that of the lamellar region. Close to the implant, a large quantity of voluminous osteocytes were observed located within wide gaps. Closer to the implant, immature bone trabeculae with innumerable large and voluminous osteoblasts were observed. The difference in staining- more intensely stained areas - revealed more recently formed bone tissue, which was found particularly in the regions between the implant spirals (Figure 3).

In the majority of specimens in the test group, the histological analysis showed absence of bone neoformation in the areas adjacent to the implant surfaces, with sites of bone remodeling close to the top of the spirals and more cervical portion of the implant. In the majority of samples, granular tissue was observed filling the spaces between the spirals (Figure 4).

Histomorphometric Analysis

Reproducibility of the measurements between examiners was shown to be high (ICC=0.993), with the repeatability (error) between evaluators being lower than 1% (0.90%) (Table 2).

Graph 1 confirms the results presented in Table 2, demonstrating that there was no evident trend in the differences between the evaluations of the examiners, and that the mean difference among them was very close to zero.

The mean BIC values in the control group were approximately 2.5 times higher than they were in the test group, showing a statistically significant difference ($p < 0.001$) (Table 3).

DISCUSSION

It is imperative to evaluate the interfaces between bone tissue and osseointegratable implants, in the development of new techniques and material related to implant dentistry. The results of *in vitro* studies cannot be extrapolated to the *in vivo* situation; at the same time, animal models are necessary for the pre-clinical tests of these materials before they are used in humans. Following this line of thinking, the present study was designed on an animal model, with the goal of evaluating parameters related to the osseointegration of titanium implants in the presence of a bisphosphonate,

The choice of the rabbit as animal model was made, based on the observation of some important facts already known in the scientific medium: ease of handling, size of

animal, early bone maturity, composition of the bone moderately similar to that of humans in bones with primary growth²⁶

In these animals, the international pattern for biologic evaluations of medical devices recommends a maximum of 6 implants (3 controls and 3 tests) per rabbit, and these devices must, approximately, be a maximum of 2 mm in diameter and 6mm long²⁷. These recommendations were observed in this study.

The influence of the use of bisphosphonates in implant dentistry has been exhaustively researched at present, with both systemic²⁸⁻³⁰, and local use by means of direct application in the surgical alveolus^{13,22,23,25} or by immobilization of the medication on the implant surface^{7,15,16,19-21}. In this study, the proposal of local application of bisphosphonate was justified by the intention to benefit from its biomodulating influence on osseointegration without, however, suffering the possible systemic effects of this drug⁸⁻¹¹. This was done, considering that locally applied bisphosphonate remains concentrated on the tissues around the application, and is not systemically distributed³¹.

The test implants were inserted immediately after local application of a bisphosphonate gel. Some studies have analyzed the local influence of this drug on osseointegration by means of applying it in the form of a solution^{13,22,23}. The choice of the presentation in gel form was due to the care taken to contain the drug in the surgical alveolus, and keep it in contact with the bone walls during implant placement. The intention was to prevent bias in case the results were equal in the two groups: due to the possibility of the drug not being really tested because it had completely extravasated.

The gel formulation applied in this test meticulously followed the one described by Reddy and Kumar²⁴, of which the properties were adequately tested. As a result, the authors reported that sodium alendronate was uniformly distributed throughout the

content of the gel, and did not demonstrate chemical reaction with the excipients of the formula. The gel presented adequate viscosity for application by means of syringes, and the not favor the growth of microorganisms after being sterilized. This gel, tested in humans in periodontal therapy, was shown to have a powerful effect on the inhibition of bone resorption and increase in bone neoformation.

According to Fleisch³², non nitrogenated bisphosphonates, such as etidronate and clodronate, require very high doses in order to attain the potential of resorption inhibition; indeed, the same doses as those that harm physiological mineralization. The development of nitrogenated bisphosphonates, as in the case of alendronate, has resolved this problem: they are compounds up to 10,000 more powerful in resorption, but with the great difference in inhibition of mineralization, and have been shown to be more adequate for purposes such as helping with osseointegration, for example.

However, in a recent publication, Manzano-Moreno *et al*³³ affirmed that low doses of the nitrogenated bisphosphonates researched, among them alendronate, are capable of exerting their effect on osteoblasts, altering their physiology and diminishing their bone formation capacity by inhibiting their differentiation and maturation, which may explain the harm to the reparative capacity of these cells. This harm to bone remodeling would be an explanation for the worse osseointegration results with the local application of sodium alendronate found in this study.

Furthermore, by means of histomorphological analysis it was demonstrated that the implants inserted were exclusively located in cortical bone tissue, because of the characteristics of the animal model used. Cuairán *et al*²³, after 8 weeks, observed significantly more cortical bone around the implants of the control group than around those in which bisphosphonate was applied, contrary to the situation observed in trabecular bone. The authors concluded that bisphosphonate would have a positive

effect on trabecular bone and a negative effect on cortical bone. This fact corroborates the negative removal torque results for the bisphosphonate group in the present study.

When dental implants are inserted in bone tissue, damage is caused to this tissue by the use of the burs indicated, and bone microfractures and necrosis may be generated in the entire adjacent tissue area. This damaged bone tissue must be remodeled by events of resorption and neoformation³⁴. According to Russel *et al*³⁵, the bisphosphonate injected is expected to cause inhibition or restriction of osteoclastic activity. Since osteoblastic activity is closely related to osteoclastic activity, it is reasonable to assume that bone remodeling could be harmed by the presence of this drug in these conditions³⁵. This could explain the significantly worse histomorphometrical and visibly altered histomorphological results found in the group tested in this research.

The study of Jakobsen *et al*³⁶ tested the osseointegration of endosseous implants inserted with a gap of 2.5mm, which was filled with an allogeneous graft imbued in a bisphosphonate, in different concentrations. In their results, both the control and the group with a low concentration of bisphosphonate had better fixation when compared with the other groups; while the group with the highest concentration had the highest potential for inhibiting bone resorption. Thus, an increase in the fraction of bone volume cannot be correlated with an increase in biomechanical fixation. This contrast clearly indicates that the beneficial effect of the drug is dose-dependent, and that the unfeasible maintenance of bone tissue may not result in the expected objective, since bone remodeling fundamentally requires the effect of resorption in order to occur.

The relevant literature, although vast, does not use standardized methodology for comparison of results, and varies both in the type of bisphosphonate used and in the form of presentation, administration pathway, animal model, secondary variables and

evaluative tests. It is important to point out that Stadelmann *et al*³⁷ developed a model of bone remodeling around implants, carriers of bisphosphonates for local release, taking into consideration the mechanical stimulus of the drug, in order to obtain a predictable result. The authors related that although the present scientific results are based on empirical choices, it is possible to obtain predictability if the type of bisphosphonate, dose and animal model adopted were taken into consideration.

Visibly there is contrast between the results found in current literature and those reported in this study. The large majority of studies that tested local application of bisphosphonates reported there was improvement in implant fixation with an increase in peri-implant bone density^{12,15,16,18,19,21,23}, positive results osteoblastic cell activity^{38,39}, increase in primary stability^{6,7,23}, and a greater degree of bone-implant contact^{13,21,40}. However, it is believed that this may be due to a publication bias, favorable to positive results in the group tested. It is important for all scientific reports, without any distinction whatever, based on correctly designed studies, to be published in periodicals of the highest impact factor, so that all the information with respect to a product tested may be accessed by the largest possible number of reasons. In addition this would facilitate analysis by researchers who seek to conduct systematic review and meta-analyses about the subject.

In this study, both the evaluation of removal torque and the histomorphometric and histomorphological analyses showed worse results for the group in which drug intervention was performed. This coherence among the biomechanical and histological findings reinforces the results as a whole and is the basis of the conclusion generated. However, it is important to point out that this was a pre-clinical study, in which only one type of bisphosphonate was tested in a single concentration, punctually after 4 weeks, *in vivo*. A great deal remains to be elucidated on this subject, particularly with

respect to the applicability in humans, since the clinical scenario has as yet been little explored in the current scientific literature.

The methodology used for conducting this experiment, starting with the analyses performed, allows one to conclude that the local application of sodium alendronate gel harmed the osseointegration of titanium implants installed in rabbit tibias, confirming the null hypothesis. The local application of this drug acted in diminishing the percentage of bone-implant contact and maximum removal torque values, in addition to having a visibly negative influence on bone remodeling around the implants inserted.

ACKNOWLEDGMENTS

No conflicts of interest.

All authors of this paper have read and approved the final version submitted. All authors of this paper have agreed to the submission to International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.

REFERENCES

1. Muller F. Interventions for edentate elders - what is the evidence? *Gerodontology* 2014;31(Suppl.1):44-51.
2. Truhlar RS, Orenstein IH, Morris HF, Ochi S. Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(12):38-45.
3. Misch CE, Wang HL. Immediate occlusal loading for fixed prostheses in implant dentistry. *Dent Today* 2003;22(8):50-6.
4. Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonates as anticancer drugs. *N Engl J Med* 1998;339:398-400.
5. Allgrove J. Bisphosphonates. *Arch Dis Child* 1997;76:73-75.
6. Abtahi J, Tengvall P, Aspenberg P. Bisphosphonate coating might improve fixation of dental implants in the maxilla: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:673-677.
7. Abtahi J, Tengvall P, Aspenberg P. A bisphosphonate-coating improves the fixation of metal implants in human bone. A randomized trial of dental implants. *Bone* 2012;50:1148-1151.
8. De Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D, Pryor-Tillotson S, Seleznick NJ, Pinkas H, Wang KK. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 1996;335(14):1016-21.
9. Bedogni A, Bettini G, Totola A, Saia G, Nocini PF. Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery: a case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:1662-66.

10. Goss A, Bartold M, Sambrook P, Hawker P. The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: A south australian case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:337-343.
11. Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Schwartz-Arad D, Peleg O, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. *J Oral MaxillofacSurg* 2010;68:790-796.
12. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli PY, Bouler JM, Gauthier O. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36:52-60.
13. Jakobsen T, Baas J, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. Local bisphosphonate treatment increases fixation of hydroxyapatite-coated implants inserted with bone compaction. *J Orthop Res* 2009;27(2):189-194.
14. Li YF, Li XD, Bao CY, Chen QM, Zhang H, Hu J. Promotion of peri-implant bone healing by sistemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporos Int* 2013;24:1063-1071.
15. Harmankaya N, Karlsson J, Palmquist A, Halvarsson M, Igawa K, Andersson M, Tengvall P. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta Biomaterialia* 2013;9:7064-7073.
16. Bobyn JD, Thompson R, Lim L, Pura JA, Bobyn K, Tanzer M. Local alendronic acid elution increases net periimplant bone formation: a micro-CT analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:687-694.

17. Yoshinari M, Oda Y, Ueki H, Yokose S. Immobilization of bisphosphonates on surface modified titanium. *Biomaterials* 2001;22:709-715.
18. Lee SJ, Oh TJ, Bae TS, Lee MH, Soh Y, Kim BI, Kim HS. Effect of bisphosphonates on anodized and heat-treated titanium surfaces: an animal experimental study. *J Periodontol* 2011;82:1035-1042.
19. Moon SH, Lee SJ, Park IS, Lee MH, Soh YJ, Bae TS, Kim HS. Bioactivity of Ti-6Al-4V alloy implants treated with ibandronate after the formation of the nanotube TiO₂ layer. *J Biomed Mater Res* 2012;100B:2053-2059.
20. Guimarães MB, Bueno RS, Blaya MBG, Hirakata LM, Hubler R. Diphosphonate immobilization on hydroxyapatite-coated titanium – Method Description. *Implant Dent* 2013;22(4):356-359.
21. Stadlinger B, Korn P, Todtmann N, Eckelt U, Range U, Burki A, Fergusson SJ, Kramer I, Kautz A, Schnabelrauch M, Kneissel M, Schlottig F. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. *Eur Cell Mater* 2013;25:326-340.
22. Skoglund B, Holmertz J, Aspenberg P. Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J Orthop Res* 2004;22:1108-1113.
23. Cuairán C, Campbell PM, Kontogiorgos E, Taylor RW, Melo AC, Buschang PH. Local application of zoledronate enhances miniscrew implant stability in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2014;145:737-49.
24. Reddy GT, Kumar TMP. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. *Drug Delivery* 2005;12:217-222.

25. Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. Effect of topical alendronate treatment on fixation of implants inserted with bone compaction. *Clin Orthop Relat Res* 2006;444:229-234.
26. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.
27. International Standard ISO 10993-6. *Biological evaluation of medical devices – Part 6*. 1994:1-11.
28. Ayan M, Dolanmaz D, Mihmanli A, Ayan A, Kurkçu M. The effect of sistemically administrated zoledronic acid on the osseointegration of dental implants. *Oral Diseases* 2012;18:802-808.
29. Chen B, Li Y, Yang X, Xu H, Xie D. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 2013;24:2115-2121.
30. De Oliveira MA, Asahi DA, Silveira CAE, Lima LAPA, Glick M, Gallottini M. The effects of zoledronic acid and dexamethasone in osseointegration of endosseous implants: histological and histomorphometrical evaluation in rats. *Clin Oral Impl Res* 2014;0:1-5.
31. McKenzie K, Bobynd JD, Roberts J, Karabasz D, Tanzer M. Bisphosphonate remains highly localized after elution from porous implants. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:514-522.
32. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002;4:30-34.
33. Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E, Reyes-Botella C, Ruiz C, García-Martínez O. Nitrogen-containing bisphosphonates modulate the antigenic profile and inhibit the maturation and biomineralization potential of

- osteoblast-like cells. *Clin Oral Invest* 2014; [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s00784-014-1309-z
34. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implant. *Clin Oral Impl Res* 2003;14(3):251-62.
35. Russel RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733-759.
36. Jakobsen T, Baas J, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. The effect of soaking allograft in bisphosphonate. A pilot dose-response study. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:867-874.
37. Stadelmann VA, Terrier A, Gauthier O, Bouler JM, Pioletti DP. Prediction of bone density around orthopedic implants delivering bisphosphonate. *J Biomech* 2009;42:1206-1211.
38. Goto T, Kajiwara H, Yoshinari M, Fukuhara E, Kobayashi S, Tanaka T. In vitro assay of mineralized-tissue formation on titanium using fluorescent staining with calcein blue. *Biomaterials* 2003;24:3885-3892.
39. Beuvelot J, Portet D, Lecollinet G, Moreau MF, Baslé MF, Chappard D, Libouban H. In vitro kinetic study of growth and mineralization of osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surface coated with a RGD functionalized bisphosphonate. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009;90B:873-881.
40. Yoshinari M, Oda Y, Inoue T, Matsuzaka K, Shimono M. Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials* 2002;23:2879-2885.

TABLES

Table 1. Maximum removal torque according to group and results of comparative test.

Group	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	N	p
Control	17.86	5.15	17.9	10.1	25.3	10	<0.001
Test	8.73	2.86	7.9	5.9	14.2	10	

Table 2. Description of percentages of bone-implant contact for each examiner, and result of reproducibility between examiners.

Examiner	Mean	SD	N	CCI	IC (95%)		Repeatability
					Lower	Upper	
1	17,2	10,6	30	0,993	0,985	0,997	0,90
2	17,2	10,1	30				

Table 3. Description of bone-implant contact according to group evaluated by Examiner 1, and result of comparative test.

Group	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	N	p
Control	24,55	8,59	23,25	11,33	48,08	15	<0,001
Bisphosphonate	9,77	6,53	9,00	2,06	26,33	15	

CAPTION TO ILLUSTRATIONS

Figure 1 - Local application of bisphosphonate gel and b) immediate insertion of titanium implant.

Figure 2 – Positioning the implants in tibial cortical and medullary bone. Magnification 20X.

Figure 3 – Bone-implant interface of control group in cortical bone region, demonstrating more intense bone activity close to the implant body, with presence of recently formed bone (region with more intense coloring), voluminous osteocytes in wide gaps (-->) and large and voluminous osteoblasts in contact with the implant surface(+). Magnification 40X.

Figure 4 – Bone-implant interface of the test group in the cortical bone region, demonstrating low bone activity located almost only in the region at the top of spirals, and most cervical region of the implant, with presence of granular tissue filling the space between spirals (+). Magnification: 40X.

Graph 1 - Bland-Altman Graph of measurements between examiners.

ANEXO E – Normas do Periódico *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants.*

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms>. A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload the declarations page ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest, and to indicate whether ethical approval and patient consent were sought. Lastly you must confirm that all authors have agreed to the submission.

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content (3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the

paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. ([pdf version](#) or [word version](#)) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at [↗](http://www.elsevier.com/fundingbodies) <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at [↗](http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf) <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: [↗](http://www.elsevier.com/authorsrights) <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

Any manuscript concerned with human subjects, medical records, or human tissue that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles stated in the Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and as amended most recently by the 64th World Medical Assembly, Fontaleza, Brazil, October 2013.

The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. *If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.*

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. *Please take careful note of the maximum length where applicable.* Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

Criteria for Publication

- Papers that will be considered for publication should be:
- focused
 - based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
 - well written in simple, scientific English grammar and style
 - presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
 - Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within **3 months**; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

Format

Observational or Case Cohort Studies, as well as Case Series must be presented in conformance with STROBE guidelines: ➔ www.strobe-statement.org

Randomized Controlled Trials must be presented in conformance with CONSORT guidelines: ➔ www.consort-statement.org

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be presented according to PRISMA guidelines: ➔ www.prisma-statement.org

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page
- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information:

- title of the article
- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent
- sources of support in the form of grants
- key words.

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references
- Should be written in the past tense
- Include exact

technical specifications, quantities and generic names • Limit the number of subheadings, and use the same in the results section • Mention statistical method • Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results • Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data • Show how results agree/contrast with previous work • Discuss the implications of your findings • State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK).

The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov/uk) .

When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. *Fundamentals of oral surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: *Fluorine chemistry*. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. ↗ <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and numbered correspondingly. **The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.**

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. **The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.**

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit ↗ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free

from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html>. There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.
5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.

ANEXO F – Submissão do artigo científico.

International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: magaliguimaraes@gmail.com
Switch To: Author | Go to: My EES Hub

Version: EES_2014.7

Submissions Being Processed for Author Magáli Beck Guimarães

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail		INFLUENCE OF LOCAL APPLICATION OF SODIUM ALENDRONATE GEL ON OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANTS	13 Oct 2014	13 Oct 2014	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions | About Us

Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our Cookies page.

20:10 12/10/2014

1 de 7

Submission Confirmation for INFLUENCE OF LOCAL APPLICATION OF SODIUM ALENDRONATE GEL ON OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANTS

Entrada x

International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery <IJOMS@elsevier.com> 20:01 (Há 9 minutos) ☆

para mim ▾

inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Dear Prof. Guimarães,

We acknowledge, with thanks, the receipt of your manuscript submitted to International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijoms/>. Your username is Your username is: magaliguimaraes@gmail.com.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ijoms/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Your paper will then be forwarded to the expert reviewers of the Editorial Board for review. Once the results of the reviewing process are available we will advise you.

Thank you for showing your interest in publishing in the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.

Kind regards,

Jacqui Merrison
IJOMS Editorial Office