

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

**ESTUDO PROSPECTIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS LIGADOS
À REMODELAÇÃO ÓSSEA E O INSUCESSO DE IMPLANTES DENTÁRIOS**

CAMILA EPITÁCIO CRAVO TEIXEIRA

Recife – PE

2014

CAMILA EPITÁCIO CRAVO TEIXEIRA

**ESTUDO PROSPECTIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS LIGADOS
À REMODELAÇÃO ÓSSEA E O INSUCESSO DE IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Recife –PE

2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

T266e Teixeira, Camila Epitácio Cravo.
Estudo prospectivo da associação entre polimorfismos ligados à remodelação óssea e o insucesso de implantes dentários / Camila Epitácio Cravo Teixeira: O Autor, 2014.
67 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Tibério César Uchoa Matheus.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2014.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Implantes Dentários. 2. Polimorfismo Genético. 3. Osteoprotegerina. I. Matheus, Tibério César Uchoa (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2014-147)

TÍTULO DO TRABALHO: ESTUDO PROSPECTIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE
POLIMORFISMOS LIGADOS À REMODELAÇÃO ÓSSEA E O INSUCESSO DE
IMPLANTES DENTÁRIOS

NOME DA ALUNA: CAMILA EPITÁCIO CRAVO TEIXEIRA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 05/06/2014

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. (a) Dr. (a) LIRIANE BARATELLA EVENCIO (Presidente)

Prof. (a) Dr. (a) ALEXANDRE BATISTA LOPES DO NASCIMENTO (1º Examinador)

Prof. (a) Dr. (a) CÁTIA MARIA FONSECA GUERRA (2º Examinador)

Recife –PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Profa. Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Címões Jovino Silveira

Profa. Dra. Silvia Regina Jamelli

Prof. Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof. Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

À minha mãe, que participou tão de perto da realização deste trabalho, e aos irmãos e amigos que puderam colaborar com a construção da dissertação, eu dedico as próximas linhas.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha mãe, Verônica, por tudo que ela significa em minha vida, por toda a ajuda que ela sempre está disposta a oferecer. Obrigada por estar sempre me incentivando e acreditando em mim. Por você tenho o maior amor do mundo.

Ao meu irmão Mariano, sempre muito prestativo e muito amigo, eu sou sua grande admiradora.

Ao meu irmão Victor que foi o grande incentivador para que eu iniciasse essa etapa na minha vida. Agradeço muito pelo seu desejo constante em me ver feliz.

A minhas cunhadas Bárbara e Mariana que já estão há tanto tempo na família, obrigada pela amizade, conselhos e por estimular também a minha vida profissional.

A Diogo, meu namorado, agradeço imensamente a alegria contagiante e o amor tranquilo que fizeram meus dias mais leves e felizes.

Ao meu avô Levi, in memoriam, muito obrigada por ter me ensinado tanto durante o tempo em que esteve comigo. Meu eterno avô-professor sempre preocupado e carinhoso, sempre presente e amigo. Você está diariamente nas minhas melhores lembranças.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, na pessoa do reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e ao programa de pós-graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tibério César Uchôa Matheus, pelo apoio durante todo período do mestrado e por confiar a mim a capacidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira, obrigada pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, sem seu apoio e ensinamentos o seguimento deste trabalho não teria sido possível. Muito obrigada por ceder o laboratório de Genoma da Universidade Federal Rural de Pernambuco e, mais do que isso, por orientar com tanto prazer os passos que foram necessários para a conclusão da fase laboratorial. Sou grata por ter conhecido e trabalhado com pessoas muito boas e dedicadas durante esse período.

Aos professores da pós-graduação em Odontologia da UFPE, obrigada pelas aulas e aprendizado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Joana Paula Maia, obrigada pela disposição em ajudar sempre com o sorriso no rosto e boa vontade nas atitudes.

Aos meus colegas de turma, que me proporcionaram ótimos dias durante todo o tempo em que passamos juntos, além de muito aprendizado em conjunto. Em especial, agradeço a Marília Lins e Silva, pelo carinho, amizade, companheirismo e por não me deixar desistir durante os momentos difíceis.

Aos doutorandos pela disponibilidade em ajudar quando necessário. Em especial a Rodrigo Alves que, mais de perto, transmitiu calma e se empenhou para colaborar na melhoria do trabalho.

Às amigas Raphaella Gonzaga e Karinne Azevedo que ajudaram na realização deste trabalho. Ainda bem que vocês estão por perto e, mesmo quando não estão próximas a mim fisicamente, conseguem se fazer presentes nas atitudes.

Aos pacientes que escolheram participar da pesquisa e puderam retornar a cada nova chamada, sempre dispostos a ajudar e sempre cientes do bem que estavam fazendo para o aprimoramento do conhecimento científico.

Aos meus professores da graduação da Universidade de Pernambuco (FOP/UPE), foram eles os responsáveis por me iniciar no universo da Odontologia e também foram eles que me incentivaram a continuar estudando e buscando conhecimento.

*"Viver é uma questão de rasgar-se e
remendar-se."*

(Guimarães Rosa)

RESUMO

Objetivos: Verificar a relação entre polimorfismos genéticos ligados às citocinas da remodelação óssea osteoprotegerina (OPG) e o ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL), relacionar a presença de polimorfismos em OPG e RANKL com o insucesso clínico dos implantes dentários ao longo do tempo e determinar quais combinações de polimorfismos de OPG e RANKL estão associados ao insucesso de implantes dentários. **Materiais e métodos:** Vinte pacientes de ambos os sexos, maiores de dezoito anos, reabilitados no total com trinta e quatro implantes dentários e avaliados a cada seis meses durante um ano participaram do estudo. Após o exame clínico e radiográfico, os pacientes foram divididos no grupo de insucesso dos implantes, caso um ou mais dos seguintes critérios fossem encontrados: mobilidade; queixas subjetivas persistentes; infecção peri-implantar recorrente com supuração; radiolucência contínua ao redor do implante; profundidade de sondagem ≥ 5 mm e sangramento à sondagem; e grupo de sucesso, se nenhuma das características acima fossem identificadas. Foi coletado sangue periférico para a análise do polimorfismo das citocinas de OPG e RANKL através da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de falha dos implantes em relação ao genótipo de OPG e RANKL. **Conclusão:** Os polimorfismos de OPG e RANKL não influenciam no insucesso dos implantes dentários ao longo do tempo de estudo.

Palavras-chave: Implantes Dentários. Polimorfismo genético. Osteoprotegerina.

ABSTRACT

Objectives: To investigate the relationship between genetic polymorphisms related cytokines in bone remodeling osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), to relate the presence of polymorphisms in OPG and RANKL with clinical failure of dental implants over time and to determine which combinations of polymorphisms of OPG and RANKL are associated with failure of dental implants. **Materials and methods:** Twenty patients of both sexes, over eighteen years, rehabilitated in total with thirty-four dental implants and evaluated every six months for one year participated in the study. After clinical and radiographic examination, the patients were divided in a failure group of the implants, if one or more of the following criteria were found: mobility; persistent subjective complaints; recurrent periimplantitis infection with suppuration; continuous radiolucency around the implant; probing depth \geq 5mm and bleeding on probing; and success group, if none of the characteristics above were identified. Peripheral blood was collected for analysis of cytokine polymorphism of OPG and RANKL by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** There was no statistically significant difference between the failure group of implants in relation to genotype OPG and RANKL. **Conclusion:** The polymorphisms of RANKL and OPG do not influence the failure of dental implants over time during the study.

Keywords: Dental implants. Genetic polymorphism. Osteoprotegerin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Características dos pacientes: faixa etária, sexo, tempo de carga, hábito de tabagismo, genótipos e alelos.	28
Tabela 02 – Avaliação da mobilidade, queixa subjetiva, infecção com supuração, radiolucência, sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem, perda óssea vertical anual e resultado do implante segundo cada tempo de avaliação.	30
Tabela 03 – Avaliação da profundidade de sondagem e de inserção clínica segundo cada tempo de avaliação.	31
Tabela 04 – Avaliação dos resultados dos implantes segundo a variável tabagismo segundo cada tempo de avaliação.	31
Tabela 05 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de OPG.	32
Tabela 06 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de RANKL156.	33
Tabela 07 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de RANKL438.	33
Tabela 08 – Avaliação dos resultados dos implantes segundo o tipo de alelo por genótipo e avaliação.	34

LISTA DE ABREVIACOES

- ARMS - Sistema de amplificação refratária de mutação
- EDTA – cido etilenodiamino tetra-acético
- DNA – cido desoxirribonucleico
- DP – Doença periodontal
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- OPG – Osteoprotegerina
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PGE₂ – Prostaglandina E 2
- PIC – Perda de inserção clínica
- PS – Profundidade de sondagem
- PTH - Paratormônio
- RANK – Ativador do receptor do fator nuclear kappa B
- RANKL – Ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B
- RFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição
- SNP – Polimorfismo de base única
- SS – Sangramento  sondagem
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
- TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
- TNF – Fator de necrose tumoral
- TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
- UTR – Região não traduzida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. ARTIGO	17
3.1 RESUMO	18
3.2 ABSTRACT	19
3.3 INTRODUÇÃO.....	20
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.5 RESULTADOS.....	28
3.6 DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	49
FICHA CLÍNICA	49
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	51
ANEXOS	54
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	54
NORMAS DA REVISTA	57

1. INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são uma realidade e constituem uma excelente opção para reabilitação de indivíduos edêntulo. Sustentando essa afirmação, Tatum (1988) desde essa época já considerava que o objetivo da Odontologia moderna é restabelecer o paciente com conforto, função, estética, fonação e saúde normais. O que torna a implantodontia única é a habilidade em atingir esse objetivo, independentemente da atrofia, doença ou injúria do sistema estomatognático.

A implantodontia vem ganhando, ao longo dos anos, uma enorme aceitação pelos dentistas, devido à possibilidade de reabilitação associada a sua grande taxa de sucesso que, segundo Branemark et al. (1999) chega a 98%.

A taxa de insucesso é pequena em porcentagem, mas torna-se relevante em número absoluto, devido à grande quantidade de implantes instalados e à demanda crescente de indicações. (Pereira, 2007).

Em virtude da grande disseminação da implantodontia, surgiu o aumento do índice de insucesso na área que, segundo o relatório do Consenso do Sexto Workshop Europeu em Periodontia, está relacionado à presença da doença peri-implantar. A mucosite peri-implantar (inflamação restrita a mucosa peri-implantar) é relatada e ocorre em 80% dos indivíduos implantados e a peri-implantite (inflamação peri-implantar com perda óssea adicional) em até 56% dos indivíduos (Lindhe, 2008).

A literatura demonstra que diversos fatores podem estar associados com a falha de implantes osseointegrados. Entretanto, um pequeno número de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (Deas et al. 2002), sugerindo uma incapacidade de cicatrização do hospedeiro. Dessa maneira, parece existir um grupo de risco, indicando que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrado (Junior, 2011). A resposta inflamatória individual ao insulto bacteriano, presente nas doenças ao redor dos implantes, pode ocasionar a evolução ou paralisação da doença, assim como ocorre na periodontite (Seymour, 1991).

Neste momento, pouco se sabe sobre a susceptibilidade genética e polimorfismos relacionados nas complicações peri-implantares (Loss et al. 2008). Estudos avaliando a possível relação entre marcadores do metabolismo ósseo e mucosite peri-implantar ou peri-implantite são escassos. (Arikan et al. 2011). Tendo em vista esses fatos, estudos tentam

associar as concentrações de citocinas no fluido crevicular peri-implantar com o desenvolvimento da doença peri-implantar (Ejeil et al. 2003; Stashenko et al. 2005).

Polimorfismo nos genes responsáveis pela resposta inflamatória tem mostrado ser importante para futuros procedimentos clínicos na periodontia e na implantodontia. Tendo em vista a importância do polimorfismo como fator causal de maior suscetibilidade de indivíduos desenvolverem doença peri-implantar, esse estudo tem como objetivo verificar a relação entre polimorfismos ligados à remodelação óssea com os insucessos dos implantes dentários.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a relação entre polimorfismos ligados à remodelação óssea com os insucessos dos implantes dentários ao longo do tempo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a relação entre polimorfismos genéticos ligados às citocinas da remodelação óssea osteoprotegerina (OPG) e o ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL).

- Relacionar a presença de polimorfismos em OPG e RANKL com o insucesso clínico dos implantes dentários ao longo do tempo.

- Determinar quais combinações de polimorfismos de OPG e RANKL estão associados ao insucesso de implantes dentários.

3. ARTIGO

Estudo prospectivo da associação entre polimorfismos ligados à remodelação óssea e o insucesso de implantes dentários

Camila Epitácio Cravo Teixeira¹

1 – Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Pernambuco.

Autor correspondente:

Camila Epitácio Cravo Teixeira
Programa de Pós-graduação em Odontologia
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária
Recife-PE CEP: 50.670-901
+55 81 2126-8817
camila.cravo@hotmail.com

3.1 RESUMO

Objetivos: Verificar a relação entre polimorfismos genéticos ligados às citocinas da remodelação óssea osteoprotegerina (OPG) e o ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL), relacionar a presença de polimorfismos em OPG e RANKL com o insucesso clínico dos implantes dentários ao longo do tempo e determinar quais combinações de polimorfismos de OPG e RANKL estão associados ao insucesso de implantes dentários. **Materiais e métodos:** Vinte pacientes de ambos os sexos, maiores de dezoito anos, reabilitados no total com trinta e quatro implantes dentários e avaliados a cada seis meses durante um ano participaram do estudo. Após o exame clínico e radiográfico, os pacientes foram divididos no grupo de insucesso dos implantes, caso um ou mais dos seguintes critérios fossem encontrados: mobilidade; queixas subjetivas persistentes; infecção peri-implantar recorrente com supuração; radiolucência contínua ao redor do implante; profundidade de sondagem ≥ 5 mm e sangramento à sondagem; e grupo de sucesso, se nenhuma das características acima fossem identificadas. Foi coletado sangue periférico para a análise do polimorfismo das citocinas de OPG e RANKL através da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de falha dos implantes em relação ao genótipo de OPG e RANKL. **Conclusão:** Os polimorfismos de OPG e RANKL não influenciam no insucesso dos implantes dentários ao longo do tempo de estudo.

Palavras-chave: Implantes Dentários. Polimorfismo genético. Osteoprotegerina.

3.2 ABSTRACT

Objectives: To investigate the relationship between genetic polymorphisms related cytokines in bone remodeling osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), to relate the presence of polymorphisms in OPG and RANKL with clinical failure of dental implants over time and to determine which combinations of polymorphisms of OPG and RANKL are associated with failure of dental implants. **Materials and methods:** Twenty patients of both sexes, over eighteen years, rehabilitated in total with thirty-four dental implants and evaluated every six months for one year participated in the study. After clinical and radiographic examination, the patients were divided in a failure group of the implants, if one or more of the following criteria were found: mobility; persistent subjective complaints; recurrent periimplantitis infection with suppuration; continuous radiolucency around the implant; probing depth \geq 5mm and bleeding on probing; and success group, if none of the characteristics above were identified. Peripheral blood was collected for analysis of cytokine polymorphism of OPG and RANKL by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** There was no statistically significant difference between the failure group of implants in relation to genotype OPG and RANKL. **Conclusion:** The polymorphisms of RANKL and OPG do not influence the failure of dental implants over time during the study.

Keywords: Dental implants. Genetic polymorphism. Osteoprotegerin.

3.3 INTRODUÇÃO

As evidências clínicas da osseointegração transformaram a implantodontia, tornando os implantes osseointegrados a alternativa mais estética e funcional para diversas situações de ausências dentárias (Henry 2005). O conceito de “osseointegração” como uma ancoragem direta de fixação do implante ao redor do osso do hospedeiro é, aparentemente, a característica mais importante para confirmar o sucesso clínico a longo prazo dos implantes dentários (Ekfeldt et al. 2001; Shwartz-Arad et al. 2008).

O sucesso da osseointegração depende de fatores biológicos, como a ausência de infecção, peri-implantite, perda óssea na ausência de infecção e técnicos através da inexistência de sobrecarga e fratura dos componentes (Esposito et al. 1998; Salvi & Bragger 2009).

Apesar de a osseointegração apresentar resultados previsíveis, reproduzíveis e estáveis ao longo do tempo, garantindo um alto índice de sucesso no tratamento com implantes dentários, entre 85 a 94% após 10 anos (Holm-Pedersen et al. 2007), falhas ainda ocorrem. Além disso, o aumento do número deste procedimento ao longo dos últimos anos torna cada vez mais frequente a existência de insucesso e complicações relacionadas (Levin 2010). A percentagem do sucesso diminui para aproximadamente 61% quando critérios mais bem definidos são utilizados para se considerar um implante como bem sucedido (exemplo: o plano de tratamento original é realizado como pretendido sem complicações, todos os implantes colocados permanecem estáveis e funcionando sem problemas, os tecidos duro e mole peri-implantares estão saudáveis e tanto o paciente quanto o profissional estão satisfeitos com os resultados) (Pjetursson et al. 2012).

A integração e manutenção dos implantes dentários ao osso estão relacionadas à contínua renovação do tecido ósseo a partir do processo de reabsorção e neoformação deste tecido duro. Essa remodelação óssea pode ser regulada, positiva ou negativamente, por uma série de fatores como doenças, medicamentos, hormônios sistêmicos (exemplo: paratormônio e calcitonina), citocinas locais [exemplo: interleucinas (IL)-1 e (IL)-6], fatores de crescimento [como o fator de necrose tumoral (TNF)], mediadores do metabolismo ósseo [o ativador do receptor do fator nuclear kappa B (RANK), o seu ligante RANKL e osteoprotegerina (OPG)] (Baioni et al. 2008; Soedarsono et al. 2006) e polimorfismos genéticos. RANKL é uma citocina que pertence à família TNF e é essencial para a osteoclastogênese (Soedarsono et al. 2006). A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína que impede a ativação e produção das

células osteoclásticas através da competição com RANKL pelos receptores de RANK que estão na superfície de pré-osteoclastos/osteoblastos. (Kadkhodazadeh et al. 2013).

Células do ligamento periodontal humano estimuladas com lipopolissacarídeos podem inibir a osteoclastogênese por meio da produção de altos níveis de OPG em vez de RANKL, através da indução de IL-1 β e TNF α . Em contraste, um aumento na concentração de RANKL e uma diminuição nos níveis de OPG foram detectadas no fluido gengival de pacientes com periodontite. Além disso, culturas de osteoblastos expostas a estímulos periodontopatogênicos mostraram um aumento da expressão de RANKL e diminuição da expressão de OPG. Esses mesmos mecanismos podem estar envolvidos no tecido peri-implantar, ou seja, níveis aumentados da citocina OPG podem favorecer o sucesso dos implantes dentários, na medida em que a osteoclastogênese fica reduzida. Ao mesmo tempo, falhas nos implantes podem estar relacionadas a uma maior expressão de RANKL.

Alguns indivíduos que não apresentam nenhum dos fatores de risco até o momento estabelecidos, tendo boa qualidade e quantidade óssea, sem doença sistêmica, sem uso de medicamentos e submetidos a um planejamento cirúrgico-protético adequado, perdem implantes sem justificativas claras. Como uma forma de entender esse acontecimento, o polimorfismo para genes de determinadas citocinas e quimiocinas vem sendo estudado em Implantodontia.

O polimorfismo genético é definido como uma variação na sequência de nucleotídeos localizada numa posição específica na molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) exibindo pelo menos duas variações estruturais (alelos) que ocorrem na população com uma frequência maior que 1% (Taylor et al. 2004). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) representam a forma mais comum de variação do DNA no genoma humano e alelos polimórficos têm sido indicados como causa do aumento da suscetibilidade a doenças humanas complexas. (Trevilatto et al. 2003; Riemenschneider et al. 2006).

Até o momento, pouco se sabe sobre a susceptibilidade genética e polimorfismos relacionados às complicações peri-implantares (Loss et al. 2008). Estudos avaliando a possível relação entre marcadores do metabolismo ósseo e mucosite peri-implantar ou peri-implantite são escassos (Arikan et al. 2011). Levando em consideração esses fatos, estudos tentam associar as concentrações de citocinas no fluido crevicular peri-implantar com o desenvolvimento da doença peri-implantar (Ejeil et al. 2003; Stashenko et al. 2005) e, nesta linha, vem se tentando identificar genótipos/alelos específicos como marcadores de risco para perda de implantes dentários.

Polimorfismo nos genes responsáveis pela reabsorção e neoformação óssea tem mostrado ser importante para futuros procedimentos clínicos na Periodontia e na Implantodontia. Tendo em vista a importância do polimorfismo como fator causal de maior suscetibilidade de indivíduos desenvolverem doença peri-implantar, esse estudo tem como objetivo verificar a relação entre polimorfismos ligados à remodelação óssea e os insucessos de implantes dentários ao longo do tempo.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo coorte de prognóstico terapêutico, no período de novembro de 2012 a novembro de 2013, na clínica odontológica da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizada na cidade do Recife, estado de Pernambuco, situada na região nordeste do Brasil. Um total de 20 pacientes de ambos os sexos e reabilitados no total com 34 implantes dentários unitários participaram da pesquisa. Foram incluídos no trabalho pacientes acima de dezoito anos que tinham sido reabilitados através de implantes dentários unitários da marca Straumann (Basel, Suíça) na clínica odontológica de Pós-Graduação da UFPE um ano antes do início do estudo e que apresentavam saúde periodontal. Esses pacientes foram avaliados após um ano da instalação e função dos implantes, em seguida, foram acompanhados durante mais duas avaliações, um ano e seis meses e dois anos após a reabilitação. Os pacientes com complicação sistêmica como diabetes mellitus, doença periodontal, pacientes que não compareceram às três avaliações, pacientes oriundos de local diferente da clínica odontológica de Pós-Graduação da UFPE ou que tinham implantes de marca diferente da Straumann (Basel, Suíça) foram excluídos do estudo. Todos os envolvidos na pesquisa consentiram previamente a sua inclusão no estudo por meio de assinatura do TCLE, após aprovação do mesmo no CEP-UFPE sob CAAE 03534012.0.0000.5208.

Avaliação Clínica e Radiográfica

Todos os pacientes foram avaliados por um pesquisador previamente calibrado utilizando uma sonda periodontal milimetrada do tipo Carolina do Norte Trinity® (São Paulo, Brasil). Mensurações de profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínica (PIC) foram registradas em quatro pontos centrais (mesial, distal, lingual e vestibular) de cada implante. Foi registrada a presença ou ausência de mobilidade e realizado exame radiográfico periapical pela técnica intrabucal do paralelismo com auxílio de um posicionador.

Os pacientes foram submetidos, nas três avaliações (um ano, um ano e meio e dois anos após instalação dos implantes), ao mesmo exame clínico e radiográfico. Além disso, a cada avaliação, os pacientes receberam orientação de higiene bucal como benefício pela participação no trabalho.

Após o exame clínico e radiográfico os indivíduos foram divididos em dois grupos (Quadro 01). O Grupo de sucesso nos implantes (Grupo-controle) foi considerado como bem sucedido após a aplicação dos critérios que foram agrupados por Ong et al. (2008) que incluem todas as definições de sucesso nos implantes (e também mudança no nível ósseo); e o grupo de insucesso nos implantes (Grupo de estudo) foi considerado quando existiu detecção de um ou mais dos critérios do grupo de insucesso.

Quadro 01: Grupos de Sucesso e Insucesso dos implantes dentários, segundo ONG et al. (2008).

Grupo de Sucesso	Grupo de Insucesso
<ul style="list-style-type: none"> - Ausência de mobilidade (Buser et al. 1990); - Ausência de queixas subjetivas persistentes (dor, sensação de corpo-estranho, disestesia) (Buser et al. 1990); - Ausência de infecção Peri-implantar recorrente com supuração (Buser et al. 1990); - Ausência de radiolucência contínua ao redor do implante (Buser et al. 1990); - Não haver profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ (Mombelli & Lang 1994; Bragger et al. 2001); - Ausência de sangramento à sondagem (Mombelli & Lang 1994). 	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de sangramento à sondagem - Presença de profundidade de sondagem maior ou igual a cinco milímetros. - Presença de radiolucência contínua ao redor do implante - Presença de queixas subjetivas persistentes (dor, sensação de corpo-estranho, disestesia). - Presença de mobilidade. <p>Para peri-implantite:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ com sangramento à sondagem com secreção purulenta e sinais radiográficos de perda óssea (Karoussis et al. 2003).

Obtenção das amostras e isolamento do DNA

No momento da primeira avaliação, na clínica odontológica de Pós-Graduação da UFPE, procedeu-se à coleta de sangue periférico que, em seguida, foi transferido para tubos contendo EDTA. As amostras de sangue foram armazenadas a -20°C para posterior isolamento e análise do DNA.

O DNA foi isolado de amostras de sangue dos participantes, utilizando-se o Kit QIAamp DNA Qiagen® (Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Após o isolamento, o DNA foi mantido a -20°C até o processamento por PCR.

Processamento através da técnica de PCR para OPG

Para a amplificação da região promotora (posição -950) do gene OPG (Brändström et al. 2002) foi utilizado o seguinte par de primer, para avaliação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): sequência forward 5`-CCC AGG GGA CAG ACA CCA C-3` and reverse 5`-GCG CGC AGC ACA GCA ACT T-3` como descrito por Baioni et al. (2008).

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes GoTaq® Green Master Mix^(a,b) (Madison, WI, EUA) com o seguinte protocolo de reação: 10.0µL de água, 1.0µL de primer forward, 1.0µL de primer reverse, 10.0µL de Master Mix e 3.0µL de DNA da amostra, sendo 25.0µL o volume final. Em todas as reações de amplificação, foi utilizada uma reação da amplificação sem amostra de DNA como controle negativo para verificação da possibilidade de contaminação.

O termociclador (Biocycler) foi programado da seguinte maneira: 1ª fase - “hot start” (95° C por 5 minutos); 2ª fase – dividida em três etapas e realizada por 35 ciclos – 1) desnaturação do DNA alvo por aquecimento (95°C por 1 minuto), 2) anelamento do *primer* (57°C por 1 minuto), 3) extensão (72° C por 1 minuto); e 3ª fase - extensão final (72° C por 7 minutos).

Para a análise do polimorfismo pela técnica da restrição do fragmento (RFLP), 5.0µl do produto de amplificação foi submetido à digestão enzimática (Overnight 37° C) com 4U da enzima de restrição HincII PROMEGA (Madison, WI, EUA) em um volume total de 10.0µl.

Após essa etapa, 10.0µl dos produtos da PCR foram adicionados a 8.0µl do corante fluorescente GelRed™ Biotium (Califórnia, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2.5%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100pb ladder (LGC Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese.

O RFLP é formado por uma base única de transição (T/C) do gene de OPG que cria um sítio de restrição para HincII. Os alelos que resultam da clivagem pela HincII são designado “C” (presença de sítio HincII, presença de dois fragmentos de 248pb e 83pb) ou “T” (ausência de sítio HincII, com um fragmento de 331pb) (Baioni et al. 2008).

Processamento através da técnica de PCR para RANKL156 e RANKL438

A amplificação da região promotora do gene RANKL156 (rs9533156) e do gene RANKL438 (rs2277438) foi realizada através da técnica de ARMS-PCR, conforme descrito por Kadkhodazadeh et al. (2013). O gene RANKL156 está situado na região promotora (Assmann et al. 2010) e o gene RANKL438 na posição 5' untranslated region (5'-UTR) (Hsu et al. 2006).

Os primers utilizados foram os seguintes:

rs9533156

ACGCCCTTTACCCTTTTCTCTGCAC[C/T]GTTTTCATCTTTATAAAGTCAGAGT

rs2277438

ATTGTTGGGGACATAAAGACTCTTGC[A/G]AGTATGAATTTTTGTTCTTAAGTC

rs número	Primer do alelo X	Primer do alelo Y	Primer comum
rs2277438	GTTGGGGACATAAAGACTCTTGCA	GGGGACATAAAGACTCTTGCG	CTGCTATTTAATACAGTGTGACTTAAGAA
rs9533156	CCCTTTACCCTTTTCTCTGCACC	CCCTTTACCCTTTTCTCTGCACT	GCCTATAGACCAACTCTGACTTTATAA

As reações de ARMS-PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes

GoTaq® Green Master Mix^(a,b) (Madison, WI, EUA) com o seguinte protocolo de reação: 5.0µL de água, 0.3µL de primer X, 0.3µL de primer comum, 4.4µL de Master Mix e 2.0µL de DNA da amostra, sendo 12.0µL o volume final. O mesmo protocolo acima foi utilizado para o primer Y. Em todas as reações de amplificação, foi utilizada uma reação da amplificação sem amostra de DNA como controle negativo para verificação da possibilidade de contaminação.

O termociclador (Biocycler) foi programado da seguinte maneira para RANKL156: 1ª fase - “hot start” (95° C por 5 minutos); 2ª fase – dividida em três etapas e realizada por 35 ciclos – 1) desnaturação do DNA alvo por aquecimento (95°C por 1 minuto), 2) anelamento do *primer* (55°C por 1 minuto), 3) extensão (72° C por 1 minuto); e 3ª fase - extensão final (72° C por 7 minutos). Para RANKL438: 1ª fase - “hot start” (95° C por 5 minutos); 2ª fase – dividida em três etapas e realizada por 35 ciclos – 1) desnaturação do DNA alvo por aquecimento (95°C por 1 minuto), 2) anelamento do *primer* (53°C por 1 minuto), 3) extensão (72° C por 1 minuto); e 3ª fase - extensão final (72° C por 7 minutos).

Após essa etapa, 5.0µl dos produtos da PCR foram adicionados a 4.0µl do corante fluorescente GelRed™ Biotium (Califórnia, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2.0%. Posteriormente, as corridas de eletroforese foram visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas para posterior análise. A massa molecular padrão 100pb ladder (LGC Biotecnologia, Brasil) foi incluída na corrida da eletroforese.

Análises estatísticas

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais e as medidas estatísticas: média, desvio padrão e mediana (técnicas de estatística descritiva). Além disso, foram utilizados os testes estatísticos: Mc-Nemar para a comparação entre avaliações das variáveis categóricas, F(ANOVA) para medidas repetidas com comparações de Bonferroni e Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher, no caso em que não foram verificadas as condições para utilização do teste Qui-quadrado (técnicas de estatística inferencial). A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5.0%.

Os dados foram digitados na planilha Excel e o programa estatístico utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 21.0.

3.5 RESULTADOS

Vinte e três pacientes compareceram à clínica de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, no entanto, três pacientes foram excluídos por não retornarem às outras duas avaliações subsequentes. O trabalho foi realizado com 20 pacientes que totalizaram 34 implantes os quais foram analisados em três instantes (avaliações).

Resultado por paciente

A idade dos pacientes analisados variou de 25 a 69 anos, teve média de 41.90 anos, desvio padrão de 11.05 anos e mediana de 40.50 anos.

Na Tabela 01 estão os resultados relativos às características dos 20 pacientes participantes da pesquisa. Nesta tabela é possível destacar que exatamente a metade dos pacientes tinham 25 a 40 anos e a outra metade de 41 a 69 anos, um pouco mais da metade (55.0%) era do sexo feminino e todos tinham tempo de carga de um ano. O hábito de tabagismo foi verificado em 10.0% dos pacientes.

No estudo do genótipo de OPG, verificou-se que a maioria (70.0%) dos pacientes tinha o genótipo TT e o restante era TC (20.0%) ou CC (10.0%). Em relação ao genótipo de RANKL156, a maioria (80.0%) era CT, 15.0% CC e um paciente (5.0%) era TT. No estudo do genótipo de RANKL438 a maioria foi AG (75.0%), 20.0% com genótipo GG e um paciente (5.0%) AA.

Na contagem dos alelos, a tabela mostra que em relação ao genótipo de OPG a maioria (80.0%) tinha alelo T e 20.0% restante, do tipo C. No genótipo de RANKL156, mais da metade (55.0%) era do tipo C e 45.0% do tipo T e no genótipo de RANKL438 mais da metade (57.5%) era G e 42.5% do tipo A.

Tabela 1 – Características dos pacientes: faixa etária, sexo, tempo de carga, hábito de tabagismo, genótipos e alelos.

Variável	N	%
• Faixa etária		
25 a 40	10	50.0
41 a 69	10	50.0
• Sexo		
Masculino	9	45.0
Feminino	11	55.0
• Tempo de carga - Um ano	20	100.0
• Hábito de tabagismo		
Sim	2	10.0
Não	18	90.0
• Genótipo OPG		
TC	4	20.0
TT	14	70.0
CC	2	10.0
• Genótipo RANKL156		
CT	16	80.0
TT	1	5.0
CC	3	15.0
• Genótipo RANKL438		
AG	15	75.0
GG	4	20.0
AA	1	5.0
TOTAL	20	100.0
• Alelos- OPG		
T	32	80.0
C	8	20.0
• Alelos- RANKL156		
T	18	45.0
C	22	55.0
• Alelos- RANKL438		
A	17	42.5
G	23	57.5
TOTAL	40	100.0

Resultado por implante

Na Tabela 02 estão presentes os resultados das variáveis: mobilidade, queixa subjetiva, infecção com supuração, radiolucência, sondagem ≥ 5 mm, Sangramento à Sondagem (SS), perda óssea vertical anual e resultados dos implantes (insucesso ou sucesso), segundo a avaliação nos 34 implantes instalados. Com exceção de dois casos de implantes na avaliação 2, em todos os demais casos foi verificada a ausência de mobilidade; não houve

implante associado a queixa subjetiva em nenhuma das avaliações; ausência de infecção com supuração, com exceção de um caso na avaliação 2. Existiu apenas um caso de radiolucência em cada uma das avaliações; a minoria dos implantes apresentaram sondagem $\geq 5\text{mm}$ e as frequências tiveram uma pequena redução a cada avaliação, sendo 17.6% na avaliação 1, 14.7% na avaliação 2 e 11.8% na avaliação 3. A maioria dos implantes em cada avaliação apresentou sangramento à sondagem, entretanto, este percentual teve redução a cada avaliação, sendo 94.1% na avaliação 1, 79.4% na avaliação 2 e 58.8% na avaliação 3, com $p < 0.05$ entre a primeira e terceira avaliação e entre a segunda e terceira avaliação. A perda óssea foi registrada em um implante em cada avaliação. A maioria dos implantes foi classificada como insucesso em cada avaliação, no entanto, com redução do percentual de insucesso a cada avaliação, sendo 94.1% na avaliação 1, 79.4% na avaliação 2 e 61.8% na avaliação 3, com $p < 0.05$ entre a primeira e terceira avaliação.

Tabela 02 – Avaliação da mobilidade, queixa subjetiva, infecção com supuração, radiolucência, sondagem $\geq 5\text{mm}$, sangramento à sondagem, perda óssea vertical anual e resultado do implante segundo cada tempo de avaliação.

Variável	Avaliação						Valor de p
	1		2		3		
	N	%	N	%	N	%	
TOTAL	34	100.0	34	100.0	34	100.0	
• Mobilidade							
Sim	-	-	2	5.9	-	-	**
Não	34	100.0	32	94.1	34	100.0	**
							**
• Queixa subjetiva							
Sim	-	-	-	-	-	-	**
Não	34	100.0	34	100.0	34	100.0	**
							**
• Infecção com supuração							
Sim	-	-	1	2.9	-	-	**
Não	34	100.0	33	97.1	34	100.0	**
							**
• Radiolucência							
Sim	1	2.9	1	2.9	1	2.9	$p^{(1)} = 1.000$
Não	33	97.1	33	97.1	33	97.1	$p^{(2)} = 1.000$
							$p^{(3)} = 1.000$
• Sondagem $\geq 5\text{mm}$							
Sim	6	17.6	5	14.7	4	11.8	$p^{(1)} = 1.000$
Não	28	82.4	29	85.3	30	88.2	$p^{(2)} = 0.688$
							$p^{(3)} = 1.000$
• Sangramento à sondagem							
Sim	32	94.1	27	79.4	20	58.8	$p^{(1)} = 0.125$
Não	2	5.9	7	20.6	14	41.2	$p^{(2)} < 0.001^*$
							$p^{(3)} = 0.039^*$
• Perda óssea vertical anual							
Sim	1	2.9	1	2.9	1	2.9	$p^{(1)} = 1.000$
Não	33	97.1	33	97.1	33	97.1	$p^{(2)} = 1.000$
							$p^{(3)} = 1.000$
• Resultado do implante							
Insucesso	32	94.1	27	79.4	21	61.8	$p^{(1)} = 0.125$
Sucesso	2	5.9	7	20.6	13	38.2	$p^{(2)} = 0.001^*$

(*): Diferença significativa ao nível de 5.0%.

(**): Não foi determinado devido a diferença nas categorias entre as avaliações.

(1): Através do teste McNemmar entre a primeira e a segunda avaliação.

(2): Através do teste McNemmar entre a primeira e a terceira avaliação.

(3): Através do teste McNemmar entre a segunda e a terceira avaliação.

São apresentadas na tabela 03 as estatísticas: média, desvio padrão (média \pm DP) e mediana da Profundidade de Sondagem (PS) e Perda de Inserção Clínica (PIC) por avaliação. Pode-se destacar que as médias das duas medidas reduziram a cada avaliação com diferenças significativas entre as avaliações e através dos testes de comparações múltiplas (entre os pares de avaliações) com diferença entre a avaliação 1 e 3 em cada medida avaliada. Da avaliação 1 para a 3 a média da PS reduziu de 2.76mm para 2.38mm; enquanto a PIC obteve uma redução na média de 2.90mm para 2.53mm.

Tabela 03 – Avaliação da profundidade de sondagem e de inserção clínica segundo cada tempo de avaliação.

Variável	Avaliação			Valor de p
	1 Média \pm DP (Mediana)	2 Média \pm DP (Mediana)	3 Média \pm DP (Mediana)	
• Profundidade de sondagem	2.76 \pm 0.65 (2.50) ^(A)	2.66 \pm 0.82 (2.50) ^(AB)	2.38 \pm 0.52 (2.38) ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0.006*
• Perda de inserção clínica	2.90 \pm 0.71 (2.69) ^(A)	2.79 \pm 0.85 (2.75) ^(AB)	2.53 \pm 0.55 (2.50) ^(B)	p ⁽¹⁾ = 0.005*

(*): Diferença significativa ao nível de 5.0%.

(1): Através do teste de F(ANOVA) para medidas repetidas.

Obs.: Se todas as letras entre parênteses são distintas, comprova-se diferença significativa entre as avaliações correspondentes pelas comparações pareadas de Bonferroni.

Na Tabela 04 realizou-se a análise do estudo sobre a associação entre os resultados dos implantes com o hábito de tabagismo em cada uma das avaliações, não sendo verificadas associações significativas (p > 0.05).

Tabela 04 – Avaliação dos resultados dos implantes segundo a variável tabagismo segundo cada tempo avaliação.

Avaliação/Tabagismo	Tabagismo				TOTAL		Valor de p
	N	Sim %	N	Não %			
TOTAL	4	100.0	30	100.0	34	100.0	
• Avaliação 1							
Insucesso	4	100.0	28	93.3	32	94.1	p ⁽¹⁾ = 1.000
Sucesso	-	-	2	6.7	2	5.9	
• Avaliação 2							
Insucesso	3	75.0	24	80.0	27	79.4	p ⁽¹⁾ = 1.000
Sucesso	1	25.0	6	20.0	7	20.6	

• Avaliação 3							
Insucesso	2	50.0	19	63.3	21	61.8	$p^{(1)} = 0.627$
Sucesso	2	50.0	11	36.7	13	38.2	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Foi analisado o genótipo com cada uma das variáveis: sondagem ≥ 5 mm, Sangramento à Sondagem (SS) e resultado do implante (insucesso ou sucesso) em cada uma das avaliações (Tabelas 05, 06, 07). Não foram verificadas associações significativas ($p > 0.05$) entre os tipos de genótipos de OPG, RANKL156 e RANKL438 com nenhuma das variáveis nas três avaliações que estão presentes nas tabelas 05, 06, 07, respectivamente.

Tabela 05 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de OPG.

Avaliação / Variável	TC		Genótipo – OPG		CC		Valor de p
	N	%	N	TT	%	N	
TOTAL	9	100.0	22	100.0	3	100.0	
• Avaliação 1							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	1	11.1	4	18.2	1	33.3	$p^{(1)} = 0.628$
Não	8	88.9	18	81.8	2	66.7	
Sangramento à sondagem							
Sim	9	100.0	20	90.9	3	100.0	$p^{(1)} = 1.000$
Não	-	-	2	9.1	-	-	
Resultado do implante							
Insucesso	9	100.0	20	90.9	3	100.0	$p^{(1)} = 1.000$
Sucesso	-	-	2	9.1	-	-	
• Avaliação 2							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	2	22.2	3	13.6	-	-	$p^{(1)} = 0.763$
Não	7	77.8	19	86.4	3	100.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	8	88.9	16	72.7	3	100.0	$p^{(1)} = 0.545$
Não	1	11.1	6	27.3	-	-	
Resultado do implante							
Insucesso	8	88.9	16	72.7	3	100.0	$p^{(1)} = 0.545$
Sucesso	1	11.1	6	27.3	-	-	
• Avaliação 3							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	2	22.2	1	4.5	1	33.3	$p^{(1)} = 0.130$
Não	7	77.8	21	95.5	2	66.7	
Sangramento à sondagem							
Sim	7	77.8	11	50.0	2	66.7	$p^{(1)} = 0.426$
Não	2	22.2	11	50.0	1	33.3	
Resultado do implante							

Insucesso	7	77.8	12	54.5	2	66.7	$p^{(1)} = 0.648$
Sucesso	2	22.2	10	45.5	1	33.3	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Tabela 06 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de RANKL156.

Avaliação/Variável	Genótipo - RANKL156						Valor de p
	CT		TT		CC		
	N	%	N	%	N	%	
TOTAL	27	100.0	2	100.0	5	100.0	
• Avaliação 1							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	4	14.8	1	50.0	1	20.0	$p^{(1)} = 0.480$
Não	23	85.2	1	50.0	4	80.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	26	96.3	2	100.0	4	80.0	$p^{(1)} = 0.374$
Não	1	3.7	-	-	1	20.0	
Resultado do implante							
Insucesso	26	96.3	2	100.0	4	80.0	$p^{(1)} = 0.374$
Sucesso	1	3.7	-	-	1	20.0	
• Avaliação 2							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	4	14.8	-	-	1	20.0	$p^{(1)} = 1.000$
Não	23	85.2	2	100.0	4	80.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	21	77.8	2	100.0	4	80.0	$p^{(1)} = 1.000$
Não	6	22.2	-	-	1	20.0	
Resultado do implante							
Insucesso	21	77.8	2	100.0	4	80.0	$p^{(1)} = 1.000$
Sucesso	6	22.2	-	-	1	20.0	
• Avaliação 3							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	3	11.1	1	50.0	-	-	$p^{(1)} = 0.306$
Não	24	88.9	1	50.0	5	100.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	16	59.3	1	50.0	3	60.0	$p^{(1)} = 1.000$
Não	11	40.7	1	50.0	2	40.0	
Resultado do implante							
Insucesso	17	63.0	1	50.0	3	60.0	$p^{(1)} = 1.000$
Sucesso	10	37.0	1	50.0	2	40.0	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Tabela 07 – Avaliação da sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e resultado do implante segundo o genótipo de RANKL438.

Genótipo - RANKL438							
---------------------	--	--	--	--	--	--	--

Avaliação/Variável	AG		GG		AA		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
TOTAL	27	100.0	6	100.0	1	100.0	
• Avaliação 1							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	5	18.5	1	16.7	-	-	p ⁽¹⁾ = 1.000
Não	22	81.5	5	83.3	1	100.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	26	96.3	5	83.3	1	100.0	p ⁽¹⁾ = 0.374
Não	1	3.7	1	16.7	-	-	
Resultado do implante							
Insucesso	26	96.3	5	83.3	1	100.0	p ⁽¹⁾ = 0.374
Sucesso	1	3.7	1	16.7	-	-	
• Avaliação 2							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	5	18.5	-	-	-	-	p ⁽¹⁾ = 0.622
Não	22	81.5	6	100.0	1	100.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	23	85.2	4	66.7	-	-	p ⁽¹⁾ = 0.069
Não	4	14.8	2	33.3	1	100.0	
Resultado do implante							
Insucesso	23	85.2	4	66.7	-	-	p ⁽¹⁾ = 0.069
Sucesso	4	14.8	2	33.3	1	100.0	
• Avaliação 3							
Sondagem ≥ 5mm							
Sim	4	14.8	-	-	-	-	p ⁽¹⁾ = 1.000
Não	23	85.2	6	100.0	1	100.0	
Sangramento à sondagem							
Sim	18	66.7	2	33.3	-	-	p ⁽¹⁾ = 0.111
Não	9	33.3	4	66.7	1	100.0	
Resultado do implante							
Insucesso	19	70.4	2	33.3	-	-	p ⁽¹⁾ = 0.098
Sucesso	8	29.6	4	66.7	1	100.0	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

Não foram registradas associações significativas entre os alelos dos três genótipos analisados e os resultados dos implantes nas três avaliações (Tabela 08).

Tabela 08 – Avaliação dos resultados dos implantes segundo o tipo de alelo por genótipo e avaliação.

Avaliação	Variável	Insucesso		Sucesso		TOTAL	Valor de p
		N	%	N	%		
Avaliação 1	TOTAL	64	94.1	4	5.9	68	100.0

• Alelos do genótipo OPG

T	49	92.5	4	7.5	53	100.0	$p^{(1)} = 0.569$
C	15	100.0	-	-	15	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 156							
T	30	96.8	1	3.2	31	100.0	$p^{(1)} = 0.620$
C	34	91.9	3	8.1	37	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 438							
A	36	92.3	3	7.7	39	100.0	$p^{(1)} = 0.631$
G	28	96.6	1	3.4	29	100.0	
Avaliação 2 TOTAL							
• Alelos do genótipo OPG							
T	40	75.5	13	24.5	53	100.0	$p^{(1)} = 0.167$
C	14	93.3	1	6.7	15	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 156							
T	25	80.6	6	19.4	31	100.0	$p^{(2)} = 0.818$
C	29	78.4	8	21.6	37	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 438							
A	31	79.5	8	20.5	39	100.0	$p^{(2)} = 0.986$
G	23	79.3	6	20.7	29	100.0	
Avaliação 3 TOTAL							
• Alelos do genótipo OPG							
T	31	58.5	22	41.5	53	100.0	$p^{(2)} = 0.296$
C	11	73.3	4	26.7	15	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 156							
T	19	61.3	12	38.7	31	100.0	$p^{(2)} = 0.941$
C	23	62.2	14	37.8	37	100.0	
• Alelos do genótipo RANKL 438							
A	23	59.0	16	41.0	39	100.0	$p^{(2)} = 0.583$
G	19	65.5	10	34.5	29	100.0	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

3.6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, os implantes dentários tornaram-se uma alternativa de tratamento comumente usada para pacientes com ausências dentárias totais ou parciais. O prognóstico do tratamento com implantes é frequentemente relatado através de taxas de sobrevivência, ou seja, pelo fato de o implante ainda estar presente na boca (Roos-Jansaker et al. 2006a). O mesmo autor, em publicação anterior, observou uma taxa de sobrevivência de 95.7%, o que está de acordo com outros estudos de longo prazo (Esposito et al. 1998a; Berglundh et al. 2002). No entanto, a fim de descrever o resultado do tratamento com implantes dentários de forma mais precisa, a condição clínica dos implantes deve ser considerada (Mombelli et al. 1987; Mombelli & Lang 1998; Leonhardt et al. 1999; Roos-Jansaker et al. 2003).

De acordo com os autores: Albrektsson et al. (1986), Buser et al. (1990) e Misch et al. (2008), até o momento não há consenso sobre a definição de sucesso dos implantes, mas muitos critérios têm sido propostos. Os critérios sugeridos são baseados em parâmetros clínicos e radiográficos para determinar a taxa de sobrevivência dos implantes. Como resultado da inexistência de uma definição completa do que seria sucesso no tratamento com implantes, a importância dos estudos a longo prazo tem sido criticamente revisada (Ong et al. 2008; Van der Weijden et al. 2005).

Neste trabalho foi encontrada uma alta percentagem de insucesso, principalmente na primeira avaliação e este percentual diminuiu ao longo do tempo, com diferença significativa entre a primeira e terceira avaliação. Possivelmente, esse baixo percentual de sucessos deve-se aos detalhados critérios de insucesso utilizados nesta metodologia como, por exemplo, o sangramento à sondagem que foi verificado também em grande número na primeira avaliação e diminuindo ao longo do tempo, embora ainda tenha sido elevado o percentual desta variável até a última avaliação.

Nos trabalhos realizados até o momento, as falhas dos implantes tendem a aumentar ao longo do tempo, entretanto, a definição do que seria a falha nos implantes varia muito entre as pesquisas e muitas consideram apenas a presença de peri-implantite como fator de falha para o implante. Dessa forma, o sangramento à sondagem isoladamente, que não

necessariamente está associado à peri-implantite, torna-se um critério gerador de aumento de insucesso nos implantes neste trabalho. A diminuição do sangramento à sondagem ao longo do tempo e, por consequência, o aumento de sucessos, pode ter ocorrido devido à melhoria da higiene pelo paciente, uma vez que, a partir do conhecimento do sangramento na primeira avaliação, o paciente tende a melhorar o controle do biofilme, principalmente, após a orientação de higiene realizada pelo pesquisador, como benefício, a cada avaliação. Tal resultado está de acordo com os achados de Charyeva et al. (2012) que relataram haver significativo efeito para o sucesso e sobrevida dos implantes o paciente manter uma satisfatória higiene oral.

Swierkot et al. (2012) analisaram a mucosite, peri-implantite, sucesso e sobrevida dos implantes em pacientes com periodontite agressiva previamente tratada em um estudo prospectivo com 53 pacientes, sendo 18 pacientes com 30 implantes no total e sem a doença periodontal. Os critérios utilizados pelos pesquisadores para definir um implante como de sucesso foi semelhante ao presente estudo e, no grupo de pacientes sem doença periodontal, foi verificado um resultado de 50% de falhas dos implantes dentários, o que se aproxima do atual resultado de 61.8% ao final da terceira avaliação. Diferentemente deste estudo, esses pesquisadores acompanharam os pacientes por um período de dezesseis anos, enquanto neste trabalho foi de dois anos após a reabilitação. No estudo de Roos-Jansaker et al. (2006b), com acompanhamento por longo período, foi descrita a presença de lesões de peri-implantite utilizando diferentes limiares de profundidade e presença/ausência de sangramento à sondagem, ambos com ou sem diferentes graus de perda óssea e, a partir disso, encontrou-se uma percentagem de mucosite e peri-implantite de 30.1% e 43.3% respectivamente.

Em relação ao presente trabalho, verificou-se que a $PS \geq 5\text{mm}$ ocorreu em uma pequena quantidade de implantes nas três avaliações com uma diminuição não estatisticamente significativa entre os tempos estudados. Já a perda óssea vertical anual só foi verificada em um caso neste trabalho. Em concordância com o trabalho de Misch et al. (2008), a PS neste estudo foi relacionada com a presença de outros critérios como perda óssea, queixa subjetiva, infecção com supuração e sangramento, pois a PS isoladamente, segundo o autor acima, tem pouco valor diagnóstico e não necessariamente indica doença no implante intra-ósseo. No estudo de Roos-Jansaker et al. (2006b) foi encontrado que 16% dos pacientes apresentaram profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$ e 70% dos implantes, após cinco, anos tiveram alguma perda óssea. Tal diferença de resultados pode ser entendida pelo fato de Ross-Jansaker e colaboradores terem realizado um estudo com acompanhamento bem mais

longo e com uma quantidade de implantes muito mais elevada, além do fato de considerarem 1mm a menos na profundidade de sondagem em relação ao atual estudo.

Sobre a PS e PIC houve, assim como as variáveis anteriores, um decréscimo dos valores a cada avaliação. No estudo de Rakic et al. (2012) a média da PS no grupo com peri-implantite foi de 5.55mm e o nível de inserção clínica foi 4.85mm e no estudo de Kadkhodazadeh et al. (2013) o grupo com peri-implantite obteve média de PS de 6.81mm e PIC de 4.44mm. Tal diferença de resultados deve-se ao fato de que no presente estudo houve uma pequena quantidade de pacientes com $PS \geq 5\text{mm}$ em comparação com esses dois estudos citados, além disso, esses estudos tinham nos grupos experimentais pacientes com peri-implantite, ou seja, todos tinham $PS \geq 5\text{mm}$ e alguma perda de inserção óssea.

Estudos têm descrito a influência do consumo de tabaco no sucesso do implante e tais pesquisas encontram resultados que indicam maior risco de perda do implante pelo hábito do tabagismo (Bain & Moy 1993; De Bruyn & Collaert 1994; Strietzel et al. 2007). Um estudo de acompanhamento de 10 anos, mas sem um programa de reavaliações e tratamento periodontal regulares, encontrou uma maior reabsorção óssea entre fumantes (Lindquist et al. 1997). Schwartz-Arad et al. (2002) e McDermott et al. (2003) encontraram maior risco de complicações e inflamação peri-implantar em fumantes.

Contrariamente aos estudos acima, no atual trabalho não houve associação entre o hábito de fumar e o risco para insucesso dos implantes dentários, além disso, ao longo das avaliações, existiu diminuição do insucesso relacionado ao fumo. Embora tal resultado não tenha sido estatisticamente significativo, nos trabalhos de Roos-Jansaker et al. (2006a), Mengel et al. (2007) e Swierkot et al. (2012) que, como a presente pesquisa, também fizeram reavaliações e, além disso, realizaram tratamento periodontal simultâneo, não foi verificada relação entre o cigarro com peri-implantite, sucesso ou sobrevida dos implantes. Portanto, ao se realizar uma pesquisa com uma amostra maior de indivíduos fumantes em um programa de reavaliações e tratamento periodontal ao longo de um tempo maior do que o do atual trabalho, o cigarro parece não influenciar a saúde e o sucesso dos implantes dentários.

Trabalhos recentes indicam que complicações dos implantes, como: perda do implante, peri-implantite e perda óssea ao redor do implante tendem a estar agrupadas em um subconjunto de indivíduos, em vez de serem distribuídas aleatoriamente na população, o que implica que a resposta individual do hospedeiro pode ter um papel determinante para o sucesso dos implantes dentários (Weyant & Burt, 1993; Tonetti, 1999; Franson et al. 2005; Roos-Jansaker et al. 2006a 2006b 2006c; Fransson et al. 2010). Esse fenômeno de

agrupamento pode ser devido ao polimorfismo genético (Gruica et al. 2004; Feloutzis et al. 2003; Santos et al. 2004; Shimpuku et al. 2003a; Shimpuku et al. 2003b; Nosaka et al. 2002).

Apesar de alguns estudos (Feloutzis et al., 2003; Shimpuku et al., 2003b; Gruica et al., 2004; Jansson et al., 2005; Laine et al., 2006; Lin et al., 2007; Montes et al., 2009) mostrarem correlação entre alterações genéticas e perda óssea peri-implantar, estes estudos analisaram diferentes quimiocinas e regiões polimórficas, populações com etnias variadas, número de pacientes muitas vezes limitado, caracterização clínica sem padrões estabelecidos, inclusive não diferenciando, em sua maioria, mucosite peri-implantar da peri-implantite, e não tendo acompanhamento em longo prazo que caracterize a sobrevida dos implantes após avaliação inicial. Este trabalho, apesar de ter acompanhado os pacientes reabilitados durante três avaliações, foi constituído por uma quantidade pequena de pacientes e implantes para serem analisados. Além disso, o tempo de acompanhamento não foi bastante longo, apenas um ano e meio e, de acordo com Alvim et al (2008) falhas tardias estão mais relacionadas a casos de sobrecarga e peri-implantite, ou seja, um tempo mais longo de acompanhamento seria necessário para verificar esse insucesso do implante.

Neste estudo, procurou-se associar o insucesso dos implantes a citocinas chamadas de OPG e RANKL. A identificação do sistema OPG-RANKL-RANK como mediador final da osteoclastogênese representa um grande avanço na biologia óssea. A clonagem e caracterização inicial de OPG como um receptor solúvel, pertencente à superfamília dos receptores de TNF foi o primeiro passo que levou a um maior conhecimento deste sistema. Logo em seguida, a molécula que é bloqueada por OPG, chamada RANKL, foi identificada como sendo o mediador chave da osteoclastogênese. Por sua vez, foi demonstrado que RANKL liga-se ao seu receptor, RANK, em células da linhagem dos osteoclastos. O importante papel desempenhado por esses fatores na regulação do metabolismo ósseo foi demonstrado através de resultados de fenótipos esqueléticos extremos (osteoporose e osteopetrose) em camundongos com expressão alterada dessas moléculas (Yamashita et al. 2002).

O eixo regulador RANK-RANKL-OPG também está envolvido na destruição óssea inflamatória induzida por citocinas pró-inflamatórias, tais como a prostaglandina E_2 (PGE_2), a $IL-1\beta$, $IL-6$ e $TNF-\alpha$ (Boyle et al. 2003). Além disso, um certo número de outros mediadores do metabolismo ósseo, tais como $TGF-\beta$ (Takai et al. 1998), PTH (Lee & Lorenzo 1999), a 1.25-di-hidroxivitamina D_3 (Kitasawa et al 1999), glucocorticóides (Hofbauer et al 1999) e estrogênios (Saika et al. 2001), exercem seus efeitos sobre a osteoclastogênese através da regulação da produção, pelas células osteoblásticas/do estroma, de OPG e RANKL. No

entanto, nem toda a regulação de osteoclastos é feita exclusivamente através do osteoblasto, uma vez que a calcitonina atua diretamente sobre as células osteoclásticas (Nicholson et al. 1986) e estrogênio tem demonstrado induzir a apoptose dos osteoclastos (Hughes et al. 1996).

Estudos têm demonstrado que a proporção relativa de RANKL/OPG é maior em locais com doença periodontal do que em locais saudáveis. Portanto, é possível que OPG e RANKL desempenhem um papel na regulação da reabsorção óssea na doença periodontal (Crotti et al. 2003; Mogi et al. 2004). Estes mesmos mecanismos podem estar envolvidos na reabsorção óssea presente nas doenças peri-implantares.

No presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa quando realizada a associação entre os polimorfismos de OPG, RANKL156 e RANKL438 com o insucesso dos implantes dentários ao longo do tempo. Tais genes das citocinas anteriormente citadas foram escolhidos para análise neste estudo, porque em outras pesquisas estavam relacionados a doenças do metabolismo ósseo. Levando-se em consideração os pré-requisitos utilizados neste trabalho para se considerar um implante como sendo um caso de insucesso (mobilidade, queixa subjetiva, infecção com supuração, radiolucência, PS \geq 5mm, SS e perda óssea vertical anual), nenhum outro trabalho até o momento agrupou esses critérios específicos e tentou associar com polimorfismos dessas citocinas estudadas. Além disso, essas citocinas estão relacionadas com reabsorção e neoformação óssea, e nesta pesquisa houve apenas um caso de reabsorção radiograficamente detectada, o que torna difícil a associação de tais polimorfismos com as amostras do estudo presente.

Neste trabalho, o genótipo mais frequentemente encontrado para OPG foi TT, e o alelo T foi mais frequente e associado ao insucesso. Não houve relação estatisticamente significativa entre o genótipo TT e o alelo T com o resultado de insucesso dos implantes nem com os parâmetros clínicos utilizados de SS e PS \geq 5mm, embora este genótipo tenha sido o mais encontrado nos pacientes com implantes de insucesso nas três avaliações. Também no trabalho de Baioni et al. (2008), que relacionou a doença periodontal com polimorfismo do gene de OPG, houve maior percentagem do genótipo TT no grupo de pacientes com DP, em relação ao grupo saudável e o alelo T foi o mais frequente, embora não tenha existido relevância estatisticamente significativa.

No trabalho de Kadkhodazadeh et al. (2013), em que se relacionou a peri-implantite, que é um fator que gera insucesso para o implante, com polimorfismos de RANKL156 e RANKL438, foi encontrada associação significativa entre o genótipo CT de RANKL156 e a presença de peri-implantite, o mesmo não acontecendo com os genótipos de RANKL438 com a peri-implantite, o que também coincide com o atual trabalho, já que CT, embora não

estatisticamente significativa, foi o genótipo de RANKL156 mais encontrado nos casos de insucesso nas três avaliações. Por outro lado, a frequência do alelo T do gene de RANKL156 foi maior no grupo de peri-implantite nesse estudo de Kadkhodazadeh et al. (2013) e, no presente estudo, o alelo mais frequente e associado a insucesso foi o C, entretanto, não houve relevância estatística em ambos os estudos no aspecto das frequências alélicas. Deve-se levar em consideração também o fato do trabalho de Kadkhodazadeh et al. (2013) ter sido realizado apenas com iranianos e, de acordo com uma metanálise realizada por Liao et al. (2014) os resultados dos genótipos da citocinas por eles estudadas, mostraram que a etnia é uma fonte significativa de heterogeneidade.

Possivelmente, neste trabalho, não se encontrou a relação de significância entre polimorfismo e insucesso devido ao número reduzido de pacientes e implantes investigados, de acordo com estudo de Schafer et al. (2011) grandes populações são o pré-requisito para superar qualquer viés devido à heterogeneidade de uma amostra.

4. CONCLUSÃO

Os presentes achados não mostraram associação significativa entre polimorfismo de OPG e RANKL com o insucesso dos implantes dentários. Dessa forma, mais estudos com um tempo de acompanhamento mais longo e com um maior número de amostras são essenciais para se obter resultados mais evidentes.

REFERÊNCIAS

Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Consensus report of session IV. In: Lang, N. P, Karring, T., eds. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*, p. 365. London: Quintessence Publishing Co. Ltd.

Albrektsson, T., Jansson, T. & Lekholm, U. (1986) Osseointegrated dental implants. *Dental Clinics of North America* **30**: 151-174.

Albrektsson, T., Zarb, G., Worthington, P. & Eriksson, A.R. (1986) The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **1**:11-25.

Arikan, F., Buduneli, N. & Lappin, D. (2011) C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble rankl, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: a case-control study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **26**: 282–289.

Assmann, G. Koenig, J., Voswinkel, J., Pfreundschuh, M., Roemer, K. & Weiczorek, S. (2010) Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL and OPG in rheumatoid arthritis: a case-control study. *The journal of Rheumatology* **37**: 900-904.

Bain, C.A. & Moy, P.K. (1993) The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **8**: 609-615.

Baioni, C.S., Souza, C.M., Ribeiro, A.P.B., Luczyszyn, S.M., Silva, M.A.S., Ignácio, S.A., Benato, W.D.M., Riella, M.C., Pecoits-Filho, R., Naval, M.A.M. & Trevillato, P.C. (2008) Analysis of the association of polymorphism in the osteoprotegerin gene with susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **43**: 578–584.

Berglundh, T., Persson, L. & Klinge, B. (2002) A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology* **29**: 197–212.

Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **6937**: 337–342.

Bragger, U., Aeschlimann, S., Burgin, W., Hammerle, C.H. & Lang, N.P. (2001) Biological and technical complications and failures with fixed partial dentures (FPD) on implants and teeth after four to five years of function. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 26-34.

Brändström, H., Stiger, H., Lind, F., Kahan, L., Melhus, T. & Kindmark, A. (2002) A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene of osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **293**: 13-17.

De Bruyn, H. & Collaert, B. (1994) The effect of smoking on early implant failure. *Clinical Oral Implants Research* **5**: 260- 264.

Buser, D., Weber, H.P. & Lang, N.P. (1990) Tissue integration of non-submerged implants. 1-year results of a prospective study with 100 ITI hollow-cylinder and hollow screw implants. *Clinical Oral Implants Research* **1**: 33-40.

Charyeva, O., Atynbekov, K., Zhartybaev, R. & Sabdanaliev, A. (2012) Long-term dental implant success and survival – a clinical study after an observation period up to 6 years. *Swedish Dental Journal* **36**: 1-6.

Crotti, T., Smith, M.D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern & M.J., Haynes, D. (2003) Receptor activator NF Kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **38**: 380-387.

Ejeil, A., Gaultier, F, Igondjo-Tchen, S., Senni, K., Pellat, B. & Godeau, G. (2003) Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *Journal of Periodontology* **74**: 196-201.

Eckfeldt, A., Christiansson, U., Eriksson, T., Lindén, U., Lundqvist, S., Rundcrantz, T., Johansson, L.A., Nilner, K. & Billström, C. (2001) A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 462-467.

Esposito, M. Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998) Biological factors contributing to failures of osseointegrated osseo implants. *European Journal of Oral Sciences* **106**: 721-724.

Feloutzis, A., Lang, N.P., Tonetti, M.S., Bürgin, W. Buser, D., Duff, G.W. & Kornman, G.S. (2003) IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clinical Oral Implants Research*, **14**: 10-17.

Fransson, C. (2005) Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 440-446.

Gruica, B., Wang, W.I., Lang, N.P. & Buser, D. (2004) Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 393-400.

Henry, P.J. (2005) Oral implant restoration for enhanced oral function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **32**: 127-127.

- Hofbauer, L.C., Gori, F. & Riggs, B.L. (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* **140**: 4382–4389.
- Holm-Pedersen, P., Lang, N.P. & Müller, F. (2007) What are the longevities of teeth and oral implants? *Clinical Oral Implants Research* **3**: 15-19.
- Hsu, Y.H., Niu, T., Terwedow, H.A., Xu, X., Feng, Y., Li, Z., Brain, J.D., Rosen, C.J., Laird, N. & Xu, X. (2006) Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Human Genetics* **118**: 568-577.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R. & Boyce, B.F. (1996) Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Natural Medicine* **2**: 1132–1136.
- Jansson, H., Hamberg, K., Bruyn, H. & Bratthall, G. (2005) Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7**: 51-59.
- Kadkhodazadeh, M., Ebadian, A.R., Gholami, G.A., Khosravi, A. & Tabari, Z.A. (2013) Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Archives of Oral Biology* **58**: 530-536.
- Kitazawa, R., Kitazawa, S. & Maeda, S. (1999) Promoter structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gene. *Biochimica et Biophysica Acta* **1445**: 134–141.
- Lee, S.K. & Lorenzo, J.A. (1999) Parathyroid hormone stimulates TRANSC and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* **140**: 3552–3561.
- Leonhardt, A., Renvert, S. & Dahlén, G. (1999) Microbial findings at failing implants. *Clinical Oral Implant Research* **10**: 339–345.
- Levin, L. (2010) Dealing with dental implant failures. *Journal of Applied Oral Science* **27**: 6-12.
- Liao, J., Li, C., Wang, Y., Ten, M., Sun, X., Tian, A., Zhang, Q. & Liang, X. (2014) Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Molecular Biology Reports*.
- Lindquist, L.W., Carlsson, G.E. & Jemt, T. (1997) Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: A 10-year follow-up study. *Journal of Dentistry Research* **76**: 1667-1674.
- Loss, B.G., Van der Velden, U. & Laine, M. L. (2008) Susceptibility. In: Lindhe, J., Lang, N., Karring, T., eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 5^a edition, p. 328. Oxford: Blackwell Munksgaard.

McDermott, N.E., Chuang, S.K., Woo, V.V. & Dodson, T.B. (2003) Complications of dental implants: Identification, frequency, and associated risk factors. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **18**: 848-855.

Mengel, R., Behle, M. & Flores-de-Jacoby, L. (2007) Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-years results of a prospective, long-term cohort study. *Journal of Periodontology* **78**: 2229- 2237.

Misch, C.E., Perel, M.L., Wang HL, Sammartino, G., Galindo-Moreno, P., Trisi, P., Steigmann, M., Rebaudi, A., Palti, A., Pikos, M.A., Schwartz-Arad, D., Choukroun, J., Gutierrez-Perez, J.L., Marenzi, G. & Valavanis, D.K. (2008) Implant success, survival, and failure: The International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. *Implant Dentistry* **17**:5-15.

Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. & Togari, T. (2004) Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of Dental Research* **83**: 166-169.

Mombelli, A. & Lang, N.P. (1994) Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontology 2000* **4**: 81-6.

Mombelli, A. & Lang, N.P. (1998) The diagnosis and treatment of periimplantitis. *Periodontology 2000* **17**: 63–76.

Mombelli, A., van Oosten, M.A.C., Schürch, E. & Lang, N. P. (1987) The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiology and Immunology* **2**: 145–151.

Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Sexton, P.M., Mendelsohn, F.A. & Martin, T.J. (1986) Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *Journal of Clinical Investigation* **78**: 355–360.

Nosaka, Y., Tachi, Y., Shimpuku, H., Kawamura, T. & Ohura, K. (2002) Association of calcitonin receptor gene polymorphism with early marginal bone loss around endosseous dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **17**: 38-43.

Ong, C.T., Ivanovski, S., Needleman, I.G., Retzepi, M., Moles, D.R., Tonetti, M.S. & Donos, N. (2008) Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 438-462.

Pjetursson, B.E., Thoma, D., Jung, R., Zwahlen, M. & Zembic, A. (2012) *Clinical Oral Implants Research* **6**: 22-38.

Rakic, M., Lekovic, V., Nikolic-Jakoba, N., Vojvodic, D., Petkovic-Curcin, A & Sanz, M. (2012) Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 1110-1116.

Riemenschneider, M., Konta, L., Friedrich, P., Schwarz, S., Taddei, K., Neff, F., Padovani, A., Kölsch, H., Laws, S.M., Klopp, N., Bickeböller, H., Wagenpfeil, S., Mueller, J.C.,

- Rosenberger, A., Diehl-Shmid, J., Archetti, S. Lautenschlager, N., Borroni, B., Müller, U., Illig, T., Heun, R., Egensperger, R., Schlegel, J., Försti, H., Martins, R.N. & Kurz, A. (2006) A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* **15**: 2446-2456.
- Roos-Jansaker, A.M., Renvert, S. & Egelberg, J. (2003) Treatment of peri-implant infections: a literature review. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 467-485.
- Roos-Jansaker, A.M., Lindahl, C., Renvert, H. & Renvert, S. (2006a) Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 283-289.
- Roos-Jansaker, A.M., Lindahl, C., Renvert, H. & Renvert, S. (2006b) Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 290-295.
- Roos-Jansaker, A.M., Lindahl, C., Renvert, H. & Renvert, S. (2006c) Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *Journal of Clinical Periodontology* **33**: 296-301.
- Saika, M., Inoue, D., Kido, S. & Matsumoto, T. (2001) 17 β -Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- α . *Endocrinology* **142**: 2205-2212.
- Salvi, G.E. & Bragger, U. (2009) Mechanical and technical risks in implant therapy. *The International Journal of Oral and Maxillofacial implants* **24**: 69-85.
- Santos, M.C., Campos, M.I., Souza, A.P, Scarel-Caminaga, R.M., Mazzonetto, R. & Line, S.R. (2004) Analysis of the transforming growth factor-beta 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Implant Dentistry* **13**: 262-269.
- Santos, M.C., Campos, M.I., Souza, A.P., Trevilatto, P.C. & Line, R.S. (2004) Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **19**: 38-43.
- Schafer, A.S., Jepsen, S. & Loos, B.G. (2011) Periodontal genetics: a decade of genetic association studies mandates better study designs. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 103-107.
- Schwartz-Arad, D., Laviv, A. & Levin, L. (2008) Failure causes, timing, and cluster behavior: an 8-year study of dental implants. *Implant Dentistry* **17**: 200-207.
- Schwartz-Arad, D., Samet, N., Samet, N. & Mamlider A. (2002) Smoking and complications of endosseous dental implants. *Journal of Periodontology* **73**: 153-157.
- Shimpuku, H., Nosaka, Y., Kawamura, T., Tachi, Y., Shinohara, M. & Ohura, K. (2003a) Bone morphogenetic protein-4 gene polymorphism and early marginal bone loss around endosseous implants. *International Journal of Maxillofacial Implants* **18**: 500-504.

- Shimpuku, H., Nosaka, Y., Kawamura, T., Tachi, Y., Shinohara, M. & Ohura, K. (2003b) Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **14**: 423-429.
- Soedarsono, N., Rabello, D., Kamei, H., Fuma, D., Ishihara, Y., Suzuki, M., Noguchi, T., Skaki, Y., Yamaguchi, A. & Kojima, T. (2006) Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **41**: 397-404.
- Stashenko, P., Jandinski, J., Fujioshi, P., Rynar, J. & Socransky, S. (2005) Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **62**: 504-509.
- Strietzel, F.P., Reichart, P.A., Kale, A., Kulkarni, M., Wegner, B. & Kuchler, I. (2007) Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* **34**: 523-544.
- Swierkot, K., Lottholz, P., Flores-de-Jacoby, L. & Mengel, R. (2012) Mucositis, Peri-Implantitis, Implant Success, and Survival of Implants in Patients With Treated Generalized Aggressive Periodontitis: 3- to 16-Year Results of a Prospective Long-Term Cohort Study. *Journal of Periodontology* **83**: 1213-1225.
- Takai, H., Kanematsu, M. & Yano, K. (1998) Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 27091–27096.
- Taylor, J.J., Preshaw, P.M. & Donaldson, P.T. (2004) Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000* **35**: 158-182.
- Tonetti, M.S. (1999) Determination of the success and failure of root-form osseointegrated dental implants. *Advances in Dental Research* **13**: 173-180.
- Weiant, R.J. & Burt, B.A. (1993) An assessments of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *Journal of Dental Research* **72**: 2-8.
- Van der Weijden, G.A., Van Bommel, K.M. & Renvert S. (2005) Implant therapy in partially edentulous, periodontally compromised patients: A review. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 506-511.
- Wilson, T.G.J. & Nunn, M. (1999) The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *Journal of Periodontology* **70**: 724-729.
- Yamashita, T., Okada, S., Higashio, K., Nabeshima, Y., Noda & M. Double (2002) Mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology* **143**: 4711–4717.

APÊNDICES

FICHA CLÍNICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

FICHA CLÍNICA - Nº. _____

Identificação

Nome _____

Nacionalidade: _____ Estado civil: _____ Sexo: masc () fem ()

Idade: _____ Nascimento: _____ Renda (salários): _____

Fone: () _____ - _____ Celular: () _____ - _____

Escolaridade:

() Não sabe ler ou escrever	() 1º grau incompleto	() 1º grau completo
() 2º grau incompleto	() 2º grau completo	() Universidade incompleta
() Universidade completa	() Pós-graduação	() Não sei

Fumante? _____

Critérios de exclusão

- Diabetes? Que tipo? _____

Dente: _____

Tempo de carga: _____

Tipo de Implante: _____

Avaliação dos critérios de sucesso – Ong et al., 2008 (Sim/não)

Avaliação dos critérios de sucesso					
Implante					
Mobilidade					
Queixas subjetivas					
Infecção com supuração					
Radiolucência					
Sondagem \geq 5mm					
Sangramento à sondagem					
Perda óssea vertical anual					

Legenda: Mobilidade; Queixas subjetivas (dor/sensação de corpo-estranho/disestesia); Infecção peri-implantar com supuração; Radiolucência contínua ao redor do implante; Profundidade de sondagem \geq 5mm; Sangramento à sondagem; Perda óssea vertical anual (após primeiro ano).

Avaliação clínica periodontal (Sonda Trinity® PC15)

Profundidade de sondagem (PS)						Perda de inserção clínica (PIC)					
Implante						Implante					
V						V					
L/P						L/P					

M						M					
D						D					

Coleta de sangue periférico

Radiografia periapical do implante com posicionador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da nossa pesquisa intitulada “**Estudo prospectivo da associação de polimorfismos ligados à remodelação óssea com insucessos dos implantes dentários**”, que é coordenada pela pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Seguem abaixo informações adicionais sobre a pesquisa.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira (Pesquisadora de Pós-Doutorado em Odontologia da UFPE). Endereço: *Campus* Univesitário da UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Prótese e Cirurgia Bucomaxilofacial (Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE) – Av. Prof^o Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP 50670-901, Recife/PE. Telefone: (81) 2126-8817.

OBJETIVO: O estudo tem como objetivo avaliar a presença dos polimorfismos (mutações genéticas) relacionados às proteínas da imunidade inata (defesa natural do paciente), à reabsorção (perda óssea) e neoformação óssea (nova formação de osso) e às proteínas relacionadas à inflamação, associando aos insucessos (falhas durante o processo de cicatrização) dos implantes dentários.

BENEFÍCIOS: Os participantes serão reabilitados e conseqüentemente terão novamente a função mastigatória e estética, o que proporciona uma reintegração social desses pacientes.

Além disso, os voluntários receberão orientações de higiene oral e a manutenção dos implantes colocados. Aqueles pacientes que forem detectados com algum critério de insucesso que possa comprometer a sobrevida do implante terão acompanhamento diferenciado em um intervalo de tempo menor que os demais. Havendo o insucesso total (perda do implante) o caso será reavaliado e uma nova intervenção clínica cirúrgica será realizada.

RISCOS: Os pacientes submetidos à pesquisa poderão correr o risco de, durante o exame clínico, se sentirem constrangidos devido às perguntas em relação à história médica, além do constrangimento durante o exame intrabucal, pois se trata de pacientes com ausências dentárias. Essas situações serão minimizadas pela experiência do examinador, o qual fará o exame em local apropriado (Clínica de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE) e estará sob a orientação do professor responsável. Os voluntários podem apresentar hematoma pós-coleta de sangue periférico (coletado da veia do braço) e dor durante a injeção da agulha. Esses acontecimentos também poderão ser contornados através da experiência do profissional especializado que fará a coleta. A quantidade de sangue a ser coletada será de 5 ml. Também serão colhidas amostras da mucosa oral (bochecha) por meio de um citobrush (escova específica para esse fim), sendo um procedimento não-invasivo tipo “esfregaço” e que apresenta mínimo risco para o paciente. Os procedimentos de coleta de sangue e de células da mucosa oral serão realizados na Clínica do Curso de Pós-Graduação em Implantodontia dessa Universidade respeitando os critérios de biossegurança necessários.

Você ficará com uma cópia deste Termo e qualquer dúvida que surgir a respeito desta pesquisa poderá ser resoluciona diretamente pela pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira, no *Campus* Universitário da UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Prótese e Cirurgia Bucomaxilofacial (Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE) – Av. Prof^o Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP 50670-901, Recife/PE, ou pelo telefone: (81) 2126-8817. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, localizado no *Campus* Universitário da UFPE, Avenida da Engenharia s/n – 1^o. andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, pelo telefone (81) 2126-8588 ou pelo e-mail: cepccs@ufpe.br.

A qualquer momento o participante terá os seguintes direitos:

1. Garantia de ter qualquer dúvida esclarecida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outras questões relacionadas com a pesquisa;
2. Liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo;
3. Segurança de não ser identificado e que todas as informações relacionadas à sua privacidade serão mantidas em caráter confidencial.
4. Disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito por parte da instrução à saúde, em casos de danos (acidentes decorrentes de traumatismos da intervenção cirúrgica, constrangimentos referentes ao exame clínico, de acordo com o citado acima no tópico de *Riscos*, ou constrangimentos durante a realização do tratamento referentes

à exposição excessiva do paciente a outros colegas, que não seja o professor responsável) que sejam justificados e causados diretamente pela pesquisa;

5. Compromisso de obter informação atualizada durante o estudo, ainda que este possa afetar a minha vontade de continuar participando;

6. Em caso de gastos adicionais, os mesmos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa;

7. A garantia de que os materiais coletados, como o sangue e células da mucosa oral, serão devidamente armazenados em freezers à temperatura de -20°C aproximadamente, por um período de três anos, sob a responsabilidade da pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira.

Assinatura da Pesquisadora

Eu, _____ **,RG.Nº.** _____

Abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar desta pesquisa, bem como autorizo toda a documentação necessária, a divulgação e a publicação da mesma, em periódicos científicos, na área de Odontologia.

Tendo ciência do exposto acima, desejo participar da pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Contatos:

- Pesquisadora Dr^a Renata Cimões Jovino Silveira (81) 2126-8817 (Secretaria de Pós-graduação em Odontologia da UFPE);
- Prof^a Dr^o Tibério César Uchôa Matheus: (81) 9967-3660;

- Comitê de Ética em Pesquisa (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126 8588).

ANEXOS

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo prospectivo da associação de polimorfismos ligados à imunidade inata, remodelação óssea e processos inflamatórios com insucessos dos implantes dentários

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03534012.0.0000.5208

Pesquisador: Renata Cimões Jovino Silveira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 84041

Data da Relatoria: 17/08/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Pesquisa tipo Coorte de Prognóstico que visa estabelecer associação entre polimorfismos da imunidade inata, remodelação óssea e processos inflamatórios, nos insucessos de implantes dentários. O estudo será conduzido pela Dra Renata Cimões Jovino Silveira e uma equipe constituída por mais 06 pesquisadores. Os documentos apresentados -curriculum vitae- da pesquisadora responsável e dos demais pesquisadores demonstram ampla capacitação para o desenvolvimento do estudo.

O estudo será realizado na Clínica da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, sendo prevista a inclusão de 100 indivíduos maiores de 18 anos que foram reabilitados através de implantes dentários unitários. Os pacientes serão acompanhados por um período de 3 anos, sendo submetidos a exame clínico e coleta de amostras para exames laboratoriais no período inicial e com 6, 12, 18, 24, 30 e 36 meses após o procedimento. Dois grupos serão constituídos: um com sucesso nos implantes e o outro com falha nos implantes. Ambas as definições fundamentados em critérios específicos descritos no projeto. A hipótese do estudo é que os pacientes que apresentarem polimorfismos apresentarão mais insucessos ao longo do tempo.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem como objetivo principal avaliar a presença dos polimorfismos das proteínas da imunidade inata (MBL2 e B-defensina1), polimorfismos relacionados à reabsorção e neoformação óssea (OPG e RANK) e polimorfismos das proteínas relacionadas à inflamação (IL-6 e IL-1) associando à

presença dos microrganismos periodontopatogênicos, nos insucessos dos implantes dentários.

Como objetivos secundários:

- Verificar se há associação dos polimorfismos relacionados à reabsorção e neoformação óssea, da imunidade inata e proteínas relacionadas à

inflamação ao insucesso nos implantes dentários.- Verificar se há associação entre a presença dos polimorfismos e os patógenos.- Verificar se a

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 50.740-600	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2126-8588	Fax: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



presença dos polimorfismos interfere na sucesso clínico no período de 3 anos de acompanhamento pós colocação dos implantes dentários.-
Determinar quais as combinações de polimorfismos estão associados ao insucesso dos implantes dentários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora poderá ocorrer constrangimentos(não referindo quais) que serão minimizados pelo pesquisador(não referindo como).Dor e equimoses poderão ser decorrentes da punção venosa para coleta de amostras biológicas(sangue).

Tais riscos são superados pelos benefícios decorrentes de um acompanhamento clínico e laboratorial por um período prolongado, com detecção precoce do insucesso dos implantes e direcionamento para um tratamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os implantes dentários são uma realidade e constituem uma excelente opção para reabilitação de indivíduos edêntulo. O aumento do índice de insucesso na área está relacionado a presença da doença peri-implantar. Neste momento, pouco se sabe sobre a susceptibilidade genética e

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

polimorfismos relacionados nas complicações peri-implantares. Tendo em vista a importância do polimorfismo como fator causal de maior suscetibilidade de indivíduos desenvolverem doença peri-implantar,o estudo tem como objetivo avaliar a presença dos polimorfismos das proteínas da imunidade inata (MBL2 e B-defensina1), polimorfismos relacionados à reabsorção e neoformação óssea (OPG e RANK) e polimorfismos das proteínas relacionadas à inflamação (IL-6 e IL-1), associando à presença dos microrganismos periodontopatogênicos nos insucessos dos implantes dentários.Para este estudo será considerada uma amostra de conveniência de 100 indivíduos que foram reabilitados com implantes dentários unitários atendidos na clínica de pós-graduação em odontologia da UFPE. Os pacientes serão divididos em um grupo referente ao sucesso nos implantes que diz respeito a ausência de mobilidade, de queixas subjetiva, de infecção peri-implantar, da radiolucidez, de profundidade de sondagem > 5mm e de perda óssea vertical > 0,2mm. O outro grupo, com falha nos implantes, será considerado quando houver qualquer umas das características acima citadas. Após essa fase clínica será feito o isolamento do DNA através da coleta de células da mucosa oral e sua análise com a técnica de PCR. Em seguida, será realizada a genotipagem de OPG através dePCR,genotipagem de RANK utilizando-se o PCR-RFLP, genotipagem da MBL2 pela técnica de PCR em tempo real, genotipagem DEFB1 pela técnica Q-PCR e Primer hairpin-shaped (HP), genotipagem da IL-6 em que será feita a análise dos genes por Restriction Fragment-Lenght Polymorphism (RFLP) IL-6, genotipagem IL-1 através da técnica de PCR e por último será realizada a análise microbiológica em que as bactérias Tannerellaforsythia (Tf), Porphyromonas gingivalis (Pg), Treponema

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
 PERNAMBUCO CENTRO DE
 CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



denticola (Td) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) terão a sua presença detectada através da técnica Q-PCR. Após a coleta, os dados serão analisados pelo programa Statistical Package of Social Science (SPSS) versão 13.0, através de métodos estatísticos descritivos e inferenciais.

A normalidade de distribuição dos dados será testada para se verificar a adequação do teste estatístico (paramétrico ou não paramétrico). Serão realizadas análises bi-variadas para se verificar a associação ou não das variáveis avaliadas e o insucesso nos implantes. Após estas análises será realizada uma análise de regressão logística multivariada para verificar quais as variáveis de maior influência sobre os resultados obtidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador atendeu às solicitações que geraram pendências de forma adequada.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 28 de Agosto de 2012

Assinado por:
 GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br

NORMAS DA REVISTA

Clinical Oral Implants Research

1. General

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. Ethical guidelines

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

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

2.3 Clinical Trials

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

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

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

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

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

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

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

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

Creative Commons Attribution License OAA
--

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

2.8 OnlineOpen

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

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

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

3. Submission of manuscripts

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site

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

3.1. Getting Started

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

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

3.2. Submitting Your Manuscript

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

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

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

3.5. **Suggest a Reviewer**

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

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

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

3.7. **E-mail Confirmation of Submission**

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

3.8. **Manuscript Status**

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

3.9. **Submission of Revised Manuscripts**

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

4. **Manuscript types accepted**

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

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

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

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

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

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

5. Manuscript format and structure

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

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

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

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

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

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author

responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3.

References

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

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

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

b) The order of the items in each reference should be:
 (i) for journal references:
 name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:
 name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town

of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

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

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

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

Examples:

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

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

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

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures:

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

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

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

6. After acceptance

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

6.1 Proof Corrections

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

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

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

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

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

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted -

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