

**Correlação entre a expressão de Osteocalcina e a de marcadores da reabsorção óssea (Rank, RankL E OPG) em sítios implantáveis das maxila e mandíbula**

Donizete de Castro e SILVA, Andrea de Castro PEREIRA, Aline Carvalho BATISTA, Rejane Faria RIBEIRO-ROTTA

Faculdade de Odontologia - UFG, 74605-020, Brasil  
donizetecs@hotmail.com / rejanefff@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Implante dentário, imunoistoquímica, marcadores da formação e reabsorção óssea

Revisado pelo orientador.

Orientando: Donizete de Castro e Silva (Aluno de Graduação, Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Goiás – UFG)

Orientadora: Rejane Faria Ribeiro-Rotta (Professora Associada, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás – UFG)

## 1. INTRODUÇÃO

O sucesso e insucesso/falha do tratamento com implantes dentários podem ser vistos sob diferentes aspectos. O sucesso pode ser alcançado sob o ponto de vista fisiológico (presença e manutenção da osseointegração, ausência de dor e outros processos patológicos), da sua função como parte de um sistema orgânico (capacidade de mastigar) e satisfação do usuário (estética e ausência de desconforto). Conseqüentemente, a falha pode ser medida quantitativamente, como, por exemplo, quando o implante apresenta mais de 2 mm de perda óssea peri-implante após o primeiro ano de carga mastigatória ou bolsas de sangramento excedendo 5 mm de profundidade periodontal (ESPOSITO et al. 1998a).

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

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

O termo qualidade óssea é complexo, compreendendo vários parâmetros microscópicos, morfológicos e moleculares (LINDH; OBRANT; PETERSSON, 2004), sem uma definição consensual na literatura. Porém, é utilizada em diferentes classificações clínicas subjetivas (LEKHOLM E ZARB, 1985, MISCH, 1990, LINDH et al 1996,) para o planejamento e prognóstico do tratamento com implantes. A análise da chamada “qualidade óssea”, sob o ponto de vista molecular, ainda não foi estudada e tem potencial para contribuir para um melhor entendimento dessa característica óssea.

A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea pode contribuir para a investigação da fisiopatologia óssea em sítios implantáveis e pode, em associação aos exames por imagem, caracterizar melhor a qualidade óssea. Porém, até o momento, não há estudos que avaliem a relação desses mediadores com os diferentes tipos ósseos da maxila e mandíbula.

Neste contexto, uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos envolve o sistema recentemente descoberto, RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B)-RANKL (RANK ligante)-OPG (osteoprotegerina). O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e exerce seus efeitos por meio de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003), uma vez que quando OPG está ligada ao RANKL, este não pode se ligar ao RANK, impossibilitando dessa forma que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoclastos e não haja reabsorção óssea. O desequilíbrio desse sistema RANK/RANKL/OPG é observado na osteoporose, artrite reumatóide, doença periodontal (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; AMORIM et al., 2008) e recentemente foi demonstrado em lesões fibro-ósseas da maxila e mandíbula (ELIAS et al., 2010), porém a expressão dessas moléculas nos diferentes padrões de osso “normal” ainda não foi estudada..

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

Logo, a investigação da relação entre a expressão de marcadores da reabsorção e da formação óssea pode contribuir para a fisiologia dos diferentes tipos ósseos e abrir novos “insights” na definição da “qualidade óssea”, conferindo suporte para que outros estudos, especialmente os longitudinais, investiguem o real impacto dessa característica óssea no resultado do tratamento com implantes dentários.

Portanto, o objetivo deste estudo foi correlacionar a expressão das moléculas reguladoras da reabsorção (RANK, RANKL e OPG) e formação óssea (OSTEOCALCINA) em sítios implantáveis da maxila e mandíbula.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Seleção e caracterização da amostra**

A amostra desse estudo observacional foi composta por lâminas com cortes microscópicos de espécimes ósseos, submetidos a técnica de imunistoquímica, obtidos por biópsias realizadas durante o preparo dos sítios implantáveis de maxila e mandíbula, de pacientes com indicação para tratamento com implantes dentários. Esses pacientes integram a amostra do projeto "AVALIAÇÃO CLÍNICA, RADIOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE SÍTIOS PARA IMPLANTES DA MAXILA E MANDÍBULA", submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG) (Processo n. 114/2007) e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Processos n.418/2008 e 860/2009) e cadastrado no SAPP WEB sob número 28568.

Os fragmentos ósseos foram removidos utilizando uma trefina de 2,7mm de diâmetro interno, especialmente confeccionada, que serviu como broca inicial do preparo do alvéolo cirúrgico para colocação do implante. Logo após a remoção de cada fragmento ele foi irrigado com soro fisiológico, fixado em formol 10% tamponado, desmineralizado, processado, incluído em bloco de parafina, seccionado em micrótomo (Leica RM2165) e montados em lâminas silanizadas.

### **2.2. Técnica da Imunoistoquímica**

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

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

Tabela 1 - Anticorpos utilizados

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

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

- **Osteócitos e osteoblastos:** para identificação das células positivas e negativas foi utilizado um retículo de integração em rede quadrada (4740680000000-Netzmik-rometer 12.5x, Carl Zeiss), acoplado na objetiva do microscópio, cuja área no aumento de 40 corresponde a  $0,0961 \text{ mm}^2$ . A densidade ( $\text{mm}^2$ ) e a porcentagem de cada amostra foram calculadas, tendo sido analisados até 10 campos microscópicos consecutivos para cada amostra, a depender do seu tamanho;
- **Osteoclastos:** O número total de células positivas e negativas foi obtido por meio da análise de toda a extensão da amostra;
- **Medula:** A proporção de células marcadas positivamente por RANKL, OPG e OC em relação ao conjunto de todas as células do campo foi avaliada utilizando-se um sistema de gradação proposto por Tóbon-Arroyave (2005) modificado: 1) <25% das células marcadas; 2) 25-50% das células marcadas; 3) 51-75% das células marcadas e 4) >75% das células marcadas. A classificação foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, sendo que os resultados discordantes foram definidos por consenso. Foram analisados até 10 campos microscópicos para cada amostra, a depender do seu tamanho.

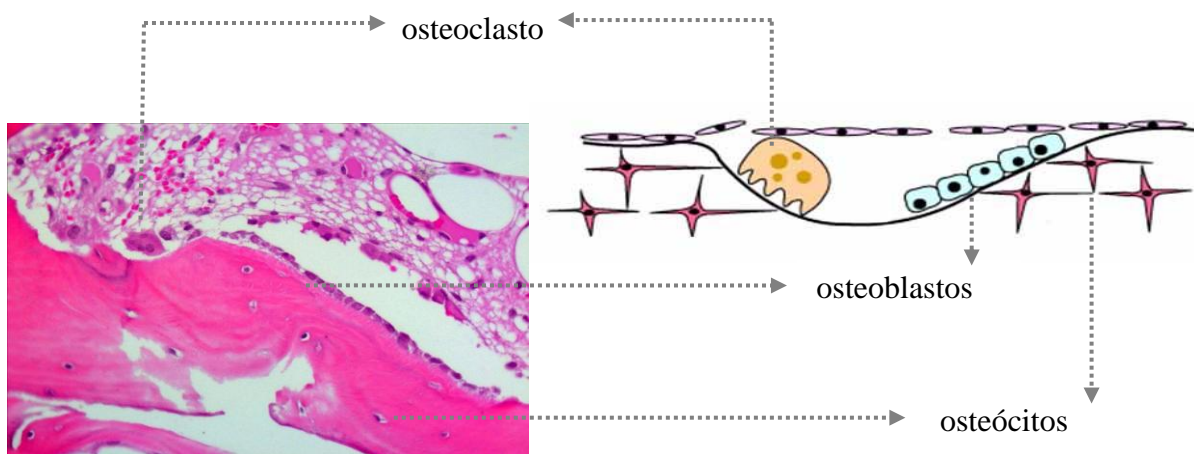


Figura 1. Células responsáveis pela remodelação óssea.

### 2.3. Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada por meio de estatística descritiva expressa em valores mínimos e máximos, média e desvio padrão e os seguintes testes não-paramétricos: a) Coeficiente de Correlação de Pearson para a associação dos parâmetros clínicos, radiográficos e moleculares; b) Análise de Variância (ANOVA) para comparação dos tipos ósseos das classificações subjetivas dos cirurgiões-dentistas (PP e L&Z) com os parâmetros moleculares e o c) Teste de Tukey, realizado posteriormente ao da Análise de Variância (ANOVA), para identificar a posição das diferenças estatisticamente significantes. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $P < 0.05$ . Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA).

## 3. RESULTADOS

Um total de 46 espécimes foram biopsiados de 32 pacientes (14 do sexo masculino e 18 do sexo feminino, com idade entre 25 e 67 anos (média = 42 anos) foram incluídos na amostra desse estudo. Os espécimes ósseos foram alisados pela técnica da imunohistoquímica. Dos 46 espécimes obtidos a partir dos sítios ósseos implantáveis desses pacientes, 28 foram da região posterior da mandíbula, 9 da maxila anterior e 9 da maxila posterior. Todos os voluntários com região anterior de mandíbula edêntula não cumpriram os critérios de inclusão no estudo.

Ao aplicar o Coeficiente de Correlação de Pearson para a associação dos parâmetros moleculares obteve os resultados da tabela 2.

Foi analisada a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> associada ao número de células RANK<sup>+</sup> e a densidade de células RANK L<sup>+</sup> e OPG<sup>+</sup>. Os dados da tabela revelam que houve associação entre a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com o número de células RANK<sup>+</sup>. Quando avaliado a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com a densidade de células RANK L<sup>+</sup> e células OPG<sup>+</sup> verifica-se que houve correlação entre as variáveis nos osteócitos. No entanto, não houve relação entre a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com a densidade de células RANK L<sup>+</sup> e densidade de células OPG<sup>+</sup> em osteoblastos.

Foi analisada a porcentagem de células Osteocalcina<sup>+</sup> com o número de células RANK<sup>+</sup> e a porcentagem de RANK L<sup>+</sup> e porcentagem de células OPG<sup>+</sup>. Os dados da tabela revelam que não houve associação entre a porcentagem de células Osteocalcina<sup>+</sup> com o número de células RANK<sup>+</sup> nem com a porcentagem de células RANK L<sup>+</sup> e porcentagem de células OPG<sup>+</sup> tanto em osteócitos quanto em osteoblastos.

Portanto, houve relação entre a Densidade de Osteocalcina e a Densidade de RANKL<sup>+</sup> e OPG em osteócitos.

Tabela 2. Relação dos moduladores da formação óssea

	n	r	p
<b>Quantidade de células RANK+</b>			
Densidade de células Osteocalcina <sup>+</sup>	40	0,333	0,0355
% de células Osteocalcina <sup>+</sup>	40	-0,262	0,1020
<b>Densidade de Osteócitos RANKL<sup>+</sup></b>			
Densidade de células Osteocalcina <sup>+</sup>	40	0,613	0,0000
<b>Densidade de Osteoblastos RANKL+</b>			
Densidade de células Osteocalcina <sup>+</sup>	40	0,090	0,5806
<b>Densidade de Osteócitos OPG<sup>+</sup></b>			
Densidade de células Osteocalcina <sup>+</sup>	41	0,455	0,0028
<b>Densidade de osteoblastos OPG<sup>+</sup></b>			
Densidade de células Osteocalcina <sup>+</sup>	38	0,042	0,8012
<b>% de Osteoblastos OPG<sup>+</sup></b>			
% de células Osteocalcina <sup>+</sup>	38	0,066	0,6928
<b>% Osteócitos Osteocalcina<sup>+</sup></b>			
% de células RANKL <sup>+</sup>	40	0,089	0,5868
% de células OPG <sup>+</sup>	41	-0,212	0,1832
<b>% de Osteoblastos Osteocalcina<sup>+</sup></b>			
% de células RANKL <sup>+</sup>	40	0,062	0,7037
% de células OPG <sup>+</sup>	41	0,126	0,4312

Correlação de Pearson,  $P < 0.05$

Neste estudo, os espécimes ósseos foram agrupados de acordo com a classificação de tipos ósseos (tabela 3), segundo as três metodologias utilizadas: PP (simulando rotina clínica empírica), L&Zoriginal (LEKHOLM,ZARB, 1985) e Lindh (LINDH et al, 1997). Os critérios de cada uma das classificações foram associados com sua respectiva expressão dos



reguladores do metabolismo ósseo (RANK<sup>+</sup>, RANK L<sup>+</sup>, OPG<sup>+</sup> e Osteocalcina), na expectativa de estabelecer uma correlação útil para integrar as ferramentas utilizadas no entendimento das características ósseas que determinam a qualidade desse tecido. Nessa associação observa-se que a densidade de osteócitos OPG<sup>+</sup> influencia na classificação de PP (tabela 4). Enquanto que a porcentagem de osteoblastos RANK L<sup>+</sup> influencia na classificação L&Zoriginal (tabela 5). Não foram encontradas nenhuma outra relação de densidade ou porcentagem de marcadores do metabolismo ósseo que esteja associado com a classificação dos tipos ósseos.

Tabela 3. Frequência dos tipos ósseos de acordo com as classificações PP, L&Zoriginal e Lindh

Tipo Ósseo	PP		L&Zoriginal		Lindh	
	n	%	n	%	n	%
1	5	11	9	20	16	35
2	14	30	12	26	25	54
3	21	46	15	32	5	11
4	6	13	10	22	–	–
TOTAL	46	100	46	100	46	100

n- número absoluto de sítios

Tabela 4. Influência da densidade de osteócitos OPG<sup>+</sup> na classificação PP

Classificação PP						
Densidade de osteócito OPG <sup>+</sup>						
Tipo ósseo	N	Média	DP	IC(95%)		Valor de p
				Mínimo	Máximo	
1	14	164,43	34,03	144,78	184,08	
2	23	121,74	50,90	99,73	143,75	0,023
3	4	145,25	21,83	110,50	179,99	

Teste ANOVA,  $P < 0,05$

Tabela 5. Influencia da porcentagem de osteoblastos RANK L<sup>+</sup> na classificação L&Z

Classificação L&Z						
Porcentagem (%) de osteoblasto RANKL <sup>+</sup>						
Tipo ósseo	N	Média	DP	IC(95%)		Valor de p
				Mínimo	Máximo	
1	8	79,64	5,14	75,34	83,93	
2	9	65,44	5,95	60,87	70,01	
3	13	72,89	9,37	67,22	78,55	0,004
4	10	71,64	7,27	66,45	76,84	

Teste ANOVA,  $P < 0.05$

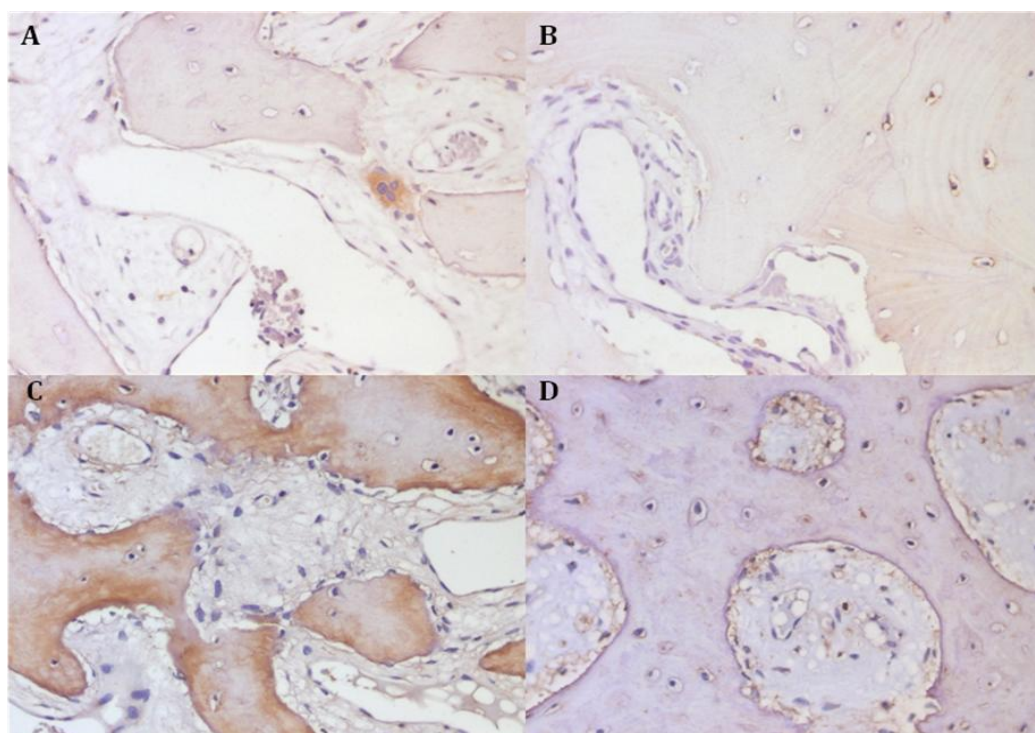


Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica dos marcadores da remodelação óssea - (A) RANK; (B) RANKL; (C) Osteocalcina e (D) OPG - em osso tipo 2, de acordo com o sistema de classificação L & Z (coloração imunoistoquímica, X40 ampliação original).

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, os espécimes ósseos foram agrupados de acordo com a classificação de tipos ósseos, segundo as três metodologias utilizadas: PP (simulando rotina clínica empírica), L&Zoriginal (LEKHOLM,ZARB, 1985) e Lindh (LINDH et al, 1997). Os critérios de cada uma das classificações foram associados com suas respectivas expressões de reguladores do metabolismo ósseo (Rank, RankL, OPG e Osteocalcina), na expectativa de estabelecer uma correlação útil para integrar as ferramentas utilizadas no entendimento das características ósseas que determinam a qualidade desse tecido.

Considerando-se que RANKL é uma molécula indutora da reabsorção óssea e a OPG seu bloqueador (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003), a presença tecidual de uma maior quantidade de RANKL em relação à OPG poderia estar associada a um tecido ósseo menos denso e vice-versa, favorecendo à identificação subjetiva das classificações ósseas pelo clínico. No contexto da implantodontia, os ainda escassos estudos imunoistoquímicos e moleculares investigam os aspectos geralmente associados à periimplantite (Duarte et al,2009) e sugerem que o desequilíbrio da razão OPG/RankL está inversamente relacionada com a severidade da doença perimplantar, ou seja, conforme diminuía-se a razão OPG/RankL, há um favorecimento à reabsorção óssea perimplantar.

Apesar da maioria dos estudos sugerirem esse desequilíbrio molecular no contexto de lesões osteolíticas e a doença perimplantar (BOSTANCI et al. 2007; DUARTE et al. 2009), na análise da amostra de nosso estudo, que é constituída de osso saudável, não foi encontrada nenhuma relação considerável entre os marcadores do metabolismo ósseo e as classificações subjetivas dos clínicos.

O desequilíbrio entre OPG-RankL e OC, além das lesões osteolíticas, têm sido associado a um momento de reabsorção na remodelação óssea fisiológica (KHOSLA et al. 2008). Ao analisar a expressão molecular num espécime ósseo saudável, não necessariamente o desequilíbrio OPG/RankL e Osteocalcina caracterizaria melhor ou pior qualidade óssea, pois esse desequilíbrio poderia advir de um momento da remodelação óssea que aquele sítio se encontra. A análise da expressão gênica do tecido poderia fornecer maior compreensão da expressão desses marcadores.

Houve correlação entre a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com a densidade de osteócitos RANK L<sup>+</sup> e OPG<sup>+</sup>, o que não foi percebido em osteoblastos, outros estudos são necessários para se descobrir as causas desse achado.

Um dado encontrado nesse estudo, e que não era esperado, foi a relação entre a densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com o número de células RANK<sup>+</sup>, o que pode ser resultado de uma atividade óssea metabolicamente maior. No entanto, não é sabido o mecanismo biológico que favorece ao aumento desses dois marcadores. Outros estudos são necessários para a comprovação desse achado.

## **5. CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A partir dos resultados deste estudo, pode-se afirmar que a expressão das moléculas reguladoras da remodelação óssea parecem não exercer influência nos aspectos morfológicos da maxila e mandíbula, não influenciando dessa forma as classificações subjetivas dos tipos ósseos.

A correlação entre a Osteocalcina e os mardadores da reabsorção óssea foi percebida apenas quando relacionada à densidade de células Osteocalcina<sup>+</sup> com a densidade de osteócitos RANK L<sup>+</sup> e OPG<sup>+</sup>, sugerindo dessa forma que quando da presença de reabsorção óssea, caracterizada pela molécula RANK L<sup>+</sup> há também um aumento significativo de moléculas que inibem a reabsorção, OPG<sup>+</sup>, e promovem a formação óssea, Osteocalcina. Não é sabido o motivo dessa relação ocorrer apenas nos osteócitos e não ocorrer nos osteoblastos. Sugere-se que sejam desenvolvidos estudos que analisem a expressão desses reguladores no intuito de se estabelecer o motivo dessa relação ocorrer apenas nos osteócitos.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi subsidiado por auxílio à pesquisa concendido pela FAPEG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás; CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ILAPEO - Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, Curitiba.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASKARY, A.S.E.; MEFFERT, R.M.; GRIFFIN, T. Why do dental implants fail? Part II. **Implant dentistry**, v.8, n.3, p. 265-277, 1999.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.15, p. 337-42, May/2003.

DALLE CARBONARE, L.; VALENTI, M.T.; BERTOLDO, F.; ZANATTA, M.; ZENARIS, S.; REALDI, G.; CASCIO, V. L. O.; GIANNINI, S. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron**, v.36, p.609-16, 2005.

ENGQUIST, B.; BERGENDAHL, T.; KALLUS, L.U. A retrospective multicenter evaluation of osseointegrated implants supporting overdentures. **Int J Oral Maxillofacial Implants**, v.3, p.129-34, 1998.

ESPOSITO, M.; HIRSH, J.M.; KEKHOLM, U.; THOMPSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. Part I: Success criteria and epidemiology. **J. Oral. Sci.**, Eur., v.106, p.527-551 1998.

ESPOSITO, M.; HIRSH, J.M.; KEKHOLM, U.; THOMPSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. Part II: Etiopathogenesis. **J Oral Sci**, Eur., v.106, p.721-764, 1998.

LEKHOKM, U.; ZARB, G.A. Patient selection and preparation. In: Brånemark, P-I; Zarb GA; Albrektsson T et al. **Tissue integrated prostheses: Osseointegration in clinical dentistry**. Quintessence Publ Co., Chicago, p.199-209, 1985.

LINDH, C.; PETERSSON, A.; ROHLIN, M. Assessment of the trabecular pattern before endosseous implant treatment: diagnostic outcome of periapical radiography in the mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.82, p.335-43, 1996.

LIND, C.; OBRANT, K.; PETERSSON, A. Maxillary bone mineral density and its relationship to the bone mineral density of the lumbar spine and hip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.98, p.102-9, 2004.

MISCH, C.E. Density of bone – Effect on treatment plans, surgical approach, and progressive loading. **Int J Implant**, v.6, p.23-31, 1990.

NKENKE, E.; HAHN, M.; WEINZIERL, K.; RADESPIEL-TROGER, M.; NEUKAM, F.W.; ENGELKE, K. Implant stability and histomorphometry: a correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. **Clin Oral Implants Res**, v.14, p.601-9, 2003.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocrin Rev**, v.14, p.424-42, p.1993.

TRISI, P.; RAO, W. Bone classification: Clinical-histomorphometric comparison. **Clin Oral Impl Res**, v.10, p.1-7, 1999.