

Geraldo Luiz Griza

ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNOMARCAÇÕES (OC, VEGF, TRAP) EM HUMANOS, NAS CIRURGIA DE LEVANTAMENTO DO ASSOALHO DE SEIO MAXILAR UTILIZANDO OSSO AUTÓGENO E HETERÓGENO.

Araçatuba
2015

Geraldo Luiz Griza

ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNOMARCAÇÕES (OC, VEGF, TRAP) EM HUMANOS, NAS CIRURGIA DE LEVANTAMENTO DO ASSOALHO DE SEIO MAXILAR UTILIZANDO OSSO AUTÓGENO E HETERÓGENO.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho.

Araçatuba
2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G872e Griza, Geraldo Luiz.
Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterógeno para levantamento de seio maxilar : avaliação histológica e imunoistoquímica em humanos / Geraldo Luiz Griza - Araçatuba, 2015
65 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Osvaldo Magro Filho

1. Seio maxilar 2. Transplante ósseo 3. Substitutos ósseos
I. Título

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais **Odilo e Nilva**, a **Yeda**, ao **Pedro** e a **Rafaela**.

Pai e mãe: obrigado pelo carinho, pela dedicação, pelas constantes ajudas, este passo também é de vocês.

À minha esposa **Yeda** por sua compreensão, por seu estímulo, por sua presença.

Meus queridos filhos **Pedro e Rafa**, minha pequena grande família, a vida não teria muito sentido sem vocês. Que isto lhes sirva de estímulo para suas vidas, não porque tenhamos que ser DOUTORES, mas por que temos que buscar o conhecimento.

Agradecimentos

Obrigado a este **SER SUPERIOR QUE É “DEUS”**, pela sua constante guarda, por me dar forças para superar as barreiras que são inerentes à vida.

Obrigado pela presença em cada passo.

Ao meu orientador Professor Doutor Osvaldo Magro Filho, obrigado pela possibilidade de realizar este sonho, pela orientação, pela ética e responsabilidade social que demonstra. Dinho, que DEUS continue te Abençoando.

Ao Professor Doutor Idelmo Rangel Garcia Junior, agradeço a confiança e ensinamentos. Sua forma de ensinar é singular tanto na parte técnica como na de Ser Humano. Aprendi muito.

A Professora Doutora Roberta Okamoto, pelas suas orientações e disponibilidade, pela sua gentileza e paciência.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Francisley Ávila Souza, Alessandra Marcondes Aranega, Ana Paula Farnezzini Bassi, Daniela Ponzoni, Letícia Helena Theodoro por estarem dispostos a me ajudar quando necessário.

Aos meus Amigos e Colegas da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucal-Maxilo-Facial da UNIOESTE, Eleonor Alvaro Garbin Junior, Natasha Magro Érnica, Ricardo Augusto Conci e Greisson Rabelo de Oliveira, obrigado pelo companheirismo, por me auxiliarem em minhas ausências.

Ao Professor Doutor Celso Koogi Sonoda, pela sua disponibilidade e desprendimento

A Daniela Colet, Ricardo Augusto Conci, Maria Del Pilar Rodrigues Sanches e Rodrigo dos Santos Pereira, obrigado pela ajuda, vocês foram fundamentais neste trabalho.

Ao Colegiado do Curso de odontologia da UNIOESTE por permitir e estimular a busca pelo conhecimento.

A Associação Brasileira de Odontologia, regional de Cascavel, que possibilitou que a pesquisa fosse desenvolvida em suas dependências.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, Alaíde Gonçalves, Edilson Ervolino, obrigado pela ajuda.

Ao Leonardo Perez Faverani por sua contribuição.

Aos técnicos de laboratório e clínica, Paulo, Odair, e ao secretário, Renato, obrigada pela ajuda quando necessária.

A Dirce e Cleide, muito obrigado pela ajuda desinteressada e competente.

Aos meus amigos e colegas de pós -graduação, André Luis Fabris, Lamis Meorin Nogueira, Carlos Timóteo, Helen EsperBianca Bravin, SabrinaFerreira, Juciléia Maciel, Giovanna Francisconi, Fernando Isquierdo de Souza, Fernanda Boos, Gabriel Ramalho, Patrícia Bermejo, Juliana Zorzi, Wilian Moraes, obrigado pela convivência fraterna, que tenham muito sucesso na vida.

Ao Luan, que muito me ensinou e ajudou na confecção deste trabalho

As estagiárias de Ciências Básicas, Danila de Oliveira, Karen Lumi Nakasato, Fernanda Yogui, obrigado por fazer possível este trabalho.

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, sem vocês nada teria sido possível, pois cada um de vocês com o seu sim, nos permitiu o desenvolvimento da mesma.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho acontecesse.

Epígrafe

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar a alma humana, seja apenas outra alma humana"

Carl Jung.

Resumo

GRIZA GL. Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterógeno para levantamento de seio maxilar. Avaliação histológica e imunoistoquímica em humanos. [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de análise histológica e imunoistoquímica, a neoformação e a remodelação óssea após a realização de cirurgias de elevação de seio maxilar, através de imunomarcagem das proteínas osteocalcina, VEGF e TRAP. Foram selecionados 25 pacientes que foram submetidos a cirurgia para elevação do seio maxilar, através da técnica aberta sendo divididos em 3 grupos: A. Osso autógeno particulado; AB. Osso autógeno e heterógeno (Bio-oss[®]) e B. Apenas osso heterógeno (Bio-oss[®]). Passados seis meses desta intervenção, os pacientes foram submetidos a cirurgia para instalação dos implantes, concomitante a remoção de amostra do osso enxertado nesse local, previamente. Na avaliação histológica foi observada neoformação óssea nos três grupos, com presença de trabéculas de osso maduro. Nos grupos B e AB, foi observada a presença de grânulos do biomaterial com tecido ósseo circundante. A análise estatística apontou diferença significativa (ANOVA $p=0.002$), sugerindo uma maior neoformação óssea no grupo de osso autógeno. Na avaliação imunoistoquímica não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos experimentais (A, B e AB), bem como as proteínas analisadas (OC: $p=0,657$; VEGF: $p=0,133$; TRAP: $p=0,163$). Conclui-se que a utilização de Bio-Oss[®], associado ou não ao osso autógeno, para levantamento de seio maxilar através da técnica da janela lateral resulta em reparo ósseo. Uma previsível formação óssea é possível quando se utiliza esse material como osteocondutor.

Palavras chave: seio maxilar, transplante ósseo, substitutos ósseos.

Abstract

GRIZA GL Comparative study of the use of autogenous and heterogenous bone tomaxillary sinus lifting. Histological and immune-histochemistry evaluation inhuman. [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015.

The objective of this study was to evaluate, through histological and immunohistochemistry analysis, the neoformation and bone remodeling after surgery of maxillary sinus lift, through immunostaining of the osteocalcin, VEGF and TRAP proteins. Were selected 25 patients who underwent surgery for maxillary sinus lift, through the open technique, and these were divided into 3 groups: A –particulate autogenous bone; AB - autogenous and heterogeneous bone (Bio-oss®) and B - only heterogeneous bone (Bio-oss®). After six months of this intervention, the patients were submitted to surgery for installation of implants and concomitant removal of grafted bone sample from the surgical site. The histological evaluation showed bone neoformation in three groups, with presence of trabeculae of mature bone. In groups B and BA, it was observed the presence of granules of the biomaterial with surrounding bone tissue. A statistical analysis showed significant difference (ANOVA $p=0,002$), suggesting a greater bone neoformation in group of autogenous bone. In immunohistochemical evaluation no statistically significant differences were observed in the comparison between the experimental groups (A, B and AB), as well as the proteins analyzed (OC: $p= 0.657$; VEGF: $p= 0,133$; TRAP: $p= 0.163$). It is concluded that the use of Bio-Oss®, associated or not to autogenous bone, for maxillary sinus lift through the side window technique results in bone repair. A predictable bone formation is possible when using this material as osteoconductive.

Key words: Maxillary Sinus, Bone Transplantation, Bone Substitutes

Lista de figuras

- Figura 1:** Achado radiográfico mostrando ausência de rebordo alveolar suficiente para instalação de implantes devido à presença do seio maxilar.....41
- Figura 2:** Radiografia Panorâmica utilizada para avaliação e seleção do paciente para a pesquisa.....41
- Figura 3:** Representação esquemática da coleta da biópsia, após a elevação do seio maxilar.....42
- Figura 4:** Mensuração de porcentagem de osso neoformado, utilizando o programa ImageJ. Através da marcação e contagem dos pontos presentes no osso neoformado.....42
- Figura 5:** Imagens representativas das biópsias coletadas (25x) dos seios maxilares reconstruídos com A: osso autógeno; B: Osso autógeno e Bio-Oss® (1:1); C: Bio-Oss®. Coloração: hematoxilina e eosina em escala de 100 µm.....43
- Figura 6:** Representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea nos grupos avaliados.....44
- Figura 7:** Imunomarcações para Osteocalcina: A: Grupo A 25X; B: Grupo AB 40X; C grupo B 25X; D: Grupo B 12,5X; (MEC) Matriz extra celular mineralizada; (OB) Osteoblasto; (Ot) Osteócito.....45
- Figura 8:** Imunomarcações para VEGF A: grupo A 40X; B e C: Grupo AB 25X D: Grupo B 40X. (OB) Osteoblasto; (Ot) Osteócito46
- Figura 9:** Imunomarcações para TRAP: A: Grupo A 25X; B Grupo AB 25X; C: grupo AB 40X; D: grupo B 25X. (OC) osteoclastos.....47

Lista de tabelas

Tabela 1: Distribuição dos pacientes de acordo com gênero e idade.....48

Tabela 2: Distribuição dos grupos.....48

Tabela 3: Resultados das análises estatísticas dos dados histomorfométricos
.....48

Tabela 4: Escores representativos da análise imunoistoquímica realizada em
todas as biópsias dos 3 grupos experimentais.....49

Lista de Abreviaturas

VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial / Vascular endothelial growth factor.
TRAP	Proteína tartarato fosfatase ácida resistente / Tartrate-resistant acid phosphatase.
OC	Osteocalcina/Osteocalcin
A	Osso autógeno
AB	Bio-Oss + osso autógeno
B	Bio-Oss
mm	Milímetros (unidade de medida)
mL	Mililitros (unidade de medida)
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético (Ethylenediaminetetraaceticacid)
FOA UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
RO	Roberta Okamoto
MPRS	Maria Del Pilar Rodrigues Sanches

Sumário

1. Introdução	16
2. Proposição	19
3. Material e métodos	21
4. Resultados	27
5. Discussão	30
6. Conclusões	35
Referências	37
Figuras e tabelas	50
Anexos	47

Estudo comparativo através de imunomarcações em humanos (OC, VEGF e TRAP) quando do uso do osso autógeno e heterógeno para levantamento de seio maxilar.

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.*

Introdução

1. Introdução

A alta relevância social e de saúde do fenômeno da osseointegração é claramente observada pelos inúmeros estudos sobre fisiologia do osso e sua reparação, disponíveis na literatura, bem como a tecnologia avançada em pesquisas de biomateriais a fim de promover a formação óssea e tornar possível a reabilitação utilizando implantes dentários ¹⁻⁴. Uma condição essencial para o sucesso do tratamento com implantes é a presença de quantidade e qualidade ósseas adequadas e a maxila posterior edêntula apresenta desafios especiais para o cirurgião, que são únicos para esta região, em comparação com as outras áreas da boca devido a presença do seio maxilar ⁵⁻⁷.

A técnica de elevação do assoalho do seio maxilar usando a técnica da janela lateral é o método mais comumente aplicado para aumentar a altura do osso alveolar da região posterior da maxila, sendo que altas taxas de sucesso de implantes foram relatadas em várias revisões sistemáticas após este procedimento ^{2,5-8}. A indicação principal para cirurgia de enxerto do seio maxilar é a reconstrução com implantes prevista para a região posterior da maxila edêntula pós-exodontia e consequente perda óssea alveolar e pneumatização do seio, resultando em um osso muito atrófico para o referido implante ⁶.

Embora o osso autógeno para enxerto ainda seja considerado o padrão ouro para a reconstrução do osso, a busca por um material que eliminasse a necessidade de abordagem da área doadora levou a novos avanços na pesquisa de biomateriais ^{1,8}. Para tal cirurgia vários tipos de materiais alternativos podem ser usados, incluindo osso alógeno, heterógeno, além dos materiais aloplásticos. O material de enxerto ósseo escolhido deve fornecer viabilidade adequada para estabilizar o implante inicialmente e favorecer a osseointegração. Enxertos ósseos autógenos são os únicos materiais de enxerto que contêm osteoblastos endósseos. Além disso, um enxerto córtico-medular fornecerá proteína morfogenética óssea e fatores de crescimento que induzem à formação óssea, juntamente com um arcabouço, tendo assim atividade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora.

Os enxertos heterógenos, também conhecidos como xenógenos, são enxertos provenientes de indivíduos de espécies diferentes. Dentre os materiais

heterógenos, a matriz óssea bovina mineralizada, também chamada de hidroxiapatita bovina tem sido muito utilizada ⁶. Esses materiais são quimicamente tratados, eliminando qualquer traço de material orgânico, porém, conservando a parte mineral. Portanto, atua apenas como suporte na forma osteocondutora para que as células do hospedeiro se proliferem ³. Um substituto de osso desproteinizado de origem bovina (Bio-Oss, Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça) é frequentemente utilizado para elevação do seio maxilar, isoladamente, ou em combinação com osso autógeno ². A matriz óssea inorgânica de Bio-Oss parece ter uma estrutura microporosa semelhante ao osso esponjoso humano, facilitando a migração de osteoblastos e também uma melhor revascularização ^{2,8}.

Proposição

2. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a neoformação óssea através de análise histométrica e imunohistoquímica e caracterizar os eventos que marcam a remodelação óssea após a realização de cirurgias de elevação de seio maxilar preenchidos com três modalidades de enxerto ósseo: osso autógeno particulado; osso autógeno e heterógeno (Bio-Oss®); apenas osso heterógeno (Bio-Oss®).

Material e métodos

3. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob o número 05509112.4.0000.5420 (Anexo A).

De 25 pacientes foram coletadas 38 biópsias, visto que, em alguns pacientes foram realizados enxertos bilateralmente, e as amostras foram submetidas ao processamento histológico e imunoistoquímico para a detecção das proteínas Osteocalcina, VEGF e TRAP, no tecido ósseo analisado.

3.1. Seleção dos pacientes

Os critérios de inclusão de pacientes para o presente estudo eram:

- Do ponto de vista sistêmico: Risco cirúrgico ASA I e II; ausência de doenças do trato respiratório;
- Do ponto de vista bucal: Indicação para a reabilitação com implante dental; achado radiográfico através da radiografia panorâmica mostrando ausência de rebordo alveolar maxilar suficiente para posicionamento do implante dental e presença de seio maxilar ocupando espaço onde o implante dental deve ser posicionado.

Trinta e oito elevações do seio maxilar foram realizadas em 25 pacientes de ambos os gêneros, com idade variando entre 41 a 65 anos (Tab. 1), atendidos na Associação Brasileira de Odontologia-Regional Cascavel-PR, com volume ósseo inadequado na região posterior da maxila e rebordo remanescente menor ou igual a 5 mm de altura, avaliados radiograficamente, e selecionados para realizar cirurgias reconstrutivas ósseas para posterior instalação de próteses implanto-suportadas. Para a seleção dos pacientes realizaram-se análises de imagens diagnósticas, radiográficas (Fig.1) das áreas receptora e doadora (mento e ramo mandibular), sendo coletado osso nas áreas de maior volume.

Os critérios de exclusão eram pacientes com problemas sistêmicos não controlados, tabagistas, com histórico de radiação na área de cabeça e pescoço, doença periodontal ou patologias sinusais.

3.2. Cirurgias de enxerto

Os pacientes foram submetidos à cirurgia para elevação do seio maxilar, através da técnica da janela lateral preconizada por Tatum (1986)⁹ e divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de enxerto utilizado: Grupo A. Osso autógeno particulado; Grupo AB. Osso autógeno e heterógeno; Grupo B. Apenas osso heterógeno (Bio-Oss®), de acordo com o tipo de preenchimento do seio maxilar (Tab. 2).

Os pacientes foram medicados profilaticamente com antibiótico e corticosteroide e, no pós-operatório, com analgésicos e antiinflamatórios não esteroidais. Os mesmos eram anestesiados de acordo com as técnicas convencionais por bloqueio regional e submetidos à cirurgia.

As áreas doadoras intra-bucais do enxerto ósseo foram escolhidas pelo pesquisador de acordo com a quantidade ou volume ósseo necessário para o leito receptor (sínfise ou ramo mandibular). Para este fim utilizou-se a técnica ilustrada por Mazzonetto *et al.*⁸. Para particular o osso autógeno utilizou-se triturador ósseo manual (Neodent – Brasil). Para o grupo AB a proporção foi de aproximadamente 50% de cada tipo ósseo (1:1). Os casos selecionados para o grupo B apresentavam os remanescentes ósseos maiores (aproximadamente 5mm) e foram preenchidos com partículas pequenas (0,25 - 1 mm) de osso heterógeno inorgânico (Bio-Oss® Small) hidratados em soro fisiológico 0,9% e misturados com sangue quando acomodados através de compressão leve no seio maxilar. Em nenhuma das cirurgias houve perfuração da membrana do seio maxilar e não utilizou-se nenhum tipo de membrana de revestimento.

Antes de dispensados, os pacientes receberam instruções de cuidados pós-operatórios e, após duas semanas, regressaram para avaliação, remoção da sutura e acompanhamento do caso.

3.3. Técnica de obtenção das biopsias

Após 6 meses do procedimento de enxerto, os pacientes retornaram para novo procedimento cirúrgico objetivando a colocação dos implantes dentários osseointegráveis. Nesta etapa, coletou-se uma única amostra do osso enxertado em cada seio para biópsia, utilizando broca do tipo trefina com diâmetro de 2 mm

(Neodent - Brasil) em direção vertical, de acordo com a posição planejada para a instalação do implante. Foram instalados 74 implantes, do tipo Hexágono Externo (P-I Brånemark® -Zimmer/Brasil), de diâmetro e comprimento compatíveis com a necessidade de cada local. Os pacientes foram anestesiados convencionalmente e medicados de forma semelhante à etapa da realização dos enxertos.

3.4. Análise histológica

Realizou-se o processamento das peças no Laboratório do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP.

As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7 por 48 horas, descalcificadas em EDTA 5% (Ácido Etileno DiaminoTetracético - Merck-Frankfort/Alemanha) por 42 dias, incluídas em parafina e submetidas à microtomia para a obtenção de cortes longitudinais com 6 µm de espessura para a análise histomorfométrica e imunoistoquímica.

3.4.1 Análise Histomorfológica

Utilizou-se microscópio de luz convencional Carl Zeiss-Jenamed 2 (Jena/Alemanha) sob foco fixo e clareza de campo, com aumento inicial de 63X e 400X. Foram avaliados pelo menos quatro cortes histológicos de cada espécime. Um observador calibrado identificou a morfologia tecidual de cada grupo.

3.4.2 Análise Histométrica

As imagens dos cortes semi-seriados dos espécimes para avaliação da neoformação óssea da área enxertada foram capturadas por câmera digital (Axiocam ICc1- Zeiss- Jena/Alemanha), acoplada ao microscópio óptico Carl Zeiss - Jenamed 2 (Jena/Alemanha) e conectado a um computador Itautec infowayST43443329 DC, monitor LG □ E2355V, 800x600 dpi. As imagens eram capturadas em aumento de 63X imediatamente acima da interface entre o osso remanescente, capturando a área enxertada. Utilizou-se o programa de

processamento de imagem digital ImageJ para avaliar as fotos. O mesmo, foi calibrado em 8000 pixels, que permitiam a contagem de 192 pontos na área total da imagem. Os pontos presentes na área de osso neoformado eram contabilizados, verificando que não fossem áreas de osso enxertada. Foi transformada em densidade de área (%), considerando a área total de 192 pontos como 100%. (Fig.3)

3.5. Análise Imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Ciências Básicas da FOA-Araçatuba/UNESP.

O processamento imunoistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos, seguidos de banhos em citrisolve e banhos em concentrações decrescente de álcoois) e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01M). A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) em calor úmido. Foi realizado ainda o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado por 20 minutos. Ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%.

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário para osteocalcina (OC, Goat anti-OC - Santa Cruz Biotechnology, SC18319), TRAP (Goat anti-trap - Santa Cruz Biotechnology, SC30832) e VEGF (Goat anti-VEGF - Santa Cruz Biotechnology, SC1881). Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE).

O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo). Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de

desidratação, embebidas em xilol, as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha).

Para cada um dos anticorpos utilizados, avaliou-se a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes escores de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular com imunomarcção positiva, determinada por uma coloração marrom no citoplasma das células, durante o processo de remodelação óssea. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas mostrando o escore representativo dos grupos. O analisador (RO) foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente, atribuindo-se os escores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os escores foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado.

3.6. Análise Estatística

Após a obtenção dos resultados histométricos os dados foram tratados estatisticamente, baseados nos valores de porcentagem de neoformação óssea, pelo programa Biostat 5.0 (IDSM- Amazonas/Brasil). O teste de Shapiro-Wilk para contrastar a normalidade dos dados. Confirmada a distribuição normal dos dados foi realizado o análise de variância ANOVA, e o Tukey com o intuito de verificar as diferenças entre os grupos. Para as análises, valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Os escores obtidos da imunoistoquímica referentes as proteínas OC, VEGF e TRAP foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, o qual mostrou heterogeneidade ($p < 0,05$) para OC e VEGF, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Willis. Observou-se homogeneidade dos resultados ($p > 0,05$) para TRAP, onde aplicou-se análise de variância – ANOVA 1 fator. Para todos os testes foi utilizado o programa Sigmaplot versão 12.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, Estados Unidos da América), com nível de significância de 5%.

Resultados

4. Resultados

4.1. Análise Histomorfológica

Avaliou-se o padrão histomorfológico das lâminas coradas em HE, onde foi possível observar o processo de neoformação óssea nos três grupos, que podem ser visualizados na figura 4. No grupo A, é possível observar o padrão de trabéculas ósseas espessas em maior quantidade que os outros grupos (Fig. 4). Ainda neste grupo foram observados fragmentos de osso caracterizado pela ausência de osteócitos nas lacunas, sendo compatível com fragmentos de osso enxertado (Fig. 4A). Neste grupo também foram observadas áreas de tecido conjuntivo. No grupo AB observou-se o mesmo padrão de neoformação óssea que no grupo anterior, entretanto, as trabéculas mostram-se mais espessas, caracterizando um maior grau de maturidade do tecido ósseo. No grupo B observou-se entre os grânulos, trabéculas delgadas de osso maduro bem organizado, caracterizado pela presença de osteócitos, assim como áreas de tecido conjuntivo (Fig. 4).

4.2. Análise Histométrica

Os dados obtidos por meio da análise histomorfométrica permitiram quantificar a porcentagem de neoformação óssea em cada grupo estudado (Figura 5). Foram avaliados no mínimo quatro cortes de cada peça, tomando como referência a área acima da linha da interface entre o osso residual e a área enxertada.

Ao realizar a estatística dos dados coletados na histometria, estes apontaram diferenças estatísticas no teste ANOVA um fator ($p=0.002$). Para determinar a diferença entre grupos foi aplicado o teste de Tukey, apontando diferença estatisticamente significativa na comparação do grupo A com o B e A com AB ($p=0.001$ cada um). Os dados da estatística estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados das análises estatísticas dos dados histomorfométricos

Grupo	N	Média ± desvio padrão	p(ANOVA)	p(Tukey)
A	15	48.96 ± 25.6	0,002	A - AB p=0-01 ab
AB	11	29.00 ± 4.71		AB – B= ns
B	12	32.26 ± 6.02		B – A = 0.01 a

p<0.05

ns= não significante

a= Estatisticamente significativa em relação ao grupo B e A

b= Estatisticamente significativa em relação ao grupo AB e A

4.3. Análise Imunoistoquímica

A representação dos escores dos grupos A, AB e B das imunomarcações das proteínas OC, VEGF e TRAP podem ser visualizadas na tabela 4.

De maneira geral, a imunomarcação para OC foi intensa (3) nos grupos A e B e, variou de moderada a intensa (2-3) no grupo AB. Para VEGF, a imunomarcação foi intensa no grupo B, moderada no grupo AB e variou de moderada a intensa no grupo A. Para TRAP, a imunomarcação foi moderada nos grupos A e B e, variou de moderada a intensa no grupo AB.

Estatisticamente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos experimentais (A, B e AB), bem como as proteínas analisadas (OC: p=0,657; VEGF: p=0,133; TRAP: p=0,163).

As figuras 5, 6 e 7 demonstram as fotomicrografias das imunomarcações de ambos os grupos, sugerindo calcificação, revascularização e reabsorção óssea.

Tabela 4: Escores representativos da análise imunoistoquímica realizada em todas as biópsias dos 3 grupos experimentais.

	Osso autógeno	BioOss + autógeno	BioOss
OC	3	2-3	3
VEGF	2-3	2	3
TRAP	2	2-3	2

Discussão

5. Discussão

O aumento do assoalho do seio maxilar utilizando a técnica da janela lateral foi o método selecionado por ser o mais comumente aplicado para esse fim e por possuir altas taxas de sobrevivência de implantes e próteses ². Um estudo recente da abordagem lateral e técnicas trans-alveolares concluiu que a elevação do seio maxilar é um método de tratamento previsível demonstrando altas taxas de sobrevivência, com poucas complicações ¹⁰.

O substituto ósseo reabsorvível ideal deve ter propriedades biomecânicas semelhantes ao osso autógeno no momento da implantação, e deve então ser remodelado em osso novo. Isto significa que a reabsorção do material e a formação de osso novo devem ser equilibradas para assegurar uma mecânica funcional do osso ¹¹. Este fato corresponde ao observado neste trabalho, pois ao fim de 6 meses observou-se a presença de osso neoformado e a presença ainda de grânulos remanescentes de Bio-Oss®.

O potencial osteocondutor de substitutos de osso é regularmente avaliado em humanos por mensuração da qualidade e quantidade de osso recentemente formado na área pesquisada. Tais avaliações são realizadas utilizando radiografia e/ou biópsia feita a partir do seio enxertado no final do processo de reparo, o que na maioria das vezes estende-se a 6 meses ¹². Por esse motivo optou-se pela coleta das amostras após 6 meses, porém, esse intervalo de tempo prolongado entre o tratamento e a avaliação da sua eficácia dificulta a comparação do processo detalhado e potencial de formação óssea dos vários substitutos em questão durante o período de espera, sendo apenas possível observar o resultado ao final.

O Bio-Oss® é um xenoenxerto bovino desproteínizado reabsorvível, quimicamente e fisicamente idêntico ao osso humano, sob a forma de grânulos corticais, que apresenta 75-80% de porosidade e uma grande malha de interligação do sistema de macro e microporos que facilita a angiogênese e a migração de osteoblastos ¹³. Sendo assim, a matriz óssea inorgânica de Bio-Oss® parece ter uma estrutura microporosa semelhante ao osso esponjoso humano.

O enxerto ósseo autógeno, adicionado ao biomaterial, promove a adição de características osteoindutoras capazes de melhorar a qualidade do osso na

região enxertada ¹⁴. A utilização de osso bovino (Bio-oss®) em combinação com o osso autógeno oferece muitas vantagens. Em primeiro lugar, ele permite que o volume do enxerto possa ser aumentado consideravelmente, evitando a necessidade de coletar grandes quantidades de osso autógeno. Em segundo lugar, as propriedades osteocondutoras do osso bovino atuam como um arcabouço que é essencial para a remodelação óssea. Terceiro, o osso bovino é um carbonato de apatita cálcio-deficiente com um tamanho de cristal de cerca de 10 nm, tornando a sua reabsorção consideravelmente mais lenta, mantendo o volume do enxerto durante o período de espera ¹⁵.

A substituição completa do ósseo autógeno por substitutos ósseos foi avaliada em muitos estudos. Jensen *et al.* realizaram duas revisões sistemáticas cujo objetivo foi testar a hipótese de não haver diferenças no resultado do tratamento com implantes quando do uso de Bio-Oss® puro ou Bio-Oss® associado ao osso autógeno como enxerto para o aumento do assoalho do seio maxilar usando a técnica de janela lateral. Constataram que a estabilidade volumétrica do enxerto melhorou significativamente com o aumento da proporção de Bio-Oss®. A Regeneração Óssea, contato osso-implante, os valores biomecânicos em teste com implante, e biodegradação de Bio-Oss® após elevação do seio maxilar com Bio-Oss® ou Bio-Oss® misturado com osso autógeno nunca foram comparados dentro do mesmo estudo em animais. Assim, a hipótese de não haver diferenças entre o uso de Bio-Oss® e Bio-Oss® associado ao osso autógeno como enxerto para elevação do seio maxilar não poderia ser confirmada nem rejeitada com base em estudos com animais existentes até o momento ^{2,16}. Neste estudo observou-se que não houve diferenças significantes na formação óssea quando se compara o grupo AB e B, não sendo possível afirmar a superioridade de um tipo de enxerto em relação ao outro.

O osso autógeno confirmou seu potencial como enxerto ideal para as reconstruções ósseas, apresentando a maior porcentagem de neoformação óssea em relação a uso do Bio-Oss® ou da sua associação com ele. Sendo isto confirmado através do teste estatístico aplicado ANOVA, ($p=0.002$) e o teste de Tukey nas comparações entre os grupos.

A interação biológica entre a interface osso-biomaterial é essencial para o sucesso clínico a longo prazo. A neoformação óssea em contato com as

partículas do Bio-Oss® tem sido relatada em diferentes estudos ¹⁷⁻¹⁹, corroborando com os achados deste estudo, onde houve neoformação óssea ao redor das partículas, além de apresentar uma maior porcentagem de neoformação óssea no grupo B (32.26%) quando comparado com o grupo AB (29%), embora não tenha apresentado diferença estatística na comparação destes grupos.

Foi observado e é importante destacar que a neoformação óssea imediatamente acima da interface leito receptor/enxerto, é maior nos 3 grupos, diminuindo à medida que se aproxima da membrana de Schneider. As trabéculas de osso no grupo AB são menores quando comparadas com as do grupo B, o que pode ser explicado pela presença de partículas de osso autógeno que exercem seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor, pelo transplante de células vitais, e ao mesmo tempo acreditamos que menores taxas de neoformação óssea foram encontradas no grupo AB devido a associação com o biomaterial que não favorece a sobrevivência das células mais apicais, isolando-as do leito nutritivo vascular.

Na análise histológica, assim como na imunoistoquímica, após 6 meses de pós-operatório foi possível observar a presença dos grânulos do Bio-Oss® em contato direto com osso neoformado. Os grânulos de Bio-Oss® são reabsorvidos gradualmente pelos osteoclastos e posteriormente é depositado osso neoformado ²⁰. Acredita-se que a microestrutura do Bio-Oss® favoreça a deposição de proteínas que beneficiem a neoformação óssea na superfície do biomaterial, especialmente alguns fatores de crescimento e proteínas da matriz óssea que podem infiltrar a camada superficial do biomaterial e ligar-se à hidroxiapatita deste ²¹.

Os grânulos de Bio-Oss® não afetam o processo de osseointegração dos implantes já que estes estão em contato direto com o osso neoformado, e a presença dos grânulos parece ser uma vantagem porque garante a manutenção do volume do enxerto ²¹ e provoca um composto de biomaterial e osso neoformado ao invés de uma estrutura óssea homogênea ²³.

A osteocalcina é uma proteína não-colagênica da matriz óssea. É sintetizada por osteoblastos totalmente diferenciados e possui propriedades específicas na mineralização óssea. É considerada um marcador conhecido de viabilidade, diferenciação e capacidade osteogênica nessas células¹. A

osteocalcina está associada ao *turnover* ósseo quando a reabsorção e formação estão ocorrendo simultaneamente ²⁴. Nesta pesquisa, as marcações imunistoquímicas para esta proteína demonstra que em todos os grupos estudados houve uma atividade intensa da osteocalcina, evidenciando que mesmo após o período de 6 meses, permaneceu a atividade em relação a formação e mineralização óssea.

A migração e diferenciação celular no tecido de cicatrização só ocorrem se uma vascularização suficiente está presente. Especialmente no tecido ósseo, existe uma íntima relação entre os vasos sanguíneos e células ósseas. O VEGF está envolvido na angiogênese, isto é, estimular a proliferação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos existentes, uma situação comum em condições de reparação ²⁵. Os resultados obtidos nessa pesquisa mostram que há ativação do mecanismo da angiogênese e de formação de osteoblastos. A VEGF estimula a formação de capilares a partir dos já existentes no leito receptor, sendo extremamente importante no curso do reparo ósseo. Neste estudo a imunomarcaçã para o VEGF foi intensa no grupo B, sendo superior ao grupo A e AB que continham osso autógeno. O osso autógeno, conhecido pelo seu potencial osteoindutivo, demonstrou uma menor expressão de proteínas. Sugere-se que, por algum mecanismo, o organismo é capaz de reconhecer a presença desse osso e inibir os sinais para a liberação de fatores osteoindutores que já estariam presentes no enxerto. Além disso, o estímulo inicial para reparação em enxertos corticais e medulares é o mesmo, mas a densidade do osso cortical torna difícil a revascularização e impede a proliferação celular ²⁶.

A enzima TRAP é secretada pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea. A atividade da TRAP apresentou-se de fraca a moderada nas marcações realizadas em todos os grupos, confirmando que há atividade osteoclástica presente no material, porém não de forma intensa devido ao período de maturação do enxerto.

Estes eventos tornaram-se possíveis provavelmente pelas propriedades osteocondutoras do biomaterial relacionadas à sua microestrutura porosa, semelhante ao osso autógeno.

Conclusões

6. Conclusões

Pelos resultados obtidos nesse trabalho conclui-se que:

- O osso autógeno apresentou maiores taxas de neoformação óssea em comparação a associação do osso autógeno e Bio-Oss® ou de Bio-Oss® isolado.

- O osso autógeno, a associação do autógeno e Bio-Oss®, e o Bio-Oss® isolado, permitem que entre suas partículas haja a expressão das proteínas osteocalcina, TRAP e VEGF, resultando em mineralização, remodelação e revascularização ósseas, quando se utiliza a técnica da janela lateral para cirurgia de levantamento do seio maxilar.

Referências

Referências

1. Chaves MD, de Souza Nunes LS, de Oliveira RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA, Ribeiro DA. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Craniomaxillofac Surg* 2012 Dec; 40(8):315-20.
2. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41:114–120.
3. Abrahams JJ, Hayt MW, Rock R. Sinus lift procedure of the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174(5):1289-92.
4. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(Suppl.):237–59.
5. Raja SV. Management of the posterior maxilla with sinus lift: Review of techniques. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1730-1734.
6. Stern A, Green, J. Sinus lift procedures: an overview of current techniques. *Dent Clin N Am* 2012; 56:219–233.
7. Park YB, Jeon HS, Shim JS, et al. Analysis of the anatomy of the maxillary sinus septum using 3-dimensional computed tomography. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69(4):1070–8.
8. Mazzonetto R, Netto HD, Nascimento FF. *Enxertos ósseos em implantodontia*. Editora Napoleão: 1ed; 2012, 574p.
9. Tatum OH. Maxillary sinus and implant reconstructions. *Dent Clin North Amer* 1986; 30(2):207-29.
10. Tan WC, Lang NP, Zwahlen M, Pjetursson BE. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. Part II: transalveolar technique. *J Clin Periodontol* 2008 Sep; 35(8 Suppl):241-54.
11. Zhang Z, Egaña JT, Reckhenrich AK, Schenck TL, Lohmeyer JA, Schantz JT, Machens HG, Schilling AF. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. *Acta Biomater* 2012 Jan;8(1):13-9.

12. Srouji S, Ben-David D, Funari A, Riminucci M, Bianco P. Evaluation of the osteoconductive potential of bone substitutes embedded with Schneiderian membrane- or maxillary bone marrow – derived osteoprogenitor cells. *Clin Oral Impl Res* 2012; 00:1–7.
13. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nencovski CE. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and β -tricalciumphosphate in canine. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 19(3): 357-68.
14. D. Rickert, J. J. R. Huddleston Slater, H. J. A. Meijer, A. Vissink, G. M. Raghoobar. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factor or (solely) bone substitutes - A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41: 160–167.
15. Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Aguilar M, Sanchez-Fernandez E, Cutando A, Wang HL. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:376–82.
16. Jensen T, Schou S, Svendsen PA, Andersen G, Forman JL, Gundersen HJG, Terheyden T, Holmstrup P. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios. A radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2012 Aug;23(8):902-10.
17. Ewers R, Goriwoda W, Schopper C, Moser D, Spassova E. Histologic findings at augmented bone areas supplied with two different bone substitute materials combined with sinus floor lifting. Report of one case. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15(1):96- 100.
18. Orsini G, Traini T, Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piccirilli M, et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74(1):448-57.
19. Pettinicchio M, Traini T, Murmura G, Caputi S, Degidi M, Mangano C, et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. *Clin Oral Investig* 2012;16(1):45-53.
20. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli J, Botticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16(9):789-93.
21. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15(3):315-24.

22. de Vicente JC, Hernandez-Vallejo G, Brana-Abascal P, Pena I. Maxillary sinus augmentation with autologous bone harvested from the lateral maxillary wall combined with bovine-derived hydroxyapatite: clinical and histologic observations. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21(4):430-8.
23. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann (R) Bone Ceramic, Bio- Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24(5):576-85.
24. Hawthorne AC. Comparative evaluation about onlay allograft and autogenous graft. Histological, immunohistochemical and tomograft study in the rabbits. *Dissertação [mestrado] Riberirão Preto, 2010.*
25. De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immuno expression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:584-90.
26. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia I Jr, Okamoto R, Okamoto T, Filho OM. Evaluation of the presence of VEGF, BMP2 and CBFA1 proteins in autogenous bone graft: histometric and immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 2014 Jun; 42(4):333-9.

Figuras e tabelas

Figuras



Figura 1: Achado radiográfico mostrando ausência de rebordo alveolar suficiente para instalação de implantes devido à presença do seio maxilar.



Figura 2: Radiografia Panorâmica utilizada para avaliação e seleção do paciente para a pesquisa.

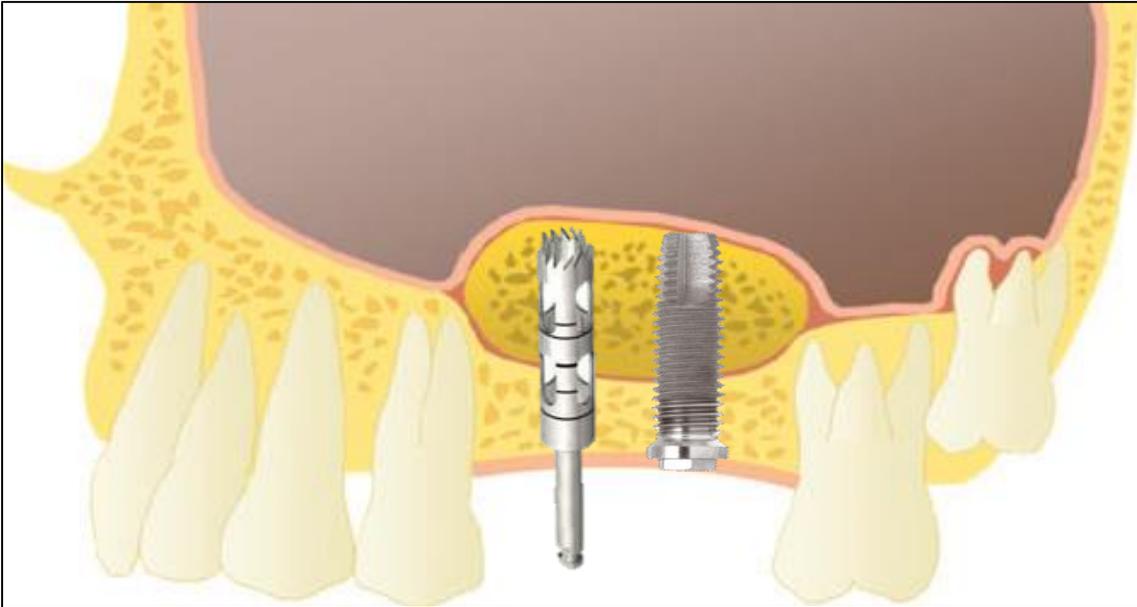


Figura 3: Representação esquemática da coleta da biópsia, após a elevação do seio maxilar.

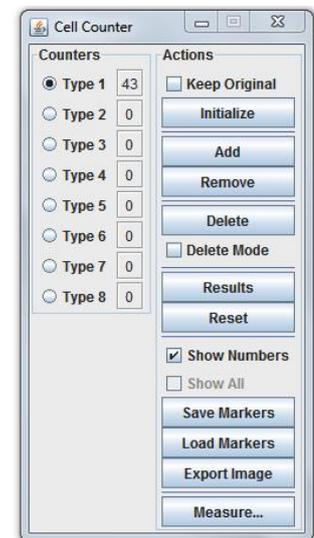
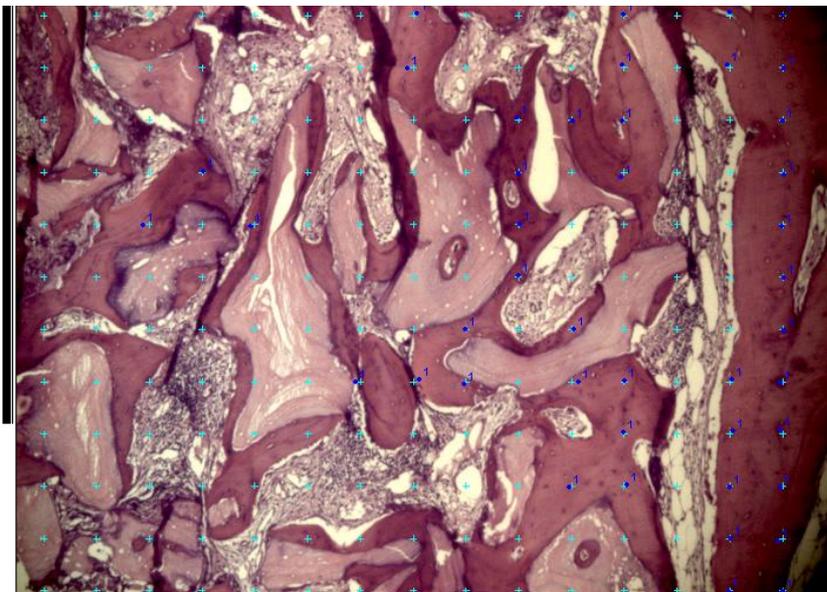


Figura 4: Mensuração de porcentagem de osso neoformado, utilizando o programa ImageJ. Através da marcação e contagem dos pontos presentes no osso neoformado.

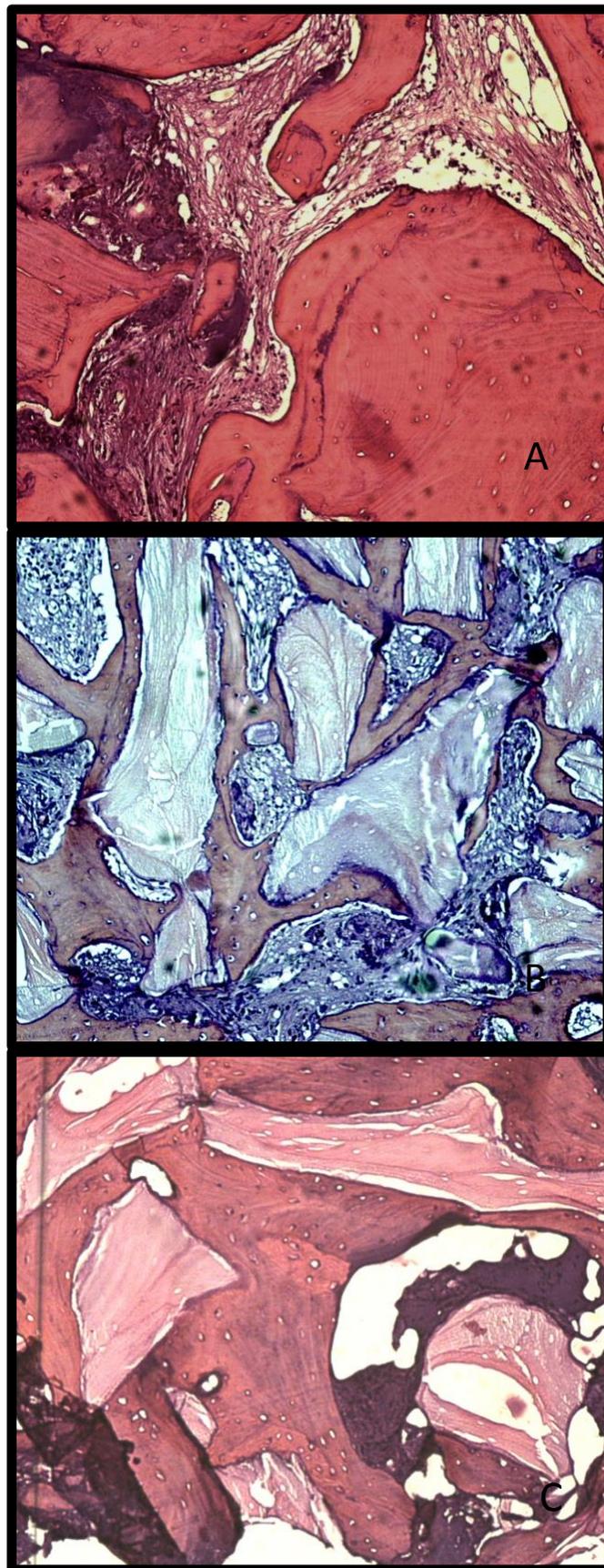


Figura 5: Imagens representativas das biópsias coletadas (25x) dos seios maxilares reconstruídos com A: osso autógeno; B: Osso autógeno e Bio-Oss® (1:1); C: Bio-Oss®. Coloração: hematoxilina e eosina em escala de 100 μm .

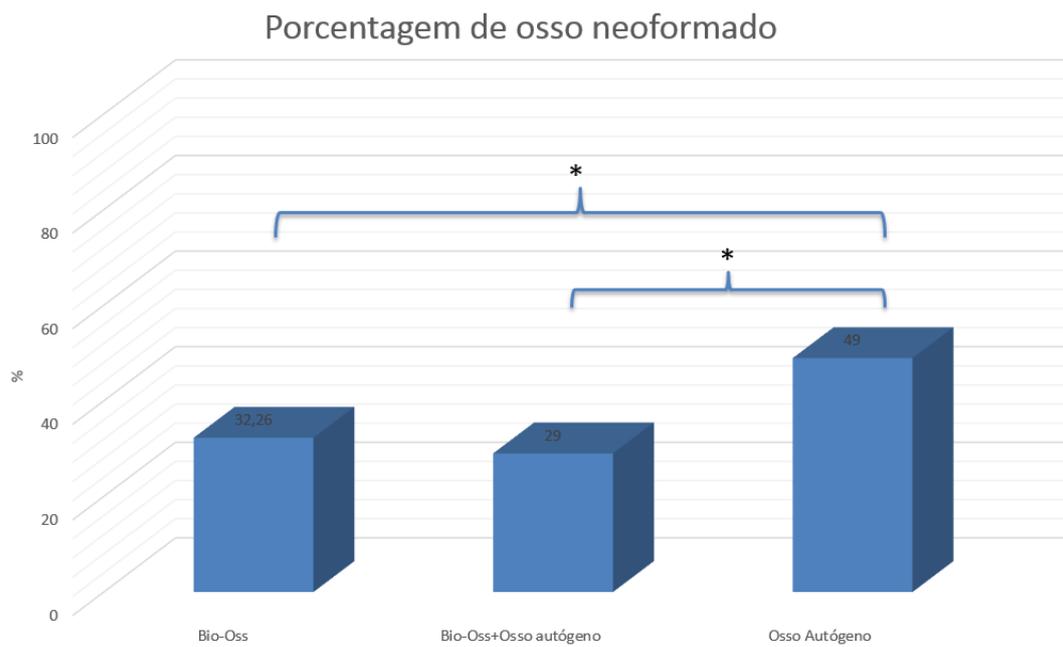


Figura 6: Representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea nos grupos avaliados.

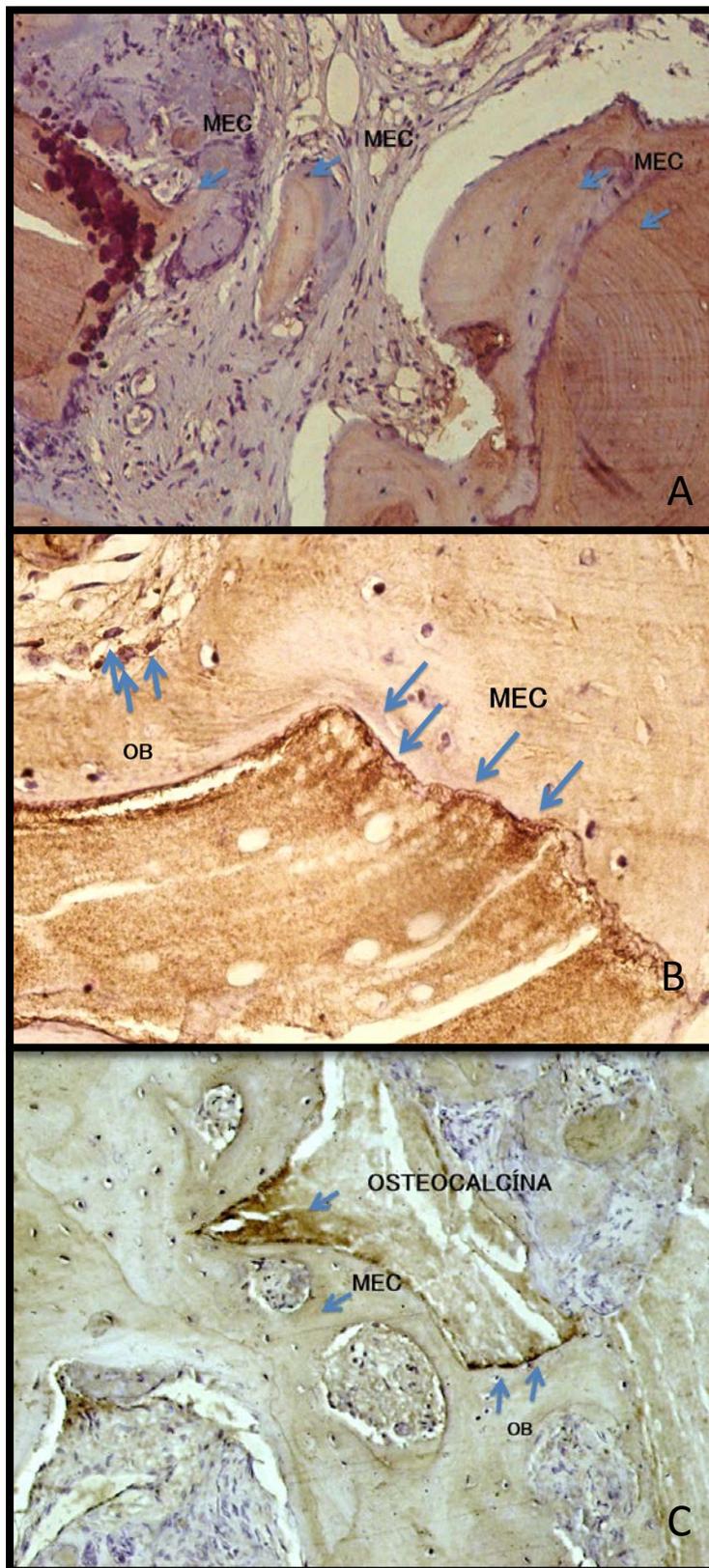


Figura 7: Imunomarcações para Osteocalcina: A: Grupo A 25X; B: Grupo AB 40X; C grupo B 25X; (MEC) Matriz extra celular mineralizada; (OB) Osteoblasto; (Ot) Osteócito.

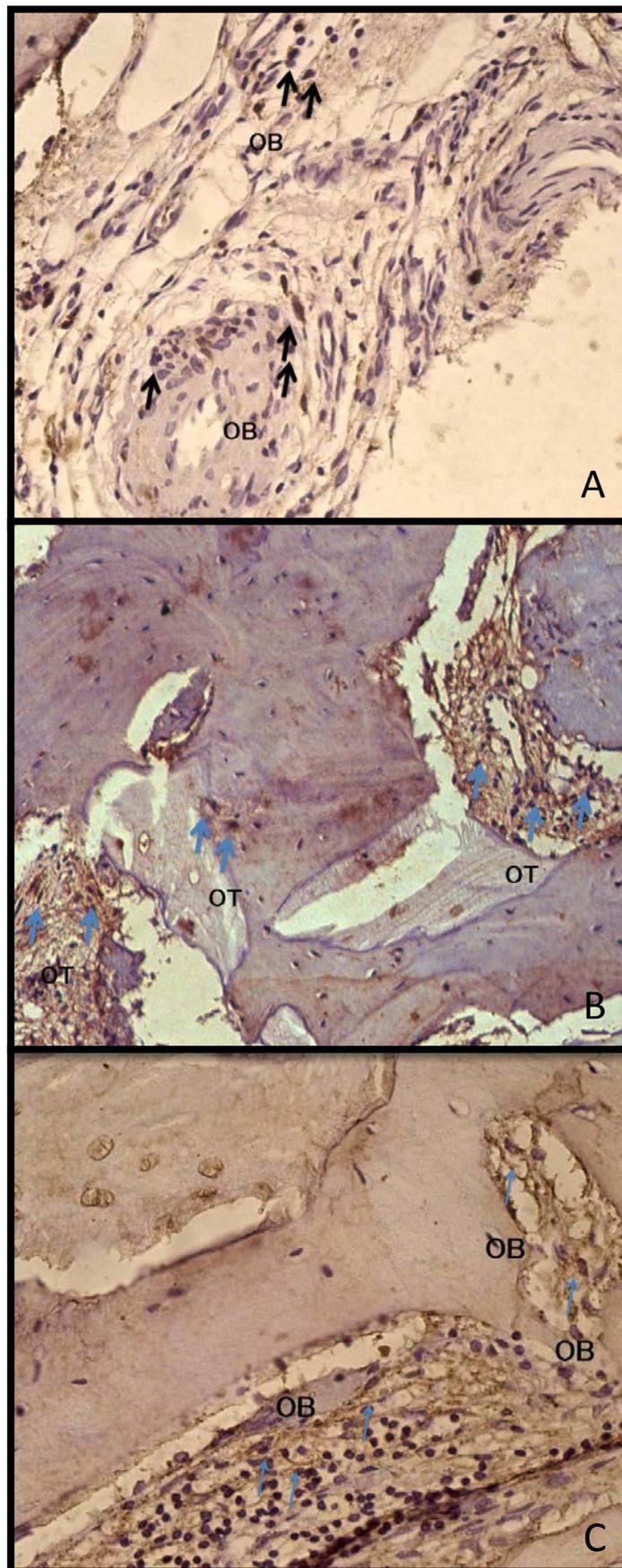


Figura 8: Imunomarcações para VEGF A: grupo A 40X; B : Grupo AB 25X; C: Grupo B 40X. (OB) Osteoblasto; (Ot) Osteócito.

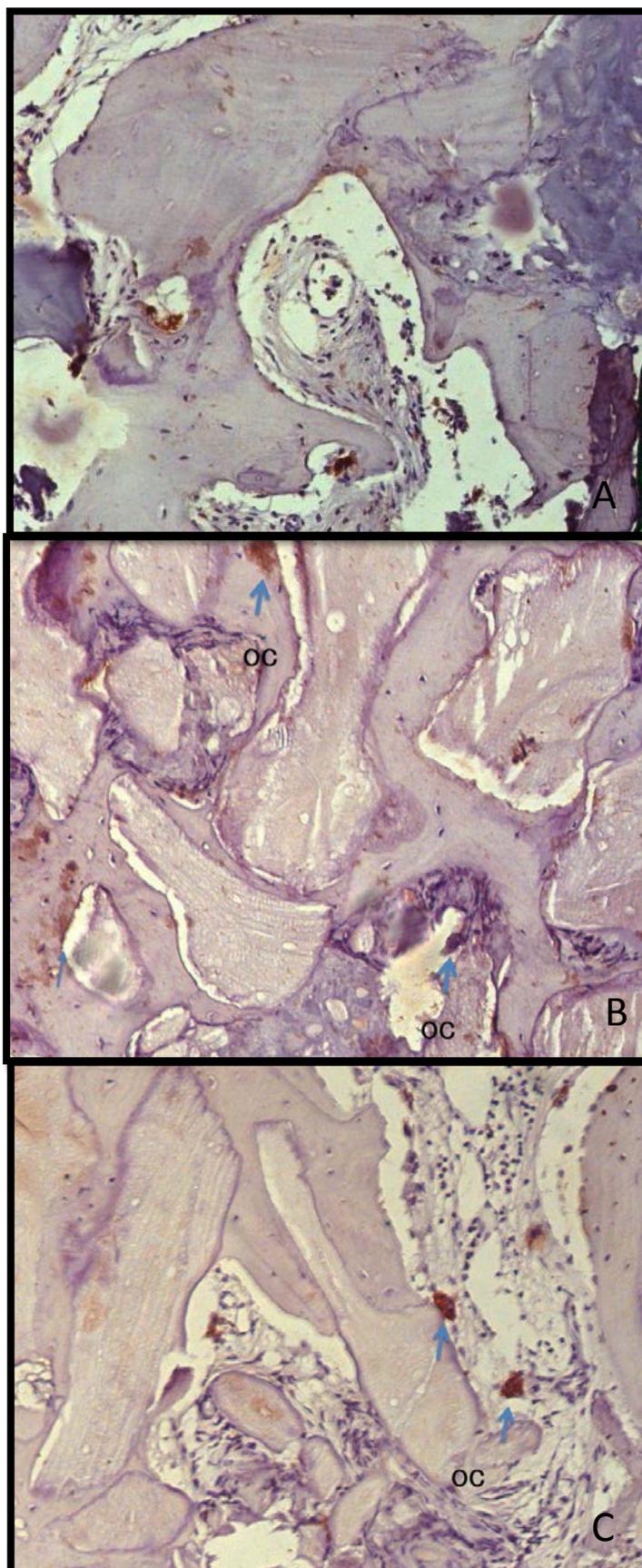


Figura 9: Imunomarcações para TRAP: A: Grupo A 25X; B Grupo AB 25X; C: grupo B 25X. (OC) osteoclastos.

Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos pacientes de acordo com gênero e idade:

Total de pacientes	Quantidade por Gênero	Variação de idade (Anos)	Média de idade
25	Masculino - 13	41-65	51 ± 7
	Feminino - 12		

Tabela 2: Distribuição dos grupos

Grupo	Material	N de seios operados
A	Osso Autógeno	15
AB	1:1Bio-Oss® (Geistlich AG)+ enxerto autógeno	11
B	BioOss® (Geistlich AG)	12

Tabela 3: Resultados das análises estatísticas dos dados histomorfométricos

Grupo	N	Média ± desvio padrão	p(ANOVA)	p(Tukey)
A	15	48.96 ± 25.6	0,002	A - AB p=0-01 ab
AB	11	29.00 ± 4.71		AB – B= ns
B	12	32.26 ± 6.02		B – A = 0.01 a

p<0.05

ns= não significante

a= Estatisticamente significante em relação ao grupo B e A

b= Estatisticamente significante em relação ao grupo AB e A

Tabela 4: Escores representativos da análise imunoistoquímica realizada em todas as biópsias dos 3 grupos experimentais.

	Osso autógeno	BioOss + autógeno	BioOss
OC	3	2-3	3
VEGF	2-3	2	3
TRAP	2	2-3	2

Anexos

Anexo A

Aprovação do Comitê de ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterólogo para levantamento de seio maxilar. Avaliação histológica e imunoistoquímica em humanos.

Pesquisador: Geraldo Luiz Griza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05509112.4.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 632.219

Data da Relatoria: 28/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata o presente parecer de avaliação de emenda proposta para o projeto de pesquisa intitulado "Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterólogo para levantamento de seio maxilar: Avaliação histológica e imuno-histoquímica em humanos", aprovado por este CEP em 14/12/2014. O pesquisador solicita autorização para avaliar no mesmo material obtido dos participantes da pesquisa, mais dois parâmetros do metabolismo ósseo. Justifica o pedido pela necessidade de ampliação dos resultados, para melhor elucidação da problemática apresentada. Solicita ainda ampliação de 12 meses no prazo final.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será comparar o reparo ósseo, aos 6 meses pós-operatórios, do levantamento de seio maxilar preenchido com três modalidades de enxerto ósseo: osso autógeno particulado; Osso autógeno e heterólogo (Bio-oss) e apenas osso heterólogo (bio-oss). Para tanto serão realizadas avaliações histológica e imuno-histoquímica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco adicional, uma vez que não serão coletadas novas amostras dos participantes da pesquisa.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



Continuação do Parecer: 632.219

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há considerações.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP aprova a inclusão das análises e a ampliação do prazo. Salienta que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 05/11/2014.

ARACATUBA, 05 de Maio de 2014

Assinador por:

Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

Anexo B

Normas da Revista para publicação

Guide for Authors

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

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

Online Submission

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

Editorial Policy

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

Declarations

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

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

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data

(2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content

(3) final approval of the version to be submitted.

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Conflict of interest

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

Role of the funding source

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

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have

entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at External link <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at External link <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: External link <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

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

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

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

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in

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

Language Editing Services

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

Article Types

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

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references
- review papers - no limit on length or number of references

- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

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

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

Criteria for Publication

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

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

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays

in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

Format

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

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

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

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

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

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

Title page

The title page should give the following information: • title of the article

- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent

- sources of support in the form of grants
- key words.

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

Abstract

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

Text

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

Introduction

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

Materials and Methods

- Give the full details, limit references • Should be written in the past tense
- Include exact technical specifications, quantities and generic names • Limit the number of subheadings, and use the same in the results section • Mention statistical method • Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense

- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

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

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

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

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

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be

named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

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

References

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

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

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

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov). When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and

full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

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

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

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

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

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

Tables

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

Figures

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

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

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

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

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

Funding body agreements and policies

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

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within 48 hours. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from External link <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: External link

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

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

Offprints

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

Accepted Articles

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

Instructions for Letters to the Editor

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

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

Anexo C

Esta pesquisa foi realizada sem interesses comerciais e não obteve apoio financeiro, nem doação de qualquer empresa citada no estudo.

Descrição da técnica cirúrgica utilizada para a realização dos enxertos.

Os pacientes foram medicados profilaticamente com protocolo antibiótico e antiinflamatório, anestesiados por bloqueio regional do nervos mentonianos bilaterais e lingual bilateral, com Articaina a 4% (DFL) e submetidos à cirurgia.

Remoção do enxerto da Sínfise mandibular

A incisão foi realizada na mucosa labial inferior com profundidade de aproximadamente 2mm estendendo-se de canino a canino deixando uma faixa de mucosa aderida à gengiva queratinizada. Com a visualização dos músculos mentuais, a lâmina foi inclinada em direção ao osso e novamente incisada até o periósteo e realizado o descolamento mucoperiostal. A osteotomia foi realizada com uma broca 701 sob irrigação constante com solução fisiológica 0.9%. Os limites do bloco foram delimitados da seguinte forma: 5 mm abaixo das raízes dentárias superiormente, acima da protuberância mentoniana inferiormente e nas raízes dos caninos lateralmente. Os blocos foram removidos com auxílio de cinzéis e particulados em triturador ósseo manual. A sutura foi realizada por planos com mononylon 5.0 por meio de pontos simples na musculatura e contínuos na mucosa oral.

Remoção do enxerto do ramo mandibular

A incisão foi realizada, com lamina de bisturi, ao longo da linha oblíqua, estendendo-se do ramo ascendente até o segundo molar inferior. Foi realizado o descolamento mucoperiostal e exposição da face externa do corpo mandibular. Com uma broca 701, sob irrigação constante com solução fisiológica 0.9%, foram delimitadas as osteotomias na parte superior e laterais do bloco. A delimitação inferior foi feita com um disco de aço e, com auxílio de cinzéis, removeu-se um bloco que foi triturado com um particulador ósseo. A sutura foi realizada com mononylon 5.0 através de pontos contínuos.

Acesso ao seio maxilar

Foi realizada incisão em crista alveolar com lâmina 15, com retalho de espessura total, seguida de uma incisão relaxante na região mesial ou distal,

deslocamento do periósteo e confecção de uma janela óssea na parede lateral do seio maxilar com broca esférica diamantada. Em seguida foi realizado o descolamento delicado da membrana sinusal com curetas específicas. A tábua óssea da janela vestibular foi mantida e elevada para que configurasse o teto da cavidade formada. O osso enxertado foi depositado na cavidade e levemente compactado. Finalizando, o retalho foi reposicionado e suturado com mononylon 5.0 em pontos simples.

Antes de dispensados os pacientes receberam instruções de cuidados pós-operatórios e após duas semanas, regressaram para avaliação, remoção da sutura e acompanhamento e preservação do caso.