

Rodrigo dos Santos Pereira

**ANÁLISE TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA, HISTOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO BETA TRICÁLCIO FOSFATO COM
OSSO AUTÓGENO EM AUMENTO DO SOALHO DE SEIO
MAXILAR.**

Araçatuba
2014

Rodrigo dos Santos Pereira

**ANÁLISE TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA, HISTOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO BETA TRICÁLCIO FOSFATO COM
OSSO AUTÓGENO EM AUMENTO DO SOALHO DE SEIO
MAXILAR.**

Dissertação 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 Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira.

Araçatuba
2014

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Eu dedico esta conquista aqueles que são meu alicerce como Ser humano, que me ensinaram e, até hoje ensinam, o valor da vida: **a minha família.**

Ao meu pai, Pascoal Alves Pereira, um exemplo de homem e cidadão. Que me ensinou a ser idôneo em todas as áreas da minha vida e a nunca desistir das dificuldades. Pai eu te amo.

À minha mãe, Lídia Maria Góes dos Santos Pereira, uma mulher guerreira, batalhadora e temente à Deus. Me ensinou a ter paciência durante minhas lutas, sempre com muito amor e dedicação. Eu agradeço à Deus todos os dias por ter você na minha vida. Eu te amo com todo meu coração.

À minha irmã, Renata Góes dos Santos Pereira, por todos os dias em que esteve presente em minha vida. Mesmo com todas as adversidades presentes leva a vida com alegria. Obrigado por todo carinho. Eu te amo !

À alegria da nossa casa, Maria Luíza, minha sobrinha querida! Você é minha princesa. Depois que você nasceu não teve um dia sequer que não acorde pensando em você. Obrigado por me fazer sorrir todos os dias.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Meu maior prazer é a busca pelo conhecimento. Esta dádiva foi-me dada pelo autor da vida, Deus. Eu O agradeço por todo seu infinito amor e por estar presente em todos os momentos da minha vida. Agradeço, também, por tudo que tens feito na vida da minha família, pelos meus amigos, por todos os dons que me deste e pelos relacionamentos que me proporcionam um crescimento diário. Muito obrigado pelo dom da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira. O senhor é uma dádiva em minha vida. O senhor me proporcionou oportunidades que jamais poderia imaginar em ter. A cada dia tens me demonstrado o caminho certo a seguir e a nunca desistir em meio as dificuldades. És um exemplo de orientador. Obrigado pelo privilégio de ser seu orientado, de sua compreensão e de mostrar o infinito mundo do conhecimento. Que Deus abençoe o senhor e a toda sua família. Com toda minha alma, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Nada engrandece mais ao homem do que ajudar ao próximo. O senhor me mostrou que a humildade, paciência e dedicação são requisitos primordiais não somente para ser Mestre, para também ser humano. Este é seu dom, ser Mestre. Muito obrigado pela oportunidade e pela confiança que o senhor depositou em mim. Seu coração realmente não cabe no peito de tão grande que é. Jamais esquecerei de seus conselhos, muito obrigado.

À Prof. Dra. Roberta Okamoto. A sua serenidade e paciência em ensinar é um dos meus exemplos dentro da UNESP. Muito obrigado por aceitar o convite para ser minha banca avaliadora. Esta é uma forma de agradecer por dividir seus conhecimentos comigo. A senhora é um exemplo de educadora.

Ao Prof. e amigo Dr. Nicolas Homsy. O senhor me deu oportunidades quando ainda era acadêmico. Mesmo não me conhecendo na época, me proporcionou a alegria de conhecer a Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e da chance de compartilhar do seu conhecimento. Ao senhor agradeço por ter me inspirado no sonho de ser professor e de me incentivar em estudar na UNESP – FOA. Muito obrigado por sempre me aconselhar nas minhas decisões acadêmicas e profissionais. O senhor tem a minha mais sincera gratidão.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Dr. Osvaldo Magro Filho, Michel Saad Neto, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Ávila Campos e ao ilustríssimo Professor Tetuo Okamoto. Meu muito obrigado por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados no departamento. Vocês têm a minha admiração.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi. Obrigado por confirmar a minha escolha na carreira de docente. Seus conselhos e conhecimentos engrandeceram a minha formação e me fizeram descobrir o professor que há em mim. Ao senhor meu muito obrigado.

À minha querida amiga Fernanda Brasil Daura Jorge Boos. Graças você todo esse trabalho se tornou possível. A você desejo todas as bênçãos que Deus pode proporcionar e que encontres a felicidade nesta nova fase da sua vida. Meu muito obrigado por compartilhar do seu conhecimento e por todos os momentos durante o nosso curso.

Ao colega e graduando Luis Fernando Gorla, o meu muito obrigado por todo seu empenho na parte tomográfica deste estudo. Seus esforços jamais serão esquecidos por mim e pela Fernanda Boos.

À “Cleidinha” (Cleide Lemes Toquetão), obrigado por nos acolher no departamento com todo seu carinho e dedicação. Saudades de encontra-la durante as manhãs em sua sala para ouvir seus conselhos. Que Deus abençoe você e toda sua família.

Ao Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, obrigado pela sua atenção, dedicação e amizade. O senhor é um dos mais queridos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e por isso é um dos meus exemplos de Mestre. Obrigado pelo conhecimento compartilhado, pelas nossas conversas na clínica e por estar sempre prontamente à atender seus alunos.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Dirce, Renato, Odair, Paulo e Gilmar. Meu muito obrigado pelo acolhimento que tive dentre vocês. Que Deus abençoe a vida de cada um imensamente.

À Prof. Dra Pâmela Santos, meu muito obrigado por toda ajuda durante meu curso, por todos os momentos de conhecimento compartilhado e pela sua amizade. Deus a abençoe plenamente.

Ao amigo Dr. Rodolpho Valentini Neto. Quando aqui cheguei você se prontificou a me acolher, orientar e aconselhar. Você foi meu primeiro amigo em Araçatuba. Meu muito obrigado por sua amizade.

À amiga Maria del Pilar, meu muito obrigado por todos os momentos vividos. Você sempre se prontificou a me ensinar e ajudar durante todo meu curso. Jamais esqueci da sua ajuda durante as clínicas e principalmente sua orientação na formulação dos meus trabalhos. Que Jesus te guarde e proteja na sua carreira.

À colega de curso Giovanna Francisconi, meu muito obrigado por todo a ajuda prestada antes mesmo de eu chegar em Araçatuba. Sempre prestativa e atenciosa comigo nos momentos mais difíceis, desejo a você toda sorte do mundo. Deus esteja sempre com você.

Ao colega André Luis da Silva Fabris, obrigado por toda ajuda prestada nesta empreitada e por sua amizade. Deus abençoe e guarde seu caminho nas veredas da odontologia.

Ao meu “irmão” Fernando Isquierdo de Souza. Muito obrigado pela sua amizade, sua prestabilidade e seu acolhimento. Um amigo indescritível. Sempre pude contar com você, tenha certeza que onde eu estiver, também pode contar comigo. Deus te guie e guarde em sua jornada.

Aos colegas Geraldo Griza, Julierme Ferreira, Wilian Morais, Gabriel Ramalho, Júlio Cesar, Juciléia Maciel, Lamis Meorin, Bianca Bravim, Patrícia Bermejo, Sabrina Ferreira, Juliana Zorzi, Igor Mariotto, Carlos Timóteo, Ana Paula Simões, Flávia Pereira. Vocês têm minha

admiração, amizade e carinho. Muito Obrigado por fazerem dos meus momentos em Araçatuba tão especial.

Aos alunos da graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Bruno Mendes, Igor Puttini e Tárík Polo, a imensa ajuda de vocês jamais será esquecida. A dedicação que vocês possuem com certeza será recompensada com o tempo. Meu muito obrigado e que Deus ilumine a vida de todos vocês.

À Juliani Boque, muito obrigado por seu amor e carinho nesse período. Ao seu lado encontrei motivos para minha felicidade.

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas, Alaíde Gonçalves e Edilson Ervolino, muito obrigado por dividir seus conhecimentos comigo nesta jornada.

As estagiárias do Departamento de Ciências Básicas, Ana Cláudia Ervolino e Jaqueline Hassumi, muito obrigado pela ajuda nas marcações imunoistoquímicas das nossas lâminas.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa mestrado (Processo 2012/08455-4) indispensável à realização do meu curso e da minha sobrevivência na pós-graduação.

Agradecimientos

Agradecimentos

À faculdade de odontologia de Araçatuba na figura de sua diretora Professora Adjunta Dra. Ana Maria Pires Soubhia que me deu a oportunidade de cursar o Mestrado em Odontologia. Meu maior orgulho é dizer que faço parte desta instituição que tanto preza pelo ensino e pesquisa. Muito obrigado.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Prof. Adj. Dra. Maria José Hitomi Nagata pela competência na condução do nosso curso.

Aos Professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese na figura dos Professores Dr. Wirley Assunção, Eduardo Passos Rocha e Paulo Henrique dos Santos.

Aos funcionários da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba pela disponibilidade nas etapas do meu curso de Mestrado.

Aos colegas da pós-graduação em odontologia da área de prótese dentária Adara Smith, Caroline Cantieri, Aljomar Vechiato, Agda Marobo, Ana Carolina Hipólito e Rodrigo Medeiros; da área de Estomatologia Rúbia Vieira e Glaucia Soares; da área de Dentística Restauradora André Godas, Rafael

Simões e Laura Molinar. Muito obrigado por todos os momentos de alegria e conhecimento compartilhado.

Aos pacientes, pela confiança depositada em mim durante todo o tratamento realizado. Obrigado por me proporcionar melhorar minhas habilidades cirúrgicas e aprender constantemente com vocês. Serei eternamente grato.

Epígrafe

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.”

Isaac Newton

LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

- Figura 1** – Imagem TIFF demonstrando a marcação realizada e o cálculo da área referente a fatia. 64
- Figura 2** – Desenho esquemático do cálculo do volume do enxerto no seio maxilar. Adaptado de Uchida *et al.* 65
- Figura 3** – Fotomicrografia da lâmina histológica com a grade de Merz anexada. (Aumento 125x) 66
- Figura 4** – Gráfico mostrando o percentual de reabsorção do osso autógeno (OA) e do ChronOs[®] misturado ao osso autógeno (Ch+OA). 67
- Figura 5** – Fotomicrografia panorâmica da biópsia referente ao grupo teste. Pode-se observar áreas de neoformação óssea (OC) próximas ao leito receptor (LR) com focos isolados mais apicalmente com tecido conjuntivo (TC) ao redor das formações ósseas. (Aumento 1.25x) 68
- Figura 6** – Fotomicrografia panorâmica da biópsia referente ao grupo controle. Pode-se observar áreas de neoformação óssea (OC) próximas ao leito receptor (LR) e apicalmente mais madura com grande quantidade de tecido conjuntivo (TC). (Aumento 1.25x) 68

Figura 7 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo teste demonstrando presença de osso imaturo (WB), osso lamelar (OL), remanescente ósseo autógeno (OAR), tecido conjuntivo (TC) e vaso sanguíneo (VS). (Aumento de 250x) 69

Figura 8 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo teste demonstrando presença de células multinucleadas (setas) próximas a um grânulo de ChronOs[®] em processo de reabsorção. (Aumento de 1000x) 70

Figura 9 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo controle demonstrando uma área de tecido ósseo imaturo (WB) com formação lamelar mais periféricamente (OL) e a presença de células osteoblásticas ao redor do osso. (Aumento de 400x) 71

Figura 10 – Gráfico demonstrando os resultados da neoformação óssea nos seios maxilares enxertados com o ChronOs[®] misturado ao osso autógeno (Ch+OA) e com osso autógeno (OA). 72

Figura 11 – Imunomarcações das proteínas analisadas no grupo teste evidenciadas com setas. I – Osteocalcina; II – Runx2; III – TRAP e IV – VEGF. (O * indica um grânulo de ChronOs[®]). 73

Figura 12 – Imunomarcações das proteínas analisadas no grupo controle evidenciadas com setas. I – Osteocalcina; II – Runx2; III – TRAP e IV – VEGF. 74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Volume ósseo enxertado após 7-15 dias (T1) e após 6 meses de reparo (T2) nos seios maxilares com a taxa de reabsorção do grupo teste. 62

Tabela 2 - Volume ósseo enxertado após 7-15 dias (T1) e após 6 meses de reparo (T2) nos seios maxilares com a taxa de reabsorção do grupo controle. 62

Tabela 3 - Resultados histométricos da formação do tecido ósseo e do tecido conjuntivo após 6 meses da enxertia nos seios maxilares. 63

Tabela 4. Scores das proteínas imunomarcadas após a reparação óssea nos seios maxilares do grupo teste e controle. 63

Lista de Abreviaturas

B-TCP	= Beta-Tricálcio Fosfato
Runx 2	= Fator de Transcrição 2/ <i>Runt-related transcription factor 2</i>
VEGF	= Fator de crescimento vascular Endotelial/ <i>Vascular endothelial growth factor</i>
TRAP	= Proteína tartarato de osteoclastos fosfatase ácida resistente/ <i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
OC	= Osteocalcina/ <i>Osteocalcin</i>
TC	= Tomografia Computadorizada
T1	= Tempo de 5 a 7 dias após a primeira enxertia no seio
T2	maxilar = Tempo de 6 meses após a cirurgia de enxerto no seio maxilar
TIFF	= <i>Tagged Image File Format</i>
A	= Área referente a uma fatia da imagem do enxerto
h	= Altura entre as fatias
V	= Volume do enxerto ósseo
EDTA	= Ácido etilendiamino tetra-acético/ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
NaOH	= Hidróxido de sódio
µm	= Micrômetro
g	= Grama

H ₂ O ₂	= Peróxido de hidrogênio
PBS	= Tampão fosfato-salino/ <i>Phosphate buffered saline</i>
mm	= milímetro
mm ³	= milímetro cúbico
HE	= Hematoxilina e eosina
Ncm ²	= Newton por centímetro quadrado

Sumário

1.0 – Resumo	26
1.1 – Abstract	28
2.0 – Introdução	30
3.0 – Material e Método	33
4.0 – Resultados	41
5.0 – Discussão	45
6.0 – Conclusão	50
7.0 – Referências	51
8.0 – Anexos	75

*Análise Tomográfica, Histológica, Histométrica e Imunoistoquímica
do beta-tricálcio fosfato com osso autógeno em aumento do soalho do
seio maxilar*

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico
International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Ver anexo 3).*

1.0 – Resumo

A proposta deste estudo é avaliar o comportamento do enxerto ósseo composto de beta tricálcio fosfato (B-TCP) misturado ao osso autógeno na proporção de 1:1 frente a reabsorção, neoformação óssea e atividade molecular na enxertia do seio maxilar de humanos. Nove seios maxilares foram enxertados com esse material (Grupo Teste) e 12 com osso autógeno (Grupo Controle). Após 7 a 15 dias, os pacientes foram submetidos a uma tomografia computadorizada (TC) cone beam para mensurar o volume inicial do enxerto (T1). Decorrido 6 meses de reparação óssea, uma nova TC foi realizada para avaliar o volume final (T2) e verificar as alterações volumétricas dos materiais. Após 6 meses, no momento da instalação dos implantes dentais, biópsias foram colhidas por meio de uma broca trefina para avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica. As taxas de reabsorção encontradas não foram significantes ($p=0.17$) com médias em torno de $38.3\% \pm 16.6$ para o grupo teste e $45.7\% \pm 18.6$ no grupo controle. Houve significância estatística na taxa de neoformação óssea do grupo teste ($25.4\% \pm 6.4$) em comparação com o grupo controle ($38.6\% \pm 10.5$). A análise imunoistoquímica teve como objetivo avaliar as proteínas Runx2, VEGF, TRAP e Osteocalcina. Os resultados encontrados com a imunomarcagem destas, mostram que este enxerto possui um alto *turnover* celular e um tecido conjuntivo apresentando células em um curso de diferenciação celular. Visto isso, o enxerto do B-TCP misturado ao osso autógeno 1:1 em seio maxilar apresenta características moleculares com capacidade osteogênica promissora.

Palavras Chave: Substitutos ósseos, Seio maxilar, Tomografia, Imunoistoquímica

The Tomographic, Histological, Histometric and Immunohistochemistry analysis of beta tricalcium phosphate mixed with autogenous bone graft in maxillary sinus floor augmentation.

1.1 – Abstract

The aim of this study is to evaluate the behavior of beta tricalcium phosphate (B-TCP) mixed with autogenous bone compost graft in the rate 1:1 analyzing bone reabsorption, bone formation and molecular activity in grafting human maxillary sinus floor augmentation. Nine maxillary sinus were grafted with this material (Test group) and 12 with autogenous bone graft alone (Control Group). After 7 – 15 days, patients were submitted to an initial computed tomography (CT) to measure the initial graft volume (T1). After 6 months of bone healing, new CT was performed by patients to evaluate bone graft final volume (T2) and the graft volumetric changes. During dental implants placement, biopsies were collected with a 3.0 mm trephine burr and processed to histomorphometric and immunohistochemistry analisys. The average of reabsorption rates of test group were $38.3\% \pm 16.6$ and $45.7\% \pm 18.6$ to control group ($p=0.17$). The new bone formation was statistical significant between test group ($25.4\% \pm 6.4$) and control group ($38.6\% \pm 10.5$) ($p<0.05$). The immunohistochemistry analysis evaluated Runx2, VEGF, TRAP and Osteocalcin proteins. Outcomes showed a high cellular turnover with a pathway cellular differentiation in connective tissue. Thus, B-TCP mixed with autogenous bone graft in maxillary sinus presents propitious molecular characteristics to osteogenic capacity.

Keywords: Bone substitute, Maxillary sinus, Tomography, Immunohistochemistry.

2.0 – Introdução

A reabilitação dos pacientes edêntulos na região maxilar posterior com implantes osseointegrados foi, durante muito tempo, um desafio aos cirurgiões dentistas ⁽¹⁾. A cirurgia de elevação da membrana sinusal e as exaustivas pesquisas sobre substitutos ósseos vieram proporcionar o reestabelecimento da altura óssea local para a futura instalação dos implantes dentais ⁽²⁻⁴⁾. Os biomateriais comumente utilizados para este procedimento são: o osso autógeno, os enxertos alógenos, os aloplásticos, e a combinação deles ⁽⁵⁻⁷⁾.

O osso autógeno apresenta a capacidade de ser osteocondutor, osteoindutor e osteogênico, sendo o mais favorável e de melhor previsibilidade para o aumento do soalho sinusal ^(2, 8, 9). Os sítios doadores na cavidade oral são os mais utilizados nesses procedimentos, pois possuem vantagens de estar na mesma região e serem coletados sob anestesia local na maioria dos casos ^(8, 10). Contudo, a quantidade de osso necessária para a cirurgia pode ser insuficiente, além de possuir reabsorção imprevisível ^(11, 12).

Quando há limitação do osso autógeno, os biomateriais demonstram-se promissores na reconstrução maxilar posterior ⁽¹³⁻¹⁶⁾. Estes materiais devem seguir critérios específicos que possibilitem a reparação óssea, como: ser biocompatível, não serem antigênicos, promoverem um arcabouço para o crescimento vascular, serem reabsorvíveis e estimularem a osteogênese ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

A literatura reporta resultados satisfatórios com o uso do beta-tricálcio fosfato (B-TCP) na odontologia, sendo um dos mais utilizados, também, na enxertia do seio maxilar ⁽¹⁹⁻²³⁾. Possui características peculiares como

microporosidades e rápida absorção com a simultânea formação de osso ^(24, 25). A interconectividade entre os poros permite a formação de capilares na atração de células, nutrientes e ancoragem de proteínas aos grânulos, além de propiciar a circulação de fluídos biológicos que aceleram o processo de degradação ^(17, 26, 27). Alguns autores informam que a reabsorção do B-TCP se dá por dissolução química contudo, há relatos de ação de osteoclastos mesmo que em minoria ^(17, 22, 28).

Alguns substitutos ósseos têm a desvantagem de não possuírem características ideais de condução e de resistência estrutural ⁽²⁹⁾ influenciando na qualidade da osseointegração a longo prazo ⁽³⁰⁾. Para isso, alguns autores têm proposto a adição do osso autógeno a esses materiais com a finalidade de obter maior volume, adicionar fatores osteoindutivos, melhorar a reparação óssea e propiciar melhores resultados na reabsorção ^(14, 15).

Os estudos de comportamento clínico dos biomateriais no seio maxilar são numerosos ⁽³¹⁻³⁸⁾, porém há poucos que avaliam o mecanismo molecular da formação óssea do B-TCP ^(20, 21, 24) e principalmente na sua associação com o osso autógeno ⁽²⁹⁾. No processo de reparo ósseo, algumas moléculas são responsáveis pela diferenciação dos osteoblastos. A Runx2 (Runt-related transcription factor 2), por exemplo, regula os genes que executam esse processo e o da produção de proteínas ósseas específicas ^(39, 40). A VEGF (Vascular endothelial growth factor) está associada ao mecanismo de angiogênese e osteogênese que ocorrem durante o reparo ósseo, exercendo, inclusive, efeito quimiotático nos osteoblastos ^(41, 42). A osteocalcina é uma proteína associada à calcificação do enxerto e sua expressão indica maturação

óssea ^(43, 44) e, a TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), que é responsável pela marcação dos osteoclastos na superfície óssea, indica o processo de remodelação no enxerto ⁽²⁰⁾.

Tendo em vista essas considerações, a proposta deste estudo é analisar a formação e a reabsorção óssea do enxerto ósseo composto de B-TCP com osso autógeno na proporção de 1:1 na elevação da membrana sinusal de humanos em comparação com enxerto de osso autógeno puro. A análise da reabsorção será realizada por meio de tomografias computadorizadas (TC) avaliando-se a alteração volumétrica do material enxertado. A neoformação óssea será determinada através de análises histométricas e de marcação imunohistoquímica, realizadas através de reações de imunomarcações para as proteínas Runx2, VEGF, Osteocalcina e TRAP.

3.0 – Material e Método

Este estudo foi realizado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no período de março de 2012 a novembro de 2013 com aprovação do comitê de ética e pesquisa em humanos número 03416512.7.0000.5420 (Anexo 1), auxílio financeiro FAPESP (Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) 2012/10028-7 e bolsa mestrado FAPESP 2012/08455-4 .

3.1 – Seleção dos Pacientes

Foram avaliados 157 pacientes afim de compor os grupos a serem estudados. A seleção se deu por meio de fatores de inclusão como: pacientes edêntulos na região posterior da maxila, com altura óssea menor ou igual a 5mm e que necessitassem de elevação do soalho sinusal para posterior instalação de implantes osseointegrados. Os critérios de exclusão do estudo foram pacientes que apresentassem comprometimentos sistêmicos não controlados, problemas periodontais não tratados, patologias sinusais, tabagistas, irradiados na região da cabeça ou pescoço, com a presença de raízes residuais no seio maxilar ou que possuíssem volume ósseo inadequado no ramo ou mento mandibular onde se realizou a coleta do enxerto ósseo autógeno. Os pacientes foram submetidos à TC da maxila e da mandíbula com o intuito de avaliar os requisitos propostos. O osso autógeno foi coletado no local onde houvesse o melhor volume. Ao final, foram convidados, por meio de

um termo de consentimento informado, 19 pacientes para realizarem enxertia no seio maxilar (Anexo 2).

Dos 19 pacientes selecionados, foram realizadas 23 elevações nos seios maxilares dos referidos pacientes sendo 11 procedimentos no grupo teste e 12 no grupo controle. Dois pacientes, correspondentes ao grupo teste, desistiram do tratamento após a cirurgia. Os restantes constam de 12 mulheres e 5 homens com idade variando de 41 a 65 anos (Média de 55.1 ± 5.7). Os enxertos ósseos autógenos foram obtidos do ramo esquerdo (3), ramo direito (10) e do mento (6). Foram utilizados 12 embalagens de ChronOs[®] de 0.5cc que foram adicionados a uma proporção de 1:1 ao osso autógeno. Após o período de reparação óssea, as biópsias foram realizadas com uma broca trefina 3.0 no mesmo momento da instalação dos implantes dentais de 4.5 mm cônicos (Implalife – Jales/Brasil).

3.2 – Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na clínica de cirurgia oral da Faculdade de Odontologia de Araçatuba sob anestesia local com Lidocaína com adrenalina 1:1000.000 (Alphacaine – DFL/Brasil).

3.2.1 – Remoção do Enxerto Ósseo Autógeno

3.2.2 – Sínfise

A incisão foi realizada com uma lâmina de bisturi na mucosa labial inferior estendendo-se de canino a canino deixando uma faixa de mucosa aderida à gengiva. Com a visualização dos músculos mentuais, a lâmina foi inclinada em direção ao osso e novamente incisada até o periósteo. Depois, com um descolador Molt número 9 (Golgran – São Caetano do Sul/SP), o osso da região foi exposto. A osteotomia foi realizada com uma broca 701 (KG Sorensen – Cotia/SP) sob irrigação com solução fisiológica 0.9% (ADV – Nova Odessa/SP). 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 (Neodent – Curitiba/Brasil) para posterior enxertia no seio maxilar. A sutura foi realizada por planos com fio absorvível de poligalactina 4.0 Ethicon (Johnson & Johnson – São Paulo/Brasil) por meio de pontos simples na musculatura e contínuos na mucosa oral.

3.3.3 – Ramo

A incisão foi realizada ao longo da linha oblíqua externa, com uma lâmina de bisturi, estendendo-se do ramo ascendente até o segundo molar inferior. A exposição da face bucal do corpo mandibular foi realizado com um descolador

Molt número 9. Também com uma broca 701, sob irrigação abundante 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 também foi realizada com fio absorvível 4.0 e pontos contínuos.

3.3.4 – Seio Maxilar

A incisão foi realizada na região posterior da maxila percorrendo a crista alveolar. Com um descolador mucoperiosteal Molt número 9, elevou-se a mucosa para a exposição do osso maxilar. A osteotomia procedeu-se com uma broca esférica diamantada número 8 (KG Sorensen – Cotia/SP) para acessar o antro sinusal como preconizado por Tatum ⁽²⁾. A membrana sinusal foi elevada com elevadores (Neodent – Curitiba/PR) e o espaço entre a membrana e o soalho do seio maxilar foi enxertado com B-TCP (ChronOs[®] - DePuy Synthes – Paoli/CA) e osso autógeno na proporção 1:1 (Grupo Teste) e somente osso autógeno (Grupo Controle). As feridas foram suturadas também com fio absorvível 4.0.

Os pacientes foram medicados com cetorolaco de trometamol 10mg (EMS – São Paulo/Brasil) 1 comprimido sublingual de 6 em 6 horas por 2 dias para analgesia e Amoxicilina 500mg (EMS – São Paulo/Brasil) 1 cápsula de 8 em 8 horas por 7 dias para antibioticoterapia no pós-operatório.

Decorrido 6 meses, os pacientes foram novamente submetidos a um procedimento cirúrgico, sob anestesia local, para instalação de implantes

osseointegrados nos locais enxertados previamente. No mesmo momento, foram colhidas biópsias com uma broca trefina (MK Life – Porto Alegre/Brasil) de 3.0mm diâmetro e armazenadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7, por 48 horas.

3.4 – Análise Tomográfica

Após 7 a 15 dias de pós-operatório, os pacientes foram encaminhados para realizar a TC afim de mensurar o volume ósseo inicial (T1). Decorridos 6 meses, os pacientes foram submetidos a uma nova TC para mensurar o volume ósseo tardio (T2).

As tomografias foram obtidas em um tomógrafo volumétrico para imagens dentofaciais (I-Cat; KaVo do Brasil Ind. Com. Ltda - Joinville/SC). Um tomógrafo odontológico computadorizado volumétrico 3D que apresenta velocidade até três vezes maior que os tomógrafos utilizados na medicina com radiação 10 vezes menor para o paciente. O ciclo dura, no máximo, 40 segundos, porém, devido ao Raio X emitido ser pulsante, o tempo real efetivo de exposição à radiação torna-se menor.

As imagens foram geradas na forma DICOM e avaliadas pelo software OsiriX (Osirix Foundation – Genebra/Suíça). Cortes sagitais (Cross-sections) de 0.25mm de espessura foram criados tendo 1mm de distância entre as fatias como preconizado por Spin-Neto *et al.* ⁽⁴⁵⁾. O contraste de exposição das imagens foi ajustado para o filtro “flow” com 3086 W e 667 L como nível de largura e centro da banda respectivamente. O contorno de cada fatia foi

traçado manualmente por um único avaliador.

Para cada fatia, foi gerada um imagem TIFF (Tagged Image File Format) e a área (A) foi calculada através da ferramenta ROI tool (Fig.1). O volume (V) foi calculado mediante a soma de todas as áreas (A) multiplicado pela altura (h) entre as fatias como proposto por Uchida *et al.* ⁽⁴⁶⁾ (Fig. 2).

3.5 – Análise Histomorfométrica

Foram obtidos 4 cortes de cada biópsia. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para a análise morfométrica da neoformação do tecido ósseo e do tecido conjuntivo no seio maxilar dos pacientes estudados. As lâminas foram codificadas em 3 áreas aleatórias de cada biópsia e foi examinada através de um microscópio de luz com objetiva de 12,5X por um único avaliador. Não foram avaliados os leitos receptores das peças. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (JVC TK1270 Color Video Câmera) acoplada ao microscópio e analisadas por meio da grade de Merz (Fig 3). As 3 imagens, com a grade anexada, foram montadas no programa PowerPoint for Mac (Microsoft[®]) onde se contou os pontos referentes a serem analisados para, enfim, obter o percentual de osso neoformado e de tecido conjuntivo da amostra.

3.6 – Análise Imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foram utilizados como anticorpos primário policlonal produzido em cabras para osteocalcina (OC, Goat anti-OC - Santa Cruz Biotechnology, SC18319), a Runx2 (Goat anti-Runx2 - Santa Cruz Biotechnology, SC8566), 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 biotinizado (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).

Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% (Perhidrol 30% H₂O₂ - MERCK) por 45 minutos. As secções sofreram recuperação antigênica por tampão citrato (pH 6,0 – 55°C) e posteriormente foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas a serem analisadas e em concentrações previamente testadas e padronizadas. Após 18h as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos) e incubados com um segundo anticorpo biotinizado, por mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas

em PBS e re-incubadas com o complexo Avidina-biotina (Strept ABCComplex/HRP-Vector) por 45 min.

O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente como relatado por Hawthorne *et al.* ⁽⁴⁷⁾, atribuindo-se os scores 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 scores foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado.

3.7 – Análise Estatística

A análise estatística do presente estudo foi realizada pelo programa Bioestat 5.0 (IDSM – Amazonas/Brasil) e atribuído o teste de Shapiro-Wilk para avaliar se as amostras possuíam distribuição normal. Confirmando a normalidade da distribuição, o teste *t* de Student foi aplicado. A relação entre T1 e T2 na análise tomográfica foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

4.0 – Resultados

4.1 – Observações Clínicas

Não foi evidenciado nenhum problema no decorrer da reparação do enxerto ósseo como: sinusites, sangramentos nasais e infecções. Durante a instalação dos implantes dentais, observou-se ancoragem menor que 30 Ncm² de torque nos pacientes do grupo teste.

4.2 – Resultados da Análise Tomográfica

Os volumes correspondentes aos períodos T1 e T2 de ambos os grupos foram calculados em mm³. Para avaliar a reprodutibilidade das análises, 30% da amostra foi mensurada novamente com um intervalo de 1 mês pelo mesmo avaliador. Os valores de T1 e T2 das duas medições distintas foram testados pelo teste de correlação de Pearson. Os resultados obtidos para T1 ($r=0.98$) e T2 ($r=0.96$) demonstraram uma forte correlação das análises nos 2 momentos distintos, o que atesta a reprodutibilidade do estudo.

Em relação ao grupo teste, a taxa de reabsorção do enxerto variou de 4% a 62% (média de $38.3\% \pm 16.6$) (Tabela 1). A taxa de reabsorção do grupo controle variou de 3% a 74% (média de $45.7\% \pm 18.6$) (Tabela 2). Os dados de T1 e T2 de ambos os grupos encontraram-se com distribuição normal e foram analisados pelo teste *t* de Student que evidenciou dados estatisticamente significantes entre os períodos dos grupos estudados ($p<0.05$). Os períodos de

ambos os grupos também foram analisados pelo teste de correlação de Pearson que mostrou forte correlação entre os períodos T1 e T2 dos grupos teste ($r=0.82$) e controle ($r=0.91$). As taxas de reabsorção de ambos os grupos também encontraram-se dentro da curva de normalidade e, segundo o teste t , as mesmas não foram significantes ($p=0.17$) (Fig. 4).

4.3 – Resultados da Avaliação Histológica

Em uma visão panorâmica das biópsias, pôde-se observar que no grupo teste há uma maior neoformação óssea próxima do leito receptor, com grandes áreas de tecido conjuntivo e pequenos focos de neoformações ósseas na região apical (Fig. 5). No grupo controle, há uma maior quantidade de neoformação óssea na região apical e próximo ao leito receptor, com grandes áreas de tecido conjuntivo por toda a peça (Fig. 6).

No grupo teste, pôde-se observar, também, tecido ósseo lamelar com áreas de osso imaturo (*Woven bone*), remanescente ósseo autógeno e um tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado ao redor das partículas de osso remanescente (Fig. 7). Em um aumento de 1000x, observou-se a presença de células multinucleadas próximas a um grânulo de ChronOs[®] em processo de reabsorção (Fig. 8). No grupo controle, evidenciou-se um osso com formação lamelar na periferia com a presença de uma camada de osteoblastos. Ao centro do mesmo, há uma neoformação óssea imatura (Fig. 9).

4.4 – Resultado Histométrico

As possíveis alterações qualitativas detectadas pelas análises histológicas foram avaliadas por meio de uma análise histométrica do processo de reparo ósseo no seio maxilar dos referidos grupos. Foi comparada a neoformação óssea do B-TCP misturado ao osso autógeno com a neoformação óssea do osso autógeno puro após um período de 6 meses de reparo no seio maxilar de humanos.

Através da análise pelo teste paramétrico *t* de Student, observou-se significância estatística na neoformação óssea entre os grupos no período estudado ($p=0.001$). A porcentagem média de tecido ósseo formado no grupo teste foi de $25.4\% \pm 6.4$ em comparação à $38.6\% \pm 10.5$ do grupo controle (Fig. 10). No grupo teste, a porcentagem média de tecido conjuntivo encontrado foi de $38.9\% \pm 6.9$ e de $34.9\% \pm 8.7$ no grupo controle ($p=0.13$) (Tabela3).

4.5 – Resultado Imunoistoquímico

A imunomarcção foi analisada por um único observador, previamente calibrado, a partir da atribuição de *scores* de 0 a 3 (*score* 0: sem marcação, 1: marcação fraca/difusa 2: marcação moderada e 3: marcação intensa). Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas Osteocalcina, Runx2, TRAP e VEGF, analisadas após o período de 6 meses de reparo ósseo no seio maxilar.

As marcações para Osteocalcina em ambos os grupos foi intensa. No grupo teste, as marcações se deram na superfície do osso neoformado apresentando, também, marcações no enxerto e no tecido conjuntivo.

A imunomarcação da Runx2 no grupo teste foi moderada com marcações de células no tecido conjuntivo e nos espaços medulares. No grupo controle, as marcações foram de fracas a moderadas com algumas células osteoblásticas expressadas no tecido conjuntivo.

A TRAP mostrou marcação moderada no grupo teste, com células de linhagem osteoclástica evidenciadas na superfície e periferia do osso. No grupo controle, houve uma marcação fraca para TRAP, observando-se poucas células marcadas em áreas periféricas.

A VEGF foi marcada de forma moderada tanto no grupo teste como no controle. As imunomarcações foram presentes nas células do tecido conjuntivo em ambos os grupos e ao redor de grânulos em processo de reabsorção do B-TCP.

As figuras 11 e 12 demonstram as fotomicrografias das imunomarcações de ambos os grupos.

Os scores dados às imunomarcações avaliadas são apresentados na tabela 4.

5.0 – Discussão

O material utilizado no presente estudo foi o ChronOs[®], um B-TCP com grânulos variando de 0.5 a 0.7 mm, e porosidade de 60%. Segundo a literatura, é um material de fácil manipulação, com grânulos maiores, mais circulares e com mais conexões entre os poros quando comparado a outros existentes ⁽⁴⁸⁾. O tamanho dos poros interfere diretamente na formação do tecido ósseo, sendo que o ideal é que possua diâmetro acima de 50 µm ⁽⁴⁹⁾. O ChronOs[®] possui poros que variam de 100 a 400 µm conferindo boas qualidades estruturais ao material.

Não há, até o presente momento, estudos que avaliem as taxas de reabsorção volumétrica do B-TCP no seio maxilar. Cosso *et al.* ⁽¹⁴⁾ avaliaram, comparativamente, as alterações volumétricas da hidroxiapatita associada ao osso autógeno na proporção de 80:20 (Grupo teste) com osso autógeno puro (Grupo controle) em seios maxilares. Seus dados foram de 25.8% e 42.3% de reabsorção para os grupos teste e controle respectivamente. O resultado do grupo teste do presente estudo demonstra uma taxa de reabsorção 38.3% do enxerto. Esta diferença pode ser explicada pelo fato da hidroxiapatita possuir lenta reabsorção comparado ao B-TCP, que é rapidamente degradado ⁽⁵⁰⁾.

Arasawa *et al.* ⁽³²⁾ avaliaram as alterações volumétricas do enxerto ósseo autógeno no seio maxilar em dois tempos distintos: T1 (após 3 meses do procedimento cirúrgico) e T2 (após 1 ano de reparação óssea). Em seus resultados, os autores concluem que o enxerto apresenta uma reabsorção óssea progressiva com o decorrer do tempo. Os nossos resultados corroboram

com os dos referidos autores, pois T1 e T2, de ambos os grupos, apresentaram o mesmo comportamento no período estudado, o que foi confirmado através do teste de correlação de Pearson.

Devido ao seu potencial osteogênico, o osso autógeno é o mais confiável como enxerto no seio maxilar ⁽⁵¹⁾. Porém, há diversos estudos do uso do B-TCP, como substituto ósseo, em seio maxilar reportados na literatura com resultados promissores ^(13, 15, 16, 19, 21-23). Somanathen & Simünek ⁽¹⁾ informam que há até 29% de formação óssea de predomínio lamelar. Szabó *et al.* ⁽¹⁵⁾ encontraram 36.47% de neoformação óssea com o uso de Cerasorb[®] em seios maxilares em comparação aos 38.34% quando utilizado osso autógeno. Martinez *et al.* ⁽¹⁶⁾ obtiveram 40.7% de osso lamelar quando empregado B-TCP e 34.9% com BioOss em um estudo comparativo em seio maxilar de humanos. Todos esses dados mostram o B-TCP como um bom substituto do osso autógeno.

Uma vez que o procedimento da antroplastia sinusal visa a futura reabilitação com implantes dentais, o material empregado deve ter capacidade de promover uma osseointegração de qualidade. Jensen *et al.* ⁽³⁰⁾ levantaram esta hipótese em um estudo que avaliaram o contato osso-implante quando empregados biomaterial puro, o osso autógeno puro e a associação de ambos em seios maxilares de *mini pigs*. Em seus resultados, os autores encontraram uma taxa de contato osso-implante altamente significativa quando era empregado o osso autógeno puro ou a combinação de osso autógeno com o biomaterial.

O enxerto ósseo autógeno, adicionado ao biomaterial, promove a adição de características osteoindutoras capazes de melhorar a qualidade do osso na região enxertada, além de aumentar o volume ^(5, 9, 33, 52). Tadjoeidin *et al.* ⁽⁵³⁾ reportaram uma formação óssea de 44% com o uso de vidro bioativo misturado ao osso autógeno em seios maxilares de humanos. Os nossos resultados mostram uma taxa de formação óssea de 25.4% com o uso do B-TCP misturado ao osso autógeno comparado a 38.6% quando utilizado osso autógeno somente ($p < 0.05$).

Thaler *et al.* ⁽⁵⁴⁾ mencionaram que o ChronOs[®] possui uma rápida degradação, com total reabsorção dos grânulos em até 18 meses. Martinez *et al.* ⁽¹⁶⁾ encontraram uma média 32.6% de partículas de B-TCP remanescentes após 8 meses de reparação óssea no seio maxilar. Em nosso estudo, encontramos uma média de 1.4% do biomaterial e 8.2% de osso autógeno remanescente presentes no grupo teste. Visto que o B-TCP misturado ao osso autógeno na proporção de 1:1 apresenta o mesmo comportamento de reabsorção que o osso autógeno puro após 6 meses, o osso presente após o período de reparação é de boa qualidade para instalação de implantes osseointegrados.

Devido a diferença de percentual ósseo neoformado entre os grupos, buscamos entender o comportamento desse enxerto a nível molecular. Para isso, realizamos marcações imunoistoquímicas, com proteínas específicas, no intuito de avaliar a diferenciação osteoblástica, a angiogênese, a calcificação e a reabsorção do enxerto proposto.

Miyamoto *et al.* ⁽²⁹⁾ avaliaram se o enxerto composto de 50% de B-TCP e 50% de osso autógeno possuía características osteogênicas. Seu estudo constou em analisar, através de imunomarcações com Runx2, as células do tecido conjuntivo do enxerto. Quando essa proteína é expressada, marca a célula na fase de diferenciação em osteoblastos e, também, quando há a transcrição do gene de formação do colágeno tipo 1 ^(22, 55). Com os resultados encontrados, os autores concluíram que o enxerto proposto possui um curso de diferenciação osteogênica semelhante aos encontrados por Zerbo *et al.* ⁽²²⁾ quando utilizou B-TCP puro em elevações do seio maxilar. Em nosso estudo, observamos a marcação da Runx2 moderadamente no tecido conjuntivo ao redor do enxerto, o que corrobora com os resultados expostos pelos autores.

A marcação da VEGF no tecido conjuntivo encontrada em nosso estudo expõe que ainda há ativação do mecanismo da angiogênese e de formação de osteoblastos como relatado por outros autores ^(31, 41). Isso é importante pelo fato de que a migração e a diferenciação celular de um tecido em processo de reparo ocorre somente na presença de vascularização ⁽³¹⁾. A VEGF estimula a formação de capilares a partir dos já existentes no leito receptor ^(29, 56), sendo assim extremamente importante no curso do reparo ósseo.

O presente estudo também apresentou que o enxerto empregado possui intensa atividade da proteína osteocalcina. Isso demonstra que, no período de 6 meses, o osso neoformado está calcificado. A atividade da TRAP apresentou-se moderada nas marcações realizadas confirmando que há atividade osteoclástica presente no material como evidenciado em outros estudos ⁽²²⁾. Visto isso, os resultados moleculares encontrados mostram que,

após 6 meses de reparo ósseo, o enxerto composto de B-TCP com osso autógeno na proporção de 1:1 apresenta um alto *turnover* celular.

6.0 – Conclusão

Os resultados encontrados com uso do B-TCP misturado ao osso autógeno na proporção de 1:1 nos procedimentos de elevação do seio maxilar demonstram que pode ser uma boa alternativa neste tipo de intervenção, pois apresenta características moleculares com capacidade osteogênica.

7.0 – Referências

1. Somanathan RV, Simunek A. Evaluation of the success of beta-tricalciumphosphate and deproteinized bovine bone in maxillary sinus augmentation using histomorphometry: A Review. *Acta Medica* 2006;49:87-9.
2. Tatum H, Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 1986;30:207-29.
3. Visser A, Raghoobar GM, Meijer HJ, Vissink A. Implant-retained maxillary overdentures on milled bar suprastructures: A 10-year follow-up of surgical and prosthetic care and aftercare. *Int J Prosthodont*. 2009;22:181-92.
4. Esposito M, Grusovin MG, Rees J, Karasoulos D, Felice P, Alissa R, et al. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: A Cochrane systematic review. *Euro J Oral Implantol*. 2010;3:7-26.
5. Moy PK, Lundgren S, Holmes RE. Maxillary sinus augmentation: Histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993;51:857-62.
6. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss (R) in

combination with venous blood - A histologic and histomorphometric study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:217-29.

7. Small SA, Zinner ID, Panno FV, Shapiro HJ, Stein JI. Augmenting the maxillary sinus for implants: report of 27 patients. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1993;8:523-8.

8. Wood RM, Moore DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral & Maxillofac Implant.* 1988;3:209-14.

9. Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: Organized alternative treatment plans. *Int J Oral Implantol.* 1987;4:49-58.

10. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11:760-6.

11. Block MS KJ, Kalkaran FU, Thunthy K, Weinberg R. Bone maintenance 5 to 10 years after sinus grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56:706-15

12. Kingsmill VJ, Boyde A, Jones SJ. The resorption of vital and devitalized bone in vitro: Significance for bone grafts. *Calcif Tissue Int.* 1999;64:252-6.

13. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase betatricalcium phosphate granules (Cerasorb) regeneration in the ceramic for bone reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:708-13.
14. Cosso MG, de Brito RB, Jr., Piattelli A, Shibli JA, Zenobio EG. Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomography study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;00:1–6
15. Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: Histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Max Impl.* 2005;20:371-81.
16. Martinez AJF, Saiz E, Guitian F. Maxillary sinus floor augmentation on humans: Packing simulations and 8 months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and β -tricalcium phosphate particles as grafting materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2010;30:763-69.
17. Neamat A, Gawish A, Gamal-Eldeen AM. Beta-Tricalcium phosphate promotes cell proliferation, osteogenesis and bone regeneration in intrabony defects in dogs. *Arch Oral Biol.* 2009;54:1083-90.

18. Wheeler SL. Sinus augmentation for dental implants: The use of alloplastic materials. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55:1287-93.

19. Zijdeveld SA ZI, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM. Maxillary sinus floor augmentation using a b-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:432-40.

20. Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Basle MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and B-TCP: A microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron.* 2010;41:321-6.

21. Suba Z TD, Matusovits D, Barabás J, Fazekas A, Szabó G. Maxillary sinus floor grafting with b-tricalcium phosphate in humans: Density and microarchitecture of the newly formed bone. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:102-08.

22. Zerbo IR, Bronckers ALJJ, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005;26:1445-51.

23. Zerbo IR, Zijdeveld SA, de Boer A, Bronckers ALJJ, de Lange G, ten Bruggenkate CM, et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation

using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Imp Res.* 2004;15:724-32.

24. Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M. Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials.* 2008;29:2249-58.

25. Palti A HT. A concept for the treatment of various dental bone defects. *Implant Dent.* 2002;11:73 - 7.

26. Peters F RD. Functional materials for bone regeneration from beta tricalcium phosphate. *Materwiss Werksttech.* 2004;35:203-7

27. Degroot K. Bioceramics Consisting of Calcium-Phosphate Salts. *Biomaterials.* 1980;1:47-50.

28. Renooij W HH, Visser WJ, Lentferink RH, Schmitz MG, Van Ieperen H, Oldenburg SJ, Janssen WM, Akkermans LM, Wittebol P. Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;197:272-85

29. Miyamoto S SK, Miyamoto I, Takeshita K, Terada T, Takahashi T. Histomorphometric and immunohistochemical analysis of human maxillary

sinus-floor augmentation using porous b-tricalcium phosphate for dental implant treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2012;24:134-38.

30. Jensen T, Schou S, Gundersen HJ, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:635-44.

31. De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:584-90.

32. Arasawa M, Oda Y, Kobayashi T, Uoshima K, Nishiyama H, Hoshina H, et al. Evaluation of bone volume changes after sinus floor augmentation with autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:853-57.

33. Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: The use of autogenous bone. *J Oral Maxil Surg.* 1997;55:(1281-6.

34. Bornstein MM, Chappuis V, von Arx T, Buser D. Performance of dental implants after staged sinus floor elevation procedures: 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19:1034-43.

35. Gerressen M, Hermanns-Sachweh B, Riediger D, Hilgers RD, Spiekermann H, Ghassemi A. Purely cancellous vs. corticocancellous bone in sinus floor augmentation with autogenous iliac crest: A prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:109-15.
36. Geurs NC, Wang IC, Shulman LB, Jeffcoat MK. Retrospective radiographic analysis of sinus graft and implant placement procedures from the Academy of Osseointegration Consensus Conference on Sinus Grafts. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21:517-23.
37. Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:339-45.
38. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation - Part I: Lateral approach. *J Clin Periodontol.* 2008;35:216-40.
39. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44:109-16.

40. Afzal F, Polak, J., Buttery, L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J Pathol.* 2004;202:503-10.
41. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Nat Acad Sci USA.*2002;99:9656-61.
42. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger, J., Hausser, H., Kessler, S., Günther, K.-P., Dehio, C., Puhl, W., & Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone.* 2002;30:472-7.
43. Hughes SS, Hicks DG, Okeefe RJ, Hurwitz SR, Crabb ID, Krasinskas AM, et al. Shared Phenotypic-Expression of Osteoblasts and Chondrocytes in Fracture Callus. *J Bone Miner Res.* 1995;10:533-44.
44. Schroeder TM, Westendorf JJ. Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res.* 2005;20:2254-63.
45. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Pereira LAVD, Marcantonio E, Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge

augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:167-73.

46. Uchida Y, Goto M, Katsuki T, Soejima Y. Measurement of maxillary sinus volume using computerized tomographic images. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13:811-8.

47. Hawthorne AC, Xavier SP, Okamoto R, Salvador SL, Antunes AA, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. *Clinical oral implants research.* 2013;24(10):1164-72.

48. Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, et al. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials.* 2008;29:266-71.

49. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26:5474-91.

50. Nagahara K, Isogai M, Shibata K, Meenaghan MA. Osteogenesis of Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Used as a Bone Substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7:72-9.

51. Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:23-33.

52. Rickert D, Vissink A, Slot WJ, Sauerbier S, Meijer HJ, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation surgery with BioOss mixed with a bone marrow concentrate or autogenous bone: test of principle on implant survival and clinical performance. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013.

53. Tadjedin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kuiper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11:334-44.

54. Thaler M, Lechner R, Gstottner M, Kobel C, Bach C. The use of beta-tricalcium phosphate and bone marrow aspirate as a bone graft substitute in posterior lumbar interbody fusion. *Euro Spine J*. 2013;22:1173-82.

55. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, et al. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res*. 2003;63:5357-62.

56. Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. *Periodontology* 2000. 2006;41:109-22.

Tabelas

Tabela 1. Volume ósseo enxertado após 7-15 dias (T1) e após 6 meses de reparo (T2) nos seios maxilares com a taxa de reabsorção do grupo teste.

Seio Maxilar	T1 (mm ³)	T2 (mm ³)	Diferença (mm ³)	Reabsorção (%)
1D	832.4	534.0	298.4	36
2D	1125.2	548.0	577.2	51
3D	2781.6	2668.9	112.7	4
4D	318.8	204.0	114.8	36
5D	1261.4	696.5	564.9	45
6D	487.3	276.2	211.1	43
6E	894.2	683.0	211.2	24
7D	1009.8	388.5	621.3	62
8E	2946.4	1639.3	1307.1	44
Média ± SD	1295.2 ± 937.3	848.7 ± 801.5	446.5 ± 380.2	38.3 ± 16.6

Tabela 2. Volume ósseo enxertado após 7-15 dias (T1) e após 6 meses de reparo (T2) nos seios maxilares com a taxa de reabsorção do grupo controle.

Seio Maxilar	T1 (mm ³)	T2 (mm ³)	Diferença (mm ³)	Reabsorção (%)
8D	367.7	280.3	87.4	24
9E	336.1	325.10	11.0	3
10D	1294.2	804.8	489.4	38
10E	1374.8	718.5	656.3	48
11E	1579.9	673.7	906.2	57
12D	1770.6	923.2	847.4	48
13D	1247.1	523.9	723.2	58
14D	1396.4	368.2	1028.2	74
15D	1103.1	507.1	596.0	54
15E	1115.1	626.3	488.8	44
16D	453.4	274.8	178.6	39
17E	816.1	313.7	502.4	62
Média ± SD	1071.2 ± 477.8	528.3 ± 221.2	542.9 ± 321.7	45.7 ± 18.6

Tabela 3. Resultados histométricos da formação do tecido ósseo e do tecido conjuntivo após 6 meses da enxertia nos seios maxilares.

	Osso Neoformado (%)	Tecido Conjuntivo (%)
Grupo Teste	25.4 ± 6.4	38.9 ± 6.9
Grupo Controle	38.6 ± 10.5	34.9 ± 8.7
Valor de p	0.001	0.13

Tabela 4. Scores das proteínas imunomarcadas após a reparação óssea nos seios maxilares do grupo teste e controle.

	TRAP	VEGF	Osteocalcina	Runx2
Grupo Teste	2	2	3	2
Grupo Controle	1	2	3	1 - 2

Figuras

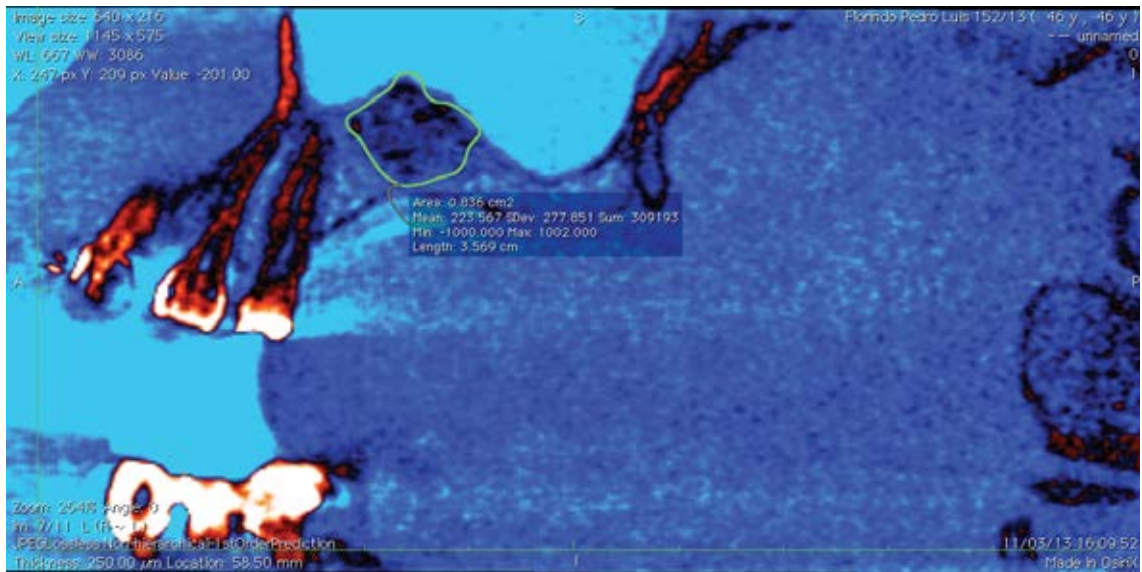


Figura 1 – Imagem TIFF demonstrando a marcação realizada e o cálculo da área referente a fatia.

$$V = \Sigma A \times h$$



Figura 2 – Desenho esquemático do cálculo do volume do enxerto no seio maxilar. Adaptado de Uchida *et al.*

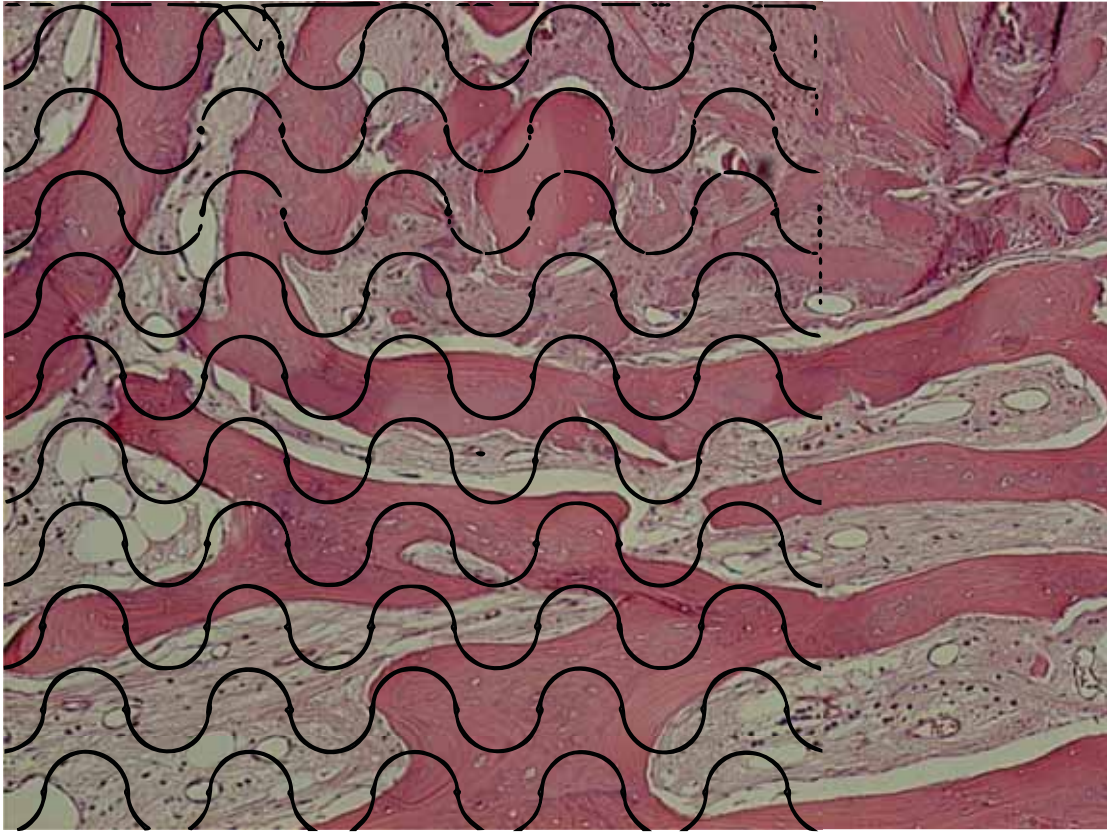


Figura 3 – Fotomicrografia da lâmina histológica com a grade de Merz anexada. (Aumento 125x)

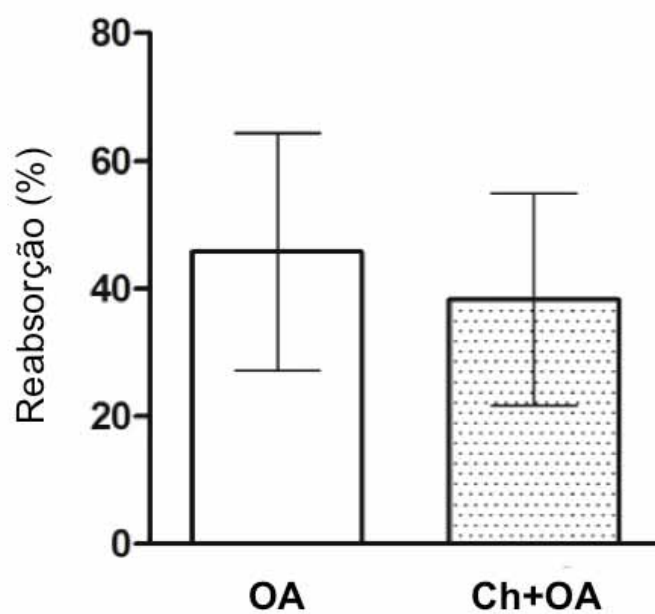


Figura 4 – Gráfico mostrando o percentual de reabsorção do osso autógeno (OA) e do ChronOs[®] misturado ao osso autógeno (Ch+OA).

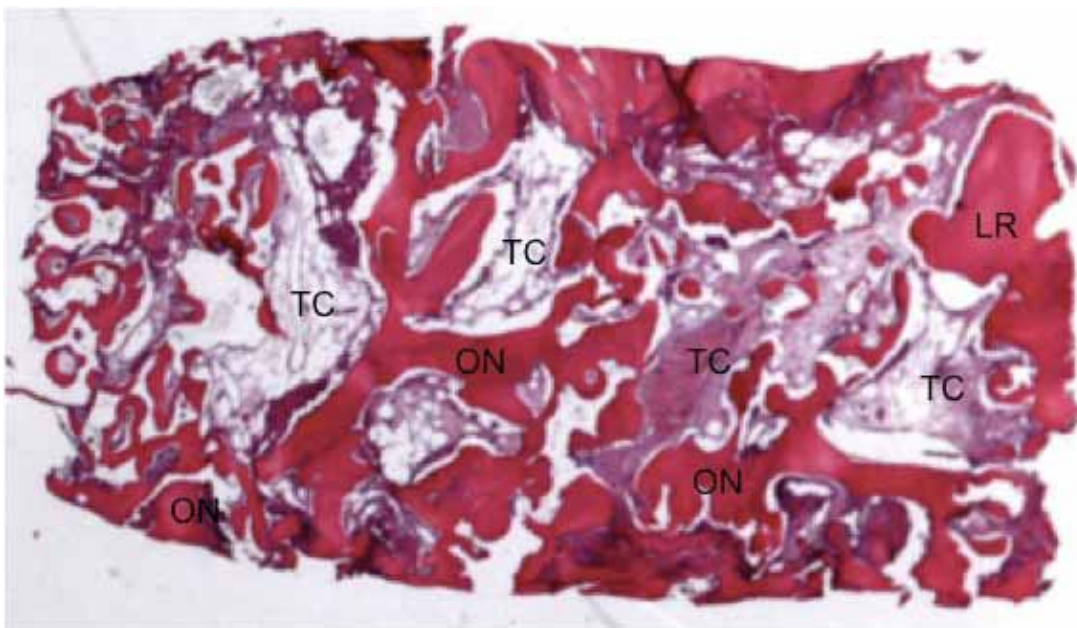


Figura 5 – Fotomicrografia panorâmica da biópsia referente ao grupo teste. Pode-se observar áreas de neoformação óssea (ON) próximas ao leito receptor (LR) com focos isolados mais apicalmente com tecido conjuntivo (TC) ao redor das formações ósseas. (Aumento 1.25x)

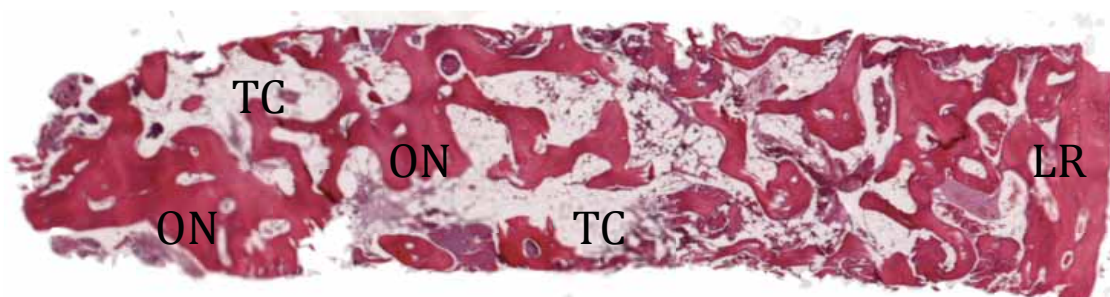


Figura 6 – Fotomicrografia panorâmica da biópsia referente ao grupo controle. Pode-se observar áreas de neoformação óssea (ON) próximas ao leito receptor (LR) e apicalmente mais madura com grande quantidade de tecido conjuntivo (TC). (Aumento 1.25x)

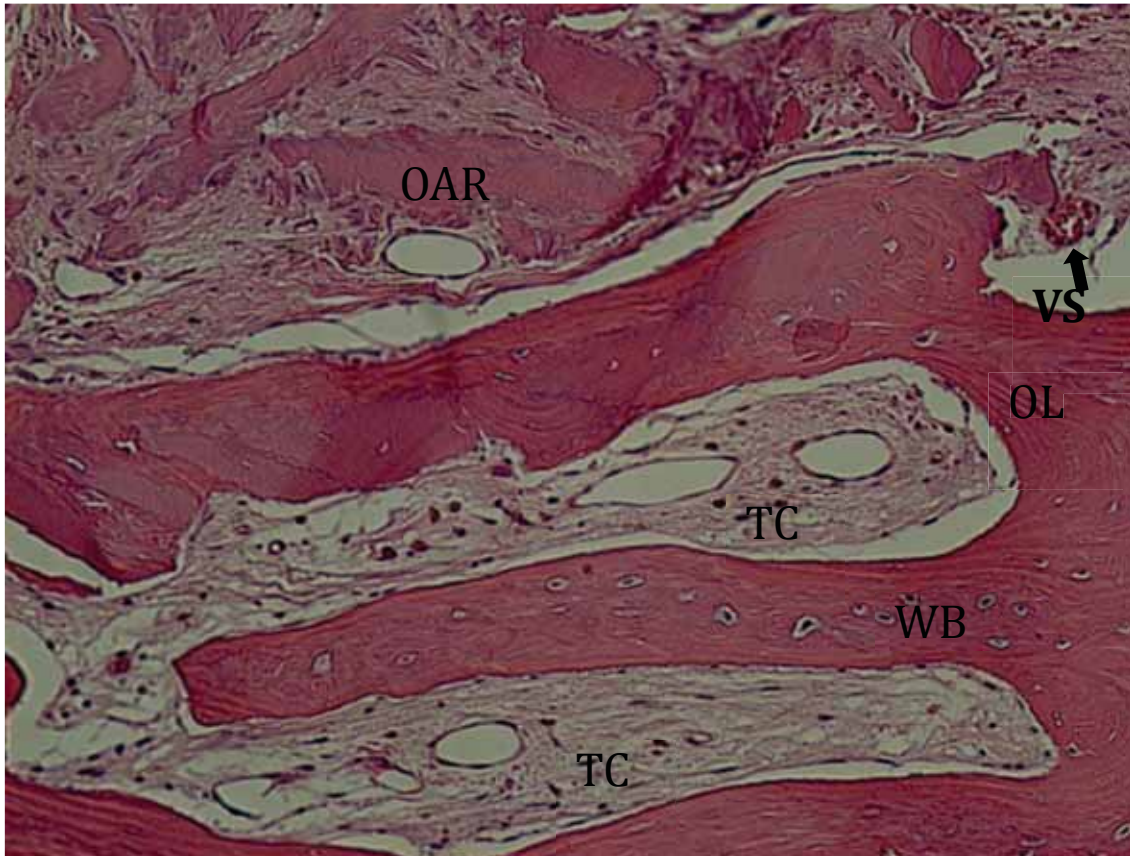


Figura 7 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo teste demonstrando presença de osso imaturo (WB), osso lamelar (OL), remanente ósseo autógeno (OAR), tecido conjuntivo (TC) e vaso sanguíneo (VS). (Aumento de 250x)

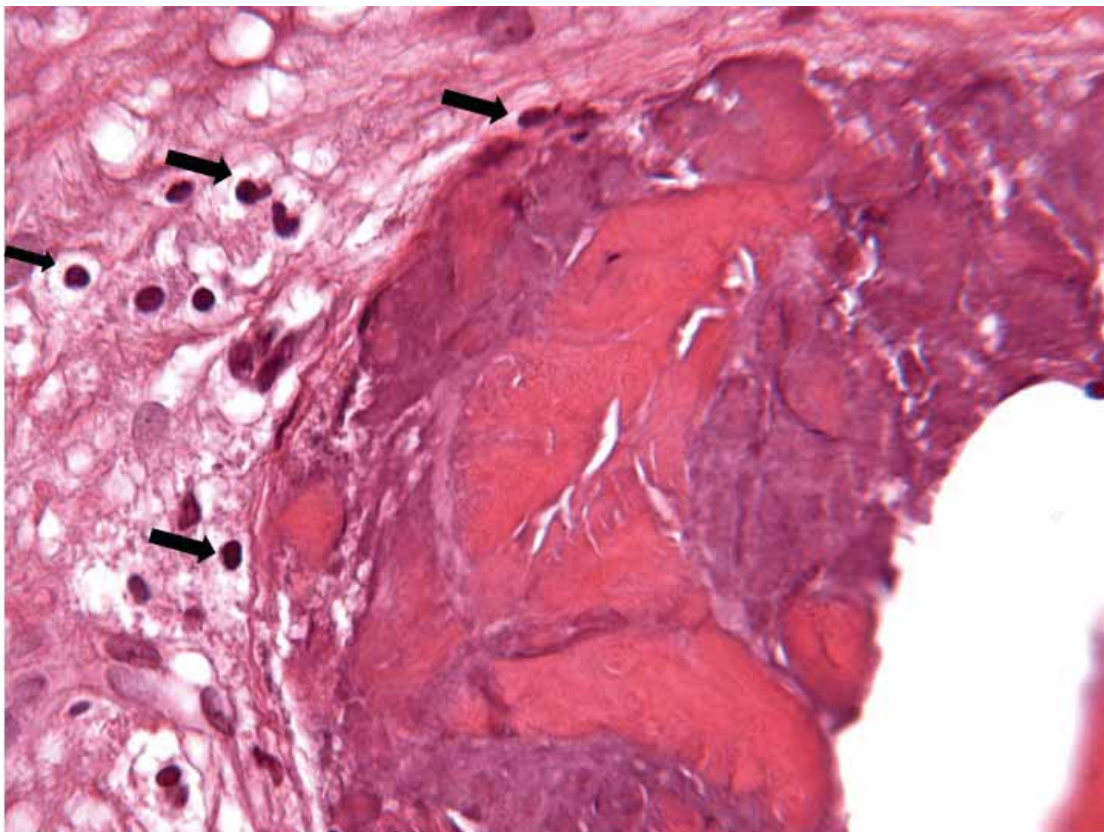


Figura 8 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo teste demonstrando presença de células multinucleadas (setas) próximas a um grânulo de ChronOs® em processo de reabsorção. (Aumento de 1000x)

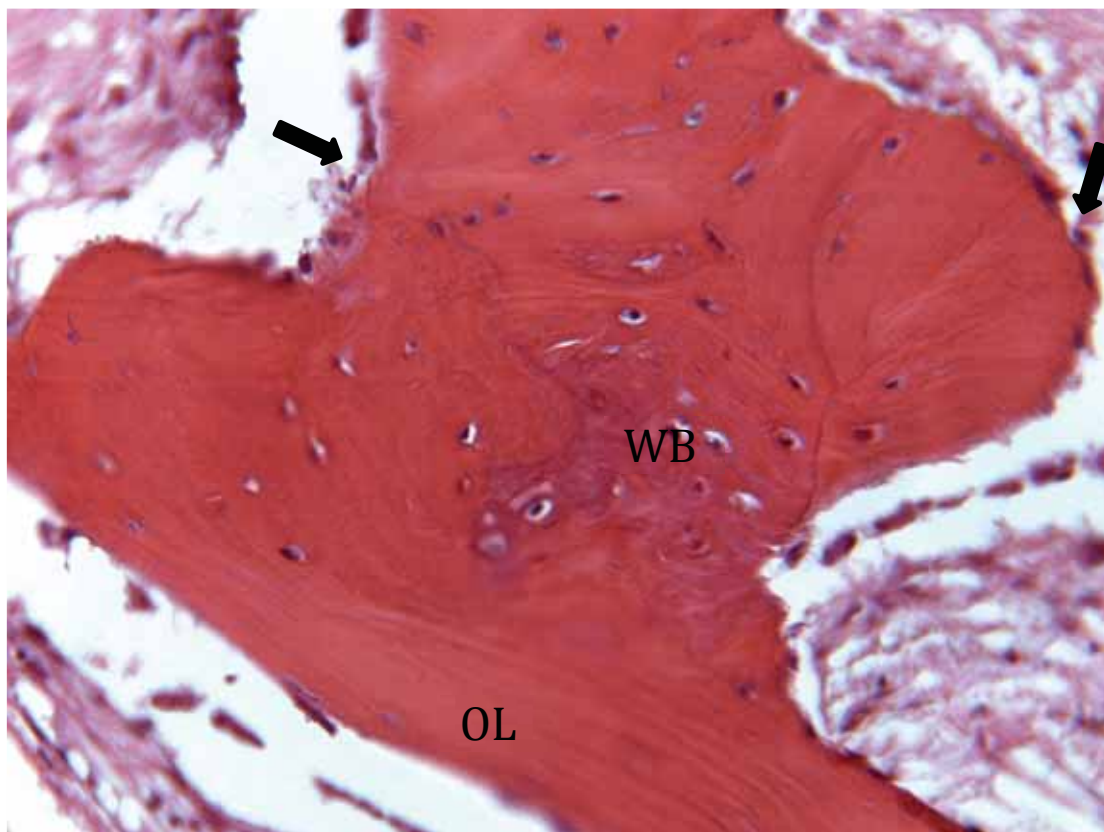


Figura 9 – Fotomicrografia da lâmina histológica do grupo controle demonstrando uma área de tecido ósseo imaturo (WB) com formação lamelar mais periféricamente (OL) e a presença de células osteoblásticas ao redor do osso. (Aumento de 400x).

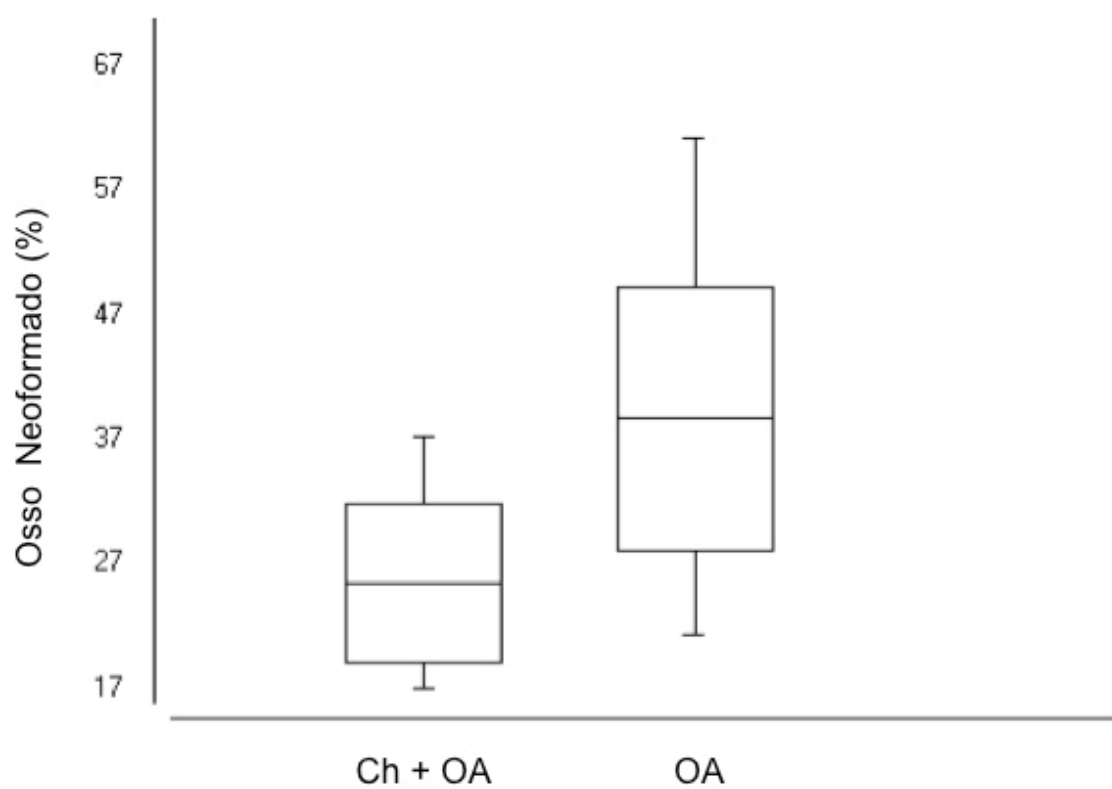


Figura 10 – Gráfico demonstrando os resultados da neoformação óssea nos seios maxilares enxertados com o ChronOs[®] misturado ao osso autógeno (Ch+OA) e com osso autógeno (OA).

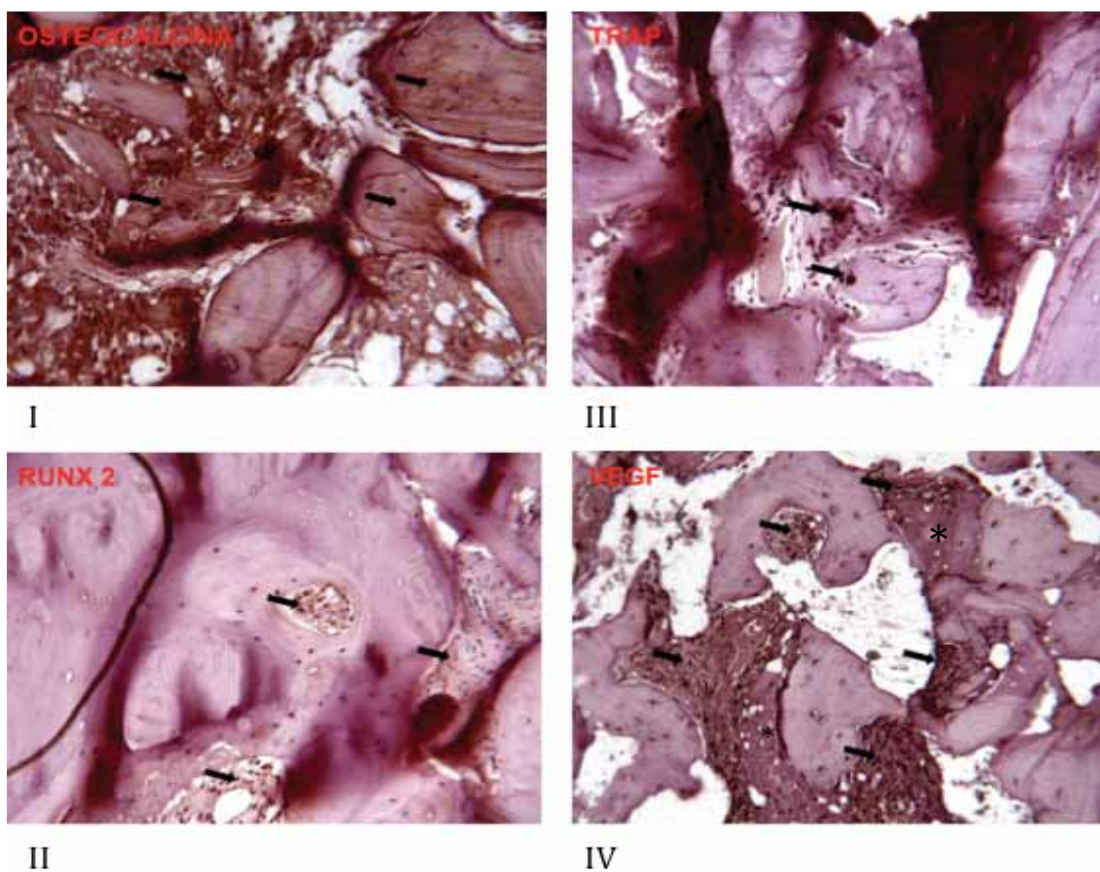
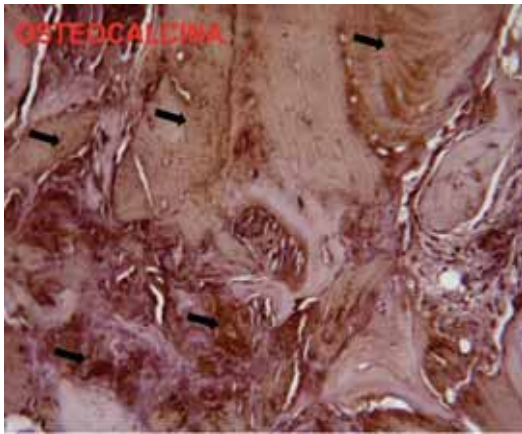
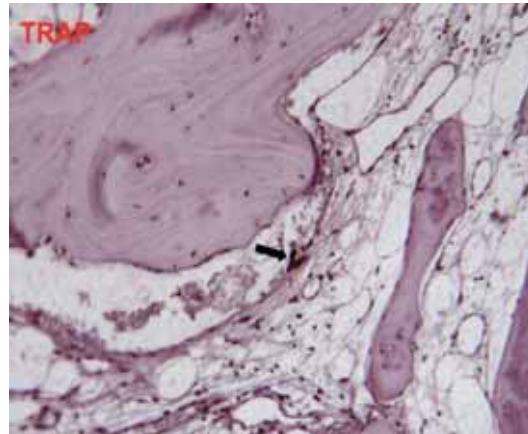


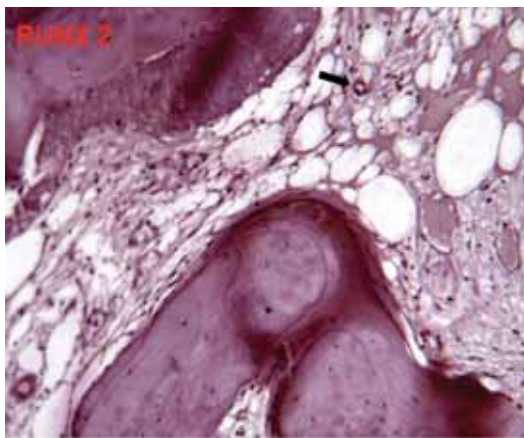
Figura 11 – Imunomarcações das proteínas analisadas no grupo teste evidenciadas com setas. I – Osteocalcina; II – Runx2; III – TRAP e IV – VEGF. (O * indica um grânulo de ChronOs®).



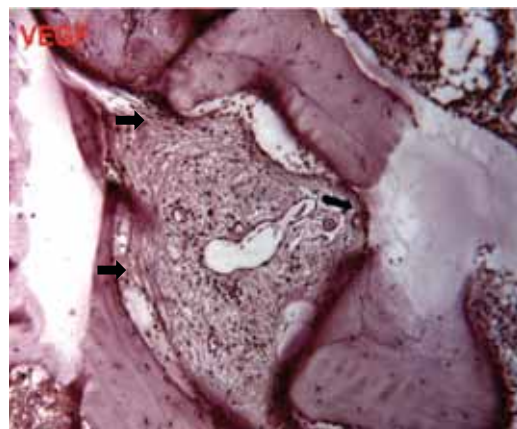
I



III



II




IV

Figura 12 – Imunomarcações das proteínas analisadas no grupo controle evidenciadas com setas. I – Osteocalcina; II – Runx2; III – TRAP e IV – VEGF.

8.0 – Anexos

8.1 – Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.

<p>FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA - JÚLIO DE</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO DE REPARO UTILIZANDO OSSO AUTÓGENO E BETA-TRICÁLCIO FOSFATO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR EM HUMANOS. ANÁLISE TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA, HISTOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA.
Pesquisador: Eduardo Hochuli Vieira
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 03416512.7.0000.5420
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 132.917
Data da Relatoria: 05/11/2012
Apresentação do Projeto:
A reabsorção óssea e a pneumatização do seio maxilar após a perda de elementos dentários na região posterior da maxila, associado à baixa densidade óssea nessa região, inviabiliza a instalação de implantes dentários. A correção de defeitos ósseos consiste na restauração das estruturas perdidas, podendo ser substituídos por implantes aloplásticos ou enxertia de ossos.
Este estudo visa comparar o processo de reparo utilizando osso autógeno, osso autógeno associado ao betatricálcio fosfato e o betatricálcio fosfato isoladamente em levantamento de seio maxilar em humanos por meio de análise tomográfica, histométrica, histológica e imunistoquímica.
Objetivo da Pesquisa:
O trabalho proposto tem o intuito de procurar entender melhor o que ocorre com os enxertos autógenos associados a biomaterial a base de tricalcio fosfato para o levantamento de assoalho de seio maxilar em humanos, uma vez que esta é uma intervenção de rotina na odontologia e poucos trabalhos relacionam o histológico, a imunistoquímica e os achados tomográficos.
Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos: Infecções sinusais, Reabsorções do material enxertado, Perda do material.
Benefícios: Aumento da altura óssea maxilar posterior para reabilitação protética oral dos
<p>Endereço: JOSE BONIFACIO 1193 Bairro: VILA MENDONÇA CEP: 16.015-050 UF: SP Município: ARACATUBA Telefone: (16)3636-3200 Fax: (16)3636-3332 E-mail: anacmsn@foa.unesp.br</p>

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



pacientes com implantes osseointegrados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Acredito que apesar dos riscos elencados, ainda assim, esta pesquisa deve ser realizada, pois proporcionará aos pacientes a possibilidade de uma reabilitação bucal, melhorando a auto estima deles.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Após análise dos termos de apresentação obrigatória, observa-se que estes estão agora de acordo, pois o pesquisador efetuou a correção necessária, já que este projeto não se enquadrava em área temática especial.

Recomendações:

Nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

FAVORÁVEL a APROVAÇÃO deste projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

ARACATUBA, 28 de Outubro de 2012

Assinador por:

Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 18.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

8.2 – Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Estudo Comparativo do Processo de Reparo Utilizando Osso Autógeno e Beta-Tricálcio Fosfato em Levantamento de Seio Maxilar em Humanos”

Nome do (a) Pesquisador (a): Rodrigo dos Santos Pereira / Fernanda Brasil Daura Jorge Boos

Nome do (a) Orientador (a): Eduardo Hochuli Vieira

1. **Natureza da pesquisa:** o(a) sr.(a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade avaliar comparativamente o processo de reparo do osso autógeno, osso autógeno misturado com Beta-Tricálcio Fosfato na proporção de 1:1 e do Beta-Tricálcio Fosfato isoladamente em seios maxilares de humanos.
2. **Participantes da pesquisa:** Serão realizados 30 reconstruções de seios maxilares em pacientes com pneumatização dos mesmos.
3. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo o(a) sr.(a) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize cirurgia de levantamento de seio maxilar com beta tricálcio fosfato e/ou beta tricálcio fosfato e osso autógeno ou somente osso autógeno. O(a) sr.(a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o(a) sr.(a). Sempre que quiser poderá pedir

mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

4. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e éticas tendo como riscos decorrentes da cirurgia infecção do seio maxilar operado, sinusites, absorção do material enxertado decorrente ou não do procedimento cirúrgico e dos cuidados pós operatórios . Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) e seu (sua) orientador (a) (e/ou equipe de pesquisa) terão conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.
6. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa o(a) sr.(a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo resulte em informações importantes sobre a forma da reparação óssea do beta tricálcio fosfato em reconstruções de seios maxilares, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa viabilizar uma alternativa para as reconstruções sinusais, onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

7. **Pagamento:** o(a) sr.(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem: Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Orientador

Pesquisador: Rodrigo dos Santos Perseira Tel: (18) 8167-4439.

Fernanda Brasil Daura Jorge Boos Tel: (43) 9955-5259.

Orientador: Eduardo Hochuli Vieira Tel: (16) 3301-6385.

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

Vice-Coodenador: Prof. Wilson Galhego Garcia

Telefone do Comitê: (18) 3636-3234

E-mail cep@foa.unesp.br

8.3 – Anexo 3 – Processamento Histológico

Após o período supracitado, as biópsias foram lavadas em água corrente por 24 horas e então foi iniciada a descalcificação das mesmas por meio solução de EDTA 4,13% (Preparo da solução de EDTA: em um litro de tampão fosfato, pH 7,2, diluir os solutos EDTA (41,3 g) e NaOH (4,4 g). Foram colocadas individualmente em frascos plásticos com solução de EDTA e mantidos sob refrigeração a 4°C. A solução de EDTA foi trocada semanalmente durante todo o período de descalcificação (aproximadamente sete semanas) até que fosse identificada a descalcificação necessária. Esta identificação foi feita por método mecânico simples (penetração, sem resistência, de uma agulha anestésica odontológica na peça anatômica).

Em seguida, as peças descalcificadas passaram pelo processo de diafanização, realizado seguindo a seqüência de álcoois e xilol descrita a seguir: álcool 70% - 1 hora, álcool 80% - 1 hora, álcool 90% - 13 horas, álcool

95% - 1 hora, álcool 100% (primeira etapa) – 1 hora, álcool 100% (segunda etapa) – 1 hora, álcool 100% (terceira etapa) – 1 hora; álcool associado à xilol – 20 minutos; xilol (passo I) – 20 minutos, xilol (passo II) – 20 minutos, e na seqüência foram incluídas em parafina.

Os cortes foram feitos com uma espessura de 5µm com navalhas de aço 18 cm (Leica) e corados em hematoxilina e eosina seguindo metodologia descrita a seguir: Inicialmente foram dissolvidos a hematoxilina (5g) em 50ml de álcool absoluto e 100g de alúmen de potássio em um litro de água destilada quente. Ambas as soluções foram misturadas entre si e, posteriormente, acrescentou-se 2,5g de óxido vermelho de mercúrio até a solução final obter coloração púrpura escura. Depois de preparada, a solução de hematoxilina 0,5% foi rapidamente resfriada e filtrada, estando, assim, própria para o uso. Para o preparo da eosina foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se a hematoxilina por 10g de eosina, obtendo-se, ao final, uma solução de eosina a 1%. Para a coloração das lâminas com HE (hematoxilina e eosina) realizaram-se as seguintes etapas na seqüência de 1 a 20:

- 1- Xilol I por 10 minutos;
- 2- Xilol II por 10 minutos;
- 3- Álcool 100% I por 1 minuto;
- 4- Álcool 100% II por 1 minuto;
- 5- Álcool 100% III por 1 minuto;
- 6- Álcool 95% por 1 minuto;
- 7- Álcool 75% por 1 minuto;
- 8- Água corrente rapidamente;

- 9- Hematoxilina por cerca de 5 minutos;
- 10- Água corrente até clarear;
- 11- Eosina por cerca de 30 segundos;
- 12- Água corrente rapidamente;
- 13- Álcool 95% I rápido;
- 14- Álcool 95% II rápido;
- 15- Álcool 100% I por 30 segundos;
- 16- Álcool 100% II por 30 segundos;
- 17- Álcool 100% III por 30 segundos;
- 18- Xilol I por 5 minutos;
- 19- Xilol II por 5 minutos;
- 20- Montagem da lâmina (1 ou 2 gotas de bálsamo "Permout" sobre a lâmina e sobreposição da lamínula).

8.4 – Anexo 4 – Normas para Publicação no Periódico International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery

Guide for Author

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

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly

those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

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

Editorial Policy

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

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Patient permission: Not required

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

Authorship

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

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and

non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

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

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. ([pdf version](#) or [word version](#)) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

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

Conflict of interest

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

Role of the funding source

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

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form

(available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics


Work on human beings that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki (Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the

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

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit 

<http://www.elsevier.com/wps/find/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 

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.

Format

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

- title page

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Text

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

Introduction

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

Materials and Methods

- Give the full details, limit references • Should be written in the past tense •
- Include exact technical specifications, quantities and generic names • Limit the

number of subheadings, and use the same in the results section • Mention statistical method • Do not include results in this section

Results

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

Discussion

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

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

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA,

$F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

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

The minus sign should be -.

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

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

References

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

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

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

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

resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

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

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

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

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

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

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate

pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

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

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

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

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-

chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

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

Funding body agreements and policies

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

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within 48 hours. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do

not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

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

Accepted Articles

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

Instructions for Letters to the Editor

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

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.

5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.
6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.
7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.
8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.