

CIRO BORGES DUAILIBE DE DEUS

Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar  
de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em  
grânulos e pasta: análise tomográfica, microtomográfica,  
histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Araçatuba – São Paulo

**2018**

CIRO BORGES DUAILIBE DE DEUS

Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar  
de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em  
grânulos e pasta: análise tomográfica, microtomográfica,  
histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia  
do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para  
obtenção do Título de MESTRE EM  
ODONTOLOGIA (Área de concentração em  
Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

**Orientador:** Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior

Araçatuba – São Paulo

**2018**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D812r Duailibe-de-Deus, Ciro Borges.  
Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em grânulos e pasta : análise tomográfica, microtomográfica, histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica / Ciro Borges Duailibe de Deus. – Araçatuba, 2018  
92 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Junior

1. Materiais biocompatíveis 2. Microtomografia por raio-x  
3. Substitutos ósseos I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

# **DEDICATÓRIA**

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ser fundamental em minha vida, meu guia, sempre presente na hora da angústia.

À todos os meus **familiares**, que não mediram esforços para que eu chegasse nessa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu pai, **Ivalber Mendes de Deus**, meu melhor amigo e primeiro orientador. Que sempre me motivou a procurar melhorar e a aprender cada vez mais. Obrigado pelo carinho, dedicação e preocupação sempre constante.

À minha mãe, **Maria Jeanne Borges Duailibe de Deus**, só tenho a agradecer a oportunidade que Deus me deu ser teu filho. Muito obrigado pela proteção, cuidado e cumplicidade. Você é a luz que ilumina minha vida.

E às minhas irmãs, **Lorena, Lívia e Lara**, minhas melhores amigas, ter vocês sempre ao meu lado tornou minha caminhada até aqui bem mais fácil.

**AGRADECIMENTOS**  
**ESPECIAIS**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Dr. Clóvis Marzola (\*in memorian)**, pelos ensinamentos em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Foi um ícone e fez uma linda história na CTBMF, um verdadeiro exemplo de dedicação à nossa classe. A especialidade deve muito ao seu esforço. Foi um prazer conviver com o senhor, ter sido seu aluno e amigo. Sou um admirador da sua história. Muito obrigado por tudo!

Ao meu orientador, **Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior**, pela oportunidade de ser seu orientado. Agradeço a paciência, motivação e instrução.

À **Profa. Adj. Roberta Okamoto**, sou muito grato por você ter participado da minha formação. Sempre disposta a me ajudar e acrescentar algo a cada dia. Agradeço imensamente o apoio e acolhimento.

Ao **Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**, um amigo sempre presente e disposto. Constantemente preocupado com o ensino de qualidade, com crescimento de cada pós-graduando e com os pacientes.

À **Profa. Ass. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi**, uma pessoa pequena somente no tamanho mas de enorme capacidade de ensino e coração.

Ao **Prof. Ass. Dr. Francisley Avila Souza**, agradeço pelo convívio descontraído e por poder aprender com você. É muito bom poder discutir alguns casos clínicos com senhor. Estando sempre com alguma piada ou alguma história antiga engraçada para alegrar nossos dias.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi**, com quem tive o prazer de ter algumas aulas e

conversas. Uma pessoa realmente diferenciada e que durante as suas aulas mostrou o que é ser um verdadeiro professor.

Ao **Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho**, obrigado pela oportunidade de aprender um pouco mais sobre a arte da cirurgia ortognática.

À **Profa. Ass. Dra. Daniela Ponzoni**, pelo conhecimento compartilhado com todos do departamento.

Ao **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, pela amizade, humildade e simplicidade.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Maldonado Pastori**, um exemplo de cirurgião e pessoa. Sou muito grato pelo o que aprendi com você.

Ao **Prof. Dr. Paulo Domingos Ribeiro Junior**, por ter sido seu aluno e orientado durante o curso de especialização em Implantodontia na APCD/Bauru. Obrigado pelas explicações, planejamentos, pelo auxílio para confecção do meu TCC durante o curso e por ter aceitado o convite para participar da minha defesa de Mestrado.

Ao grande cirurgião de cabeça e pescoço **Dr. Edgard Mello**, foi muito prazeroso poder entrar em campo ao seu lado e vê-lo operar, um exímio cirurgião. Obrigado pelos momentos de descontração durante a residência, pelas conversas e pelos churrascos.

Aos meus Professores do Maranhão, **Dr. Silvan Correa e Dr. Antônio Duarte Junior**, que despertaram o meu interesse e me deram oportunidade de ter um contato mais íntimo com a cirurgia durante a graduação e seguem me incentivando até hoje.

Ao **Erik Neiva Ribeiro Carvalho Reis**, um grande amigo que a vida me deu. Conte sempre comigo!



Ao **Pedro Henrique da Silva Gomes Ferreira**, só tenho a agradecer pela parceria desde a residência em Bauru.

Ao **Jefferson Moura Vieira**, um amigo com o coração de ouro. Acredito que não haja pessoa mais prestativa e disposta a ajudar o próximo. Sou muito feliz por tê-lo como amigo.

Ao **Luis Fernando Alcalde**, grande Bagé. Só tenho a agradecer pelos puxões de orelha quando meu R3 e pelas saídas sempre rendendo histórias homéricas.

Ao **Paulo Zupelari**, por ter amparado a mim e ao Jefferson, possibilitando o nosso apredizado teórico e prático necessário para finalização da residência, nos deixando operar os seus pacientes, de um serviço recém conquistado no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Pederneiras/SP.

Aos mais que amigos, **João Victor Abdala, Frederico Nanso, Felipe Alves, Diomildo Andrade, Arthur Andrade, Marcus Macedo, Carlos Eduardo Rios, Almeida Neto, Glalbert Cutrim, Nataniel Souza e Maurício Neto.**

Aos amigos da pós-graduação: **Ricardo Jacob, Jonathan Ribeiro, João Paulo Bonardi, Juliana Zorzi, Leonardo Freitas, Gustavo Momesso, Rodrigo nono, Somani Queiroz, Tarik Polo, Valthiere Nunes, Willian, Pier Paolo, Igor Puttini, Mônica Muñoz e Cecília Sousa**, obrigado pelos conhecimentos compartilhados e pelo bom convívio.

Aos amigos que embarcaram na pós-graduação juntos comigo: **André Hergesel de Oliva, Fábio Roberto de Souza Batista e Gabriel Mulinari** e aos pós-graduandos de outras áreas.

Aos atuais M1s da CTBMF e Implantodontia: **William Phillip, Lara Cervantes, Luara Colombo, Raquel Parra, Cássio Figueiredo, Guilherme Ramirez, Lais Egas e Thiago Machado.**

Aos **novos pós-graduandos** de 2018, sejam bem-vindos ao serviço e boa sorte.

À **Sabrina Ferreira**, muito obrigado por me ajudar desde as cirurgias com os coelhos até a confecção desde trabalho.

À **Hiskell Francine Fernandes e Oliveira**, agradeço pelos bons momentos que vivemos.

À **Michele Marques**, agradeço a intermediação com o professor Idelmo e por sempre ter conseguido facilitar de alguma forma minha vida durante o mestrado.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira e Fausto Canuto**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner e Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamento laboratoriais.

Ao **João Correa, Camilo Venâncio e seu Arnaldo**, por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, desde a organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

À todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba, NEC e DEFI.

Aos **pacientes** por confiarem suas vidas aos nossos cuidados.

Agradeço à **vida dos animais** utilizados durante os experimentos, o que tornou possível a elaboração deste trabalho e permitiu o meu aprendizado.

**AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de ser discente de uma instituição tão reconhecida e por onde já passaram grandes nomes da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**, pela forma como dirige nossa Pós Graduação.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada**, agradeço pela paciência, pelos avisos e e-mails. Vocês são peças fundamentais desta engrenagem. Muito obrigado!

Agradeço imensamente à empresa **Einco Biomaterial LTDA**, que ficou à inteira disposição e cedeu os substitutos ósseos tornando possível o desenvolvimento desta pesquisa.

# EPÍGRAFE

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo a certeza do seu destino.”*

*(Leonardo da Vinci)*

**Duailibe-de-Deus, C.B.** Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em grânulos e pasta: análise tomográfica, microtomográfica, histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2018.

## **RESUMO**

As reabsorções ósseas nas regiões posteriores de maxila são um dos fatores que limitam o tratamento reabilitador desta região. Existem atualmente uma ampla gama de biomateriais disponíveis para a regeneração óssea desta área através de elevação do assoalho do seio maxilar, dentre eles, demonstrando resultados com boa biocompatibilidade e ótima osteocondução o beta-tricálcio-fosfato em associação com a hidroxiapatita (BTCP + HA). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo de seios maxilares de coelhos reconstruídos com hidroxiapatita e beta-tricálcio-fosfato veiculados em grânulos (GRN) e em pasta (PST), por meio de análises tomográfica, microtomográfica, histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica. Para isso, 24 seios maxilares foram enxertados com BTCP + HA. Sendo 12 seios com esta associação veiculada em grânulos e 12 em pasta. Tendo como tempo experimental 7 e 40 dias. Durante a análise tomográfica notou-se a presença e estabilidade do biomaterial no seio maxilar de todos os animais.

Referente a análise microtomográfica notou-se diferença estatística em BV ( $p=0,0035$ ), BV/TV ( $p=0,0012$ ), Tb.Sp ( $p=0,0064$ ) e Tb.N ( $p=0,0034$ ), não havendo diferença significativa apenas para Tb.Th ( $p=0,1422$ ). Na histomorfometria foi observado através da análise quantitativa por grade de Merz a quantidade de 66,25% de osso para o grupo GRN e 31,75% para o grupo PST e durante a análise de imunomarcações das proteínas osteocalcina (OC) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foi verificado que o grupo PST se apresentava em estágio de processo de remodelação enquanto o grupo GRN encontrava-se em período de estabilização. Assim, ambos os biomateriais estudados demonstraram excelente osteocondutividade, boa organização tecidual e ausência de processo inflamatório crônico no período tardio.

Palavras-chave: Substitutos Ósseos; Regeneração Óssea; Microtomografia por Raio-X

**Duailibe-de-Deus, C.B.** Bone regeneration after elevation of the maxillary sinus floor of rabbits with hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate in granules and paste: tomographic, microtomographic, histological, histomorphometric and immunohistochemical analyzes [dissertation]. Araçatuba: State University of São Paulo (UNESP), School of Dentistry; 2018.

## **ABSTRACT**

Bone resorption in the posterior maxillary regions is one of the factors limiting the rehabilitation treatment of this region. There are currently a wide range of biomaterials available for bone regeneration of this area through elevation of the maxillary sinus floor, among them, showing results with good biocompatibility and optimal osteoconduction beta-tricalcium phosphate in association with hydroxyapatite (BTCP + HA) . Therefore, the objective of this study was to evaluate the bone repair process of reconstructed rabbits with hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bearing granules (GRN) and paste (PST) by tomographic, microtomographic, histological, histomorphometric and immunohistochemistry. For this, 24 maxillary sinuses were grafted with BTCP + HA. Being 12 breasts with this association vehiculated in granules and 12 in paste. Taking as experimental time 7 and 40 days. During the tomographic analysis, the presence and stability of the biomaterial in the maxillary sinus of all the animals was observed. Regarding microtomographic analysis, we observed a statistical difference in BV ( $p =$



0.0035), BV / TV ( $p = 0.0012$ ), Tb.Sp ( $p = 0.0064$ ) and Tb.N ( $p = 0.0034$ ), with no significant difference only for Tb.Th ( $p = 0.1422$ ). In the histomorphometry, the quantity of 66.25% of bone in the GRN group and 31.75% in the PST group and in the analysis of the osteocalcin (OC) and resistant acid phosphatase to the tartrate (TRAP), it was verified that the PST group was in a remodeling process stage while the GRN group was in a stabilization period. Thus, both biomaterials studied demonstrated excellent osteoconductivity, good tissue organization and absence of chronic inflammatory process in the late period.

**Keywords:** Bone Substitutes; Bone Regeneration; X-Ray Microtomography

# **LISTAS E SUMÁRIO**

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1 -</b>	Tricotomia da região maxilar	<b>70</b>
<b>Figura 2 -</b>	Degermação com polivinil pirrolidona - iodo	<b>70</b>
<b>Figura 3 -</b>	Infiltração de anestésico local na região maxilar	<b>70</b>
<b>Figura 4 -</b>	Início de incisão	<b>70</b>
<b>Figura 5 -</b>	Finalização de incisão	<b>71</b>
<b>Figura 6 -</b>	Descolamento periosteal	<b>71</b>
<b>Figura 7 -</b>	Orientação de demarcação com trefina de 5mm	<b>72</b>
<b>Figura 8 -</b>	Região de linha média maxilar	<b>72</b>
<b>Figura 9 -</b>	Trefina em posição	<b>73</b>
<b>Figura 10 -</b>	Demarcação das regiões de acesso	<b>74</b>
<b>Figura 11-</b>	Início de desgaste com broca diamantada	<b>74</b>
<b>Figura 12-</b>	Finalização de exposição do seio maxilar	<b>74</b>
<b>Figura 13-</b>	Membrana sinusal exposta	<b>74</b>
<b>Figura 14-</b>	Seio do grupo grânulos reconstruído	<b>75</b>
<b>Figura 15-</b>	Seio do grupo pasta reconstruído	<b>75</b>
<b>Figura 16-</b>	Sutura por planos com Vicryl 4-0	<b>75</b>

<b>Figura 17 -</b>	Sutura em pele com Nylon 5-0	<b>75</b>
<b>Figura 18-</b>	Slices tomográficos coronais, sagitais e axiais de uma amostra GRN (superior) e PST (inferior) tempo 40 dias	<b>76</b>
<b>Figura 19-</b>	Slices tomográficos coronais de todos os tempos e grupos	<b>77</b>
<b>Figura 20-</b>	Orientação no Software Data Viewer dos grupos GRN e PST 40 dias	<b>78</b>
<b>Figura 21-</b>	Reconstrução com Software CTvox do grupo GRN 40 dias	<b>79</b>
<b>Figura 22-</b>	Reconstrução com Software CTvox do grupo PST 40 dias	<b>79</b>
<b>Figura 23-</b>	Imagem panorâmica do grupo GRN 7 dias HE	<b>80</b>
<b>Figura 24-</b>	Imagem panorâmica do grupo GRN 40 dias HE	<b>81</b>
<b>Figura 25-</b>	Imagem panorâmica do grupo PST 7 dias HE	<b>82</b>
<b>Figura 26 -</b>	Imagem panorâmica do grupo PST 40 dias HE	<b>83</b>
<b>Figura 27-</b>	Grade de Merz grupo GRN 40	<b>84</b>
<b>Figura 28-</b>	Grade de Merz grupo PST 40	<b>84</b>
<b>Figura 29-</b>	Imagens de imunohistoquímica	<b>85</b>

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Escores de imunoistoquímica	<b>66</b>
------------------	-----------------------------	-----------

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>BTCP</b>	Beta-tricálcio-fosfato	<b>14</b>
<b>HA</b>	Hidroxiapatita	<b>14</b>
<b>GRN</b>	Grânulos	<b>14</b>
<b>PST</b>	Pasta	<b>14</b>
<b>OC</b>	Osteocalcina	<b>15</b>
<b>TRAP</b>	Fosfatase ácida resistente ao tartarato	<b>15</b>
<b>IM</b>	Intramuscular	<b>30</b>
<b>ROI</b>	Região de interesse	<b>33</b>
<b>BV</b>	Volume ósseo	<b>15</b>
<b>BV/TV</b>	Porcentagem de volume ósseo	<b>15</b>
<b>Tb.Th</b>	Espessura do trabeculado ósseo	<b>15</b>
<b>Tb.Sp</b>	Separação de trabéculas	<b>15</b>
<b>Tb.N</b>	Número de trabéculas	<b>15</b>
<b>EDTA</b>	Ácido etileno tetra-acético	<b>36</b>
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina	<b>36</b>

# LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b>	Volume ósseo (BV)	<b>67</b>
<b>Gráfico 2 -</b>	Porcentagem de volume ósseo (BV/TV)	<b>67</b>
<b>Gráfico 3 -</b>	Espessura das trabéculas (Tb.Th)	<b>68</b>
<b>Gráfico 4 -</b>	Separação entre trabéculas (Tb.Sp)	<b>68</b>
<b>Gráfico 5 -</b>	Número de trabéculas (Tb.N)	<b>69</b>

# SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	<b>26</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>29</b>
<b>Resultados</b>	<b>41</b>
<b>Discussão</b>	<b>48</b>
<b>Conclusão</b>	<b>57</b>
<b>Referências</b>	<b>58</b>
<b>Anexo A</b>	<b>86</b>
<b>Anexo B</b>	<b>87</b>



# **INTRODUÇÃO**

## **Introdução**

As regenerações ósseas têm sido amplamente realizadas em odontologia para tratamento de defeitos ósseos causados por trauma, doenças periodontais e em casos de reabsorções fisiológicas, com finalidade de instalação de implantes osseointegrados para reabilitação dos inválidos orais. Dos vários materiais utilizados para reconstruções, o enxerto autógeno se classifica como padrão ouro, desempenhando alta previsibilidade nos tratamentos, apresentando porém, algumas características negativas referentes à sua captação e disponibilidade<sup>1,2,3</sup>.

Nas últimas décadas, a indústria de engenharia tecidual cresceu exponencialmente, tanto em número de produtos quanto em relação à qualidade e aplicações dos materiais. E devido aos mais diversos casos, existe uma grande busca por restauração do sistema estomatognático. Por isso, biomateriais estão sendo estudados e desenvolvidos com o intuito de se aproximar das características do material de enxertia ideal. São exemplos de substitutos ósseos: o osso alógeno, xenógeno e aloplástico<sup>3</sup>.

Atualmente há uma grande variedade de substitutos ósseos no mercado, apresentando diferentes respostas biológicas e propriedades estruturais<sup>4</sup>, a HA de origem bovina Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich), é reconhecida como padrão de excelência internacional e é utilizada com alta efetividade nos tratamentos reconstrutivos<sup>5,6,7,8</sup>. Outro biomaterial que tem demonstrado

ótimos resultados em procedimentos cirúrgicos e em aumento de seios maxilares, é o BTCP, apresentando um bom potencial osteocondutor e rápida reabsorção<sup>7,9,10</sup>.

As propriedades químicas e estruturais dos substitutos ósseos são frequentemente descritas quanto ao seu potencial osteocondutor<sup>4</sup>. Contudo, se faz necessário mais estudos sobre a estrutura geométrica e veículo adequado destes biomateriais, estando estes produtos disponíveis em tamanhos de grânulos variados e composições diferentes de pastas<sup>11,12</sup>.

Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo de seios maxilares de coelhos reconstruídos com hidroxiapatita e beta-tricálcio-fosfato veiculados em grânulos e em pasta, por meio de análises tomográfica, microtomográfica, histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **Materiais e Métodos**

Após a aprovação do comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA n° 506-2016), 24 coelhos machos da raça Nova Zelândia de aproximadamente 4kg foram utilizados neste trabalho, divididos em 2 grupos experimentais (PST e GRN), de acordo com a cirurgia de reconstrução óssea a que foram submetidos.

### **Delineamento**

Foram utilizados vinte e quatro coelhos machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio de 4 kg e 5 meses de idade, estes animais foram submetidos ao procedimento de abaixamento da membrana sinusal do seio maxilar do lado direito para posterior preenchimento, sendo divididos em 2 grupos de acordo com o tempo experimental (7 e 40 dias) e enxerto empregado (GRN e PST) (n = 6). Foi utilizado como biomaterial, a associação de 60% de hidroxiapatita (HA) com 40% de beta-tricálcio-fosfato (BTCP) Osteosynt<sup>®</sup> (Belo Horizonte, MG, Brasil), com granulometria de 20 – 40 mesh para grânulos e granulometria de 100 – 200 mesh para pasta.

Duas seringas contendo cada uma 2g de HA+BTCP em pasta foram divididas pelo número de animais do grupo PST 7 e 40 dias, totalizando

uma quantia de 0,33g a ser aplicada em cada animal. Da mesma forma foi realizado com o grupo grânulos, dois frascos de 2g de HA+BTCP foi fracionado pelo número de animais deste grupo, totalizando a mesma quantidade de 0,33g por animal para cada tempo experimental.

Os animais foram mantidos confinados em gaiolas apropriadas para seu devido acondicionamento, em ambiente com temperatura controlada de 21 a 22 graus célsius, com acesso a ração e água *ad libitum*.

### **Procedimento cirúrgico**

Antes de realizar o procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e neles foi administrado o sedativo intramuscular (IM) Ketamina 1% (0,20 ml/kg) e Xilazina 2% (0,30 ml/kg) (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brazil). Em seguida foi realizada a tricotomia da região maxilar e a antissepsia executada com solução aquosa de polivinilpirrolidona 1%. Subsequentemente foi infiltrado na região subcutânea o anestésico mepivacaína 2% (0,3mL/kg) com vasoconstritor epinefrina 1:100.000 com finalidade hemostática durante a cirurgia e analgésica no pós-operatório imediato. Foi realizada a incisão em pele, tecido subcutâneo e periósteo com bisturi Bard-Parker número 3 com lâmina número 15. O periósteo foi descolado delicadamente com descolador de Molt (Descolador de Molt, Quinelato - 18cm. Nº 09. Avenida Pennwalt, 285, Rio Claro, SP - Brasil) e

o osso vestibular maxilar dos animais foi inicialmente demarcado através de contra ângulo (Contra ângulo cirúrgico NSK 20:1 SG20 – Elly-Beinhorn-Strasse 8, Eschborn - Alemanha) com redução 20:1 a 800 rotações por minuto e broca trefina de 5mm (Harte Instrumentos Cirúrgicos - Rua Bernardo Gonçalves, 112 Jd. Roberto Benedetti, Ribeirão Preto, SP - Brasil) sob irrigação copiosa com soro fisiológico 0,9%, em seguida, o osso foi desgastado com broca diamantada de 2,9mm (Broca Carbide Diamantada PM Esférica de Peça de Mão - Komet - Rock Hill, SC, EUA) de diâmetro montada em micromotor e peça reta (Peça reta e micro motor NSK – Elly-Beinhorn-Strasse 8, Eschborn - Alemanha) sob irrigação abundante até delicadamente expor toda membrana, e então a área do descolamento foi finalmente exposta com o auxílio de curetas. A membrana sinusal foi descolada e abaixada sutilmente, e após ganhar espaço suficiente o enxerto foi aplicado e adaptado no seio maxilar. Os tecidos moles foram reposicionados, coaptados e suturados por planos. Perióstio e tecidos musculares com Vicryl 4-0 e pele com Nylon 5-0. Todos os animais foram medicados no pós-operatório imediato com dose única de pentabiótico via IM 1.200.000 unidades (0,1mg/kg) (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP - Brasil) e para analgesia foi administrado cloridrato de tramadol (0,10 ml/kg) (Tramal®, Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro - Brasil) (Figuras 1 a 17).

A eutanásia de todos os animais foram realizadas nos tempos de 7 (12 animais) e 40 (12 animais) dias para remoção de suas maxilas, início de processamento e análises.

### **Análise Tomográfica**

Imediatamente após a realização da eutanásia, as maxilas dos coelhos dos grupos PST e GRN foram reduzidas e armazenadas para fixação em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP - Brasil) durante 48 horas, em seguida foram banhadas em água corrente por 24 horas e, após a lavagem, as peças foram acondicionadas em álcool 70% para a realização das tomadas tomográficas e microtomográficas.

Por meio do tomógrafo cone beam i-CAT (i-CAT 1910 North Penn Road Hatfield, PA 19440), todas as amostras dos dois grupos foram escaneadas.

A análise tomográfica foi realizada com o auxílio do software Dolphin Imaging (Dolphin Imaging & Management Solutions, 9200 Oakdale Ave. Suite 500 - Chatsworth, CA 91311 U.S.A.). Podendo desta forma fazer a observação das características sinusais, analisar a presença, localização e estabilidade do biomaterial em slices coronais de 1mm de espessura.



## **Análise Microtomográfica**

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica, 2003), 3 amostras de cada grupo foram escaneadas para chegar a uma média para análise. As peças foram microtomografadas utilizando cortes de 6 $\mu$ m de espessura, com a energia da fonte de radiação programada em 90 kV com corrente de 111  $\mu$ A, fazendo uso de filtro de Al 0,5 + Cu 0,038. A um passo de rotação de 0.5mm e resolução de aquisição de imagem de 2016x1344 pixels. Totalizando com esta configuração um tempo de tomada de 2 horas e 26 minutos. As imagens captadas foram armazenadas em formato (TIFF) em uma pasta identificada com o nome do respectivo grupo e posteriormente reconstruídas através do software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com a configuração de smoothing: 5, ring artefacts correction: 7, beam hardening correction: 30%, faixa de imagem dinâmica mínima de 0.0028 e máxima de 0.11 proporcionando imagens ideais para análise.

Com o auxílio do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) a DATA das imagens foi emulada nos eixos X, Y e Z, e assim, foi possível observar as imagens nas orientações coronal X-Z, sagital Z-Y e transaxial X-Y. Em seguida, as imagens foram realinhadas em relação ao plano mediano de cada maxila e o novo DATASET reordenado foi salvo em uma pasta nomeada (DV – coronal) para análise de ROI com formato

de polígono interpolizado (dinâmico). Posteriormente, fazendo uso do software CT Analyser (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0), as imagens das pastas DVs foram acessadas, e assim, foi possível fazer a análise do volume dos enxertos utilizados nos seios maxilares.

A avaliação através do polígono interpolizado foi realizada através da mensuração da porção mais central do acesso realizado com trefina de 5mm. Se baseando pelo diâmetro perpendicular ao plano mediano, e também, confirmada esta localização de análise através do paralelismo em relação ao lado contralateral (com implante), foram contados 50 slices com espessura de 0,022mm cada um, em direção ao sentido posterior da maxila para definir o limite posterior da seleção e 50 slices em sentido anterior para definir o limite anterior da seleção, totalizando um intervalo de 100 slices a ser analisado<sup>17</sup>.

Em seguida, a região de interesse (ROI) foi determinada de forma dinâmica, utilizando um polígono interpolizado, desde a imagem de limite anterior até o limite posterior, percorrendo todas as imagens do intervalo selecionado, sendo os pontos do polígono editados a cada slice, fazendo uso ainda de alterações de coloração em todos os cortes com a intenção de abranger todas as regiões com características de enxerto. O passo seguinte, foi realizar a interpolização adaptativa dos polígonos e, na aba de seleção binária, foi determinado um valor máximo de 57% e

mínimo de 16% para indexação da escala de cinza, definindo uma melhor nitidez das imagens no histograma. Desta forma pôde-se concluir a pré-visualização da morfometria do volume a ser estudado e salvar as análises em formato planilha para o software OpenOffice.org 1.1 (.csv).

Com finalidade didática, foi possível a reconstrução e manipulação em três dimensões de todas as amostras (GRN e PST) por meio do software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

E por fim, seguindo as guidelines do JBMR de Bouxsein e colaboradores em 2010, foram analisados os dados de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N) das duas apresentações.

### **Análise Histológica e Histomorfométrica**

Foram utilizados para fazer uma análise quantitativa todos os animais de cada tempo e grupo experimental, sendo as maxilas removidas e reduzidas para realização da análise histológica dos cortes em parafina.

As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP - Brasil) por 48 horas, posteriormente lavadas em água corrente por 24 horas

e então foi iniciado o processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 20%.

Após a descalcificação adequada, prosseguiu-se com a desidratação das peças através da sequência de álcoois sendo finalizada com o processo de diafanização com xilol.

Então as foram submetidas ao processo de embebição em parafina 1, 2, 3 e por fim foram imersas em parafina de inclusão em formas de papel. Em seguida, a parafina em excesso foi removida e as peças foram instaladas no sentido vertical (póstero-anterior) nos tacos para realização de cortes coronais de 5 µm de espessura com o auxílio de micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017) da área de interesse para confecção das lâminas.

Uma lâmina de cada amostra foi separada para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras duas para as reações de imunistoquímica (OC e TRAP).

As imagens das lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carl Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplado a uma câmera de captação de imagem e conectado a um computador (Configuração: Intel Core i5® com sistema operacional Windows 7®) e Software para processamento e análise de imagens

(AxioVision 4.9.1®0, Carl Zeiss by Imaging Associates Ltd, Jena, Deutschland).

As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos TIFF para serem estudadas. A análise histomorfométrica foi realizada com as imagens obtidas com objetiva de 2.5X0.07, excluindo áreas de marcação ativa para osso remanescente da região zigomática, maxilar e nasal. Para comparar as diferenças estruturais entre as seções dos seios aumentados, cada biópsia foi dividida em quatro áreas. A primeira área (A1) correspondendo à porção lateral superior esquerda da região reconstruída, segunda área (A2) correspondendo à porção medial superior, terceira área (A3) correspondendo à porção inferior esquerda e quarta área (A4) correspondendo à porção inferior direita. Estando localizadas as áreas (A3 e A4) com proximidade à membrana sinusal.

Foram mensuradas as porcentagens de osso neoformado e tecido mole (espaços medulares, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos) por meio da grade de Merz. Utilizando quatro grades retangulares com 100 pontos/grade sobre as imagens, a quantificação foi realizada. O cálculo da porcentagem de cada item analisado foi alcançado quantificando a presença de cada tipo de tecido em cada ponto da grade. O total de pontos das áreas (A1, A2, A3 e A4) de cada tipo de tecido foram somados e dividido por 4, obtendo dessa forma uma média da porcentagem tecidual relativa de cada item de todas as amostras.

## **Análise Imunoistoquímica**

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteocalcina (OC) (SC18319) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (SC30832) (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de mineralização óssea (OC) e reabsorção óssea (TRAP).

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories) e o amplificador do sinal da marcação foi a Avidina Biotina (Kit Elite, Vector Laboratories), tendo a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo relacionado aos biomateriais.

A análise foi realizada através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), que

sabidamente estarão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e serão consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos<sup>46</sup>.

### **Análise estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism<sup>®</sup> 7.04 (La Jolla, CA, USA). A análise da homocedasticidade foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para a análise dos valores paramétricos referente às médias volumétricas dos enxertos, foram utilizados os parâmetros das microtomografias: volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N). Foi utilizado o teste t não pareado e adotado nível de significância de  $p < 0,05$  para todos os testes.

# **RESULTADOS**



## **Resultados**

### **Análise Tomográfica**

Foi notado durante a avaliação das tomografias imagens sugestivas de espessamento da membrana sinusal, pólipos ou líquidos opacificando o seio maxilar nos coelhos do grupo PST 40 dias – C1 E C5 e grupo GRN 40 dias – C4, C5 e C6.

Foi possível notar ainda a presença, localização e estabilidade do biomaterial enxertado em todos os animais (Figuras 18 e 19).

### **Análise Microtomográfica**

Referente à medida do volume ósseo (BV) através do polígono interpolizado foi observado para o grupo GRN um valor médio de 18,69mm<sup>3</sup> enquanto para o grupo PST foi verificado um valor de 7,3mm<sup>3</sup> (p<0,05).

Quando avaliado a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), o grupo PST se apresentou superior, com valor médio de 73,65% e para GRN 54,02% (p<0,05).

Durante a quantificação dos resultados relacionados à espessura trabecular (Tb.Th), tanto o biomaterial em PST quanto em GRN, indicaram

médias parecidas. Sendo a medida para o grupo GRN 0,1827mm ao passo que para o grupo PST a quantificação média foi de 0,1678mm ( $p>0,05$ ).

A separação entre as trabéculas (Tb.Sp) foi maior para o grupo GRN 0,2108mm que para o grupo PST 0,1278mm ( $p<0,05$ ).

Correspondente à quantidade do número de trabéculas (Tb.N) os valores foram concordantes e expressivos para a substância PST 4,415 1/mm enquanto um menor valor referente a quantificação do trabeculado foi demonstrado no grupo GRN 3,171 1/mm ( $p<0,05$ ) (Figuras 20 a 22).

## **Análise Histológica e Histomorfométrica**

### **Grupo PST 7 DIAS:**

Notou-se grânulos regulares e homogêneos, formação exarcebada de tecido conjuntivo, muitos vasos sanguíneos, processo de reconhecimento do biomaterial.

Na região central foi notado tecido conjuntivo, melhor absorção do coágulo sanguíneo, processo inflamatório reduzido em contato com o biomaterial. O processo inflamatório se localiza na periferia do material enxertado como uma possível tentativa de reabsorver o sangramento.

### **Grupo PST 40 DIAS:**

Notou-se um padrão de granulometria residual mais homogênea, aspecto reacional mais limpo, sem sinais inflamatórios, menor quantidade de vasos sanguíneos, finas trabéculas, boa organização celular, demonstrando boa aceitação e osteocondutividade pelo biomaterial. Observando ainda através da grade de Merz a porcentagem de 68,25% de tecido mole e 31,75% de osso neoformado.

### **Grupo GRN 7 DIAS:**

Notou-se grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo formado, algumas células gigantes em formação, estrutura ricamente vascularizada, presença de grânulos de diversos formatos e tamanhos. Faixa de osso em neoformação justaposto à membrana.

### **Grupo GRN 40 DIAS:**

Nota-se grande quantidade de grânulos remanescentes irregulares, podendo ser visto várias trabéculas finas, o que demonstra que neste tempo esta apresentação apresenta também boa osteocondução, o que induz à uma perfusão sanguínea adequada para a nutrição e início de angiogênese. Observou-se ainda tecido ósseo maduro, bem formado, organizado e

trabéculas espessas conferindo uma estrutura estável. Observando ainda através da grade de Merz a porcentagem de 33,75% de tecido mole e 66,25% de osso neoformado (Figuras 23 a 27).

### **Análise Imunoistoquímica**

As imunomarcações foram avaliadas na região de tecido ósseo formado junto ao biomaterial, e com o objetivo de caracterizar as etapas de formação/mineralização óssea foi utilizada a proteína (OC) e para quantificação de reabsorção/atividade osteoclástica a proteína (TRAP). A (OC) apresenta-se marcada em osteoblastos na etapa final de mineralização, caracterizando um tecido ósseo mais maduro, enquanto a (TRAP), apresenta-se marcada positivamente em osteoclastos, sendo portanto um marcador da reabsorção do tecido ósseo.

#### **(OC) GRN 7 dias:**

Foi possível observar a presença de marcação positiva para esta proteína no tecido ósseo remanescente, na forma de precipitados sobre o tecido ósseo formado, nos osteócitos e em células do tecido conjuntivo, evidenciando uma possível atividade osteoblástica. Ao redor do biomaterial foi notado marcação de moderada a intensa da matriz extra celular.

**(OC) GRN 40 dias:**

Foi possível observar tecido ósseo em organização, osteoblastos e a matriz extracelular marcada de forma moderada.

**(TRAP) GRN 40 dias:**

Foi possível observar imunomarcção leve à moderada desta proteína.

**(OC) PST 7 dias:**

Notou-se distribuição homogênea do substituto ósseo, presença de células em organização ao redor do biomaterial, com marcação moderada a intensa na matriz extracelular.

**(OC) PST 40 dias:**

Notou-se matriz extracelular marcada de forma intensa, envolvendo áreas de biomaterial e evidenciando ainda tecido com padrão maior de organização celular.

**(TRAP) PST 40 dias:**

Notou-se osteoclastos junto às regiões com biomaterial, evidenciando marcação de moderada à intensa (Figura 29).

# **DISCUSSÃO**

## Discussão

Estudos com a finalidade de diagnóstico de sinusite em coelhos avaliaram as modalidades de imagem RNI x TC e concluíram que as TCs proporcionam imagem adequada para reconhecimento de alterações sinusais, com um menor tempo de tomada e menor custo que as RNIs<sup>43,44</sup>. No presente estudo, durante a avaliação de TC, notou-se em um total dos 24 coelhos operados, imagens sugestivas de espessamento de mucosa em 3 coelhos do grupo GRN 40 dias e em 2 coelhos do grupo PST 40 dias, enquanto o restante dos animais demonstraram seios com imagens características saudáveis e sem velamentos.

Ainda durante as análises tomográficas, foi notada estabilidade e manutenção da estrutura enxertada no último tempo analisado para o grupo GRN enquanto para o grupo PST foi identificado uma redução de volume de aproximadamente 50% da inicial. Segundo Ozcan KM e colaboradores em 2011, corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, pois ao realizarem experimentos em seios de coelhos, utilizando como material de preenchimento: coágulo sanguíneo, osso autógeno e HA bovina, afirmam que nem o coágulo e nem o osso autógeno promovem resistência estrutural adequada para manutenção e estabilidade da estrutura enxertada, mostrando melhores resultados no grupo HA, apresentando aumento de densidade de até >50%<sup>44</sup>.



A análise da microarquitetura realizada através da microtomografia evidenciou médias superiores para o grupo GRN nos parâmetros BV, Tb.Sp ( $p < 0,05$ ) e Tb.Th ( $p > 0,05$ ) e inferiores para BV/TV e Tb.N ( $p < 0,05$ ), resultando em maior quantidade óssea, porém, o grupo PST demonstrou comportamento celular e respostas antigênicas superiores durante as análises imunoistoquímicas, o que sugere plena atividade da dinâmica óssea.

Durante as análises das lâminas coradas com HE foi notado para o primeiro tempo experimental de 7 dias respostas teciduais semelhantes para os dois grupos, sendo observado grande formação de vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e inflamação fisiológica de reconhecimento do enxerto, enquanto para o tempo de 40 dias para os dois grupos, foi notado um processo mais organizado, limpo, isento de inflamação, menor quantidade de vasos sanguíneos e através da grade de Merz foi mensurado uma porcentagem de tecido ósseo para o grupo PST de 31,75% e para o grupo GRN de 66,25%.

O grupo GRN neste estudo proporcionou a formação de várias trabéculas no tempo de 40 dias, o que demonstra que esta apresentação possui alta condutividade, característica semelhante à do Biogran®, que induz a uma perfusão sanguínea adequada para a nutrição no seio maxilar<sup>46</sup>.

A escolha de um biomaterial é um fator crucial para a realização de regenerações ósseas. A HA e o BTCP são materiais que demonstram excelente biocompatibilidade e osteocondutividade. Contudo, a HA demonstra maior eficiência osteocondutora, mantendo assim o arcabouço estrutural do enxerto de forma mais duradoura, enquanto o BTCP é reabsorvido mais rapidamente, o que induz a formação de novos vasos sanguíneos promovendo nutrição capilar do composto enxertado. Portanto, a seleção de um desses biomateriais de forma isolada ainda é algo controverso<sup>25</sup>. Dessa forma, o biomaterial utilizado neste estudo (Osteosynt<sup>®</sup>) se diferencia de maneira positiva ao fazer a associação desses dois elementos<sup>26</sup>.

Durante os experimentos, foi observada uma problemática quanto à composição e fracionamento dos biomateriais. As apresentações grânulos e pasta escolhidas foram de 2g, porém, ao serem divididas pela quantidade de animais de cada grupo, foi notado que houve uma diferença discrepante relacionada ao volume a ser utilizado em cada animal. O mesmo peso de pasta (0,33g/animal) ao ser aplicado em cada coelho ocupava um volume inferior quando comparado ao volume dos grânulos. Isto pode ser explicado porque no grupo pasta as moléculas apresentavam maior proximidade em razão das características físicas inerentes ao composto, explicadas pelo alto poder de adsorção e reologia da matéria, enquanto no

grupo grânulos, as partículas exibiam um maior espaçamento entre elas, ocupando dessa forma um maior espaço<sup>18</sup>.

A técnica de “*sinus lift*” é bem fundamentada na literatura, e no que se refere à anatomia cirúrgica, sabe-se que após o descolamento da membrana sinusal, esta estrutura tende a retornar para sua posição original caso não seja instalado algum anteparo (implantes ou biomaterial) para proporcionar resistência estrutural contra o colapso da membrana durante a ação respiratória<sup>27,28,29</sup>. Foi utilizado um biomaterial neste estudo em dois veículos: pasta e grânulos, que apresentavam características semelhantes no tocante de composição química, porém, com estrutura física diferente. Foi notado durante a análise de reconstrução tridimensional a diminuição da altura obtida durante o descolamento no grupo pasta, caracterizando falta de resistência estrutural e importante colabamento da membrana sinusal sobre o biomaterial.

A proximidade à membrana sinusal pode estar relacionada à intensa diferenciação e promoção osteogênica<sup>30,31</sup>. Durante a comparação dos resultados da microtomográfica, foi visto diferença entre as análises de volume ósseo (BV). Sendo maior para grânulos do que para pasta. Isso pode ser explicado quando imaginamos que durante a mensuração do volume total por intermédio do polígono interpolizado as partículas de biomaterial do grupo GRN formaram uma estrutura firme e com

espaçamento entre os grânulos, o que facilitava a osteocondutividade e perfusão de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, contribuindo assim para a manutenção e maior quantificação do volume ósseo para esta modalidade.

Os materiais biocerâmicos podem ser classificados de acordo com seu comportamento e interação com o hospedeiro como bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. A hidroxiapatita, os biovidros e as vitrocerâmicas são exemplos de cerâmicas bioativas, tendo a capacidade de se relacionar com o tecido circundante, incitar à cura e o sistema tissular a responder fisiologicamente como se este fosse um tecido nativo do paciente. O fosfato tricálcico e o gesso são materiais classificados com bioreabsorvíveis, participando do processo metabólico e sofrendo ação química e biológica para substituição por células em crescimento<sup>32</sup>. O Osteosynt<sup>®</sup> é composto por HA e BTCP, conferindo assim, propriedades bioativas e bioreabsorvíveis.

Das várias apresentações existentes dos fosfatos de cálcio, destacam-se a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e o fosfato tricálcico de  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), dos quais as superfícies tem a característica de facilitar a adsorção de proteínas e de aumentar seu poder osteoindutivo. As configurações  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam as mesmas características osteocondutoras, porém a fase alfa apresenta maior bioatividade em função de seu arranjo estrutural possibilitar maior troca iônica com o meio biológico<sup>33</sup>. No

presente estudo foi utilizado o composto de hidroxiapatita e o fosfato tricálcico de polimorfia  $\beta$ .

A ampla gama de aplicações dos fosfatos de cálcio em reconstruções crânio-maxilo-faciais e em tratamentos de defeitos ósseos se justifica pela elevada similaridade química e estrutural com a apatita biológica<sup>34</sup>. Substância presente em grande quantidade na fase mineral de ossos e dentes, sendo encontrada ainda em cálculos urinários e dentários. Apresentando excelente biocompatibilidade e comportamento bioativo, possibilitando grande eficácia em osseointegração e osteocondução.

A HA além de ser um dos principais componentes minerais do corpo humano, apresenta como vantagens a rápida adaptação óssea, inviabiliza o crescimento de tecido fibroso oportunista, o que diminui o tempo de cicatrização<sup>35</sup>. Na apresentação de HA + BTPC foi notado durante o procedimento cirúrgico a facilidade de aplicação, adaptação e superfície de contato aumentada para o grupo pasta.

Uma característica limitante da HA é a sua lenta degradação, fragmentos remanescentes do mineral podem ser notados no leito operado em até dez anos de pós-operatório. Este comportamento pode estar atrelado à alta razão molar de íons de cálcio aos íons fósforo, tornando-o quase insolúvel em meios neutros, em contrapartida, o BTCP não são estáveis na presença de umidade, e, dependendo da sua porosidade, cristalinidade,

pureza química e rugosidade superficial do biomaterial, são reabsorvidos entre 6 e 15 semanas após sua implantação<sup>36</sup>. Assim, o emprego do BTCP somado à HA tem sido uma saída viável para acelerar a metaplasia da HA. Dessa forma, a velocidade de dissolução do composto HA + BTCP é controlado pela quantidade de BTCP. Para ambos os veículos, o Osteosynt<sup>®</sup> utilizado nesta pesquisa apresentava a proporção de 60% de HA e 40% de BTCP, sendo esta a apresentação intermediária, conferindo média estabilidade e média reabsorção, classificados ainda como biocerâmica bioativa de 3<sup>a</sup> geração, bifásica, micro-macro porosa segundo o fabricante<sup>26</sup>.

Pesquisadores avaliaram através de microtomografias as calotas de 12 coelhos reconstruídas para definir o tamanho da partícula ideal de biomaterial, sendo as menores de 150 a 400  $\mu\text{m}$ , as maiores de 1.0 to 2.0 mm e uma mistura de ambos. Concluíram que o grupo das maiores partículas proporcionaram melhor preservação de BV e altura óssea<sup>37</sup>. As partículas utilizadas no composto Osteosynt<sup>®</sup> tinham tamanhos aproximados ao do estudo desenvolvido por Kon e colaboradores, variando de 20 a 40 mesh ou 841 a 420  $\mu\text{m}$ .

Para se obter uma pasta ideal, o composto de HA + BTCP deverá respeitar parâmetros de suspensão de carga de alto teor de sólidos com viscosidade plástica. Estes processamentos de pós cerâmicos requerem

ainda o controle de homogeneidade, reologia e dispersão das suspensões<sup>18,38,39</sup>. Permitindo assim, sua utilização instantânea na consistência coloidal através de um aplicador de forma cômoda, não sendo necessário a manipulação ou hidratação das partículas.

A biologia da formação óssea está intimamente relacionada com a interação entre a angiogênese e indução da migração celular para o interior do arcabouço criado com o biomaterial escolhido. Os resultados reconstitutivos satisfatórios acontecem quando o biomaterial apresenta perfusão de vasos sanguíneos nutrindo toda a estrutura, proteção do meio bucal através de membranas e suturas adequadas, ausência de função mecânica e higiene adequada para evitar contaminações<sup>40,41</sup>. Estes aspectos quando obedecidos e somados ainda à viabilidade e integridade do leito receptor conduzem o operador ao sucesso.

Foram utilizadas as proteínas OC e TRAP para análise do processo reparatório. Desta forma, foi possível identificar marcações de moderada à intensa para OC no período de 7 dias para GRN e PST enquanto, para tempo experimental 40 dias foi observado marcações de moderada à intensa para PST e de leve à moderada para GRN. Já para TRAP foi possível identificar as imunomarcações apenas para o grupo 40 dias, evidenciando valores de moderado à intenso para PST e leve à moderado

para GRN. Evidenciando atividade plena no grupo PST e final de maturação óssea para o grupo GRN.

## **CONCLUSÃO**



## **Conclusão**

Ambos os biomateriais estudados demonstraram excelente osteocondutividade, boa organização tecidual e ausência de processo inflamatório crônico no período tardio.

O grupo formulação grânulos proporcionou maior volume ósseo depositado enquanto a formulação pasta sinaliza que o processo de deposição óssea ainda permanece ativo.

## Referências:

1. Mazock JB, Schow SR, Triplett RG. Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Jul-Aug;19(4):586-93.
2. Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res*. 2011 Dec;90(12):1428-33. doi: 10.1177/0022034511422718. Epub 2011 Sep 21.
3. Miron RJ, Sculean A, Shuang Y, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Chandad F, Zhang Y. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jun;27(6):668-75. doi: 10.1111/clr.12647. Epub 2015 Jul 30.
4. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol*. 2014 Summer;7 Suppl 2:S219-34.
5. 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 Jun;24(6):635-44. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02438.x. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22530746
6. Lambert F, Bacevic M, Layrolle P, Schüpbach P, Drion P, Rompen E. Impact of biomaterial microtopography on bone regeneration:

- comparison of three hydroxyapatites. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Oct 22. doi: 10.1111/clr.12986. [Epub ahead of print]
7. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01565.x.
  8. Trubiani O, Fulle S, Traini T, Paludi M, la Rovere R, Orciani M, Caputi S, Piattelli A. Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *Eur Cell Mater.* 2010 Jul 21;20:72-83.
  9. 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.
  10. Pereira RS, Gorla LF, Boos FBJD, Okamoto R, Garcia Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: histomorphometric study and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Apr;46(4):503-510. doi: 10.1016/j.ijom.2017.01.002. Epub 2017 Feb 6.
  11. Huber FX, Berger I, McArthur N, Huber C, Kock HP, Hillmeier J, Meeder PJ. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jan;19(1):33-8. Epub 2007 Jun 14.
  12. Komaki H, Tanaka T, Chazono M, Kikuchi T. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of beta-tricalcium

- phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(29):5118-26.
13. Goiato MC, dos Santos DM, Santiago Jr JF, Moreno A, Pellizzer EP. Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43: 1108–16.
  14. Lemos CA, Mello CC, dos Santos DM, Verri FR, Goiato MC, Pellizzer EP. Effects of platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Apr;45(4):517-25. doi: 10.1016/j.ijom.2015.07.012. Epub 2016 Jan 6.
  15. Suba Z, Takács D, Matusovits D, Barabás J, Fazekas A, Szabó G. Maxillary sinus floor grafting with beta-tricalcium phosphate in humans: density and microarchitecture of the newly formed bone. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Feb;17(1):102-8.
  16. Dasmah A, Thor A, Ekestubbe A, Sennerby L, Rasmusson L. Marginal bone-level alterations at implants installed in block versus particulate onlay bone grafts mixed with platelet-rich plasma in atrophic maxilla. A prospective 5-year follow-up study of 15 patients. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013;15:7–14.
  17. Glösel B, Kuchler U, Watzek G & Gruber R (2010). Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 25(3):516-24.
  18. Bao Y, Senos AM, Almeida M, Gauckler LJ. Rheological behavior of aqueous suspensions of hydroxyapatite (HAP). *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Jul;13(7):639-43.
  19. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.

20. Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: a meta-analysis of the total bone volume. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Jun;16(3):295-303. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0558.
21. John HD, Wenz B. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004 Mar-Apr;19(2):199-207..
22. Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res.* 2011 May;22(5):538-45. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02069.x. Epub 2010 Dec 28.
23. Cosso MG, de Brito RB Jr, Piattelli A, Shibli JA, Zenóbio EG. Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomographic study. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Nov;25(11):1251-6. doi: 10.1111/clr.12261. Epub 2013 Sep 15.
24. Scala A, Botticelli D, Faeda RS, Garcia Rangel I Jr, Américo de Oliveira J, Lang NP. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: an experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Feb;23(2):175-81. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02227.x. Epub 2011 Jun 13.
25. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite versus  $\beta$ -tricalcium phosphate in sinus augmentation. A comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol.* 2012 May 22. [Epub ahead of print].

26. EINCOBIO - HOME PAGE OSTEOSYNT, Descrição da biocerâmica fosfocálcica bifásica micro-macroporosa de  $\beta$ -TCP/HA. Disponível em: <http://www.eincobio.com.br>. Acesso em: 11 dez 2017.
27. Asai S, Shimizu Y, Ooya K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Aug;13(4):405-9.
28. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Feb;15(1):126-33.
29. De Santis E, Lang NP, Ferreira S, Rangel Garcia I Jr, Caneva M, Botticelli D. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2017 May;28(5):503-511.
30. Lundgren S, Andersson S, Sennerby L. Spontaneous bone formation in the maxillary sinus after removal of a cyst: coincidence or consequence? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5(2):78-81.
31. Bassi AP, Pioto R, Faverani LP, Canestraro D, Fontão FG. Maxillary sinus lift without grafting, and simultaneous implant placement: a prospective clinical study with a 51-month follow-up. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Jul;44(7):902-7. doi: 10.1016/j.ijom.2015.03.016. Epub 2015 Apr 18.
32. Hench, L. L.; Best, S. M.; Em Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine. Ratner, B. D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., eds.; Academic Press: Oxford, 2013, cap. I.2.4. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles

33. Pires A.N.R., Bierhalz A.C.K. e Moraes A.M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 7, 957-971, 2015
34. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(7):1465-85. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.050. Epub 2009 Dec 7..
35. Aparecida, A. H.; Fook, M. V. L.; Santos, M. L.; Guastaldi, A. C.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 892.
36. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2757-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. REF OSTEOSYNT,
37. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Kasugai S. The effect of graft bone particle size on bone augmentation in a rabbit cranial vertical augmentation model: a microcomputed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Mar-Apr;29(2):402-6. doi: 10.11607/jomi.2804.
38. Schlickewei CW, Laaff G, Andresen A, Klatte TO, Rueger JM, Epple JRM, Lehmann W. Bone augmentation using a new injectable bone graft substitute by combining calcium phosphate and bisphosphonate as composite—an animal model. *J Orthop Surg Res*. 2015; 10: 116. Published online 2015 Jul 25. doi: 10.1186/s13018-015-0263-z PMCID: PMC4513618
39. Mendes LS, Saska S, Coelho F, Capote TSO, Scarel-Caminaga RM, Marquetto R, Carrodeguas RG, Gaspar AMM, Rodríguez MA. Injectable  $\beta$ -TCP/MCPM cement associated with mesoporous silica for bone regeneration: characterization and toxicity evaluation.

- Biomed Mater. 2017 Oct 3. doi: 10.1088/1748-605X/aa9085. [Epub ahead of print]
40. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:109-17. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.006. Epub 2014 Jul 14.
  41. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011 Jun;42(6):556-61. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035. Epub 2011 Apr 12.
  42. Rickert D, Vissink A, Slot WJ, Sauerbier S, Meijer HJ, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation surgery with BioOss(R) mixed with a bone marrow concentrate or autogenous bone: test of principle on implant survival and clinical performance. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43:243–7.
  43. Kerschner JE, Cruz MJ, Beste DJ, Donahue KM, Kehl KS. Computed tomography vs. magnetic resonance imaging of acute bacterial sinusitis: a rabbit model. *Am J Otolaryngol*. 2000 Sep-Oct;21(5):298-305.
  44. Ozcan KM, Ozcan I, Selcuk A, Akdogan O, Gurgun SG, Deren T, Koparal S, Ozogul C, Dere H. Comparison of Histopathological and CT Findings in Experimental Rabbit Sinusitis. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Jan;63(1):56-9. doi: 10.1007/s12070-011-0120-2. Epub 2011 Jan 18.
  45. Pereira RDS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017 Oct; 19(5):867-875.



46.(Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior, IR, Hochuli Viera E. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66:1233-1240.)

## TABELAS

	<b>PST(OC)</b>	<b>GRN(OC)</b>	<b>PST(TRAP)</b>	<b>GRN(TRAP)</b>
<b>7 DIAS</b>	2-3	2-3	-	-
<b>40 DIAS</b>	2-3	1-2	2-3	1-2

Tabela 1 – Escores de imunoistoquímica

# GRÁFICOS

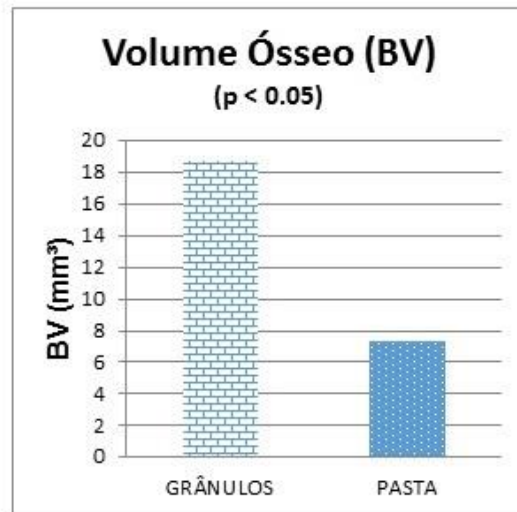


Gráfico 1 – Parâmetro de Volume Ósseo de Micro-CT

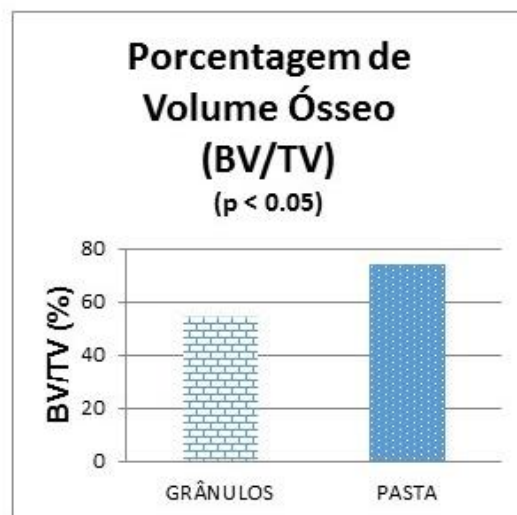


Gráfico 2 – Parâmetro de Porcentagem de Volume Ósseo de Micro-CT

## GRÁFICOS

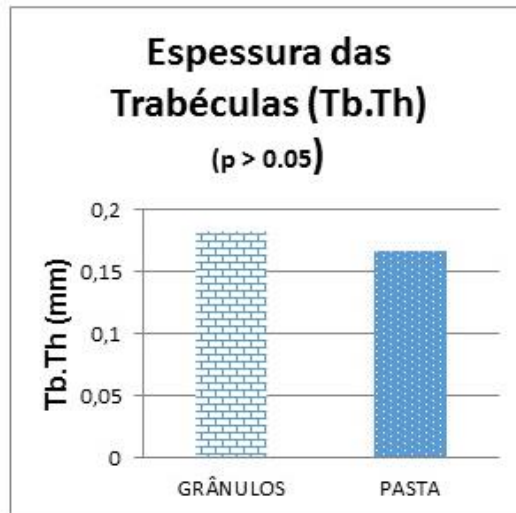


Gráfico 3 – Parâmetro de Espessura das Trabéculas de Micro-CT

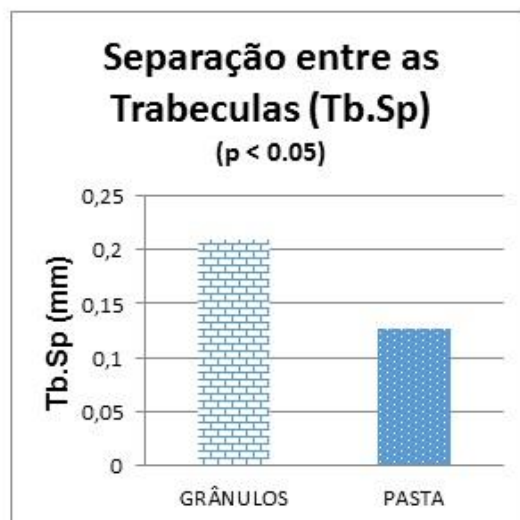


Gráfico 4 – Parâmetro de Separação entre as Trabéculas de Micro-CT

# GRÁFICOS

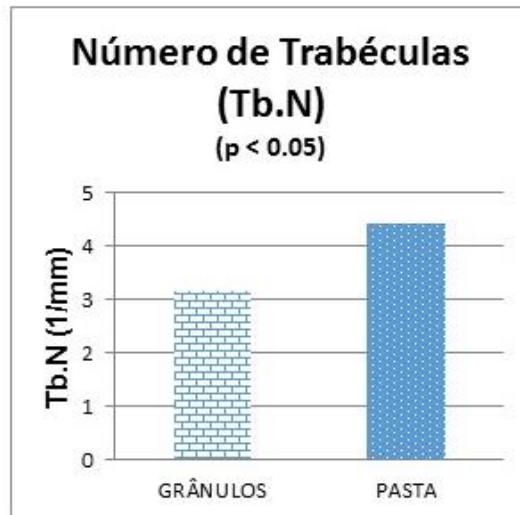


Gráfico 5 – Parâmetro de Número de Trabéculas de Micro-CT

## FIGURAS

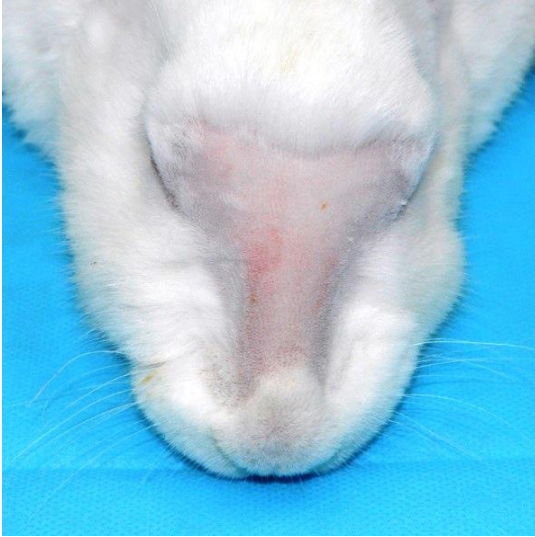


Figura 1 - Tricotomia



Figura 2 - Degermação



Figura 3 - Infiltração de anestésico

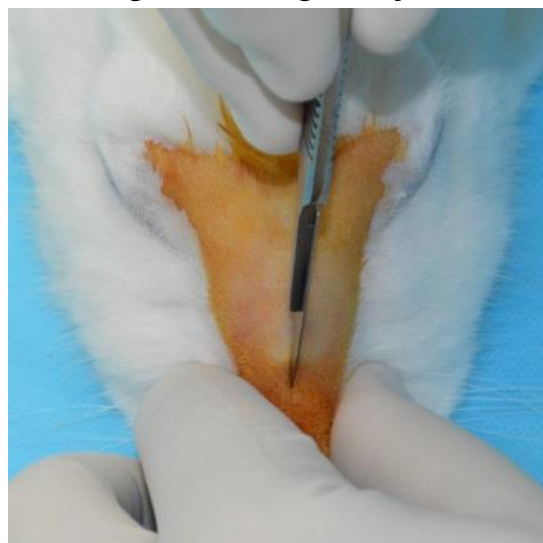


Figura 4 - Início de incisão

## FIGURAS



Figura 5 - Finalização de incisão

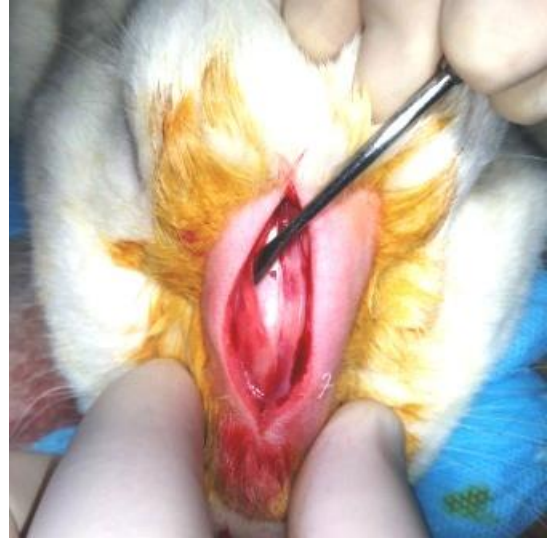


Figura 6 - Descolamento periosteal

## FIGURAS

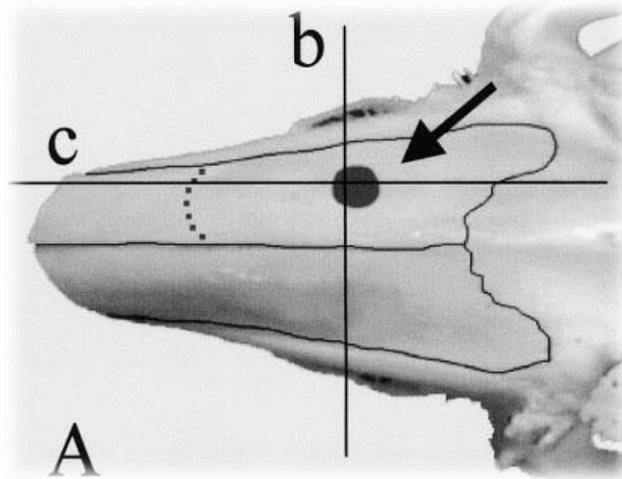


Figura 7 – Orientação de demarcação com trefina de 5mm

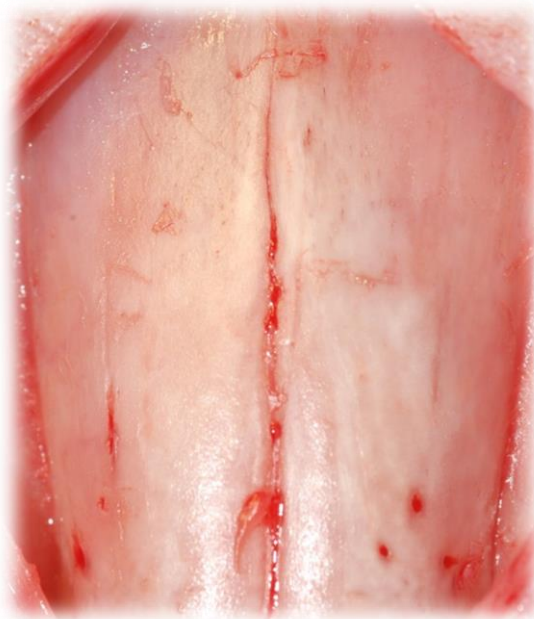


Figura 8 – Região de linha média maxilar



## FIGURAS

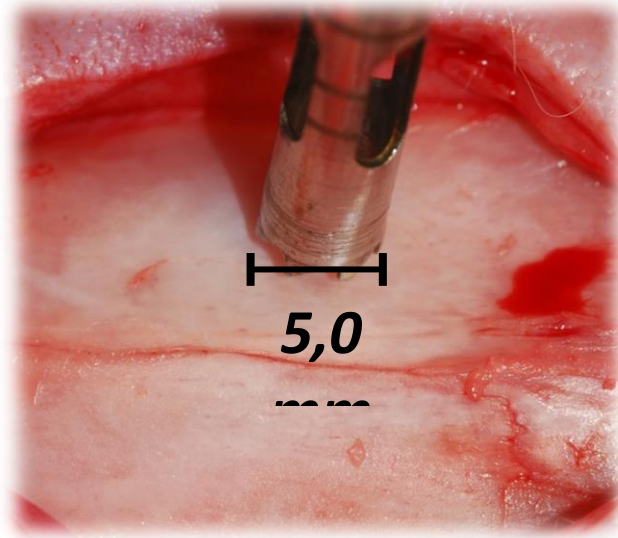


Figura 9 – Trefina em posição

## FIGURAS



Figura 10 – Demarcação de acesso



Figura 11 – Início de desgaste



Figura 12 – Exposição do seio



Figura 13 – Membrana sinusal

## FIGURAS



Figura 14 – Grupo GRN



Figura 15 – Grupo PST



Figura 16 – Sutura por planos

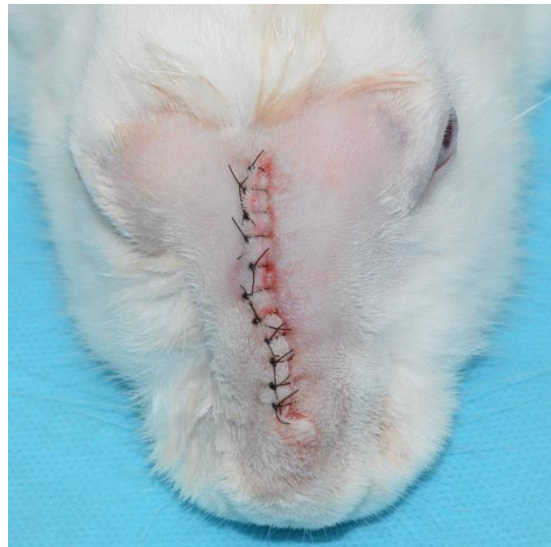


Figura 17 – Sutura em pele

# FIGURAS

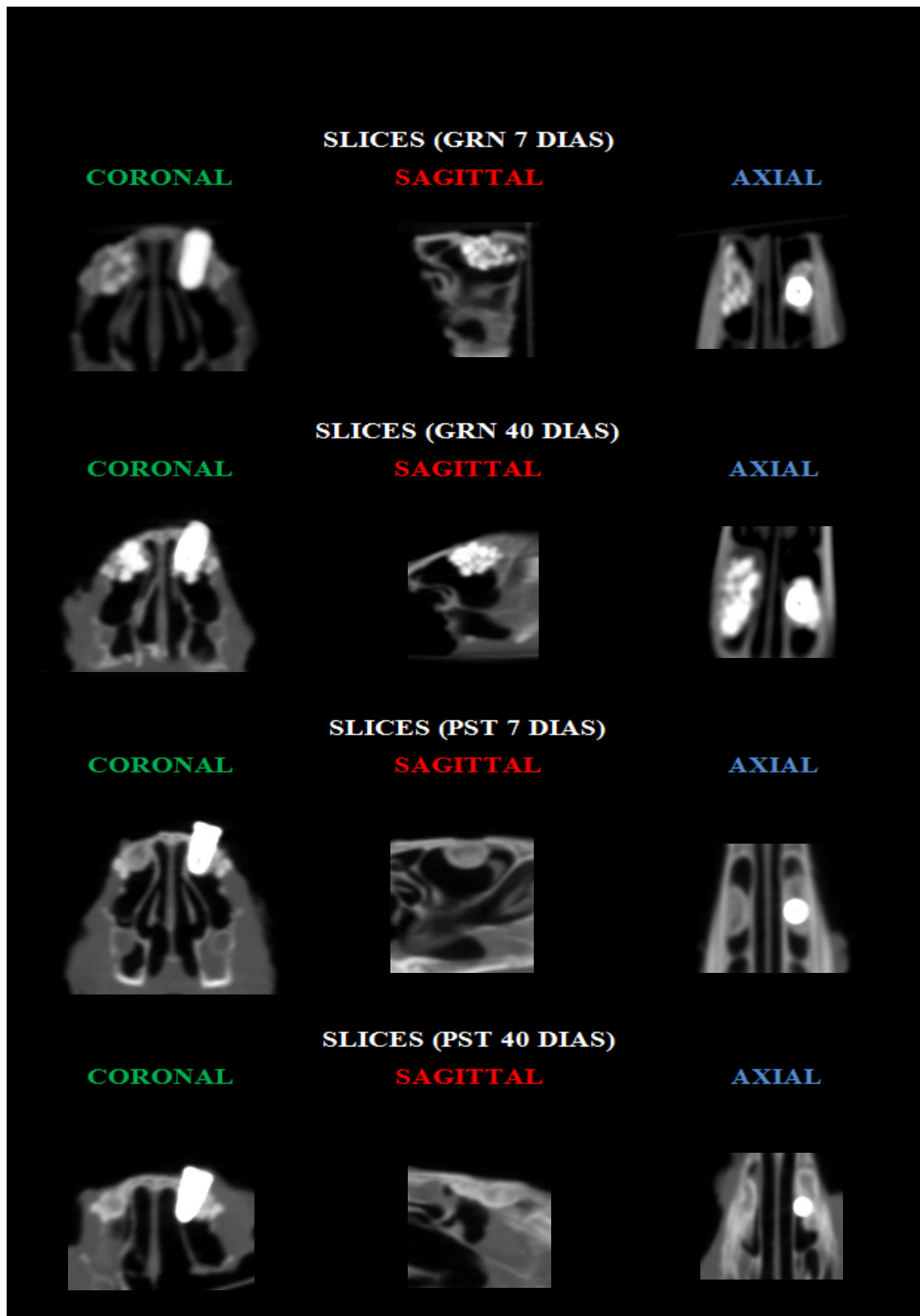


Figura 18 – Slices coronais, sagitais e axiais de uma amostra GRN (superior) e PST (inferior) tempo 40 dias

# FIGURAS



Figura 19 – Slices coronais de todos os tempos e grupos

## FIGURAS

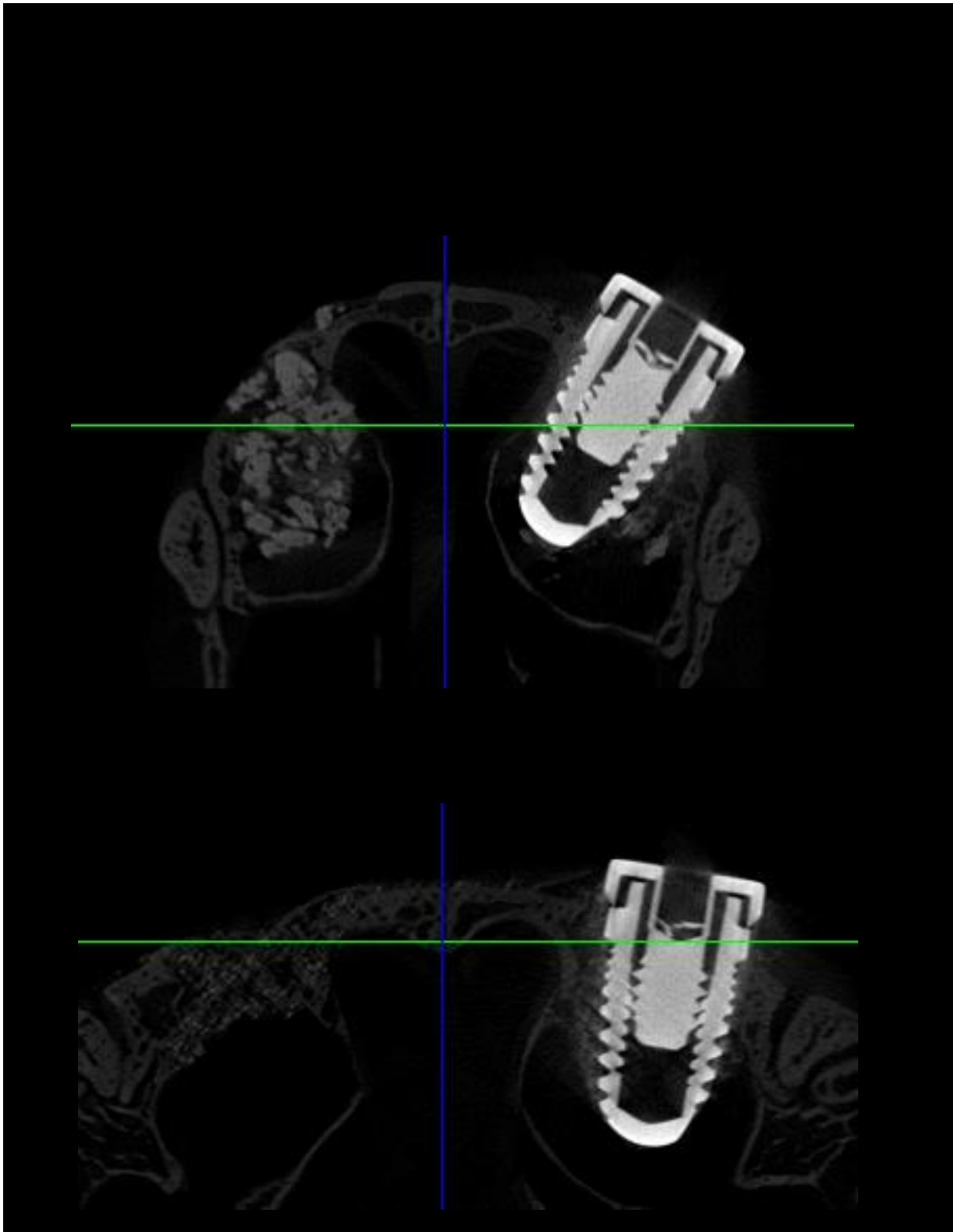


Figura 20 – Orientação no Software Data Viewer dos grupos GRN e PST  
40 dias

## FIGURAS

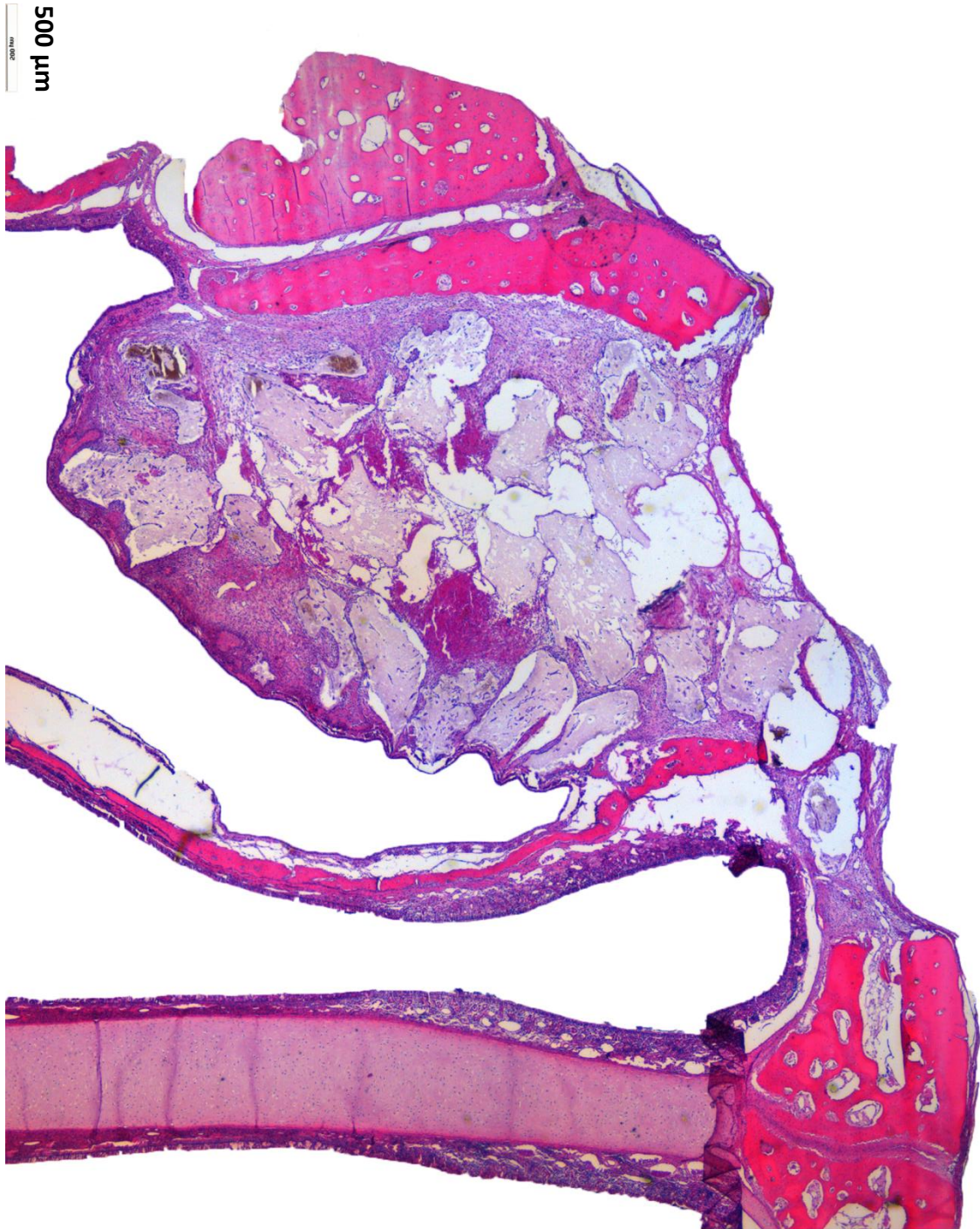


Figura 21 – Reconstrução com Software CTvox do grupo GRN 40 dias



Figura 22 – Reconstrução com Software CTvox do grupo PST 40 dias

## FIGURAS (HISTOLOGICO)

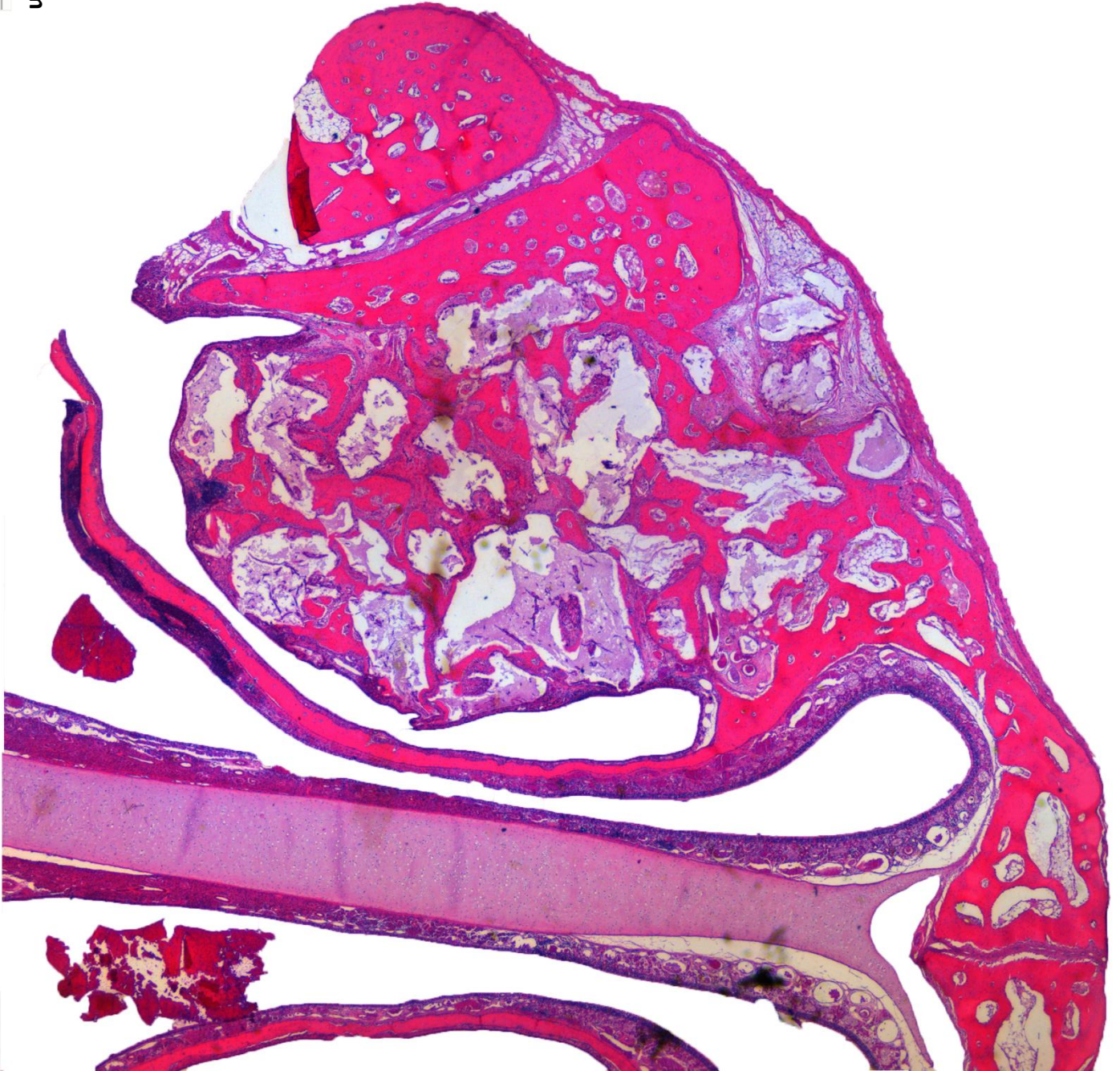


**Figura 23: Grupo GRN 7 dias – coloração hematoxilina e eosina  
(Imagem panorâmica obtida com objetiva 2.5 x 0.07)**



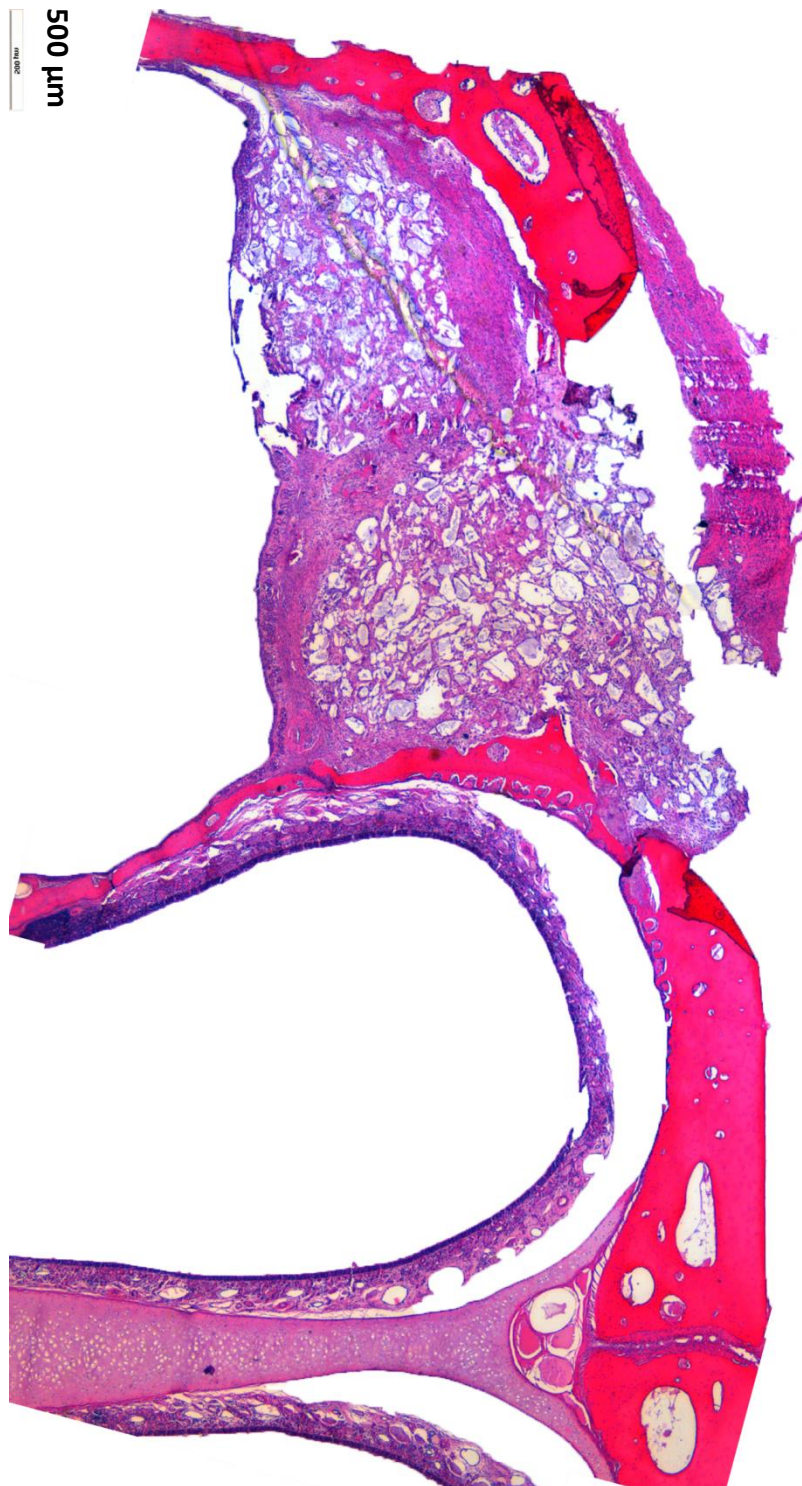
## FIGURAS (HISTOLOGICO)

500 µm



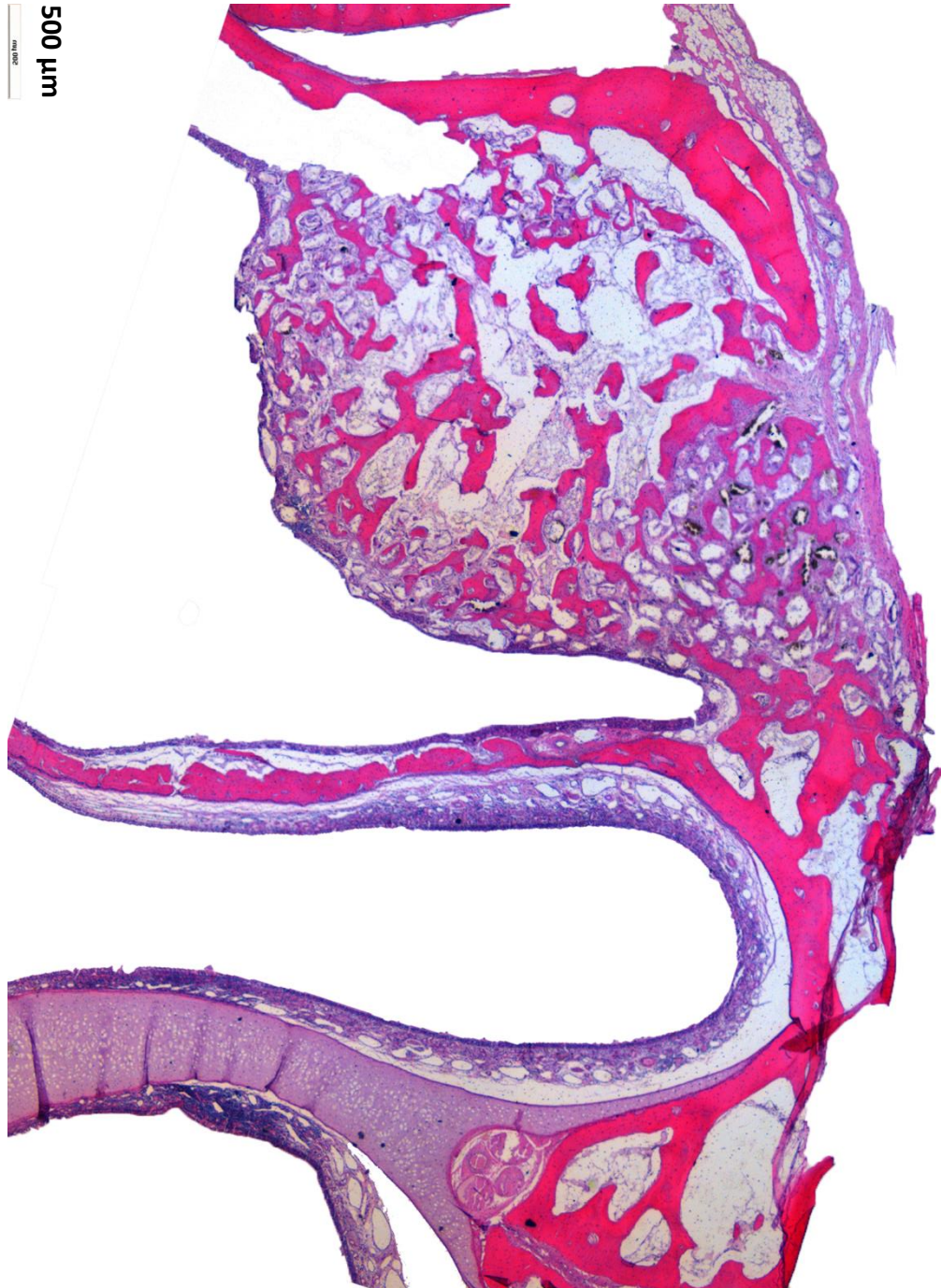
**Firuga 24: Grupo GRN 40 dias – coloração hematoxilina e eosina  
(Imagem panorâmica obtida com objetiva 2.5 x 0.07)**

## FIGURAS (HISTOLOGICO)



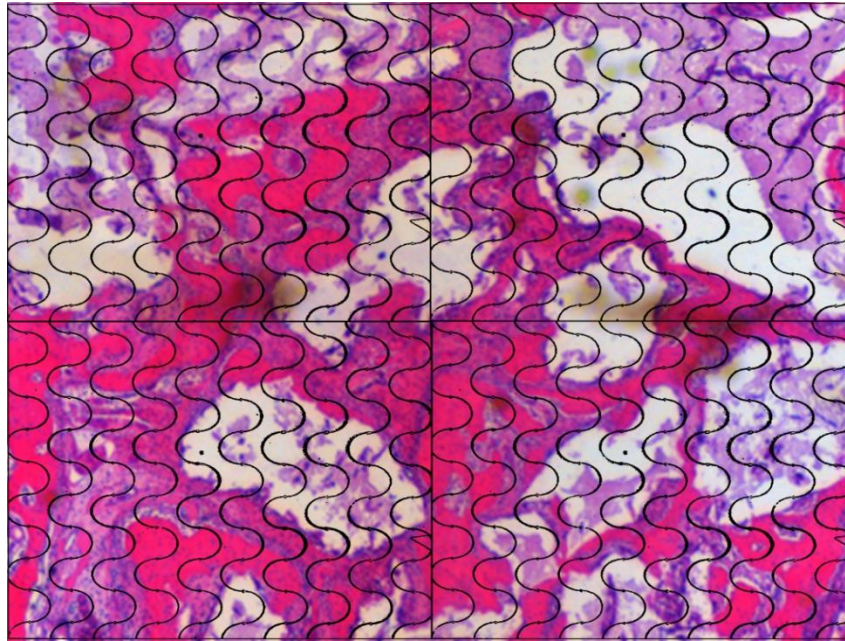
**Figura 25: Grupo PST 7 dias – coloração hematoxilina e eosina  
(Imagem panorâmica obtida com objetiva 2.5 x 0.07)**

## FIGURAS (HISTOLOGICO)

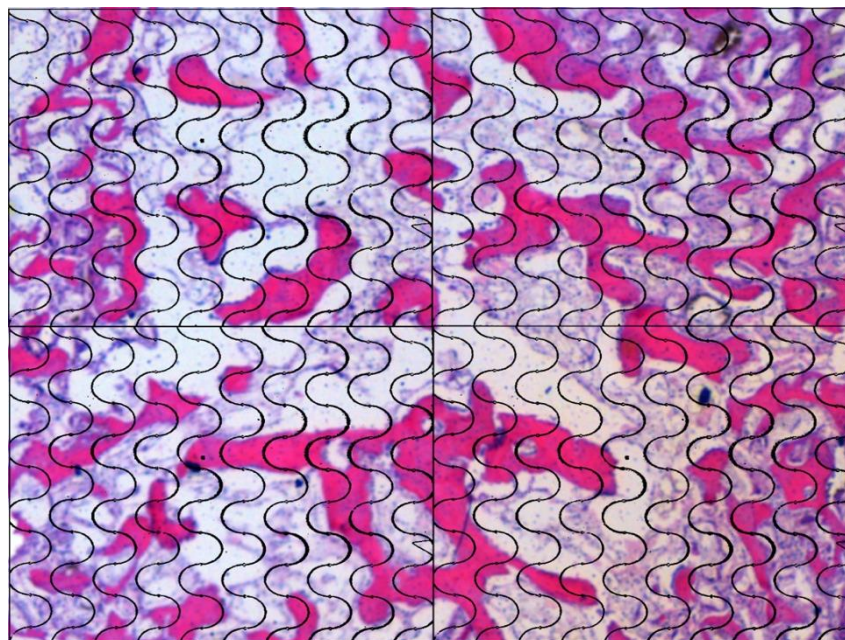


**Figura 26: Grupo PST 40 dias – coloração hematoxilina e eosina  
(Imagem panorâmica obtida com objetiva 2.5 x 0.07)**

## FIGURAS (HISTOMORFOMÉTRICO)

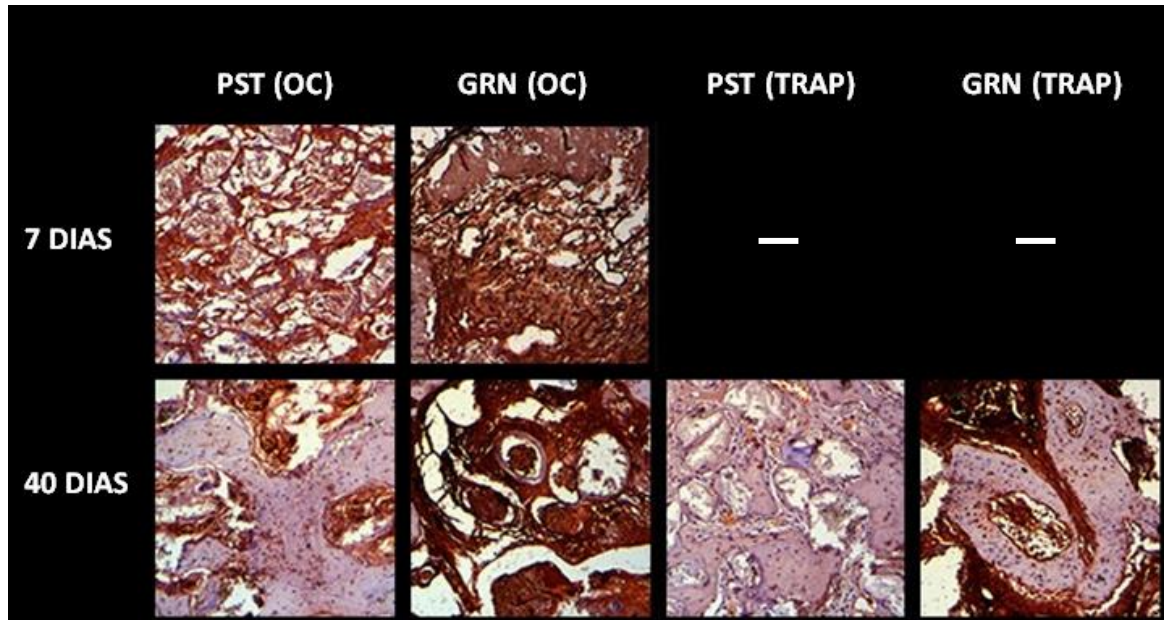


**Imagem 27: Grade de Merz para quantificação tecidual em grupo GRN 40 dias utilizando lente objetiva de 2.5X0.07**



**Imagem 28: Grade de Merz para quantificação tecidual em grupo PST 40 dias utilizando lente objetiva de 2.5X0.07**

## FIGURAS (IMUNOISTOQUÍMICA)



**Figura 29:** Imagens de imunoistoquímica dos biomateriais em reparação no período de 7 e 40 dias em aumento de 10x

# ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"** 

CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricalcício fosfato em grânulos e pasta com implantes dentários: análise tomográfica, microtomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica"**, Processo FOA nº 00506-2016, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Janeiro de 2018.

<b>VALIDADE DESTE CERTIFICADO:</b> 20 de Dezembro de 2018.
<b>DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:</b> até 20 de Janeiro de 2019.

**CERTIFICATE**

We certify that the study entitled **"Bone regeneration after maxillary sinus augmentation in rabbits with granules and paste of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate with dental implants: tomographic, micro tomographic, histomorphometric and immunohistochemistry analysis"**, Protocol FOA nº 00506-2016, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on January 15, 2018.

<b>VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:</b> December 20, 2018.
<b>DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:</b> January 20, 2019.

  
**Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

---

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (16) 3636-3234      E-mail CEUA: ceua@foa.unesp.br

## **ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO: THE INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS**

GUIDELINES FOR AUTHORS MANUSCRIPT SUBMISSION Submit manuscripts via JOMI's online submission service: [www.manuscriptmanager.com/jomi](http://www.manuscriptmanager.com/jomi) Manuscripts should be uploaded as a Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. No paper version is required.

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See <http://www.icmje.org>
- Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.
- Title page. Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- Abstract/key words. The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts



for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.

- Article text. Currently there is no article page limit (within reason).
- Acknowledgments. Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- Legends. Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- Tables. Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- Abbreviations. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- Trade names. Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.

- Numbers. Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

## REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
- Avoid using abstracts as references.
- Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style: 1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525–531.

Book reference style: 1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications*

in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Chicago: Quintessence, 1999:269–286

#### ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to:

Managing Editor JOMI Quintessence Publishing Co, Inc 4350 Chandler Drive Hanover Park, IL 60133 Email: [jomi.submit@quintbook.com](mailto:jomi.submit@quintbook.com)

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

#### DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)

- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

#### MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at [www.quintpub.com](http://www.quintpub.com)) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

#### PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

#### REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.