

Estudo experimental do uso do vidro bioativo com implantes imediatos em cirurgia para levantamento da membrana sinusal. Análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica

**Araçatuba – SP
2019**



Lara Cristina Cunha Cervantes

Estudo experimental do uso do vidro bioativo com implantes imediatos em cirurgia para levantamento da membrana sinusal. Análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do título de e “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Junior

**Araçatuba – SP
2019**



Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C419e Cervantes, Lara Cristina Cunha.
Estudo experimental do uso do vidro bioativo com implantes imediatos em cirurgia para levantamento da membrana sinusal : análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica / Lara Cristina Cunha Cervantes. – Araçatuba, 2019
70 f. : il. ; tab.

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

1. Seio maxilar 2. Coelhos 3. Implantes experimentais
4. Substitutos ósseos I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedicatória

*Aos meus pais, **Sandra Mara Cunha Cervantes e Pedro Cesar Cervantes**, por serem meus exemplos de vida. Vocês são responsáveis por cada uma das minhas conquistas, me apoiam em cada decisão, mesmo que fiquem com o coração apertado pela maioria delas não serem nada fáceis. Tenho certeza que a felicidade de vocês por eu chegar até aqui é como se vocês mesmos tivessem trilhado esse caminho, e de certa forma, trilharam. Eu agradeço por terem me criado dessa forma, por terem me ensinado princípios, a ter ética, moral e seguir meu caminho independente dos tropeços, que são inevitáveis. Agradeço a todo amor, carinho e confiança depositados em mim durante todos esses anos, vocês são as pessoas mais importantes que Deus colocou na minha vida, que fazem meus dias serem mais alegres e eu ter mais vontade de seguir em frente todos os dias.*

*À minha irmã, **Ana Elisa Cunha Cervantes**, minha metade, obrigada por estar ao meu lado sempre, por torcer pela minha vitória, me animar. A pessoa que me protege de tudo, me faz rir, parceira de dança desde pequena, que batalha muito pra conseguir o que quer, não desiste de viver a vida da forma mais plena. Eu só tenho a agradecer por ser uma inspiração pra mim, por compartilhar comigo sua vida e suas conquistas, por ser minha amiga, minha exímia irmã mais velha. E agradeço, por há 2 anos me dar o presente mais lindo que eu poderia receber, um afilhado.*

*Ao meu irmão, **Cesar Augusto Cunha Cervantes**, meu “brankinho”, que me ensinou a apanhar da vida desde pequena, que me protege, me ensina a ser uma profissional melhor. Ele que me instigou a ser mestre e me disse “você é capaz de mais do que apenas atender”. Frase essa que fez com que me enxergasse de outra forma e que me transformou em tudo que eu sou. Ele é meu exemplo de profissional, de pessoa, que me ensinou a gostar de música boa. Você é o irmão que eu não escolhi, mas que escolheria em todas as oportunidades. Obrigada por ser meu protetor, meu amigo, meu professor e comemorar comigo todas as minhas conquistas.*

*Aos meus avós, **Zenaide Almeida Cervantes e Francisco Assis Cervantes**, por fazerem parte da minha criação e me apoiarem sempre. Por comemorarem comigo todas as minhas conquistas. Obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor, me dedicar aos estudos, ao trabalho, e ser uma pessoa de bem. Essa conquista também é de vocês.*

*Aos meus avós, **Nair Marani Cunha e Benedito Cunha (in memorian)**, por fazerem parte da minha criação e me apoiarem sempre. Por comemorarem comigo todas as minhas conquistas. Obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor, me dedicar aos estudos, ao trabalho, e ser uma pessoa de bem. É com uma saudade imensa que eu agradeço por vocês terem sido exemplos de pessoas batalhadoras e por Deus ter colocado vocês na minha vida. Vocês estarão sempre nas minhas orações, e sei que mesmo não estando aqui, vocês estão felizes por mim nesse dia e estarão comigo, no meu coração.*

*Ao meu afilhado **Benício Cervantes Bido**, que há 2 anos é meu amor maior, que nasceu junto com o mestrado, meu motivo de felicidade, meu presente mais lindo. Obrigada por ser um ser tão pequenino e que me ensina tanto, obrigada por ser o rostinho que eu lembro pra ficar feliz, por ter a risada mais gostosa, por ser um príncipe. Você me ajuda todos os dias a ser uma pessoa melhor. Dinda te ama!*

Amo muito vocês.

Agradecimentos
Especiais

Agradecimentos Especiais

Agradeço a Deus por me proporcionar essa oportunidade, por ser minha fortaleza e meu guia. O que tornou possível a realização de mais um sonho.

*Ao meu orientador **Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Júnior**. O senhor é a pessoa que mais representa a essência de um professor, apenas de assistir uma aula, ou um atendimento é possível absorver muito além do que conteúdo, e aprender a ser um ser humano. Obrigada por me aceitar como paciente, e tornar possível um tratamento que mudou a minha qualidade de vida. Obrigada por ser um exemplo e aceitar ser meu orientador, por acreditar no meu potencial, por estar lá sempre que eu precisei. O carinho, a admiração e a gratidão que eu tenho são dignos de tudo que o senhor já fez por mim até hoje.*

*Ao **Professor Francisley Ávila Souza**, que sempre acolhedor, nos ensina a sermos profissionais e pessoas melhores. Obrigada professor por proporcionar aos alunos da pós-graduação qualidade de ensino junto aos professores da disciplina, por ser um modelo de profissional, com ética. Obrigada por oferecer além de conteúdo, sua amizade. Tenho muita admiração pelo seu trabalho e pela pessoa que é. Agradeço também por aceitar compor a minha banca da dissertação, e contribuir com este trabalho tão importante.*

*Ao **Professor André Luis da Silva Fabris**, que sempre nos ensina muito com sabedoria e humildade. Obrigada por manter uma relação de amizade, companheirismo e respeito conosco, alunos da faculdade de Araçatuba. Agradeço por aceitar compor a minha banca da dissertação, é uma honra tê-lo como avaliador e sei que contribuirá muito com o trabalho.*

*Ao **Professor Leonardo Perez Faverani**, que sempre se mostrou presente e solícito a todos os alunos. Obrigada Leo, por ser essa pessoa maravilhosa, que é um exemplo pra todos nós, que sempre está disponível para ajudar. Obrigada pela preocupação, pelo carinho, pela atenção, por ser parte dessa história. Você com certeza foi fundamental para meu crescimento dentro da universidade, desde a graduação, até o mestrado. Tenho uma admiração enorme por todo o seu trabalho e pela pessoa que é.*

*À **Professora Ana Paula Farnezzini Bassi**, que é uma pessoa que deixa admiração por onde passa. Professora, obrigada por toda a ajuda de sempre, pelos ensinamentos, por ter esse coração enorme. Você é uma mãe pra todos nós da pós-graduação. Obrigada por ser um modelo de profissional, por ser mulher, e mostrar que somos capazes. A senhora tem toda a minha admiração e carinho.*

*À minha tia **Neide Cunha**, que sempre me estimulou a ser uma pessoa de fibra, me deu força para estudar, foi acima de tudo um exemplo a ser seguido. Obrigada tia, por fazer parte da minha vida, por estar presente mesmo longe, cuidar de mim, por tornar muitos dos meus sonhos realidade. Sem você eu não teria chegado até aqui, essa conquista também é sua!*

*À minha amiga **Thais Yumi Umeda Suzuki**, por ser amiga, professora, um presente que Deus colocou na minha vida. Sempre me apoiando, me respeitando, sendo sincera comigo, e fazendo tudo que estivesse ao seu alcance pra me ajudar a qualquer momento, mesmo longe, mesmo durante dificuldades. Você é muito especial pra mim Tha, saiba que o carinho, a admiração, o respeito e a amizade são recíprocos. Você é um pouco dessa conquista. Obrigada por ser tão especial.*

*À minha amiga **Luara Teixeira Colombo**, que faz parte da minha vida desde a graduação, que dividiu comigo a experiência da iniciação científica e me deu o prazer de seguir o mesmo caminho do mestrado até agora. Obrigada por todo o companheirismo, apoio, pelos momentos bons e os ruins que passamos juntas, por ser minha dupla sertaneja e por aguentar esses comentários milhões de vezes. Sua amizade vai ser sempre muito especial pra mim, e eu desejo que você trilhe tudo que sempre sonhou. Estarei do seu lado sempre, assim como você sempre está do meu. Obrigada por se tornar uma irmã.*

*À minha amiga **Raquel Barroso Parra**, obrigada pela sua amizade de pouco tempo, mas que significa tanto pra mim. Você é uma pessoa incrível, que me ensina muito, que esconde o jogo, mas eu sei o quanto você é profissional, responsável, capaz de realizar coisas incríveis. Por isso estamos aqui. Vou estar sempre do seu lado, obrigada por me acompanhar e me ajudar tanto nesse período, por se tornar uma irmã.*

*À minha amiga **Thamiris Miranda**, que antes de tudo é minha cunhada. Obrigada por ser uma pessoa maravilhosa, que sempre acredita em mim, na minha capacidade, que comemora minhas conquistas junto comigo e que se tornou uma amiga, uma pessoa da família. Você é uma pessoa abençoada, de luz, um exemplo. Saiba que sempre estarei aqui pra você. Obrigada por fazer parte da minha vida e compartilhar momentos tão importantes.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante todo o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro necessário que viabilizou a realização deste sonho.*

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por ser a instituição de ensino responsável por proporcionar minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, em especial aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e orientadores da pós-graduação, Profa. Ass. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Profa. Ass. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Ass. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza, Profa. Ass. Dra. Ana Paula Farneszi Bassi, Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani, Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho, Profa. Adj. Roberta Okamoto, Profa. Adj. Mariza Akemi Matsumoto, Prof. Dr. Eduardo Hochuli Vieira. Obrigada por proporcionarem um ensino de qualidade, sendo exemplos de profissionais e pessoas. Por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo respeito, confiança.

Às funcionárias Michele, Franciane, Camila e Héliide, que sempre me acompanharam durante essa jornada e sabem das dificuldades e dos percalços. Obrigada por toda a ajuda, por serem amigas, por fazerem coisas impossíveis se tornarem possíveis, vocês são muito importantes para todos nós que passamos por aqui. O trabalho que vocês fazem é digno de muita admiração e respeito. Obrigada!

Aos funcionários do departamento Marco Ianner, Paulo R. Gratão, Renato G de Oliveira e Fausto Canuto por todo suporte laboratorial, da secretaria, respeito e auxílio durante todo o curso.

Aos funcionários Dirce e Gilmar, que mesmo aposentados sempre se fazem presentes para nos ajudar a manter um trabalho de qualidade. Obrigada por me socorrer sempre, vocês são sensacionais.

Aos doutorandos da pós graduação em Odontologia, Melyna Marques de Almeida, Ciro Borges Duailibe de Deus, Jucelêia Maciel, Leonardo de Freitas, Pedro Ferreira, André Hergesel de Oliva, Gustavo Antônio Correa Momesso, Tárik Ocon Braga Polo, Erik Neiva, Paulo Zupelari, João Paulo Bonardi, Fábio R. Batista, pelos ensinamentos, acolhimento e amizade durante todo o curso. Obrigada pela paciência e por serem ótimos profissionais que são exemplos pra mim.

Aos colegas de turma da pós graduação em Odontologia, Cássio Messias Beija-Flor Figueiredo, Luara Teixeira Colombo, William Phillip Pereira da Silva, Raquel Barroso Parra, Thiago Machado, Guilherme André Ramires e Laís Sara Egas. Obrigada por trilharmos esse caminho juntos, sempre nos ajudando, e com um ótimo convívio. Por serem companheiros da pós-graduação.

Aos colegas do primeiro ano da pós graduação em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, Breno dos Reis Fernandes, Bruna Junger, Bruno Coelho Mendes, Yasmin Comoti Vita Bantim, Henrique Hadad, Rodrigo Capalbo, Ana Flávia Piquera Santos, Caroline Chepernate Vieira dos Santos, Edith Umasi Ramos. Obrigada pela amizade, respeito e convívio dentro do departamento.

Aos meus amigos de infância Lilian Cardoso de Mendonça, Luiz Estevam Cavenage Filó, Marcelo Dadona Nunes, por sermos irmãos de alma, por termos tanta cumplicidade e amizade. Obrigada por serem meus companheiros desde sempre, por fazerem meus dias mais felizes e por saber que posso contar com vocês pra tudo. Obrigada por tantos momentos indescritíveis, que me tornaram uma pessoa melhor, mais leve e que valoriza muito a amizade de vocês. A admiração pelo que vocês se tornaram é enorme. Muito amor.

Aos meus amigos de General Salgado, Pedro Henrique Chaves de Oliveira, Maicon Marino, Marina Martins, Haila Habes, Mariana Ondeí, Lucas Galvão, Daniela Marques Tavares, Yolanda Galetti por serem minha companhia, compartilharem momentos, dividirmos alegrias e tristezas, por me apoiarem sempre e por permitirem termos uma amizade sem igual. Amo vocês.

Às minhas amigas da graduação, Carolina de Barros, Thayane Businari, Letícia Capalbo, Betina Comar, Izabela Catanoze, Brena Dartine, que não só estiveram ao meu lado durante toda a graduação me apoiando em cada decisão e sabendo de todos os meus sonhos, como preservaram nossa amizade até hoje e estão comigo sempre. Amo vocês!

Resumo

CERVANTES LCC. Uso do vidro bioativo com implantes imediatos em cirurgia para levantamento da membrana sinusal. Estudo histológico, histomorfométrico e imunoistoquímico. [dissertação] Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Resumo

A proposta deste estudo foi avaliar o processo de regeneração óssea com o uso do biomaterial Biogran®, um vidro bioativo, como uma opção de substituto ósseo para técnicas de enxerto em levantamento do assoalho do seio maxilar através de análises histológica e histomorfométrica. Para tal, 24 coelhos da raça Nova Zelândia foram submetidos ao procedimento de levantamento do seio maxilar bilateralmente, sendo divididos em dois grupos: grupo coágulo implante (GCI), no qual foi realizado o levantamento do seio maxilar, seguindo implante imediato, sem enxerto; e o grupo biovidro implante (GBI), no qual foi realizado o levantamento do seio maxilar, preenchimento com Biogran® e instalação de implante imediata. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7, 15 e 40 dias. A análise histológica mostrou no grupo GCI uma formação de tecido ósseo gradual, sendo maior aos 40 dias, com característica lamelar. Porém, não apresentava diferença estatística entre os períodos de 15 e 40 dias de eutanásia ($p=0,210$). O grupo GBI revelou uma formação de tecido ósseo mais tardia, com maior quantidade aos 40 dias, com reabsorção lenta e progressiva dos grânulos do biomaterial e sinais indicativos de atividade osteoblástica. Este grupo mostrou diferença estatística entre os períodos de 7 e 15 dias quando comparados aos 40 dias ($p<0,05$). Na análise intergrupos, não houve diferença estatisticamente significativa aos 7 e aos 40 dias, mas sim, aos 15 dias. Dessa forma, pode-se concluir que o Biogran® é um biomaterial com propriedades osteocondutoras, de reabsorção lenta, capaz de produzir tecido ósseo satisfatório. Porém, com quantidade semelhante ao coágulo aos 40 dias, o que gera maiores discussões e a necessidade de mais estudos para comprovar a eficácia desse biomaterial a longo prazo.

Palavras-chave: seio maxilar, coelhos, implantes experimentais, substitutos ósseos

Abstract

CERVANTES LCC. Use of bioactive glass with immediate implants in surgery to lift the sinus membrane. Histological, histomorphometric and immunohistochemical study. [dissertation] Araçatuba: São Paulo State University; 2019.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the bone regeneration process with the use of the Biogran® biomaterial, a bioactive glass, as a bone substitute option for grafting techniques in the maxillary sinus floor through histological and histomorphometric analysis. To that end, 24 New Zealand rabbits underwent a bilateral maxillary sinus removal procedure, and were divided into two groups: an implant clot group (ICG), in which the maxillary sinus was removed, followed by immediate implantation without graft ; and the implant bioglass group (GBI), in which the maxillary sinus was removed, filled with Biogran® and implanted in the immediate implant. The animals were submitted to euthanasia at 7, 15 and 40 days. The histological analysis showed a formation of gradual bone tissue in the GCI group, being larger at 40 days, with a lamellar characteristic. However, there was no statistical difference between the periods of 15 and 40 days of euthanasia ($p = 0.210$). The GBI group revealed a later bone formation with a greater amount at 40 days, with slow and progressive resorption of the biomaterial granules and signs indicative of osteoblastic activity. This group showed statistical difference between the periods of 7 and 15 days when compared to the 40 days ($p < 0.05$). In the intergroup analysis, there was no statistically significant difference at 7 and 40 days, but at 15 days. Thus, it can be concluded that Biogran® is a biomaterial with osteoconductive properties, of slow resorption, able to produce satisfactory bone tissue. However, with a similar amount to the clot at 40 days, which generates more discussions and the need for further studies to prove the efficacy of this biomaterial in the long term.

Key-words: maxillary sinus, rabbits, experimental implants, bone substitutes

Listas e Sumário

Lista de Figuras

Figura 1	Procedimento cirúrgico de divulsão da membrana sinusal e instalação de implante imediato, bilateralmente. A:Tricotomia, B: Antissepsia e Incisão do dorso nasal. C: Membrana sinusal descolada bilateralmente. D: Biomaterial e coágulo em posição. E: Instalação de implantes imediatos bilateralmente. F:sutura por planos anatômicos.....	57
Figura 2	A, B: Corte histológico em HE do grupo GBI aos 7 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 7 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.....	58
Figura 3	A, B: Corte histológico do grupo GBI aos 15 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 15 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.....	59
Figura 4	A, B: Corte histológico do grupo GBI aos 40 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 40 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.....	60
Figura 5	Corte histológico do grupo GCI aos 7 (A), 15 (B) e 40 (C) dias. As setas em azul indicam tecido ósseo neoformado, setas em verde indicam deposição de matriz osteoide e setas em amarelo indicam os vasos sanguíneos. Aumento de 25x.....	60
Figura 6	Corte histológico do grupo GBI aos 7 (A), 15 (B) e 40 (C) dias. As setas em azul indicam tecido ósseo neoformado, setas em verde indicam deposição de matriz osteoide e setas em amarelo os vasos sanguíneos. Aumento de 25x.....	61
Figura 7	Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GBI aos 7 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VGEF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.....	61
Figura 8	Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GCI aos 7 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VGEF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.....	62
Figura 9	Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GBI aos 15 dias. A: Marcação moderada para OC. B: Marcação leve a moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VGEF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.....	63
Figura 10	Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GCI aos 15 dias. A: Marcação intensa para OC. B: Marcação leve para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve para VGEF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.....	64

- Figura 11** Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GBI aos 40 dias. A: Marcação moderada para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação inespecífica para TRAP. D: Marcação moderada para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x..... 65
- Figura 12** Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GCI aos 40 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação inespecífica para TRAP. D: Marcação leve para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x..... 66

Lista de Gráficos e Tabelas

Quadro 1	Quantidade de marcação em escore utilizada para a análise imunoistoquímica.....	57
Gráfico 1	Porcentagem da área de osso neoformado nos grupos GCI e GBI aos 7, 15 e 40 dias.....	66
Gráfico 2	Porcentagem de Biogran® aos 7, 15 e 40 dias de reparo.....	66
Gráfico 3	Área óssea neoformada e sua relação intergrupos nos períodos de 7, 15 e 40 dias.....	67
Tabela 1	Porcentagem da área de osso neoformado nos grupos GCI e GBI aos 7, 15 e 40 dias.....	67
Tabela 2	Scores da imunomarcações das proteínas OC, RANKL, TRAP e VEGF em função dos grupos (GCI e GBI) e períodos (7,15 e 40 dias).....	68

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

VB	Vidro Bioativo
BG	Biogran®
GCI	Grupo coágulo implante
GBI	Grupo Biogran® implante
HE	Hematoxilina e Eosina
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo
COBEA	Comitê Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
JPEG	Joint Photographics Experts Group
ANOVA	Análise de Variância
FOA UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
mg	miligramas
kg	Quilogramas
AON	Área Ósea Neoformada
OC	Osteocalcina
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
RANKL	Receptor Ativador Nuclear Kappa-B Ligante
VGEF	Fator de Crescimento Endotelial

Sumário

1	Introdução.....	23
2	Proposição.....	28
3	Materiais e métodos.....	30
	Delineamento experimental.....	31
	Procedimento Cirúrgico.....	31
	Cuidados Pós-Operatórios.....	33
	Eutanásia e Coleta do Material.....	34
	Preparo das Peças.....	34
	Análise Histomorfométrica.....	35
	Análise Imunoistoquímica.....	35
	Análise Estatística.....	36
4	Resultados.....	37
	Análise Histológica.....	38
	Grupo Controle com Formação de Coágulo e Implante Imediato.....	38
	Grupo Experimental com Enxerto de Vidro Bioativo (Biogran®) e Implante Imediato....	38
	Análise Histométrica.....	39
	Análise Imunoistoquímica.....	39
5	Discussão.....	42
6	Conclusão.....	47
	Referências.....	49
	Figuras.....	55
	Anexos.....	68

Introdução

1. Introdução

A reabsorção da crista óssea é uma consequência da perda do elemento dental. Busca-se, com isso, a reabilitação de maxilas e mandíbulas atroficas por meio de enxertos ósseos e implantes osseointegráveis, devolvendo função mastigatória e estética ao paciente. Existiram tentativas de ancoragem dos implantes através de uma camada de tecido fibroso, mimetizando o ligamento periodontal. Porém, essas tentativas mal sucedidas resultaram na descoberta da relação tecido ósseo-implante, sem interferência do tecido conjuntivo, quando da instalação do implante até o osso medular, referindo o processo de osseointegração.¹

Tal processo de osseointegração dos implantes dentais sofre interferência das diferentes estruturas ósseas distribuídas pela maxila e pela mandíbula.²⁻⁴ De acordo com a classificação proposta em 1985, a qualidade óssea alveolar foi classificada em tipos 1 ao 4 de acordo com avaliações radiográfica e táteis.⁵ O osso tipo 1 caracteriza-se por apresentar cortical bastante densa; o osso tipo 2, por apresentar cortical menos densa e com maior quantidade de osso medular, comparado ao anterior; o osso tipo 3, por apresentar uma cortical porosa e fina, envolvendo um osso trabecular também fino; e, o osso tipo 4, por apresentar um padrão trabecular fino e uma cortical muito delgada. A região posterior da maxila se caracteriza por apresentar um osso classificado como tipo 4.

Outra característica da região posterior da maxila é a presença do seio maxilar, cavidade pneumática dentro do osso da maxila. Esta cavidade está intimamente ligada à crista óssea alveolar, ocorrendo a pneumatização do seio maxilar como consequência da perda dentária nessa região.⁶ Este fato tem como grave consequência a impossibilidade da instalação de implantes osseointegráveis, pois estes não apresentarão estabilidade suficiente para ancoragem protética de forma adequada.

Dentre as técnicas para a realização de enxerto ósseo, o levantamento de seio maxilar tem sido comumente utilizado para devolver altura e largura ósseas para a crista

alveolar.⁷⁻⁹ Esse procedimento favorece a reabilitação oral protética após a instalação de implantes dentários.

A instalação dos implantes osseointegráveis pode ser realizada em um ou dois tempos cirúrgicos após a elevação da membrana sinusal, dependendo da altura e largura remanescentes da crista óssea alveolar. Altura ou largura menores que 5 mm requerem um procedimento em dois estágios: a princípio realiza-se o levantamento do seio maxilar, e, após 6 meses, instala-se o implante. Caso a altura possuir 5mm ou mais, realiza-se o procedimento em um tempo cirúrgico: levantamento de seio maxilar e instalação de implantes simultânea.⁹

As técnicas para realização do procedimento de levantamento da membrana sinusal já são consagradas pela literatura. Porém, os materiais utilizados para preencher o espaço criado entre o assoalho do seio maxilar e a membrana sinusal ainda são alvos de discussão e pesquisa.^{10,11} Os materiais de enxerto podem ser classificados quanto à sua origem, em: autógenos, obtidos do mesmo indivíduo; homogêneos (aloenxertos), obtidos de indivíduos da mesma espécie; xenógenos, obtidos de indivíduos de espécies diferentes; e enxertos aloplásticos, os quais possuem origem sintética.

O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro pela maioria dos pesquisadores, pelas suas propriedades de osteocondução, osteoindução, osteogênese e biocompatibilidade.^{12,13} Porém, a forma de obtenção do enxerto autógeno traz morbidade significativa para o paciente, pela necessidade de obtenção do material em um segundo sítio cirúrgico. O sítio doador é escolhido de acordo com a quantidade óssea necessária para o aumento da altura óssea individualmente¹⁴, e ele pode ser extra ou intra-bucal.

O osso colhido da área doadora intra-bucal promove uma morbidade diminuída. Porém, além de serem áreas com menor quantidade de tecido ósseo disponível muitas vezes, e essa quantidade ser inferior à necessária, o procedimento para obtenção desse tecido é frequentemente associado a complicações transoperatórias. Dentre elas: dano aos nervos mentoniano e alveolar, desvitalização dentária adjacente ao sítio cirúrgico e aumento do risco de fratura mandibular dependendo do sítio doador.¹⁵

Desta forma, existe a necessidade de investigação de biomateriais que possuam propriedades semelhantes às do osso autógeno, substituindo-o de forma eficiente nos procedimentos de levantamento da membrana do seio maxilar. Os enxertos sintéticos têm sido uma alternativa interessante para tal substituição.^{16,17}

Dentre os materiais sintéticos, os vidros bioativos têm sido amplamente estudados. Eles são compostos por formadores de rede, modificadores de rede e óxidos intermediários. Os formadores de rede são capazes de formar o biovidro sem componentes adicionais e os mais observados na literatura são sílica (SiO_2), pentóxido de fósforo (P_2O_5) e trióxido de boro (B_2O_3). Os modificadores de rede ligam-se a átomos de oxigênio que não se ligam em ponte, modificando a estrutura do biovidro. Já os óxidos intermediários podem atuar tanto como formadores quanto como modificadores de rede. Adaptando-se a composição, pode-se controlar as propriedades físico-químicas e biológicas dos biovidros, favorecendo a bioatividade, e a formação de novo tecido ósseo.¹⁸

Por possuírem em sua estrutura átomos de oxigênio e cátions modificadores não híbridos, quando em contato com os fluidos corporais permitem a ligação direta com a água e com o aumento do pH local pela liberação de H^+ ou H_3O^+ ocorre o rompimento das estruturas Si-O-Si, liberando silício no fluido. Com pH inferior a 9,5 do meio, forma-se uma camada de gel de sílica, que permite a liberação iônica de cálcio e fósforo, resultando na formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo sobre a camada de gel de sílica. A incorporação de carbonatos à camada de fosfato de cálcio inicia a precipitação em apatita hidroxicarbonatada, semelhante à fase mineral do tecido ósseo. Essa capacidade de formar uma camada de apatita que se liga quimicamente ao tecido ósseo têm caracterizado a bioatividade desses vidros e pode ser afetada tanto pela estrutura do vidro bioativo quanto pela liberação de íons.^{18,19} Além da composição química, as características morfológicas, como tamanho de partícula e porosidade dos vidros bioativos, também afetam suas propriedades.^{20,21}

Em 1969, Larry L. Hench observou pela primeira vez a capacidade de ligação de uma composição de vidro ao osso e ao músculo após seis semanas da implantação em ratos, desenvolvendo, então, o Bioglass®.²² Um material com a mesma composição “45S5” é o Biogran® (Biomet 3i, Palm Beach Gardens, Florida, USA), uma cerâmica bioativa reabsorvível composta de dióxido de silício (SiO₂; 45%), óxido de cálcio (CaO; 24,5%), óxido de sódio (NaO₂; 24,5%) e pentóxido de fósforo (P₂O₅; 6%), porém com o tamanho de suas partículas menores, entre 300 e 355 nm.^{20,23,24}

O Biogran® têm sido utilizado em estudos experimentais e clínicos para o tratamento de diferentes tipos de defeitos ósseos, para regeneração óssea guiada associada ao uso de implantes no procedimento de elevação da membrana sinusal com resultados favoráveis em relação à eficácia do seu uso em diversos estudos.^{21,25-28} Porém, não há estudos suficientes que sustentem a hipótese das ações osteocondutoras, osteoestimuladoras e bioativas em procedimentos de levantamento da membrana sinusal com instalação de implante imediata, sendo necessários mais estudos para comprovar esta hipótese.

Proposição

2. Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de regeneração óssea com o uso do biomaterial Biogran®, um vidro bioativo, como uma opção de substituto ósseo para técnicas de enxerto em levantamento do assoalho do seio maxilar e instalação de implantes imediatos, através de análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica.

Materiais e
Métodos

3. Materiais e Métodos

Delineamento Experimental

Foram utilizados para a realização deste estudo 24 (trinta e dois) coelhos da raça Nova Zelândia variação “*albinus*”, machos, adultos, com idade aproximada de 5(cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 Kg, com *n* calculado através do poder da amostra. Os animais foram pareados no começo do estudo para diminuir o desvio padrão. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - FMZV, UNESP, e foram mantidos em Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP. Os animais tiveram os seios maxilares acessados bilateralmente e foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 1):

- Grupo Coágulo Implante (GCI): após o procedimento de elevação da membrana sinusal, o seio maxilar direito foi preenchido por coágulo sanguíneo com instalação imediata de implantes de titânio Implalife® (indústria de produtos médicos-odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) com superfície tratada por meio de duplo ataque ácido.
- Grupo Biogran Implante (GBI): após o procedimento de elevação da membrana sinusal, o seio maxilar esquerdo foi preenchido por vidro bioativo Biogran® com instalação imediata de implantes de titânio Implalife® com superfície tratada por meio de duplo ataque ácido.

Procedimento Cirúrgico

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia geral foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina

a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Em complementação anestésica, foi realizada a infiltração de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na linha mediana do dorso nasal.

Após prévia tricotomia e antissepsia pré-operatória no dorso nasal (Figura 1 A e B) por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), o osso nasal foi acessado. O protocolo cirúrgico utilizado para o acesso à cavidade sinusal do animal foi o estabelecido por Asai, Shimizu e Ooya (2002).

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, German), uma incisão linear de 5 cm foi realizada a linha mediana do dorso nasal (Figura 1 B). A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição do osso nasal e a linha da sutura nasoincisa. Após exposição, uma janela circular de 3 mm de diâmetro foi confeccionada bilateralmente à linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 2 cm anterior à linha da sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente à linha mediana.

Este procedimento foi realizado sobre abundante irrigação com solução salina fisiológica estéril a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), com a utilização de uma broca trefina de 2 mm de diâmetro interno (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para a demarcação da área e uma broca diamantada esférica nº 1011 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) para a finalização das osteotomias, ambas montadas em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil), que por sua vez foi conectado a um

motor elétrico rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm.

A membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física fosse mantida (Figura 1 C). Com o auxílio das mesmas curetas, o seio maxilar esquerdo foi preenchido vidro bioativo Biogran® e o direito formou-se coágulo (Figura 1 D). Após enxerto, implante dentário de titânio tratado com duplo ataque ácido, de 3,6x6, 5 mm, plataforma hexágono externo (Implalife® - indústria de produtos médicos-odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foi instalado bilateralmente (Figura 1 E) também com auxílio de contra-ângulo redutor de 20:1, com 30rpm, sobre refrigeração nos dois grupos experimentais (Figuras 6 e 7). Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura (Figura 1 F) realizada por planos anatômicos, com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

Cuidados Pós-Operatórios

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de enrofloxacin (Vencofarma®, Londrina, Paraná, Brasil) em uma dosagem de 5mg/kg e de doxiciclina (Coveli®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 5 mg/kg, administração via oral de cetoprofeno (Ketoflex -Mundo Animal®, Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil) na dosagem de 3 mg/kg e de tramadol (Cronidor - Agener®, São Paulo, Brasil) na dosagem de 5mg/kg, sendo a primeira dose no pós-operatório imediato e as demais nos 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, até a eutanásia animal, nos períodos de 7, 15 e 40 dias pós-operatórios.

Eutanásia e Coleta do Material

A sedação foi realizada pela administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5 mg/Kg. A eutanásia foi realizada por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de 150 ml de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos, seguida de 1800 ml de Formaldeído 4% (Paraformaldeído 4% - Acros Organics) durante 40 minutos, usando uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – Parmer Instrument Company) na velocidade de 45ml/min. Os períodos de eutanásia foram aos 7, 15 e 40 dias após o procedimento de levantamento da membrana do seio maxilar. Após a eutanásia, o complexo nasal incluindo as cavidades sinusais foi removido em bloco e todo o tecido mole superficial eliminado.

Preparo das Peças

As peças foram fixadas em formol 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e sofreram descalcificação em EDTA 5% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, por um período de 60 a 90 dias, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de álcoois 70, 90, 95 e 100, com troca de solução a cada 3 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150®, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) em todos os dias durante 4 horas. Após estas etapas, foi realizada diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 6 µm de espessura montados em lâminas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc.) e outras para as reações de imunohistoquímica.

Previamente a realização das análises histológicas e histométricas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecia a quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

Análise Histomorfométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmara de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems Ltda., Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e projetadas na tela de um monitor de 15 polegadas (Samsung®, SyncMaster 3Ne, Seul, Coreia do Sul).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente no interior do seio maxilar como a avaliação da espessura do trabeculado ósseo (em micrômetros de espessura). Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

As análises histométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ Java 1.8. Foram utilizadas as imagens obtidas em aumento de 200x e calculada, em porcentagem, a área de tecido ósseo presente (AO) entre as espiras de todo o implante.

Análise Imunohistoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram a contra osteocalcina (OC, Goat anti-oc – Santa Cruz Biotechnology), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, Goat anti-TRAP – Santa Cruz Biotechnology), Receptor Ativador Nuclear Kappa-B Ligante (RANKL, Goat anti-

rankl – Santa Cruz Biotechnology) e fator de crescimento endotelial (VGEF, Goat anti- VGEF - Santa Cruz Biotechnology). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzina (DAB- Sigma, St. Louis, MO, USA). O anticorpo secundário biotilado foi o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin – SP-AffiniPure, donkey anti-goat IgG – Jackson Immunoresearch Laboratories). Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) bem como a expressão das proteínas OC, TRAP, RANK-L e VGEF, acoplado a uma câmera de captura (Zeiss® AxioCam Icc 1, Oberkochen, Alemanha) e conectado a um microcomputador Windows Vista com um software analisador de imagens digitalizadas, AxioVision® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Oberkochen, Alemanha). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos (Quadro 1).

Análise Estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados através do programa estatístico Sigma Plot 12.0 (Exakt graphs and Data analysis, San Jose, CA, EUA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk o qual mostrou homogeneidade dos dados. Em seguida, foi aplicado o teste ANOVA 2 fatores (grupos vs períodos), e para as interações que mostraram significância estatística, o pós teste Tukey foi aplicado. Para todos os testes, o nível de significância de 5% foi considerado.

Resultados

4. Resultados

Análise Histológica

Grupo controle com formação de coágulo e implante imediato (GCI)

Aos 7 dias observa-se ao redor do implante principalmente tecido conjuntivo e matriz osteoide sendo depositada e a formação de finas trabéculas ósseas, com a presença de vasos sanguíneos nas regiões periféricas, evidenciando o início da angiogênese (Figuras 2 C e D; 5 A).

Aos 15 dias, foi possível observar a formação de trabéculas ósseas mais espessas, com a presença de inúmeros osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Além de grandes vasos sanguíneos, entremeados ao tecido ósseo e tecido conjuntivo que compõem o tecido ao redor do implante. Apesar de trabéculas mais espessas, nesse período ainda há uma grande quantidade de tecido conjuntivo que está sofrendo mineralização (Figuras 3 C e D; 5 B).

Aos 40 dias observa-se grande quantidade de tecido ósseo, evidenciando uma formação mais madura desse tecido, quando comparado aos outros períodos. Porém, com grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo entremeadado às trabéculas. Ainda com presença significativa de vasos sanguíneos, e de células da linhagem osteoblástica (Figuras 4 C e D; 5 C).

Grupo experimental com enxerto de vidro bioativo (Biogran®) e implante imediato (GBI)

Aos 7 dias observa-se a presença dos grânulos do biomaterial enxertado, entremeadado por tecido conjuntivo e matriz osteoide, depositada ao redor dos grânulos, e de vasos sanguíneos de menor calibre (Figuras 2 A e B; 6 A).

Aos 15 dias, é possível observar a formação de finas trabéculas ósseas, com grande quantidade de osteoblastos. Ainda existe uma grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, sendo notada uma matriz osteoide em formação. Há a presença de vasos sanguíneos em toda a área observada, porém, menos calibrosos do que no mesmo período do grupo controle (Figuras 3 A e B; 6 B).

Aos 40 dias observa-se trabéculas ósseas mais espessas e com tecido ósseo mais maduro, principalmente no perímetro do implante (Figuras 4 A e B). No centro das espiras ainda há tecido conjuntivo, com a presença de células gigantes multinucleadas e osteoblastos na periferia do tecido ósseo em formação. Ainda é possível observar grande quantidade de grânulos do biomaterial utilizado, porém se apresentam em tamanhos menores e com maior quantidade de tecido conjuntivo e trabéculas ósseas ao redor (Figura 6 C).

Não foi observado processo inflamatório associado ao biomaterial em qualquer um dos períodos.

Análise Histométrica

Para a variável área óssea neofomado (AON), na comparação entre períodos do grupo GCI, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 40 e 7 dias, com $p < 0,01$ e entre 15 e 7 dias, com $p < 0,01$. Porém, não houve diferença significativa entre 15 e 40 dias ($p = 0,210$). Já na comparação entre períodos no grupo GBI, houve diferença estatisticamente significativa entre o período de 40 dias, quando comparado aos 7 e aos 15 dias, com $p < 0,01$ em ambos os casos. Enquanto isso, a comparação entre 7 e 15 dias não mostrou diferença significativa, com $p = 0,140$ (Tabela 1).

Na comparação de AON por fatores, o único período a mostrar diferença estatisticamente significativa entre os grupos GCI e GBI foi o de 15 dias ($p < 0,01$).

Análise Imunoistoquímica

Osteocalcina

Aos 7 dias, a imunomarcção para osteocalcina, tanto no grupo GBI (Figura 7 A) quanto no grupo GCI (Figura 8 A) se apresentou de moderada a intensa. Porém, no grupo GBI, há destaque para a marcação expressiva em matriz extracelular e tecido conjuntivo, além das células da linhagem osteoblástica. Já no grupo GCI, está se iniciando a organização do tecido ósseo, com matriz mineralizada marcada positivamente para

osteocalcina, além de marcação intensa em osteoblastos ao redor do tecido ósseo em formação.

Aos 15 dias, o grupo GBI (Figura 9 A) apresentou uma formação de matriz mineralizada, com tecido ósseo se organizando, com precipitações de osteocalcina sobre a matriz mineralizada, de forma moderada. Já o grupo GCI (Figura 10 A) apresentou marcação intensa e importante na matriz extracelular e também no tecido ósseo neoformado. Além de marcação positiva intensa em osteócitos e osteoblastos .

Aos 40 dias, o grupo GBI (Figura 11 A) apresentou imunomarcação moderada para osteocalcina, com grande precipitação na matriz mineralizada, e grande formação de tecido ósseo. De forma semelhante, o grupo GCI (Figura 12 A) apresentou imunomarcação de moderada a intensa, com grande precipitação de osteocalcina no tecido ósseo neoformado.

RANKL

Aos 7 dias, tanto o grupo GBI (Figura 7 B) quanto o grupo GCI (Figura 8 B) apresentaram imunomarcação moderada para RANKL, com início da formação de tecido ósseo, possuindo marcação positiva em matriz extracelular e em células da linhagem osteoblástica.

Aos 15 dias, o grupo GBI (Figura 9 B) apresentou imunomarcação leve a moderada para RANKL, bem como o grupo GCI (Figura 10 B) que apresentou marcação leve.

Aos 40 dias, ambos os grupos apresentaram imunomarcação moderada para RANKL, com marcação positiva na matriz extracelular e nas células da linhagem osteoblástica (Figuras 11 e 12 B).

TRAP

Aos 7 dias, os dois grupos apresentaram marcação negativa para TRAP, sendo possível observar marcações inespecíficas em todo o tecido (Figuras 7 e 8 C).

Aos 15 dias, ambos os grupos apresentaram marcação leve para TRAP, sendo observados osteoclastos próximos ao tecido ósseo neoformado (Figuras 9 e 10 C).

Aos 40 dias, o grupo GBI (Figura 11 C) apresenta imunomarcação negativa para TRAP, enquanto o grupo GCI (Figura 12 C) apresenta marcação leve para a mesma proteína.

VGEF

Aos 7 (Figuras 7 e 8 D) e aos 15 dias (Figuras 9 e 10 D), o grupo GBI apresentou imunomarcação leve a moderada para VGEF, enquanto o grupo GCI apresentou marcação leve. Marcação positiva nas células e na matriz extracelular.

Enquanto aos 40 dias, o grupo GBI (Figura 11 D) apresentou marcação moderada para VGEF e o grupo GCI (Figura 12 D), marcação leve (Tabela 2).

Discussão

5. Discussão

A utilização do vidro bioativo particulado em tipos de granulações diferentes na regeneração óssea, com a descoberta da propriedade osteocondutora desse biomaterial por Wilson et al., permitiu o desenvolvimento de mais estudos em relação à regeneração tecidual associada ao vidro bioativo.²⁹ Estudos vêm sendo desenvolvidos desde então e mostram as propriedades osteocondutoras do biomaterial e sua lenta substituição, com formação de trabéculas ósseas entre os grânulos do biomaterial, tanto em estudos clínicos³⁰⁻³² como experimentais³³.

O mesmo foi observado neste estudo, aos 40 dias os grânulos do biomaterial ainda não haviam sido totalmente reabsorvidos, porém, grande quantidade de trabéculas ósseas ao redor desses grânulos se formaram. Aos 7 dias 20,9% do biomaterial foi encontrado entre as espiras do implante, diminuindo para 4,7% aos 40 dias pós-operatórios (Gráfico 2).

A presença de tecido ósseo com característica lamelar, indica um tecido mais maduro, com linhas periféricas de osteoblastos responsáveis pela produção da matriz osteoide³⁴. Essas características foram observadas neste estudo e descritas por Pereira et al., que comparou a utilização de Biogran® (grupo 1), osso autógeno associado ao Biogran na taxa de 1:1 (grupo 2) e apenas osso autógeno (grupo 3). A formação de pequenas áreas de tecido ósseo maduro, principalmente na interface osso-implante, mostram que o biomaterial pode ser melhor indicado na aplicação em pequenos defeitos, quando comparado ao coágulo.

Na comparação entre os grupos citados, Pereira et al. observaram uma menor porcentagem de tecido conjuntivo no grupo 1, em relação aos outros 2 grupos, porém, sem apresentar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).³⁴ Da mesma forma, este estudo não apresentou diferença estatística entre os grupos GCI e GBI em relação à quantidade de tecido conjuntivo ($p > 0,05$). Porém, o grupo GBI mostrou uma maior quantidade de tecido conjuntivo, principalmente aos 40 dias, diferente do descrito por Pereira et al.

Além disso, a arquitetura do tecido conjuntivo conferido pelo Biogran® se mostra mais organizada quando comparada ao coágulo sanguíneo, se tornando um arcabouço para a neoformação óssea, propiciando ao material, associado a outras características, um ótimo potencial osteocondutor. Bem como foi observado por Cardoso et al., que comparou a utilização de Biogran® (GI), Perioglas® (GII) e grupo controle (GIII), mostrando que o GI apresentou fibras colágenas densas entre os grânulos do biomaterial, e uma formação de septos fibrosos completos e incompletos em seus grânulos²¹, comportamento que foi observado em vários estudos.³⁵

Um comportamento característico de reabsorção gradativa dos grânulos foi observado, permitindo a deposição de matriz osteoide e a mineralização desse tecido, quando em contato com o biomaterial. Corroborando, assim, com Stravopoulos et al., que compararam o uso do Biogran® e do Bio-Oss® em mandíbula de ratos como um adjuvante da regeneração tecidual guiada, com o vidro bioativo apresentando esse comportamento de formação de tecido ósseo em contato com os grânulos do biomaterial.³⁶

Além das características qualitativas do tecido ósseo formado já descritas, a análise quantitativa é um importante fator a se observar. Diante dos resultados apresentados neste estudo, pode-se observar que o grupo GBI mostrou uma formação de tecido ósseo semelhante à do grupo GCI, aos 7 e 40 dias, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Esse comportamento foi observado pelo mesmo material em diversos estudos encontrados na literatura, quando comparado com enxerto autógeno, entre outros biomateriais ou em associação.³⁴⁻³⁷

A neoformação de tecido ósseo aos 7 dias no grupo GCI se mostrou em estágio mais avançado quando comparado ao grupo GBI no mesmo período. É possível que isso ocorra devido à lenta reabsorção do biomaterial. Tadjoeidin et al., observaram uma proporção de aproximadamente 38% de tecido ósseo neoformado e 7% de biomaterial residual contra 46% de osso neoformado no grupo controle, em 6 meses pós-operatórios de um estudo clínico de levantamento de seio maxilar bilateral, comparando a associação de vidro bioativo com osso autógeno e enxerto autógeno contralateral.³⁸ É possível notar um

padrão que o vidro bioativo mostra em relação à produção de tecido ósseo mais tardia. Além do mais, o aumento gradativo da porcentagem de tecido ósseo observado nesse estudo, associado à característica de organização do tecido conjuntivo, pode indicar que o biomaterial se iguale ao coágulo em relação à formação de novo tecido ósseo. Talvez, com estudo a longo prazo, o biomaterial poderia apresentar resultados melhores, comparando-o ao coágulo.

Dentro do contexto do reparo ósseo, outro fator importante a ser considerado e que induz a uma análise importante é o papel das proteínas de matriz sobre a ossificação, que modulam a resposta celular dentro do processo de osseointegração.^{39,40} A osteocalcina, uma pequena proteína de matriz não colágena, é a mais abundante no tecido ósseo, se ligando à hidroxiapatita na matriz. É importante na regulação da atividade osteoblástica, desempenhando um papel nos estágios mais iniciais de ossificação, na maturação do tecido ósseo, atrasando o papel do colágeno tipo I.⁴¹⁻⁴³ A expressão da osteocalcina aos 7, 15 e 40 dias, se mostra moderada a intensa no grupo GBI e intensa no grupo CGI, revelando mineralização mais precoce no grupo coágulo, porém mantendo sua atividade até os períodos mais tardios do estudo.

A proteína RANK ligante (RANKL) é responsável pela formação e ativação dos osteoclastos, desempenhando papel no equilíbrio da remodelação óssea. Quanto maior a intensidade da marcação para RANKL, maior a atividade de reabsorção óssea.⁴⁴ A marcação moderada para ambos os grupos tanto aos 7 quanto aos 40 dias, avaliando-se ao mesmo tempo a atividade moderada a intensa da osteocalcina nos mesmos períodos, mostra que a taxa de remodelação está em leve desequilíbrio, tendendo à maior formação de tecido ósseo.

Outra importante proteína para a avaliação do metabolismo ósseo é a TRAP, uma enzima que contém ferro e secretada por osteoclastos durante a remodelação óssea, caracterizando um padrão reabsortivo. Uma marcação intensa de TRAP é vista em tecidos normais. Este estudo mostrou uma marcação negativa para esta proteína nos períodos

iniciais para ambos os grupos e marcação leve nos períodos mais tardios. Esse comportamento pode ser observado devido à baixa atividade de reabsorção óssea, e alta atividade de formação óssea. Isso ocorre pelas características do sítio de implantação, que não torna necessária a reabsorção óssea para produção, apenas a remodelação de tecido conjuntivo até a mineralização.

A avaliação da proteína VEGF também tem um significado importante dentro da remodelação óssea. Suas funções incluem a indução da vascularização óssea, além da sinalização de células como osteoblastos, osteoclastos e células progenitoras pericondrais. A marcação leve para o grupo GCI em todos os períodos pode indicar baixo índice de angiogênese, diferente do grupo GBI, que apresentou marcação moderada nos períodos iniciais.

Conclusão

Conclusão

O Biogran®, portanto, se mostrou um biomaterial biocompatível e com propriedades osteocondutoras, capaz de levar à formação satisfatória de tecido ósseo. A produção de tecido ósseo foi similar para os dois grupos, principalmente aos 40 dias, porém, o comportamento histológico mostrou um padrão mais estável de formação óssea para o biomaterial, quando comparado ao coágulo, que apresenta grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo.

Referências

Referências

1. Branemark, P.I. Osseointegration and its experimental backgrounds. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. September 1983. Volume 50
2. Aaboe, M; Pinholt, E. M.; Hjorting-Hansen, E. Healing of experimentally created defects: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Sureerv* (1995) 33. 312-318).
3. Albrektsson, T.; Brånemark, P.I.; Hansson, H.A.; Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52:2, 155-170, DOI: 10.3109/17453678108991776
4. Wetzel, A.C; Stich, H. & Caffesse, R.G. (1995). Bone apposition onto oral implants in the sinus área filled with diferente grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research* 6: 155-163.
5. Zarb, George Albert, and Tomas Albrektsson. *Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence Pub Co, 1985.
6. Chanavaz M. Maxillary sinus: anatomy, physiology, surgery and bone grafting related to implantology – eleven years of surgical experience (1979-1990). *J. Oral Implantol* 1990;16:199-209.
7. Bassi, A. P. F.; Pioto, R.; Faverani, L. P.; Canestraro, D.; Fontaño, F. G. K.: 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; 44: 902–907.
8. Estaca E, Cabezas J, Usón J, Sañchez-Margallo F, Morell E, Latorre R. Maxillary sinus-floor elevation: an animal model. *Clin. Oral Impl. Res.* 19, 2008; 1044–1048 doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01557.x
9. Raghoobar GM, Timmenga NM, Reintsema H, Stegenga B, Vissink A. Maxillary bone grafting for insertion of endosseous implants: results after 12– 124 months *Clin. Oral Impl. Res.* 12, 2001; 279–286
10. Mangano, C; Piattelli, A.; Tettamanti, L.; Mangano, F.; Mangano, A.; Borges, F.; Iezzi, G.; d'Ávila, S.; Shibli, J.A. Engineered Bone by Autologous Osteoblasts on Polymeric Scaffolds in Maxillary Sinus Augmentation: Histologic Report

11. Caneva M, Lang NP, Garcia Rangel IJ, Ferreira S, Caneva M, De Santis E, Botticelli D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingistat® collagen sponge: an experimental study in rabbits. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2016, 1–10. doi: 10.1111/clr.12850
12. Bastos, A.S.; Spin-Neto, R.; Conte-Neto, N.; Galina, K.; Boeck-Neto, R.J.; Marcantonio, C.; Marcantonio, E.; Marcantonio Jr, E. Calvarial Autogenous Bone Graft for Maxillary Ridge and Sinus Reconstruction for Rehabilitation With Dental Implants. *Journal of Oral Implantology*.
13. Barone, A. & Covani, U. Maxillary Alveolar Ridge Reconstruction With Nonvascularized Autogenous Block Bone: Clinical Results. *J Oral Maxillofac Surg* 65:2039-2046, 2007.
14. Neukam, F.; Hausamen, J.; Scheller, H. & Feldmann, G. (1987) Knochentransplantation in kombination mit enossalem implantaten. In: Kastenbauer, E.; Wilmes, E. & Mess, K., eds. *Das Transplantat in der plastischen Chirurgie*, 41-44. Sasse: Rothenburg.
15. Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:376– 382.
16. Freire, A.R.; Rossi, A.C.; Queiroz, T.P.; Gulinelli, J.L.; Souza, F.A.; Margonar, R.; Garcia-Júnior, I.R.; Hochuli-Vieira, E.; Okamoto, R. Histometric Analysis of Bone Repair in Bone-Implant Interface Using a Polylactic/Polyglycolic Acid Copolymer Associated With Implants in Rabbit Tibia. *Journal of Oral Implantology*. Vol. XXXVIII /Special Issue No. One/2012.
17. Wheeler, S.L. Sinus Augmentation for Dental Implants: The Use of Alloplastic Materials. *J Oral Maxillofac Surg* 55:1287-1293, 1997.
18. Brauer DS. Bioactive Glasses—Structure and Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 4160 –4181. DOI: 10.1002/anie.201405310
19. Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE and Ferreira JMF. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials* **2018**, 11, 2530; doi:10.3390/ma11122530
20. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 4457–4486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>
21. Cardoso AKMV, Barbosa-Jr AA, Miguel FB, Marcantonio-Jr E, Farina M, Soares GDA and Rosa FP. Histomorphometric Analysis of Tissue Responses to Bioactive Glass Implants in Critical Defects in Rat Calvaria. *Cells Tissues Organs* 2006;184:128–137.
22. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* (2006) 17:967–978 DOI 10.1007/s10856-006-0432-z

23. Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Implants Res* 2016;2001(12):270–8.
24. Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1–24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil* 1997;24:171–81.
25. Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, Leepong N and Kintarak N. Effects of Enamel Matrix Derivative on Bioactive Glass in Rat Calvarium Defects. *Journal of Oral Implantology*; Vol. XXXVI/No. Three/2010. DOI: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00042
26. Araújo MFV, Mendes VC, Chattopadhyay P and Davies JE. Low temperature particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Clin. Oral Impl. Res.* 21, 2010; 632–641. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01864.x
27. Cordioli GP, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin. Oral Impl. Res.* 12, 2001; 270–278
28. Furusawa T, Mizunuma K, Yamashita S, T Takahashi. Investigation of early bone formation using resorbable bioactive glass in the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Sep-Oct;13(5):672-6
29. Wilson, J., and Low, S. B. (1992). Bioactive ceramics for periodontal treatment – comparative studies in the Patus monkey. *J. Appl. Biomater.* 3, 123–129. doi:10.1002/jab.770030208
30. Tadjoeidin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger EH (2000) Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 11(4):334–344
31. Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, Happonen RP (2004) Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res* 15(2):135–141
32. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piattelli M, Orsini G, Caputi S, Perrotti V, Mangano C, Piattelli A (2006) Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent* 15(2):197–207. doi: 10.1097/01.id.0000220120.54308.f3

33. Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, Leepong N, Kintarak S. Effects of Enamel Matrix Derivative on Bioactive Glass in Rat Calvarium Defects. *Journal of Oral Implantology*. Vol. XXXVI/No. Three/2010
34. Pereira RS, Menezes JD, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of BiogranTM and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017;1–9.
35. Zendron MV, Cardoso MV, Veronesi GF, Resende DRB, Damante CA, Sant'ana ACP, Gregghi SLA, Zangrando MSR. Bone graft and substitutes associated with titanium dome for vertical bone formation in osseointegrated implants: Histomorphometric analysis in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018; 33: 311-318.
36. Stavropoulos A, Kostopoulos L, Nyengaard J R, Karring T: Deproteinized bovine bone (Bio-Oss[®]) and bioactive glass (Biogran[®]) arrest bone formation when used as an adjunct to guided tissue regeneration (GTR). An experimental study in the rat. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 636–643.
37. D. Rickert, J. J. R. Huddleston Slater, H. J. A. Meijer, A. Vissink, G. M. Raghoobar: Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2012; 41: 160–167.
38. Iannou AL, Kotsakis GA, Kumar T, Hinrichs JE, Romanos G. Evaluation of the bone regeneration potential of bioactive glass in implant site development surgeries: a systematic review of the literature. *Clin Oral Invest*. DOI 10.1007/s00784-014-1376-1
39. Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, et al: In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dent Mater J* 21:250, 2002
40. Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, et al: Coating of titanium implants with type I collagen. *J Orthop Res* 22:1025, 2004
41. Queiroz, T.P., Souza, F.A., Okamoto, R., Margonar, R., Pereira-Filho, V.A., Garcia-Júnior, I.R. & Vieira E.H. (2008) Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 66: 1233- 1240.

42. Lieberman BJR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *The journal of bone & joint surgery* · JBJS.ORG VOLUME 84-A · NUMBER 6 · JUNE 2002.
43. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)—an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 26 (2005) 2575–2584
44. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. *Endocrine Reviews* 20(3): 345–357

Figuras

Quantidade de Marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de Marcação	-	0
Marcação Leve	+	20 (entre 10 à 30%)
Marcação Moderada	++	60 (entre 50 à 70%)
Marcação Intensa	+++	90 (entre 80 à 100%)

Quadro 1. Quantidade de marcação em escore utilizada para a análise imunohistoquímica.

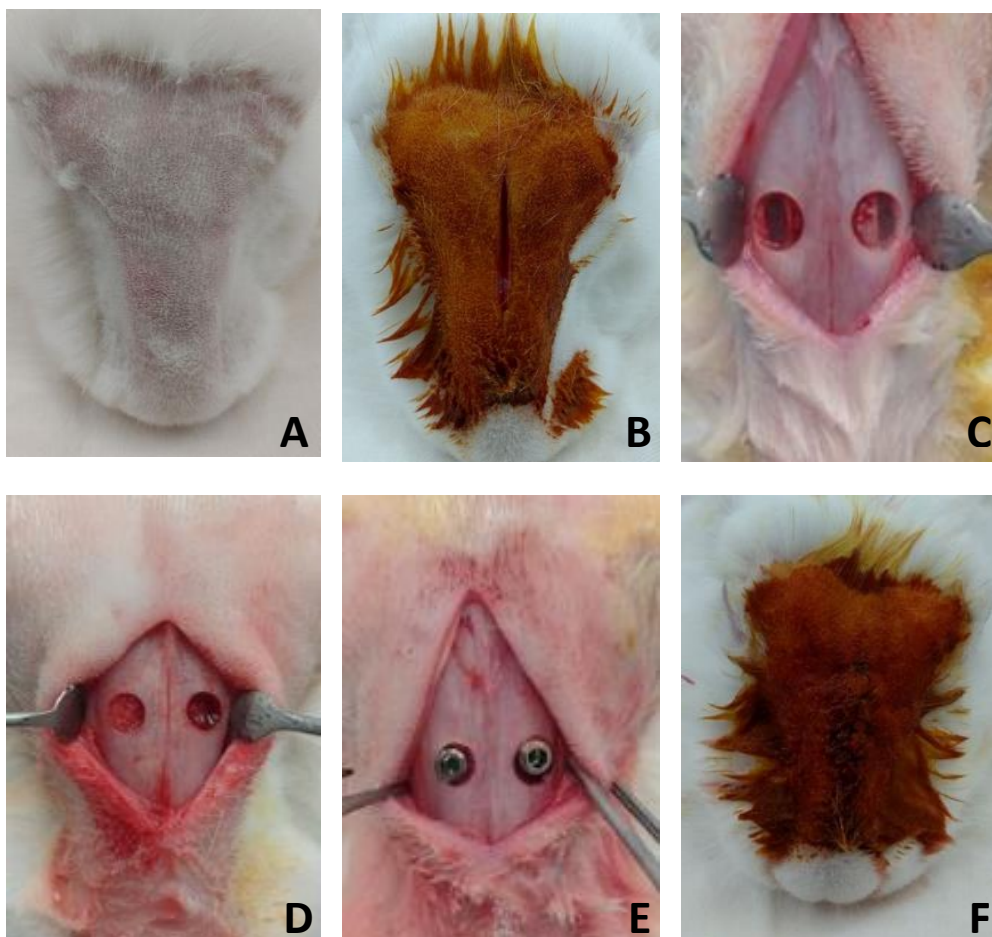


Figura 1: Procedimento cirúrgico de divulsão da membrana sinusal e instalação de implante imediato, bilateralmente. A: Tricotomia, B: Antissepsia e Incisão do dorso nasal. C: Membrana sinusal descolada bilateralmente. D: Biomaterial e coágulo em posição. E: Instalação de implantes imediatos bilateralmente. F: sutura por planos anatômicos.

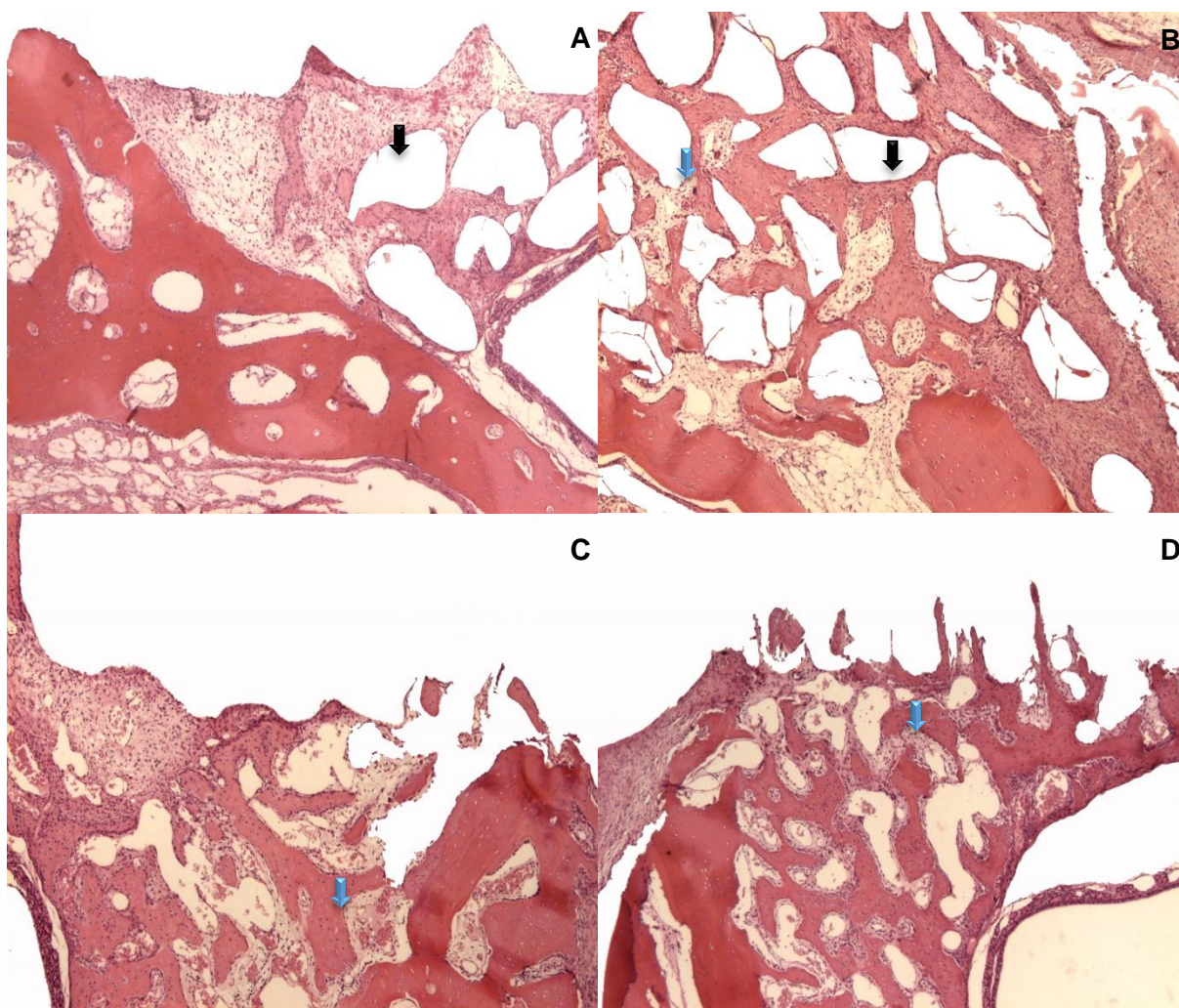


Figura 2. A, B: Corte histológico em HE do grupo GBI aos 7 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 7 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.

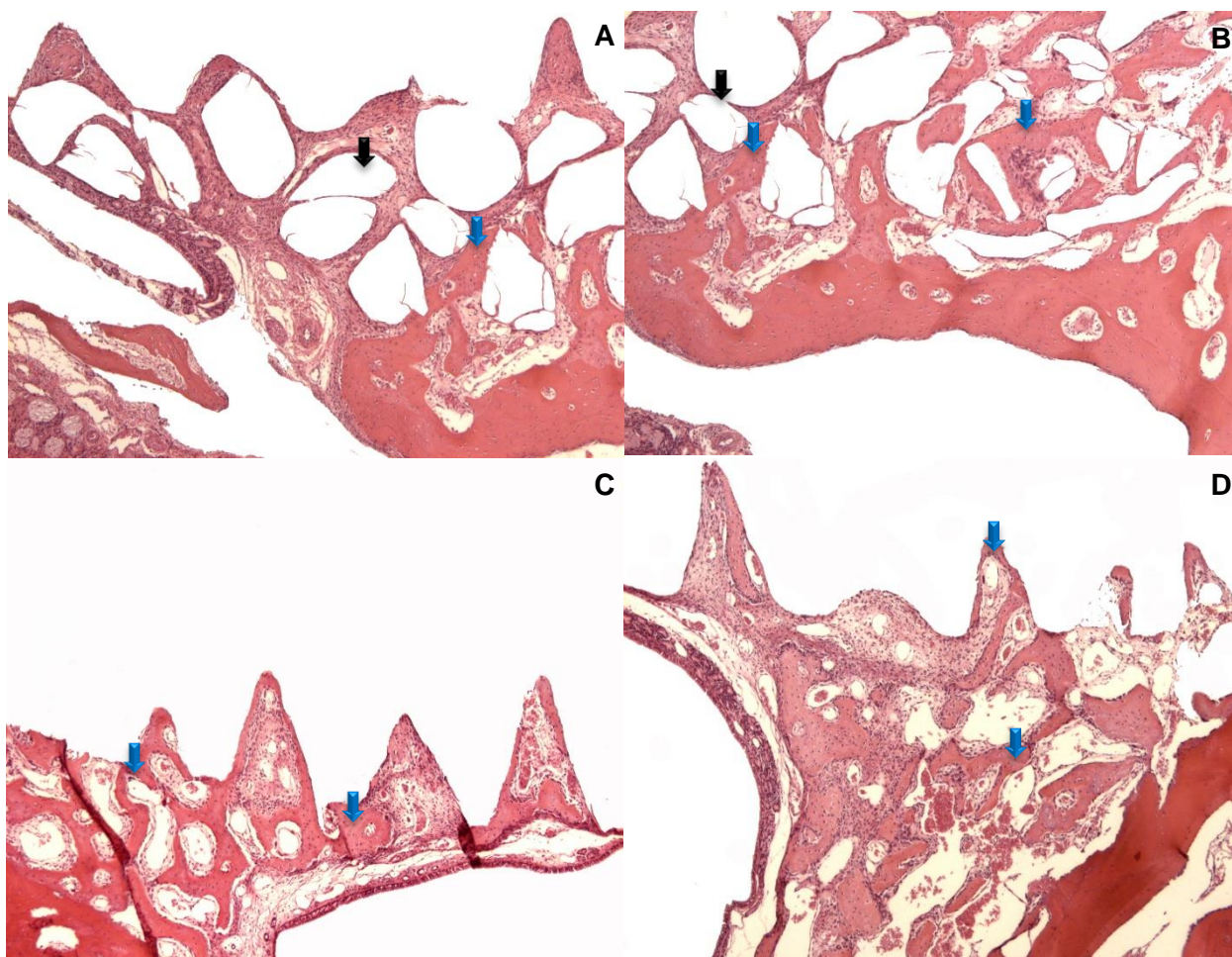


Figura 3. A, B: Corte histológico em HE do grupo GBI aos 15 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 15 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.

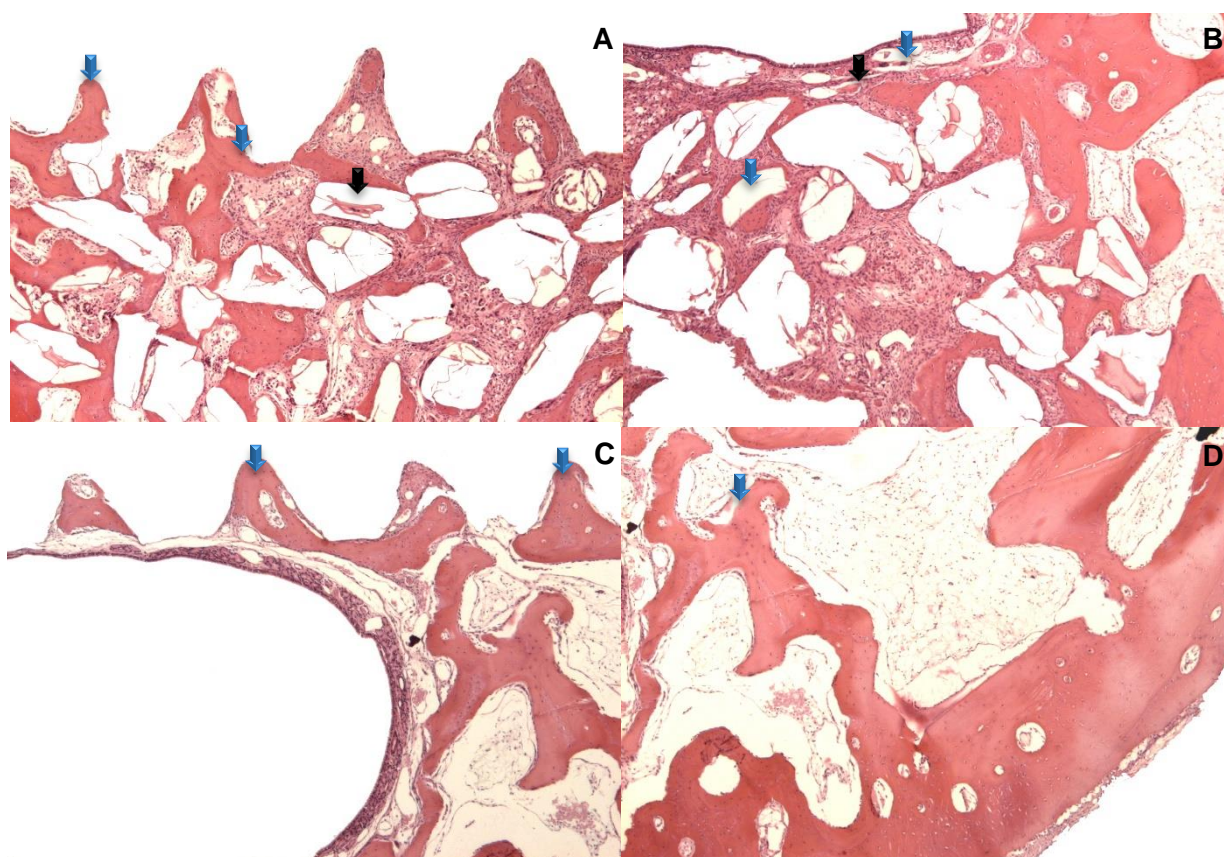


Figura 4. A, B: Corte histológico em HE do grupo GBI aos 40 dias. C e D: Corte histológico do grupo GCI aos 40 dias. As setas pretas indicam a presença dos grânulos do biomaterial Biogran® e as setas em azul indicam tecido ósseo neoformado. Aumento de 6,3x.

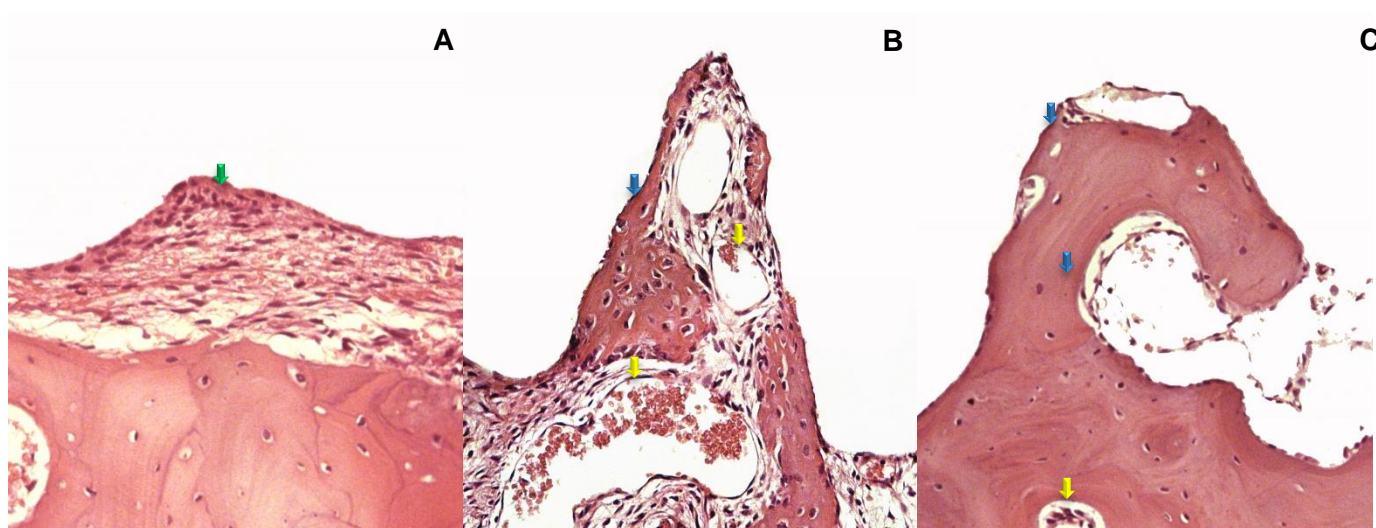


Figura 5. Corte histológico em HE do grupo GCI aos 7 (A), 15 (B) e 40 (C) dias. As em azul indicam tecido ósseo neoformado, em verde indicam deposição de matriz osteoide e em amarelo os vasos sanguíneos. Aumento de 25x.

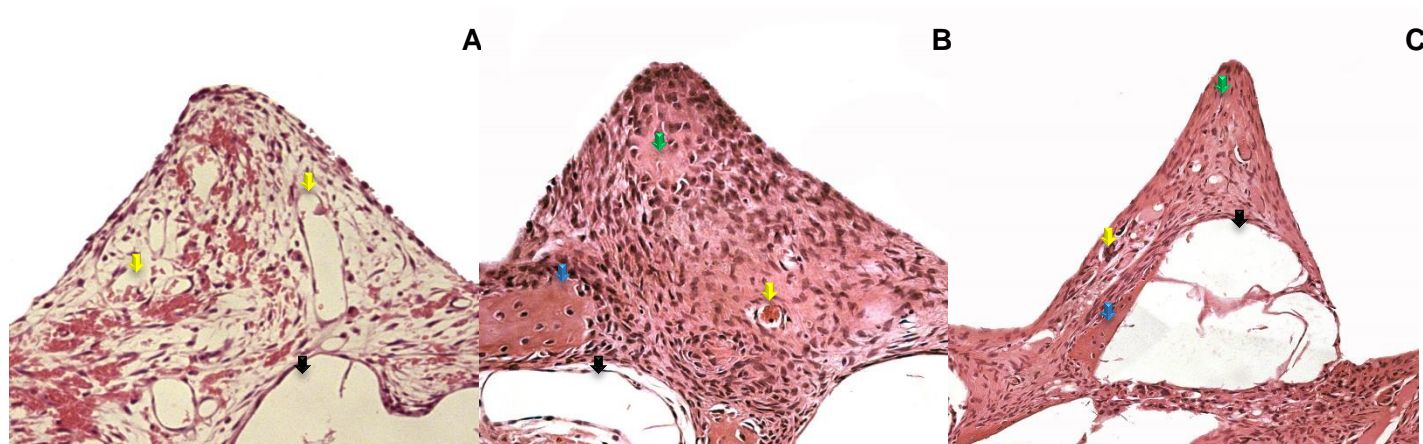


Figura 6. Corte histológico em HE do grupo GBI aos 7 (A), 15 (B) e 40 (C) dias. As em azul indicam tecido ósseo neoformado, em verde indicam deposição de matriz osteoide e em amarelo os vasos sanguíneos. Aumento de 25x.

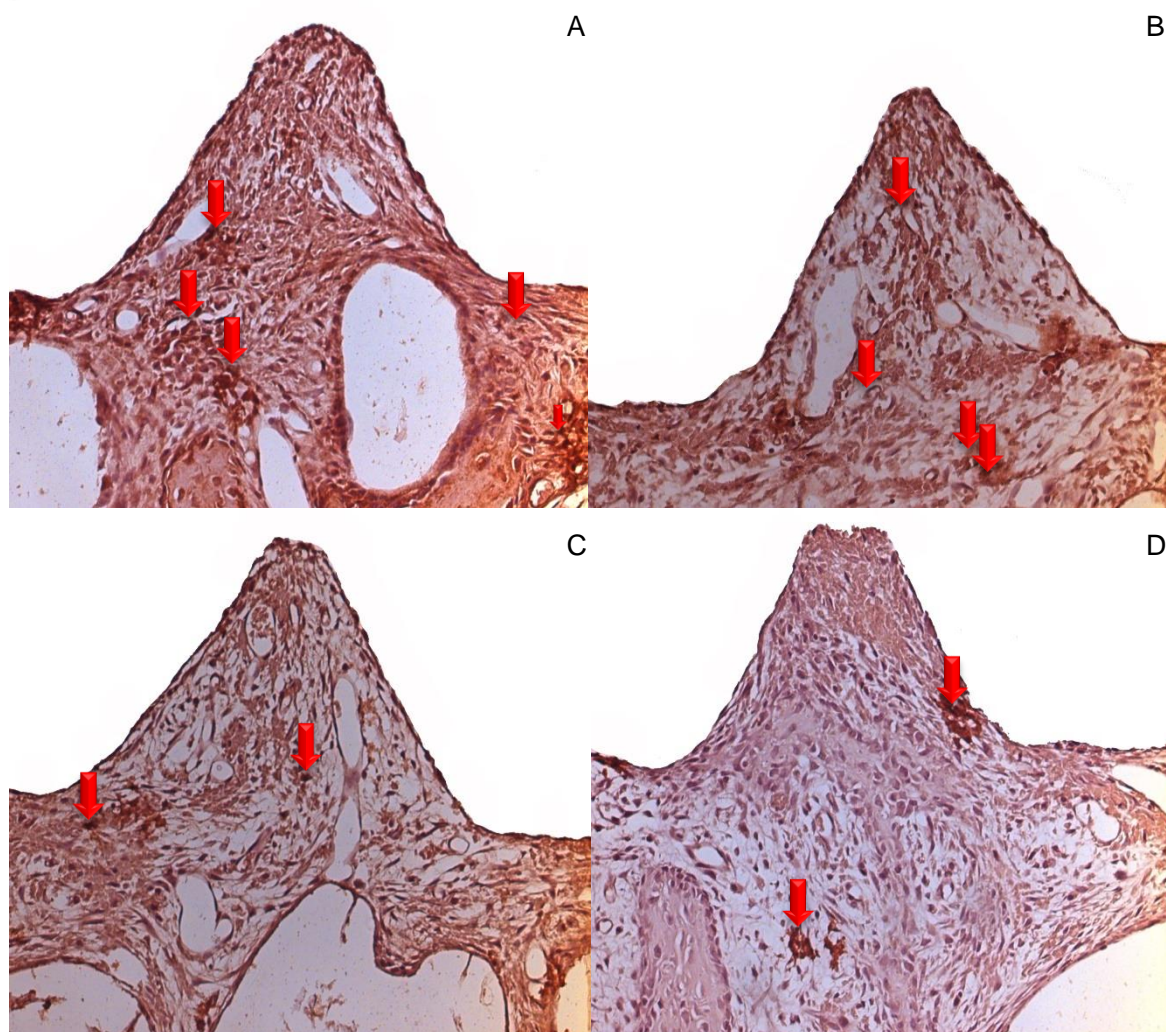


Figura 7. Cortes histológicos com coloração imunohistoquímica do grupo GBI aos 7 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

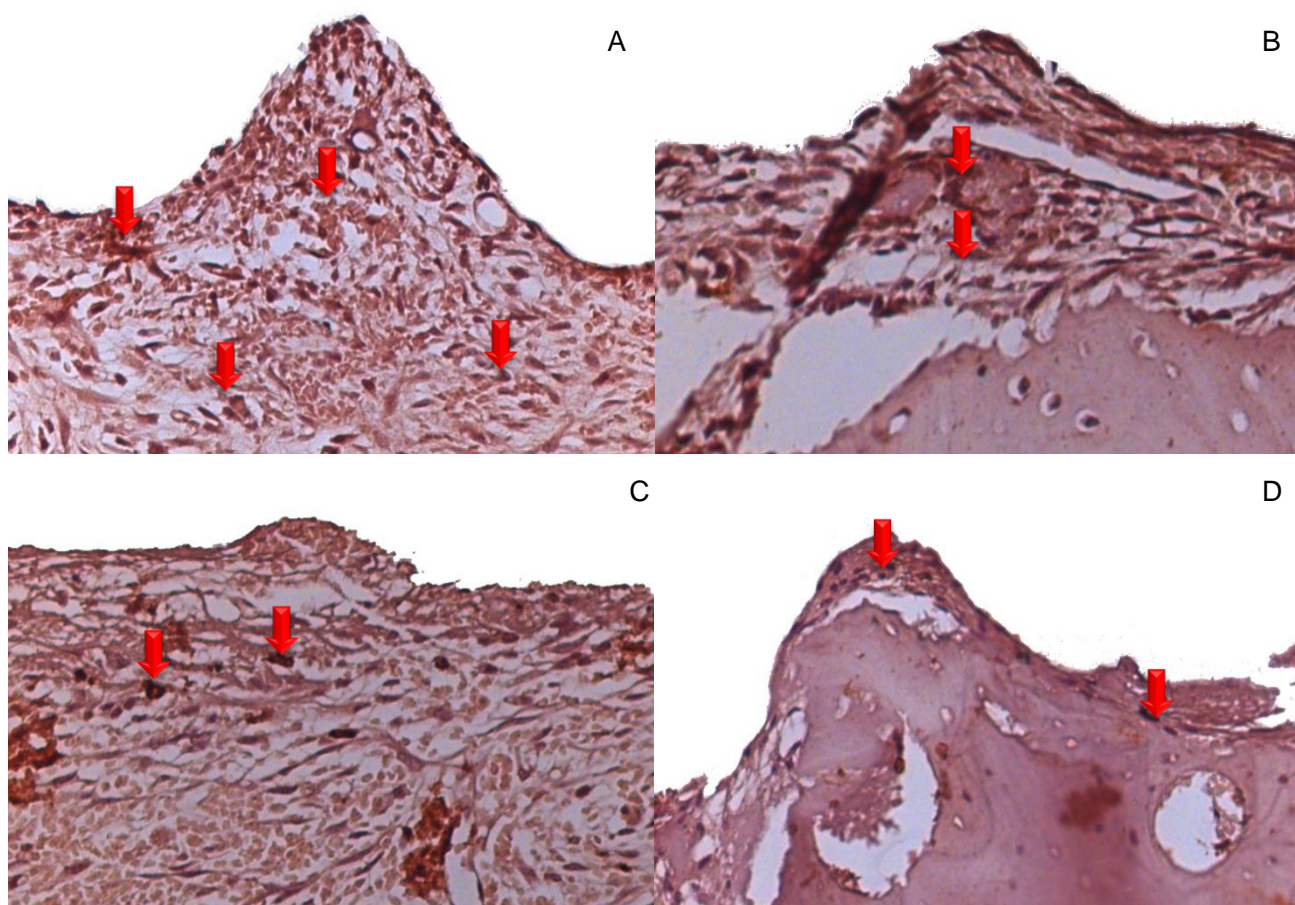


Figura 8. Cortes histológicos com coloração imunohistoquímica do grupo GCI aos 7 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

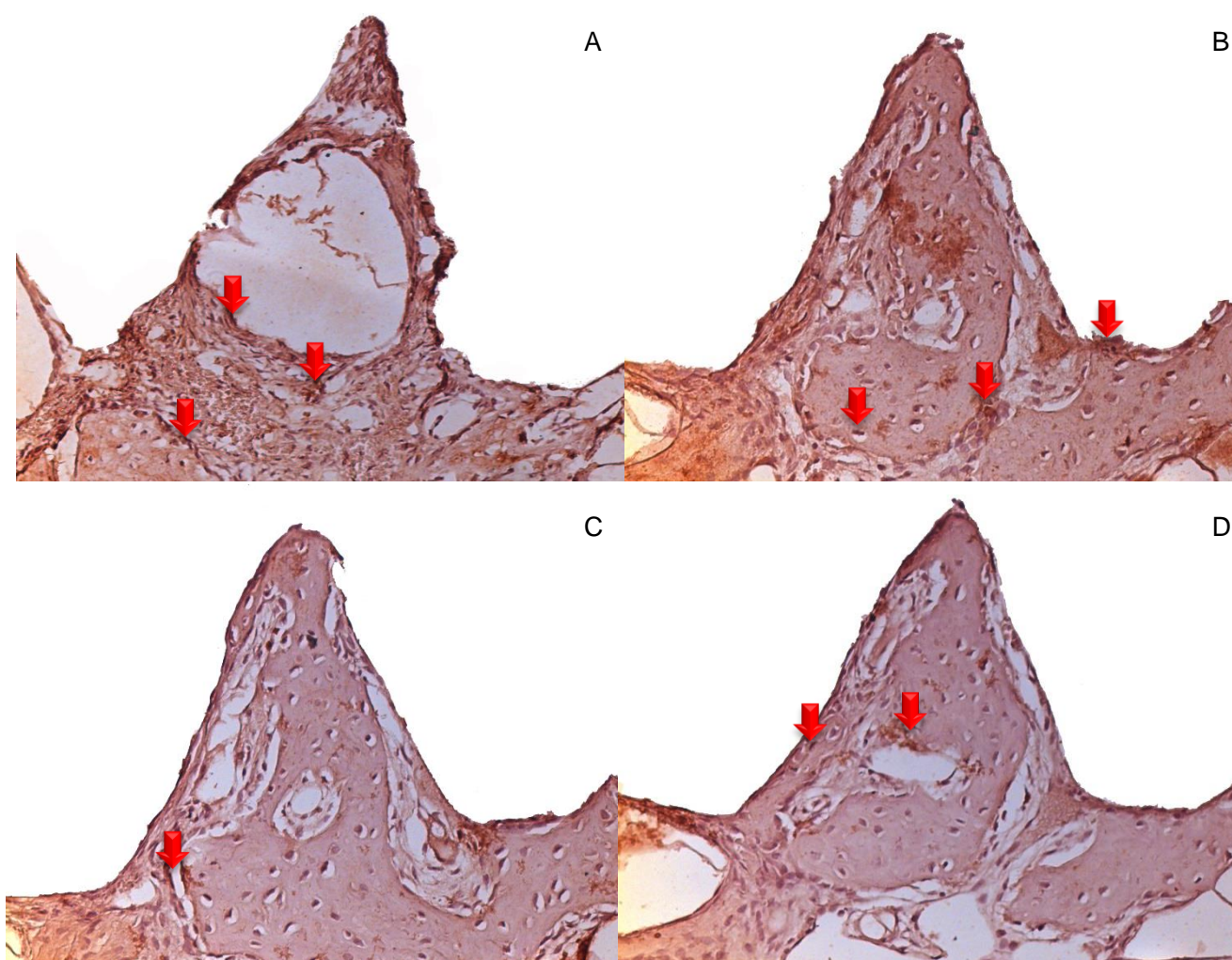


Figura 9. Cortes histológicas com coloração imunoistoquímica do grupo GBI aos 15 dias. A: Marcação moderada para OC. B: Marcação leve a moderada para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve a moderada para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

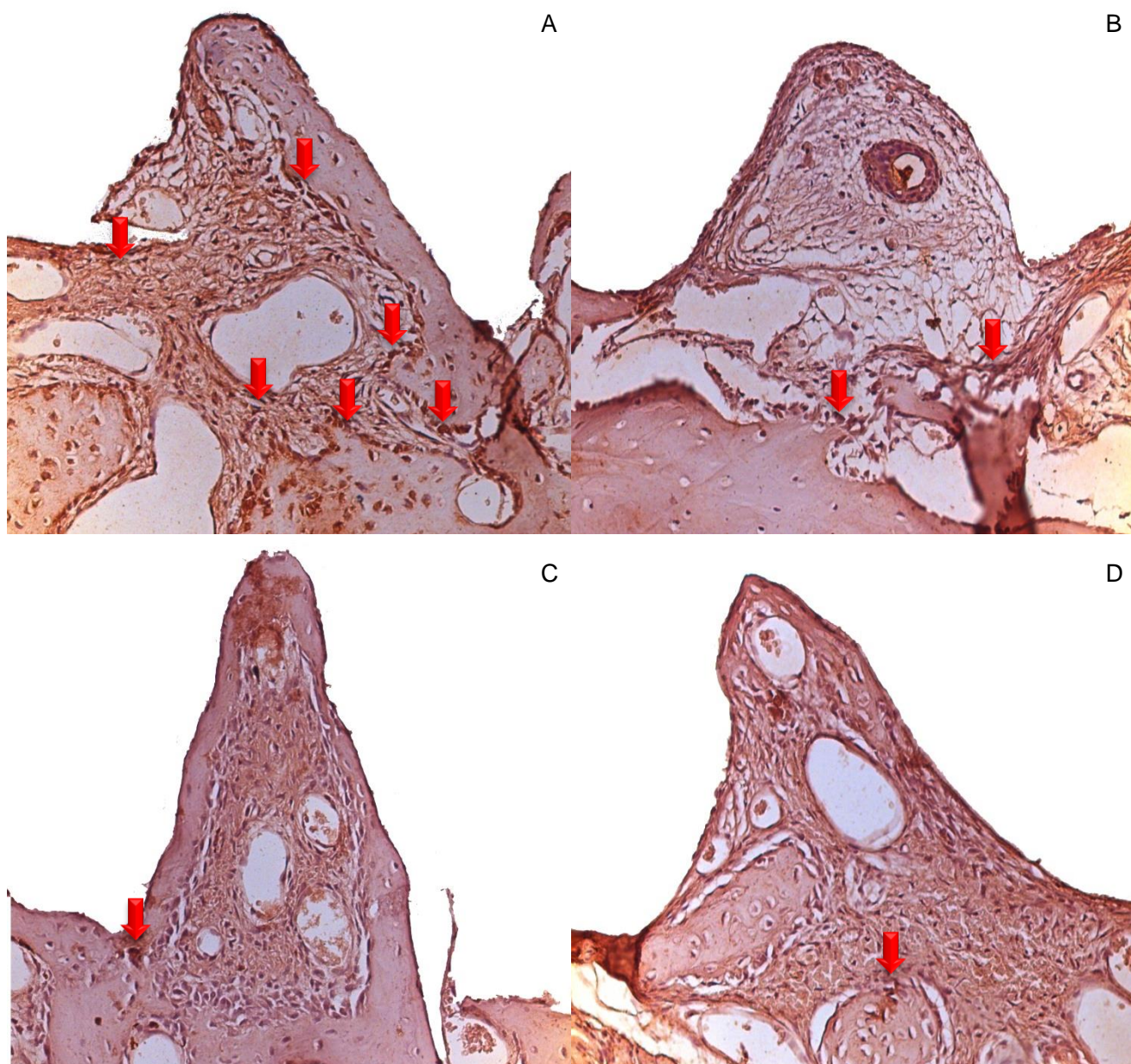


Figura 10. Cortes histológicas com coloração imunohistoquímica do grupo GCI aos 15 dias. A: Marcação intensa para OC. B: Marcação leve para RANKL. C: Marcação leve para TRAP. D: Marcação leve para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

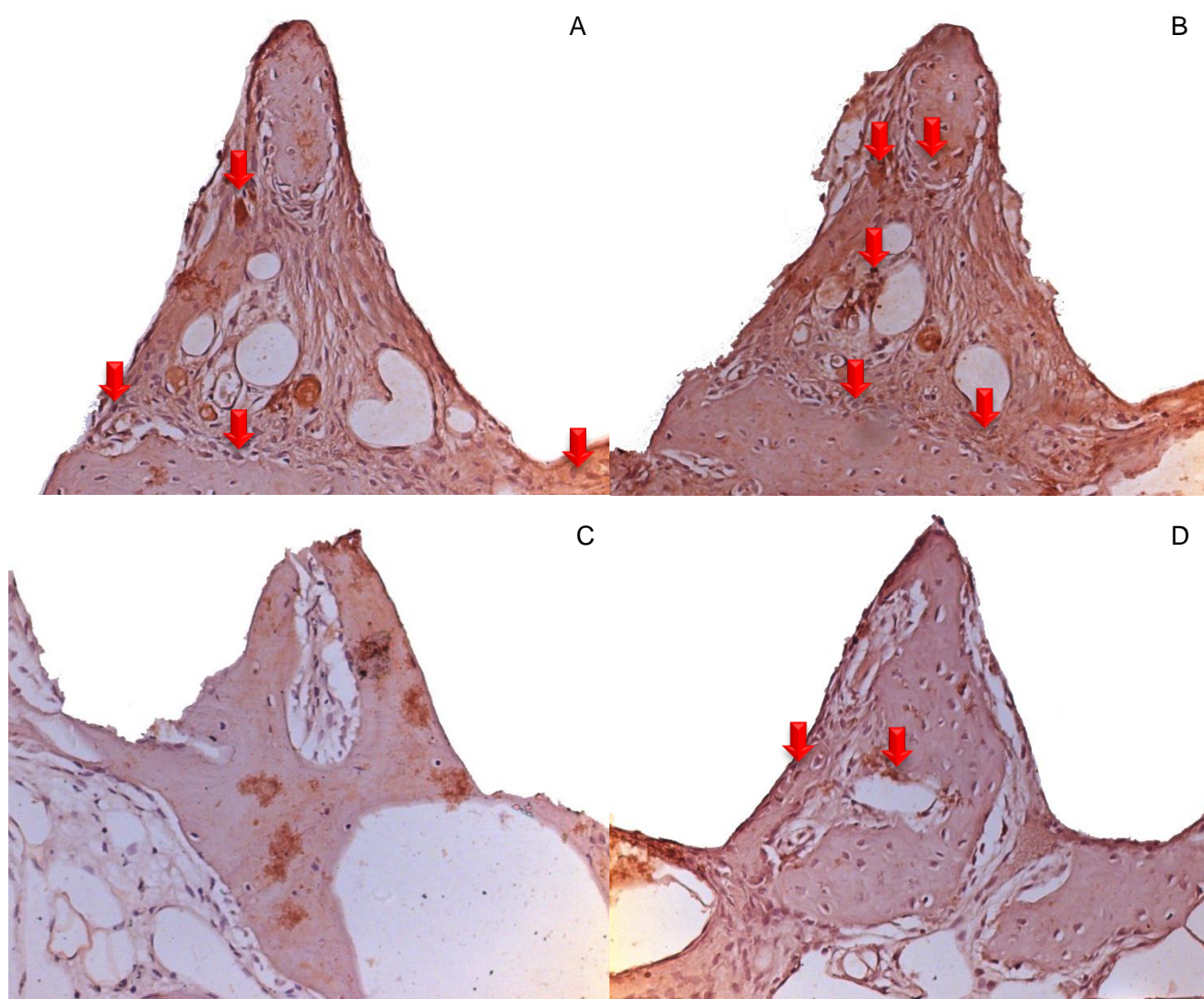


Figura 11. Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GBI aos 40 dias. A: Marcação moderada para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação inespecífica para TRAP. D: Marcação moderada para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

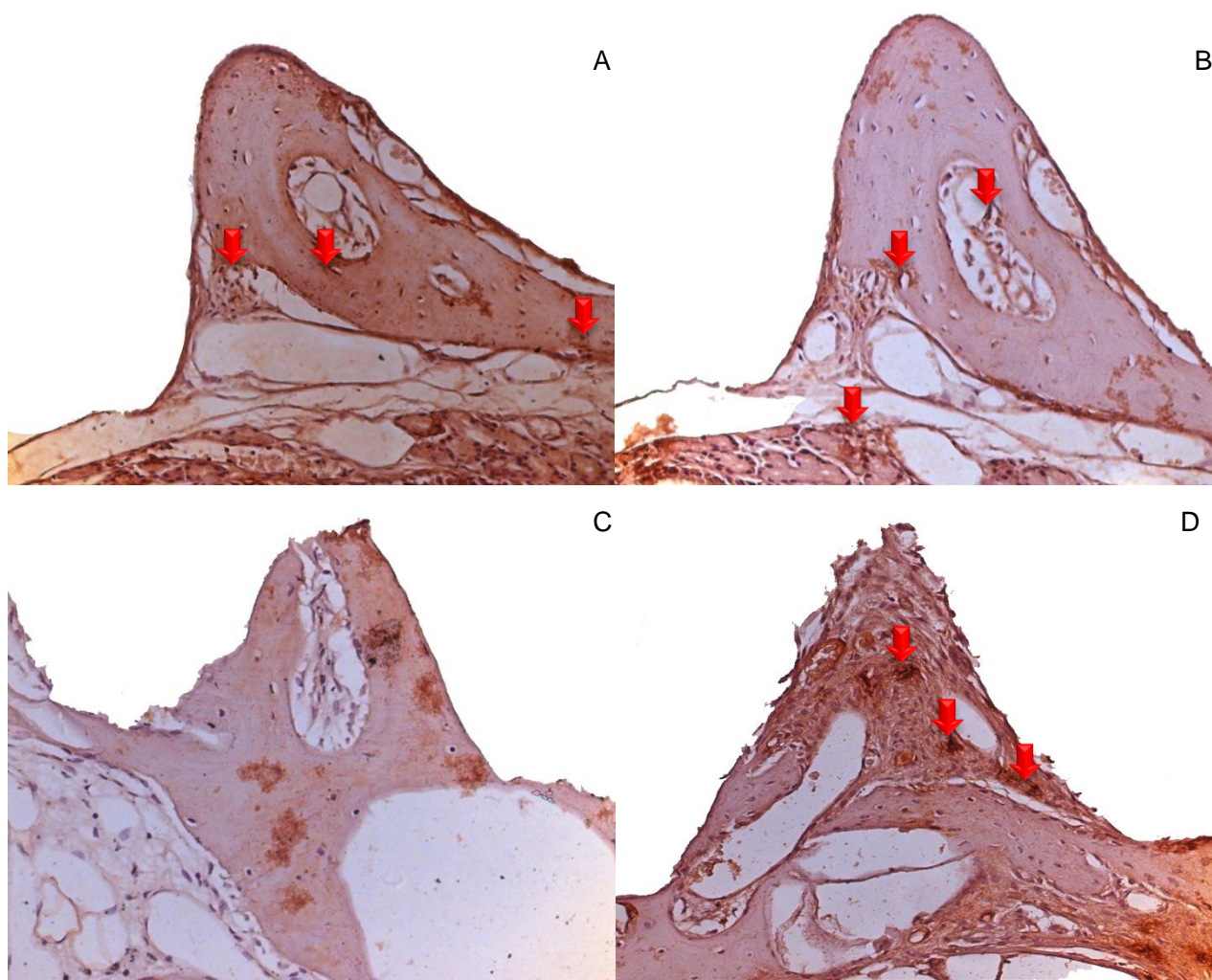


Figura 12. Cortes histológicos com coloração imunoistoquímica do grupo GCI aos 40 dias. A: Marcação moderada a intensa para OC. B: Marcação moderada para RANKL. C: Marcação inespecífica para TRAP. D: Marcação leve para VEGF. As setas vermelhas indicam as imunomarcações. Aumento de 20x.

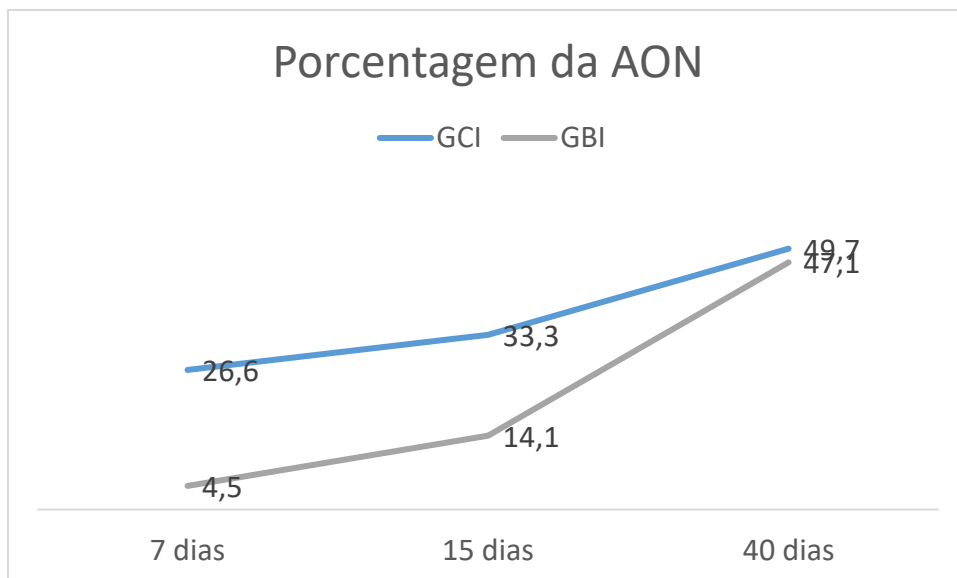


Gráfico 1. Porcentagem da área de osso neoformado nos grupos GCI e GBI aos 7, 15 e 40 dias

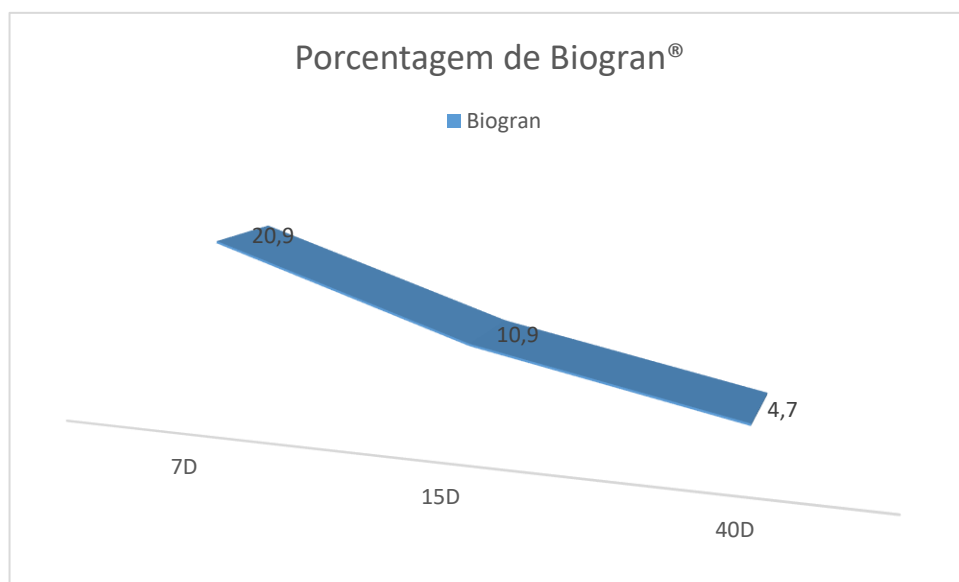


Gráfico 2. Porcentagem de Biogran® aos 7, 15 e 40 dias de reparo.

Área Óssea Neoformada (AON)

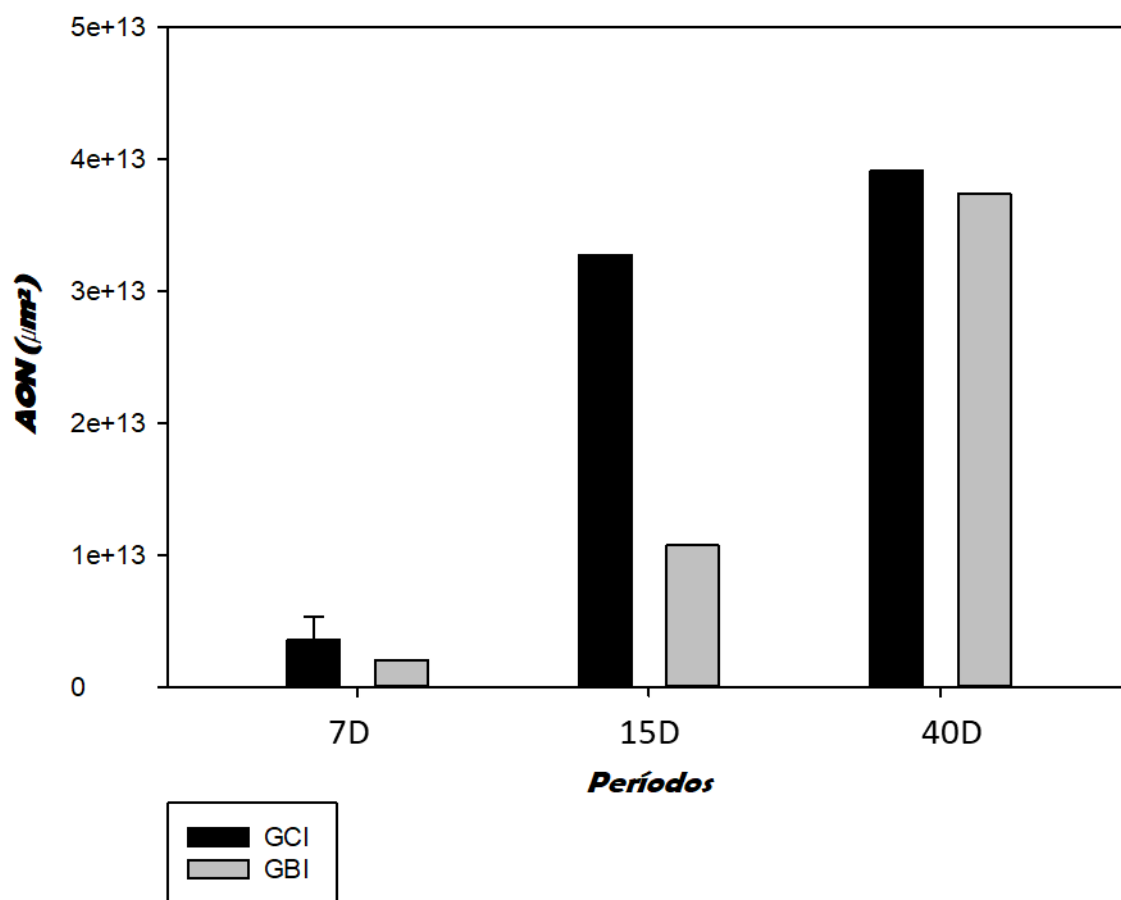


Gráfico 3. Área óssea neoformada e sai relação intergrupos nos períodos de 7, 15 e 40 dias.

AON	GCI	GBI	valor de p
7D	3,55E+11	2,07E+11	0,796
15D	3,27E+12	1,07E+12	0,001
40D	3,91E+12	3,74E+12	0,765

Tabela 1. Porcentagem da área de osso neoformado nos grupos GCI e GBI aos 7, 15 e 40 dias

Grupos/Proteínas	OC	RANKL	TRAP	VGEF
GBI-7D	moderada a intensa	moderada	marcação inespecífica (-)	leve a moderada
GCI-7D	moderada a intensa	moderada	marcação inespecífica (-)	leve
GBI-15D	moderada	leve a moderada	leve	leve a moderada
GCI-15D	intensa	leve	leve	leve
GBI-40D	moderada	moderada	marcação inespecífica (-)	moderada
GCI-40D	moderada a intensa	moderada	marcação inespecífica (-)/ leve	leve

Tabela 2: Scores da imunomarcações das proteínas OC, RANKL, TRAP e VGEF em função dos grupos (GCI e GBI) e períodos (7, 15 e 40 dias)

Anejos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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 guiada com o uso do vidro bioativo "Biogran" e implantes imediatos em levantamento da membrana sinusal. Estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e microtomográfico", Processo FOA nº 00918-2018, 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 13 de Dezembro de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Novembro de 2020.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Dezembro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Guided bone regeneration using bioactive glass "Biogran" and immediate implants in membrane lifting from the maxillary sinus. Experimental study histomorphometric, immunohistochemical and microtomographic", Protocol FOA nº 00918-2018, 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 December 13, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 13, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 13, 2020.


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, 1183 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3635-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo B - Normas para publicação *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*

JOMI

The International Journal of
ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS

GUIDELINES FOR AUTHORS

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi
Manuscripts should be uploaded as a PC 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 concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant 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 board.)

Review/editing of manuscripts.

Manuscripts will be reviewed by the editor-in-chief and will be subjected to blind review by the appropriate associate editor and reviewers 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 biomechanics (FE) articles and 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 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 (on disk) to:

Managing Editor
International Journal of Oral and Maxillofacial Implants
Quintessence Publishing Co, Inc
4350 Chandler Drive
Hanover Park, IL 60133

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) 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.