

João Paulo Bonardi

Estudo comparativo entre o ChronOs® e o Bio-Oss® em procedimentos de elevação da membrana sinusal em seios maxilares de humanos: análise histométrica e imunoistoquímica

Araçatuba – São Paulo

2017

João Paulo Bonardi

Estudo comparativo entre o ChronOs® e o Bio-Oss® em procedimentos de elevação da membrana sinusal em seios maxilares de humanos: análise histométrica 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 Bucocomaxilofacial).

Orientador: Prof. Adj. Eduardo Hochuli Vieira

Coorientadora: Prof. Dr^a. Alessandra Marcondes Aranega

Araçatuba – São Paulo

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B699e Bonardi, João Paulo.
Estudo comparativo entre o ChronOs® e o Bio-Oss® em procedimentos de levacão da membrana sinusal em seios maxilares de humanos : análise histomérica e imunoistoquímica / João Paulo Bonardi. – Araçatuba, 2017
90 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Eduardo Hochuli Vieira
Coorientadora: Profa. Alessandra Marcondes Aranega

1. Seio maxilar 2. Osso autógeno 3. Substitutos ósseos
I. T.

Black D7
CDD 617.64



DEDICATÓRIA



Dedicatória

Eu dedico esta conquista aos amores da minha vida, aos meus alicerces como pessoa e cidadão. Aqueles que fundamentam a minha história: **a Deus e a toda minha família, tanto aos que estão presentes quanto aos que nos deixou saudades.**

Em especial,

Ao meu avô “Miro” (Valdomiro Bonardi), um homem especial, um exemplo de vida a ser seguido. O senhor nos ensinou a humildade, honestidade, companheirismo, sempre ajudar ao próximo quando tiver oportunidade e a ter calma para encarar os obstáculos, pois tudo nessa vida se resolve de um jeito ou de outro.

À minha avó “Tilde” (Anezia Erotides de Souza Manoel), uma mulher guerreira, trabalhadora, sempre disposta a ajudar a todos. Obrigado por todo carinho e dedicação e por sempre acreditar em meu potencial.

À minha avó “Lena” (Maria Helena Manoel Bonardi), mulher forte, religiosa, sempre disposta a ajudar. A senhora me ensinou a amar e acreditar em Deus, que me ajuda a cada dia. Suas orações tem muita força!!! Obrigado por sempre rezar por mim e por sempre estar torcendo por minhas vitórias.

Ao meu pai (Valdomiro Bonardi Júnior), meu herói, um homem honesto e trabalhador, amoroso com sua família, sempre a defendendo de tudo e de todos. O senhor me ensinou a ser um homem honesto, com caráter e dignidade.

À minha mãe (Eliana dos Santos Bonardi), sempre dedicada à família principalmente a seus filhos. A senhora me ensinou a amar e acreditar em meus sonhos.

À minha irmã (Viviane Bonardi Andreoli), que sempre torceu pelas minhas conquistas. Além de minha irmã, você sempre foi minha amiga e companheira.

À minha esposa (Fabiula Favareto), mulher de coragem, caráter, guerreira, amorosa e um exemplo de mãe. Você é o meu porto seguro, o alicerce para as minhas conquistas. Sempre me apoiando, me incentivando e acreditando em meu potencial. Obrigado por existir em minha vida!

Ao meu filho (João Lucas Bonardi), Meu pequeno, tão carinhoso, arteiro e carismático. Você é a melhor coisa que aconteceu em minha vida! Meu estímulo para querer ir além.

Amo muito a todos vocês!



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

Ao Pai Celestial (o nosso Deus) que a cada dia me mostra o caminho a ser seguido, que é árduo, repletos de obstáculos, mas me dá forças para sempre superá-los e seguir em frente. Obrigado meu Deus por proporcionar mais esta conquista!

Ao meu orientador, Prof. Adj. Eduardo Hochuli Vieira. Grande professor e cirurgião. Sempre atencioso e disposto a ajudar no que for preciso. Obrigado por toda a confiança e dedicação.

Ao Prof. Leonardo Perez Faverani. Seu nome seria a definição ideal para palavra Professor. Sempre humilde, paciente e disposto a ajudar a qualquer aluno a qualquer momento. Me inspiro no senhor e se um dia eu chegar próximo ao seu nível como professor, estarei mais que satisfeito. Obrigado por toda ajuda, ensinamentos, orientações, amizade e parceria.

Ao Prof. Glaykon Alex Vitti Stabile. Exemplo de honestidade, homem muito correto, responsável e dedicado. Me inspiro no senhor como cirurgião, sempre estudioso e corajoso. O senhor me iniciou na CTBMF, obrigado por todos ensinamentos durante o meu período de residência em Londrina, no qual eu cresci muito, não só em termos de cirurgia, mas em responsabilidade e dedicação.

A Profa. Cecília Luiz Pereira Stabile. Mulher inteligente e esforçada. A senhora sempre me deu apoio e orientou nos artigos que escrevi durante o meu período de residência, a senhora me ensinou a gostar de escrever e isto está gerando frutos que tem me ajudado muito em meu mestrado e tenho certeza que me ajudará também no

doutorado e em toda minha carreira acadêmica. Obrigado por todo ensinamento e por toda a paciência para ensinar.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba: Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Osvaldo Magro Filho, Roberta Okamoto, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Àvila Souza, pela amizade desfrutada em nosso departamento. Recebam o meu carinho e admiração.

Ao amigo Rodrigo dos Santos Pereira, por toda as dicas, parceria e ajuda não só neste mais em muitos outros trabalhos.

Aos amigos Leonardo de Freitas Silva, Valthierre Nunes de Lima, Erik Neiva Ribeiro de Carvalho Reis, Gustavo António Correa Momesso, Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira e Igor de Oliveira Putini, por toda ajuda e parceria em vários trabalhos que graças a Deus geraram algumas publicações.

Aos amigos da pós-graduação do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA: André Fabris, Sabrina, Ricardo, Jhonatam, Sormani, Juliana Zorzi, Tarik, Willian, Heldo, Cristian, Julierme, Eduardo, Mônica, Caru, Jarede, Ana Paula, Gabriel Mulinari, Fábio, André Oliva e Ciro, por toda ajuda e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado durante os dois anos do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do Mestrado.



AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Escola Estadual Dolores Belem Novaes e aos meus professores de colegial, que proporcionaram o início de meus estudos e tem uma parcela em minha formação

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela oportunidade de realização do curso de graduação e minha iniciação na Odontologia.

À Clínica Odontológica Universitária e Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná – UEL e aos professores da Residência em CTBMF, pela oportunidade de realização do curso de residência e ter me iniciado na CTBMF.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e por todo o acolhimento que faz nos sentir em casa desde a primeira semana.

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do Mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela prontidão em nos atender e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Marco, Paulo, Renato). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação de Odontologia, nas demais áreas, pelo respeito e ajuda.

Aos pacientes, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente. Minha eterna gratidão.





Epígrafe

“Nada é impossível para aquele que persiste.”

(Alexandre O grande)

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)





LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

Figura 1 - Boxplot dos resultados da área de osso neoformado em porcentagem. Nota-se que os grupos C e CA são os grupos que apresentaram os resultados mais próximos do grupo controle (grupo A) e os grupos B e BA foram os grupos que apresentaram as menores taxas de neoformação óssea em comparação ao grupo A, com diferença estatisticamente significativa. 53

Figura 2 - Boxplot dos resultados da área de Biomateriais em porcentagem. Nota-se que os grupos B e BA foram os grupos que apresentaram o maior número de partículas de biomateriais remanescentes quando comparado aos outros grupos e o grupo BA é o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa para os grupos A, C e CA. 54

Figura 3 - Resultado da área de tecido mole. Nota-se que numericamente os grupos que apresentaram a maior quantidade de tecido mole foram os grupos C e CA. Foi encontrado diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos C e B. 55

Figura 4 - Nota-se formação de tecido ósseo entremeado por tecido conjuntivo organizado, hipervasculizado com áreas de neoformação óssea em seu interior com grau adiantado de mineralização, por meio de osteócitos aprisionados na matriz

extracelular. (Fotomicrografia do osso autógeno, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina).

56

Figura 5 –Nota-se neoformação óssea (TO) ora com maior maturação, mostrando organização lamelar, ora osso com menor grau de maturação, ambas com osteócitos na matriz extracelular. De uma forma geral, as lâminas mostraram áreas sugestivas da presença de partículas do biomaterial, sendo reabsorvidas e permitindo neoformação óssea na periferia, foi notado tecido conjuntivo entre os focos de neoformação de tecido ósseo e partículas do biomaterial. (Fotomicrografia do Chronos, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina).

57

Figura 6 –Nota-se partículas de osso autógeno com osteoplastos vazios. Grande parte do tecido ósseo neoformado encontra-se em maturação, com poucos osteócitos na matriz extracelular. No tecido conjuntivo notou-se áreas de neoformação de tecido ósseo. (Fotomicrografia do Chronos+Autógeno, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina).

58

Figura 7 – Nota-se permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial envolta por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo em desenvolvimento com focos de infiltrado inflamatório. (Fotomicrografia do Bio Oss aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina).

59

Figura 8 –Nota-se presença de grande quantidade de partículas de biomateriais envolto por neoformação óssea e tecido conjuntivo organizado com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório. (Fotomicrografia do Bio Oss+Autógeno, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina).

60

Figura 9 – Imunomarcações para RUNX2, aumento de 250X. Em “A” grupo ChronOs® + Autógeno , apresentando marcação moderada.

61

Figura 10 – Imunomarcações para RUNX2, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, em “C” Bio-Oss®, em “D” grupo Bio-Oss® + Autógeno, apresentando marcação fraca.

62

Figura 11 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Em “A” grupo ChronOs® + Autógeno, em “B” grupo Bio-Oss®, apresentando marcação intensa.

63

Figura 12 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, apresentando marcação moderada.

64

Figura 13 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Grupo Bio-Oss® + Autógeno, apresentando marcação fraca.

65

Figura 14 - Imunomarcações para Osteocalcina, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, em “C” grupo ChronOs® + Autógeno, em “D”

grupo Bio-Oss®, em “E” grupo Bio-Oss® + Autógeno. Todos apresentando marcações intensas.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Apresentação da mediana das áreas de osso neoformado e remanescentes de materiais de enxertia presentes na histoméria

47

Tabela 2. Apresentação da média e desvio padrão da área de tecido mole presente na histometria.

48

Tabela 3. Resultado do teste de Tukey para área de neoformação óssea identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

49

Tabela 4. Resultado do teste de Tukey para área de Biomaterial remanescente identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

50

Tabela 5. Resultado do teste de Tukey para área de tecido mole identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

51

Tabela 6. Resultado das imunomarcações para a Runx 2, VEGF e Osteocalcina.

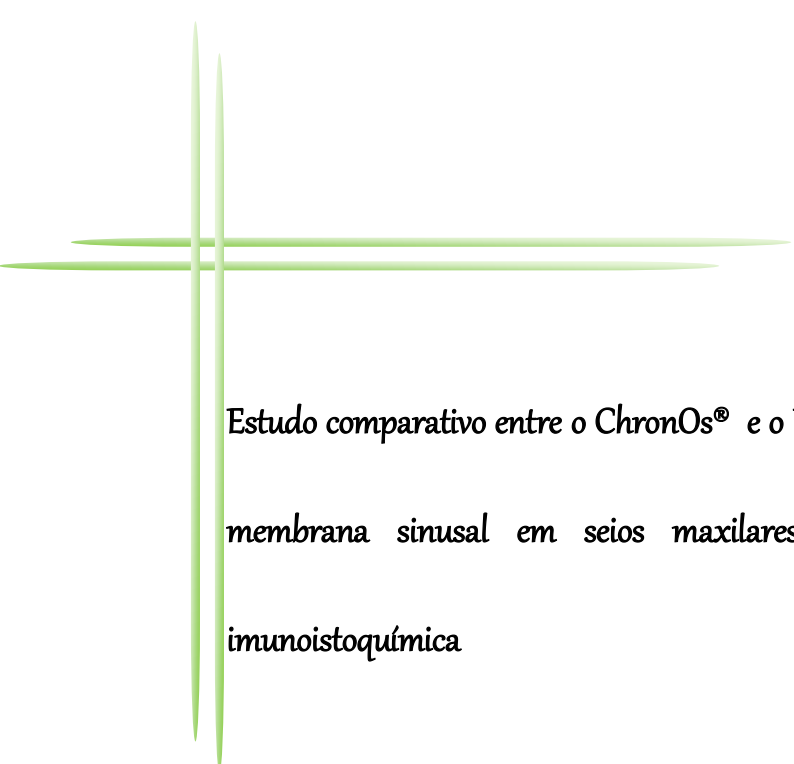
52

Lista de Abreviaturas

A	= Grupo Autógeno
B	= Grupo Bio-Oss®
BA	= Grupo Bio-Oss®+Autógeno
C	= Grupo ChronOs®
CA	= Grupo ChronOs®+Autógeno

Sumário

1. Estudo comparativo entre o ChronOs® e o Bio-Oss® em procedimentos de elevação da membrana sinusal em seios maxilares de humanos: análise histométrica e imunoistoquímica	21
1.1 Resumo	22
1.2 Abstract	24
1.3 Introdução	26
1.4 Matodologia	27
1.5 Resultados	35
1.6 Discussão	36
1.7 Referências	41
1.8 Anexos	67



Estudo comparativo entre o ChronOs® e o Bio-Oss® em procedimentos de elevação da membrana sinusal em seios maxilares de humanos: análise histométrica e imunoistoquímica

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

Bonardi JP. Estudo comparativo entre o ChronOs[®] e o Bio-Oss[®] em procedimentos de elevação da membrana sinusal em seios maxilares de humanos: análise histométrica e imunoistoquímica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

1.1 Resumo

Objetivos: Comparar através de análise histométrica e imunoistoquímica o comportamento do ChronOs[®] (β -TCP) e do Bio-Oss[®] (Osso bovino inorgânico) puros e misturados ao osso autógeno na proporção 1:1 em seios maxilares de humanos.

Metodologia: 30 pacientes foram convidados para participar deste trabalho, resultando em 30 seios enxertados com osso autógeno puro (grupo A (controle)), ChronOs[®] puro (grupo C), ChronOs[®] em adição de osso autógeno na proporção 1:1 (grupo CA), Bio-Oss[®] puro (grupo B) e Bio-Oss[®] em adição de osso autógeno na proporção de 1:1 (grupo BA), onde foram realizadas biopsias 6 meses após a realização desses enxertos e analisadas através de histometria (analisadas através do software ImageJ) e imunoistoquímica (RUNX2, VEGF e Osteocalcina). Os resultados foram tabulados, o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliação da normalidade, em seguida foram aplicados os testes Kruskal-Wallis e Anova 1 fator para os dados paramétricos e não paramétricos sucessivamente e o teste de Tukey como pós teste.

Resultados: Para neoformação óssea o grupo A foi maior que os grupos B e BA e o grupo CA foi maior que o grupo BA ($p < 0,05$). Para os remanescentes de biomateriais o grupo BA apresentou um número maior que os grupos Chronos C, CA e A ($p < 0,05$). Para tecido mole o grupo C foi maior que o grupo B ($p < 0,05$). O resultado das imunomarcações mostrou marcação fraca para RUNX 2 nos grupos A, C, B e BA e marcação moderada para o grupo CA. Marcação intensa para VEGF nos grupos B e CA,

moderada nos grupos A e C e fraca no grupo BA. Para a Osteocalcina houve uma marcação intensa em todos os grupos.

Conclusão: Conclui-se que o Chronos puro ou misturado apresentam comportamento mais próximo ao osso autógeno em termos de quantidade de tecido ósseo neoformado e remanescentes de biomateriais que o Bio Oss puro ou associado ao osso autógeno.

Palavras-chave: Seio Maxilar, Osso Autógeno, Substitutos Ósseos.

Bonardi JP. Comparative study between ChronOs® and Bio-Oss® in procedures of sinus lift in human maxillary sinuses: histometric analysis and immunohistochemistry [dissertation]. Araçatuba: School of Dentistry, São Paulo State University; 2016.

1.2 Abstract

Objectives: To compare the performance of ChronOs® (β -TCP) and Bio-Oss® (Inorganic bovine bone) pure and mixed with autogenous bone in a 1: 1 ratio in maxillary sinuses of humans through histometric and immunohistochemical analysis.

Methodology: 30 patients were invited to participate of this study, resulting in 30 grafted sinuses with pure autogenous bone (group A (control)), pure ChronOs® (group C), ChronOs® in addition 1: 1 autogenous bone (group CA), pure Bio-Oss® (group B) and Bio-Oss® in addition 1: 1 (group BA), which biopsies were performed 6 months after the grafting and analyzed by histology (analyzed using ImageJ software) and immunohistochemistry (RUNX2, VEGF and Osteocalcin). The results were tabulated, the Shapiro-Wilk test was applied to evaluate the normality, then the Kruskal-Wallis and Anova 1 tests were applied for the parametric and non-parametric data and Tukey test as post test was applied.

Results: The group A was higher than B and BA groups, and the group CA was higher than the BA group ($P < 0.05$). For the remainder of biomaterials, BA group presented a higher number than Chronos C, CA and A groups ($P < 0.05$). For soft tissue, group C was greater than group B ($P < 0.05$). The immunolabeling results showed poor labeling for RUNX 2 in groups A, C, B and BA and moderate labeling for CA group. Intense labeling

for VEGF in B and CA groups, moderate in groups A and C and weak in BA group. For Osteocalcin, there was an intense marking in all groups.

Conclusion: It was concluded that pure or mixed Chronos present behavior closer to the autogenous bone in terms of amount of neoformed bone tissue and biomaterial remnants than the pure or mixed Bio Oss.

Key-words: Maxillary Sinus, Autogenous Bone, Bone Substitute.

1.3 Introdução

O edentulismo é uma condição generalizada na população idosa, independentemente do sexo^{1,2}. A perda dentária, comumente leva à atrofia permanente do processo alveolar², que se agrava nas regiões posteriores de maxila onde soma-se a pneumatização do seio maxilar³. Essa condição torna-se desafiadora para a instalação de implantes, exigindo algumas manobras cirúrgicas como: enxertos em bloco (onlay), abordagens cirúrgicas modificadas para a inserção de implantes em regiões de baixa densidade óssea e enxertos sinusais por meio do levantamento cirúrgico do seio maxilar⁴.

Boyne & James⁵, desenvolveram o acesso lateral ao seio maxilar utilizando como material de enxertia o osso autógeno. O osso autógeno é considerado o padrão ouro, pois é o único que apresenta a capacidade de ser osteogênico, osteoindutor e osteocondutor^{6,7}, porém sua disponibilidade é limitada para grandes reconstruções e necessita de um segundo sítio cirúrgico para sua remoção^{8,9}. Na limitação do osso autógeno, biomateriais alógenos, xenógenos e aloplásticos demonstram-se promissores para o restabelecimento da dimensão óssea maxilar posterior^{10,11,12}.

O Beta-tricálcio fosfato (β -TCP) $[Ca_3(PO_4)_2]$ é um material aloplástico, osteocondutor, apresentando rápida reabsorção em meio biológico^{13,14,15}. A literatura relata bons resultados usando β -TCP como material de enxertia sinusal, porém a previsibilidade do material em grande parte ainda é desconhecida^{16,17}. O ChronOs® (Synthes - Rio Claro/SP) é uma de suas marcas comerciais com uma estrutura porosa definida e homogênea. A porosidade aumenta a área de superfície acelerando o

processo de reabsorção do material, além de possibilitar a circulação de fluidos biológicos e a penetração de células, levando a formação vascular e ao crescimento ósseo¹⁸.

O osso bovino inorgânico é um material xenógeno e uma das marcas comerciais frequentemente utilizadas em levantamentos cirúrgicos de seios maxilares é o Bio-Oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça)¹⁹, onde sua matriz inorgânica apresenta uma estrutura microporosa semelhante ao osso humano medular²⁰. Essa morfologia, assim como a do β -TCP, favorece a proliferação de vasos sanguíneos e a imigração de células ósseas através do sistema de poros interconectantes²¹. Estudos comparativos entre o osso bovino inorgânico e o β -TCP são escassos na literatura²².

O objetivo deste estudo foi comparar por meio de análise histométrica e imunohistoquímica o comportamento do ChronOs® e do Bio-Oss® puros e associados ao osso autógeno na proporção 1:1 em seios maxilares de humanos.

A hipótese nula é que não haveria diferença entre os biomateriais testados para o parâmetro de porcentagem de neoformação óssea, tecido conjuntivo e remanescentes de biomateriais.

1.4 Metodologia

Este estudo foi realizado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" com aprovação do comitê de ética e pesquisa em humanos, número 47711015.4.0000.5420.

Os critérios de inclusão para este estudo foram pacientes que apresentavam edentulismo na região de maxila posterior, com altura óssea menor que 5 mm, necessitando de enxertia sinusal para instalação de implantes dentais.

Os critérios de exclusão foram pacientes com comprometimento sistêmicos ou locais não controlados, fumantes e pacientes submetidos a radiação na região da cabeça e pescoço.

30 pacientes foram convidados a participar do estudo onde 30 seios maxilares foram enxertados, os quais receberam enxertos com osso autógeno, ChronOs® e Bio-Oss®. Os grupos foram divididos igualmente por seios maxilares (n= 6 para cada grupo), onde receberam enxerto ósseo autógeno (grupo A (grupo controle)), ChronOs® puro (grupo C), ChronOs® com adição de osso autógeno na proporção de 1:1 (grupo CA), Bio-Oss® puro (grupo B) e Bio-Oss® com adição de osso autógeno na proporção 1:1 (grupo BA). A escolha do material a ser enxertado em cada seio foi de forma aleatória. Para todos os pacientes, foram realizadas tomografias computadorizadas cone beam pré-operatória, para avaliar o seio maxilar, região retromandibular e a sínfise mandibular, determinando a altura óssea na região posterior de maxila e o volume ósseo dos sítios doadores do enxerto ósseo autógeno.

Procedimento cirúrgico

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

Coleta do enxerto ósseo autógeno

A eleição para o sítio doador foi de acordo com o volume ósseo da sínfise e do ramo, quando ambos possuíam volume ósseo favorável a área de preferência era o ramo mandibular. O osso da região sinfisária foi acessado através de uma incisão na mucosa labial com extensão de canino a canino até o músculo mental. Após a lâmina foi direcionada para o osso, incisando músculo e perióstio. O retalho foi descolado com um descolador de Molt No. 9 (Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brazil) expondo a região. A osteotomia foi realizada com uma broca 701 (KG Sorensen; Cotia, SP, Brazil) sob constante irrigação com solução salina a 0.9% (Darrow; Rio de Janeiro, RJ, Brazil). A região retromolar foi acessada através de um acesso intra-oral similar ao da osteotomia sagital, osteotomizado com uma broca 701 e removido com um cinzel. Os blocos ósseos foram triturados por um particulador ósseo (Neodent; Curitiba, PR, Brazil).

Procedimento de elevação da membrana sinusal

Os seios maxilares foram enxertados de acordo com o procedimento de Boyne e James⁵. Com uma lâmina nº 15 (Solidor® - Barueri, SP, Brazil) acoplada a um cabo de bisturi, uma incisão crestal foi realizada no osso maxilar para exposição da parede óssea lateral. Após, com uma broca diamantada esférica nº 8 (KG Sorensen - Cotia, SP, Brazil) sob irrigação copiosa com soro fisiológico 0.9% (ADV - Nova Odessa, SP, Brazil), uma fenestração foi feita para acesso à membrana do seio maxilar e elevadores de membrana sinusal (Neodent - Curitiba, PR, Brazil) foram utilizados para o cuidadoso

processo de elevação da mesma assim os enxertos ósseos propostos foram inseridos no local.

Coleta das amostras

As amostras dos enxertos sinusais foram coletadas aos 6 meses pós-operatório por meio de tráfina de 3mm de diametro nos locais de instalação dos implantes.

Foi realizada uma incisão sobre o rebordo posterior da maxila e o retalho foi descolado com um descolador de Molt No. 9 (Golgran; São Caetano do Sul, SP, Brazil) expondo a região. Foi utilizada uma brocas trefina de 3.0 mm de diâmetro externo (MK Life – Porto Alegre,RS, Brasil) e as amostras foram acondicionadas em solução de formalina tamponada 10%, PH = 7, por 48 horas.

Processamento histológico

Após o período de 48 horas de acondicionamento em formaldeído 10%, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas e então foi iniciada a descalcificação das mesmas por meio solução de EDTA 4,13% (Preparo da solução de EDTA: em um litro de tampão fosfato, pH 7,2, diluir os solutos EDTA (41,3 g) e NaOH (4,4 g). Foram colocadas individualmente em frascos plásticos com solução de EDTA e mantidos sob refrigeração a 4°C. A solução de EDTA foi trocada semanalmente durante todo o período de descalcificação (aproximadamente sete semanas) até que fosse identificada a descalcificação necessária. Esta identificação foi feita por método mecânico simples (penetração, sem resistência, de uma agulha anestésica odontológica na peça anatômica).

Em seguida, as peças descalcificadas passaram pelo processo de diafanização, realizado seguindo a seqüência de álcoois e xilol descrita a seguir: álcool 70% - 1 hora, álcool 80% - 1 hora, álcool 90% - 13 horas, álcool 95% - 1 hora, álcool 100% (primeira etapa) – 1 hora, álcool 100% (segunda etapa) – 1 hora, álcool 100% (terceira etapa) – 1 hora; álcool associado à xilol – 20 minutos; xilol (passo I) – 20 minutos, xilol (passo II) – 20 minutos, e na seqüência foram incluídas em parafina.

Os cortes foram feitos com uma espessura de 5µm com navalhas de aço 18 cm (Leica) e corados em hematoxilina e eosina seguindo metodologia descrita a seguir: Inicialmente foram dissolvidos a hematoxilina (5g) em 50ml de álcool absoluto e 100g de alúmen de potássio em um litro de água destilada quente. Ambas as soluções foram misturadas entre si e, posteriormente, acrescentou-se 2,5g de óxido vermelho de mercúrio até a solução final obter coloração púrpura escura. Depois de preparada, a solução de hematoxilina 0,5% foi rapidamente resfriada e filtrada, estando, assim, própria para o uso. Para o preparo da eosina foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se a hematoxilina por 10g de eosina, obtendo-se, ao final, uma solução de eosina a 1%. Para a coloração das lâminas com HE (hematoxilina e eosina) realizaram-se as seguintes etapas na seqüência de 1 a 20: 1- Xilol I por 10 minutos; 2- Xilol II por 10 minutos; 3- Álcool 100% I por 1 minuto; 4- Álcool 100% II por 1 minuto; 5- Álcool 100% III por 1 minuto; 6- Álcool 95% por 1 minuto; 7- Álcool 75% por 1 minuto; 8- Água corrente rapidamente; 9- Hematoxilina por cerca de 5 minutos; 10- Água corrente até clarear; 11- Eosina por cerca de 30 segundos; 12- Água corrente rapidamente; 13- Álcool 95% I rápido; 14- Álcool 95% II rápido; 15- Álcool 100% I por 30 segundos; 16- Álcool 100% II por 30 segundos; 17- Álcool 100% III por 30 segundos; 18- Xilol I por 5

minutos; 19- Xilol II por 5 minutos; 20- Montagem da lâmina (1 ou 2 gotas de bálsamo “Permout” sobre a lâmina e sobreposição da lamínula).

Análise histométrica

Foram obtidos 4 cortes de cada peça. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para a análise morfológica da neoformação do tecido ósseo, dos remanescentes dos biomateriais e do tecido mole (tecido conjuntivo e coágulo sanguíneo) no seio maxilar dos pacientes estudados. As lâminas foram codificadas em 3 áreas da amostra: próxima ao leito receptor; intermediária e apical (próxima a membrana do seio maxilar)²³. Estas foram examinadas através de um microscópio de luz com objetiva de 12,5X por um único avaliador. As imagens das lâminas foram obtidas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador com software analisador de imagens digitalizadas, Axio Vision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG. A avaliação histométrica foi realizada utilizando o software ImageJ 150e (National Institutes of Health, Maryland,USA), sempre com aumento original. A área de neoformação óssea, dos biomateriais remanescentes e do tecido mole foi calculada para cada área da amostra (leito receptor, intermediário e apical) e somadas obtendo-se a área representativa total da amostra.

Análise Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pela técnica da imunoperoxidase endógena. Anticorpos primários policlonais produzidos em cabras para Runx2 (Goat anti- Runx2 – Santa Cruz Biotechnology, SC8566), VEGF (Goat anti- VEGF - Santa Cruz Biotechnology, SC1881) e Osteocalcina (Goat anti-Osteocalcina – Santa Cruz Biotechnology, SC18319) foram utilizados para investigar o comportamento dos biomateriais em relação as reações reparacionais do tecido ósseo: atividade osteoblástica (Runx2), angiogênica (VEGF) e mineralização/maturação do tecido ósseo (osteocalcina).

Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos contra IgG de cabra biotilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo).

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

mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo Avidina-biotina (Strept ABCComplex/HRP-Vector) por 45 min.

As áreas avaliadas das amostras seguiram o mesmo padrão da análise histométrica: leito receptor, intermediário e apical. O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente como relatado por Manrique *et al*.²⁴ atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os scores foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado.

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados no programa Sigma Plot 12.3 (Graphys and Data Analysis, San Jose, CA, USA). Foi adotado como nível de significância $p < 0.05$ para todos os testes. O teste estatístico para avaliação da normalidade foi o de Shapiro-Wilk, que mostrou dados não paramétricos para neoformação óssea e biomaterial e paramétrico para tecidos moles. Após os testes de normalidade foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para osso neoformado e biomaterial e o teste Anova 1 fator para tecido mole, que identificaram diferença estatisticamente significativa entre grupos para todas as análises, o que permitiu a aplicação de pós-teste Tukey .

1.5 Resultados

Os resultados histométricos da área de osso e biomaterial podem ser encontrados na Tabela 1 e os resultados da área de tecido mole na Tabela 2. O teste de Tukey indicou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos A vs BA, A vs B e CA vs BA para a neoformação óssea (Tabela 3 e Figura 1), BA vs A, BA vs CA e BA vs C para área de biomaterial (Tabela 4 e Figura 2) e diferença estatística também entre os grupos C vs B para tecido mole (Tabela 5 e Figura 3).

Analisando a histologia das imagens nota-se que o grupo A apresentou formação de tecido ósseo entremeado por tecido conjuntivo organizado, hipervascularizado com áreas de neoformação óssea em seu interior. O tecido ósseo apresentou-se com grau adiantado de mineralização, por meio de osteócitos aprisionados na matriz extracelular (Figura 4).

O grupo C apresentou neoformação óssea ora com maior maturação, mostrando organização lamelar, ora osso com menor grau de maturação, ambas com osteócitos na matriz extracelular. De uma forma geral, as lâminas mostraram áreas sugestivas da presença de partículas do biomaterial, sendo reabsorvidas e permitindo neoformação óssea na periferia, foi notado tecido conjuntivo entre os focos de neoformação de tecido ósseo e partículas do biomaterial (Figura 5).

Na maioria das lâminas analisadas no grupo CA, foram notadas partículas de osso autógeno com osteoplastos vazios. Grande parte do tecido ósseo neoformado encontra-se em maturação, com poucos osteócitos na matriz extracelular. No tecido conjuntivo notou-se áreas de neoformação de tecido ósseo (Figura 6).

Para o grupo B foi notada a permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial envolta por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo em desenvolvimento com focos de infiltrado inflamatório (Figura 7).

O grupo BA apresentou grande quantidade de partículas de biomateriais envoltas por neoformação óssea e tecido conjuntivo organizado com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório. Esta associação mostrou em comparação ao Bio Oss puro maior quantidade de tecido conjuntivo e menor formação de tecido ósseo (Figura 8).

A análise imunoistoquímica mostrou marcação moderada para a Runx 2 no grupo CA (Figura 9) e marcação fraca para os demais grupos (Figura 10). Para o VEGF os grupos B e CA tiveram marcações intensas (Figura 11), os grupos A e C tiveram marcações moderadas (Figura 12) e o grupo BA teve marcação fraca (Figura 13). Todos os grupos tiveram marcações intensas para a Osteocalcina (Figura 14/ Tabela 6).

1.6 Discussão

A hipótese nula apresentada neste estudo que não haveriam diferenças entre os grupos experimentais para o padrão de neoformação de tecido ósseo, foi rejeitada. O osso autógeno e o biomaterial Chronos foram estatisticamente superiores no parâmetro de neoformação do tecido ósseo em comparação aos demais grupos analisados.

Gorla *et al.*²⁵ compararam o volume de osso autógeno, β -TCP, e uma mistura dos dois materiais em levantamentos cirúrgicos do seio maxilar por meio de tomografia computadorizada de feixe cônico, e relataram que a taxa de reabsorção

para os três grupos, foi maior para o osso autógeno puro e menor para o β -TCP puro após 6 meses da cirurgia aproximadamente, porém com diferença estatisticamente insignificante, relatando também que mais estudos clínicos, com focos histométricos e imunoistoquímicos são necessários afim de comparar estes materiais qualitativamente. Dos Santos Pereira *et al.*²⁶ relatam na histometria de seu estudo que houve maior taxa de formação óssea para o osso autógeno quando comparado com o β -TCP misturado com o osso autógeno (diferença estatisticamente significativa) e maior taxa de tecido conjuntivo e biomaterial remanescente para o β -TCP misturado com o osso autógeno quando comparado com osso autógeno puro (sem diferença estatisticamente significativa).

No presente estudo, diante dos dados histométricos, taxa de reabsorção de biomaterial do grupo A quando comparado aos grupos que contém o β -TCP corrobora com a literatura apresentada^{25,26}, pois a diferença das taxas de reabsorção não foi estatisticamente significativa entre estes grupos. E diferentemente do estudo de Pereira *et al.*²⁶, este estudo não conseguiu encontrar diferença estatística para a formação óssea entre os grupos A vs CA.

No que diz respeito a reabsorção dos biomateriais puros ou associados ao osso autógeno, é possível afirmar que o β -TCP em curto prazo se assemelha ao osso autógeno puro. Estudo relata que essa semelhança é uma vantagem do biomaterial a outros substitutos ósseos e que essa reabsorção pode indicar uma sobrecorreção em cerca de 40% a mais de biomaterial para obter o resultado esperado²⁵.

Em relação a neoformação óssea, o β -TCP também se assemelhou ao osso autógeno nos resultados encontrados neste estudo, porém há uma tendência a favor do osso autógeno puro ao analisar numericamente a taxa de osso neoformado. Nos estudos encontrados na literatura vigente, em geral o osso autógeno apresenta maior taxa de formação de tecido ósseo quando comparado ao β -TCP misturado ao osso autógeno, com diferença estatisticamente significativa.

Jensen *et al.*²⁷ em uma revisão sistemática relatam que não houve diferença estatisticamente significativa para a neoformação óssea em seios maxilares de humanos na comparação entre os enxertos com Bio Oss puro e misturado com osso autógeno em diferentes proporções e que a quantidade de osso neoformado parece aumentar a longo prazo. De fato, a comparação entre os grupos B vs BA neste estudo também não apresentou diferença estatisticamente significativa, não se pode afirmar neste estudo se a quantidade óssea aumenta ao longo do período pós operatório, pois a análise histológica é limitada há apenas um período de 6 meses. Assim, estudos futuros deverão realizar o acompanhamento deste design experimental no longo prazo.

Em um estudo comparativo entre o Bio Oss e o Ostim (Hidroxiapatia nanocristalina), os autores encontraram 33,13% de resíduos de Bio-Oss após 5 meses de pós-operatório, relatando que a quantidade de osso neoformado é menor que a quantidade de biomaterial residual. No mesmo estudo o Bio Oss apresentou características histológicas com partículas de Bio Oss cercadas de neoformação óssea com áreas de íntimo contato, com ausências de células inflamatórias ou reação de

corpo estranho²⁸. No presente estudo, a relação entre o osso neoformado e biomaterial é bem semelhante tanto para o Grupo B, quanto para BA, porém a quantidade de remanescentes destes biomateriais, 6 meses após sua instalação, é bem significativa, apresentando a maior quantidade de remanescentes do que todos os outros grupos. Em relação á histologia, foi verificado uma semelhança na descrição exceto para o infiltrado de células inflamatórias que estavam presentes em maior quantidade neste estudo.

Ao comparar o β -TCP com osso bovino desproteínizado (ambos puros) em seios maxilares de humanos, Martinez *et al.*²² encontraram diferença estatística somente em termos de tecido mole, embora o β -TCP apresentou-se com uma maior formação óssea e com menor quantidade de remanescentes de biomaterial. Os resultados do presente estudo estão totalmente de acordo com os resultados apresentados por Martinez *et al.*²². Os autores deste trabalho desconhecem estudos publicados comparando o β -TCP mais osso autógeno na proporção 1:1 com o osso bovino desproteínizado mais osso autógeno também na proporção 1:1. Os resultados obtidos neste trabalho a esse respeito são totalmente diferentes dos expressos na comparação entre esses dois biomateriais puros, pois foi encontrada diferença estatisticamente significativa em termos de neoformação óssea e remanescentes de biomateriais, onde o grupo CA apresenta maior neoformação óssea e menor quantidade de resíduos de biomateriais. Em relação ao tecido mole, não foi encontrado diferença estatística entre estes grupos.

Através da histologia apresentada pelos grupos associada à imunohistoquímica, nota-se que todos os grupos, exceto o grupo CA, apresentam-se maduros com áreas de organização lamelar, marcação fraca para a RUNX 2, indicando pouca atividade pré osteoblástica e marcação intensa para a Osteocalcina indicando um alto grau de calcificação/maturação do reparo ósseo. A VEGF teve marcação de moderada a intensa para todos os grupos exceto para o grupo BA, mostrando que quase todos os grupos apresentam estímulo para a proliferação celular. O grupo CA demonstrou-se em estágio de maturação, com poucos osteócitos na matriz extracelular, marcação moderada para a Runx2 demonstrando um nível mais elevado de atividades pré-osteoblástica quando comparado aos outros grupos.

O ChronOs tanto puro quanto misturado se mostrou estatisticamente semelhante ao osso autógeno, sugere-se que este fato esteja relacionado à rápida reabsorção do material que permite a ocupação do espaço pela neoformação de osso, sendo os grupos de maior formação óssea. O Bio Oss demonstrou nível de reabsorção lento e quando associado ao osso autógeno se torna curiosamente o grupo mais discrepante em relação ao grupo Autógeno, apresentando o menor número de neoformação óssea e o maior número de remanescentes de biomaterial. Sugere-se que esse baixo valor de neoformação óssea seja devido a grande presença desses biomateriais que ocupam grande espaço.

Apesar do baixo número de osso neoformado encontrados nos grupos B e BA, e ainda a fraca marcação para a VEGF no grupo associado a autógeno, estudos tem relatado taxas de sucesso de 100% após 2 anos da instalação de implantes em 45 seios

maxilares enxertados com osso bovino desproteínizado associado ao osso autógeno na proporção 1:1²⁹ e taxas de 98,2% após 5 meses da instalação de implantes em seios maxilares de humanos enxertados com osso bovino desproteínizado puro³⁰.

Deste modo, os enxertos Chronos puro, Bio Oss puro e composto de osso autógeno (1:1), após 6 meses do procedimento cirúrgico, se mostram confiáveis para a instalação de implantes.

Assim pode-se concluir que o Chronos puro ou associado apresenta comportamento mais próximo ao osso autógeno em termos de quantidade de tecido ósseo neoformado e remanescentes de biomateriais quando comparado ao Bio Oss puro ou associado, segundo a metodologia empregada.

1.7 Referências

- 1- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014 Jul;93(7 Suppl):20S-28S.
 - 2- Wagner F, Dvorak G, Nemeč S, Pietschmann P, Figl M, Seemann R. A principal components analysis: how pneumatization and edentulism contribute to maxillary atrophy. *Oral Dis.* 2016 Aug 18. doi: 10.1111/odi.12571.
 - 3- Sharan A, Madjar D. Maxillary sinus pneumatization following extractions: a radiographic study. *Int J Oral Implants Maxillofac.* 2008 Jan-Feb; 23 (1): 48-56.
 - 4- Misch CE. *Contemporary implant dentistry*, 3rd ed. St Louis; MO:Elsevier; 2008: 389-402.
-

- 5- Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980;38:613-616.
 - 6- Misch CE. Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;4:49-58.
 - 7- Wood RM, Moore DL. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;3:209-214.
 - 8- Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials.* 1998 Aug;19(16):1419-23.
 - 9- Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris GB, Sbordone C, Piombino P, Guidetti F. Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Oct;38(10):1059-65.
 - 10- Moy PK, Lundgren S, Holmes RE. Maxillary Sinus Augmentation - Histomorphometric Analysis of Graft Materials for Maxillary Sinus Floor Augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:857-862.
 - 11- Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:23-33.
 - 12- Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: Histologic
-

- and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:371-381.
- 13- Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust J-P. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002; 63(4):408-12.
- 14- Ghosh R, Sarkar R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Oct 1;67:345-52.
- 15- Artzi Z1, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 May-Jun;19(3):357-68.
- 16- Okada T, Kanai T, Tachikawa N, Munakata H, Kasugai S. Long-term radiographic assessment of maxillary sinus floor augmentation using beta-tricalcium phosphate: analysis by cone-beam computed tomography. *Int J Implants Dent* 2016 Dec; 2 (1): 8.
- 17- Gorla LF, Spin-Neto R, Boos FB, Pereira Rdos S, Garcia-Junior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Dec;44(12):1486-91.
- 18- Peters F, Reif D. Functional materials for bone regeneration from β -tricalcium phosphate. *Materwiss Werksttech*. 2004; 35:203–7.
-

- 19- Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jan;41(1):114-20.
- 20- Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Götz H, Duschner H, Wagner W. Bestimmung der gröÙe der spezifischen oberfläche von knochenersatzmaterialien mittels gas adsorption. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2000;4:148–52.
- 21- Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol.* 2008;79(7):1232-40.
- 22- Martinez A, Franco J , Saiz E , Guitian F. Maxillary sinus floor augmentation on humans: Packing simulations and 8 months histomorphometric comparative study of anorganic bone matrix and β -tricalcium phosphate particles as grafting materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2010 Jun 15;30(5):763-769
- 23- R.S. Pereira, L.F. Gorla, F.B.J.D. Boos, R. Okamoto, I.R. Garcia Júnior, E. Hochuli-Vieira. 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.*
DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2017.01.002>
- 24- Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015 Jul;19(6):1319-27.
-

- 25- Gorla LF, Spin-Neto R, Boos FB , Pereira RDOS S , Garcia-Junior IR 3, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. . *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015 Dec; 44 (12): 1486-1491.
- 26- Dos Santos Pereira R, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR Jr, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: Analysis of Histometric and Volumetric Changes. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016 Nov/Dec;36(6):885-892.
- 27- Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Mar;23(3):263-73.
- 28- Shirmohammadi A, Roshangar L, Chitsazi MT, Pourabbas R, Faramarzie M, Rahmanpour N. Comparative Study on the Efficacy of Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) and Nanocrystalline Hydroxyapatite (Ostim) in Maxillary Sinus Floor Augmentation. *Int Sch Res Notices*. 2014 Oct 29;2014:967091.
- 29- Galindo-Moreno P1, Padial-Molina M, Fernández-Barbero JE, Mesa F, Rodríguez-Martínez D, O'Valle F. Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables. *Clin implant res Res*. 2010 Feb; 21 (2): 221-7.
- 30- Dinato TR, Grossi ML, Teixeira ER, Dinato JC, Sczepanik FS, Gehrke AS. Marginal Bone Loss in Implants Placed in the Maxillary Sinus Grafted With
-

AnorganicBovineBone: A Prospective Clinical and Radiographic Study. J
Periodontol. 2016 Aug;87(8):880-7.

Tabelas

Tabelas 1. Apresentação da mediana das áreas de osso neoformado e remanescentes de materiais de enxertia presentes na histoméria

Grupos	Mediana Tec. ósseo (μm^2)	Mediana material remanescente (μm^2)
Autógeno	121917,00	2900,50
Bio Oss + Autógeno	56230,50	64753,00
Bio Oss	65717,00	56258,00
Chronos + Autógeno	99205,00	2662,00
Chronnos	83787,00	5291,00

Tabela 2. Apresentação da média e desvio padrão da área de tecido mole presente na histometria.

Grupos	Média (μm^2)	Desvio padrão \pm (μm^2)
Autógeno	67829,00	22984,59
Bio Oss + Autógeno	70203,17	13421,31
Bio Oss	65501,83	6297,59
Chronos + Autógeno	88256,00	21820,57
Chronos	97445,83	18983,26

Tabela 3. Resultado do teste de Tukey para área de neoformação óssea identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tecido ósseo neoformado	
Comparação	P<0,05
Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Sim
Autógeno VS Bio Oss	Sim
Autógeno VS Chronos	Não
Autógeno Vs Chronos+Autógeno	Não
Chronos+Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Sim
Chronos+Autógeno VS Bio Oss	Não
Chronos+Autógeno VS Chronos	Não
Chronos VS Bio Oss+Autógeno	Não
Chronos VS Bio Oss	Não
Bio Oss Vs Bio Oss+Autógeno	Não

Tabela 4. Resultado do teste de Tukey para área de Biomaterial remanescente identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Biomaterial	
Comparação	P<0,05
Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Sim
Autógeno VS Bio Oss	Não
Autógeno VS Chronos	Não
Autógeno Vs Chronos+Autógeno	Não
Chronos+Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Sim
Chronos+Autógeno VS Bio Oss	Não
Chronos+Autógeno VS Chronos	Não
Chronos VS Bio Oss+Autógeno	Sim
Chronos VS Bio Oss	Não
Bio Oss Vs Bio Oss+Autógeno	Não

Tabela 5. Resultado do teste de Tukey para área de tecido mole identificando haver ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tecido mole	
Comparação	P<0,5
Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Não
Autógeno VS Bio Oss	Não
Autógeno VS Chronos	Não
Autógeno Vs Chronos+Autógeno	Não
Chronos+Autógeno VS Bio Oss+Autógeno	Não
Chronos+Autógeno VS Bio Oss	Não
Chronos+Autógeno VS Chronos	Não
Chronos VS Bio Oss+Autógeno	Não
Chronos VS Bio Oss	Sim
Bio Oss Vs Bio Oss+Autógeno	Não

Tabela 6. Resultado das imunomarcações para a Runx 2, VEGF e Osteocalcina.

Imunomarcações			
Grupos	Runx 2	VEGF	Osteocalcina
Autógeno	1	2	3
Bio Oss + Autógeno	1	1	3
Bio Oss	1	3	3
Chronos + Autógeno	2	3	3
Chronos	1	2	3

0= Nenhuma marcação 1= Marcação fraca 2= Marcação moderada 3= Marcação intensa

Figuras

*Diferença estatisticamente significativa

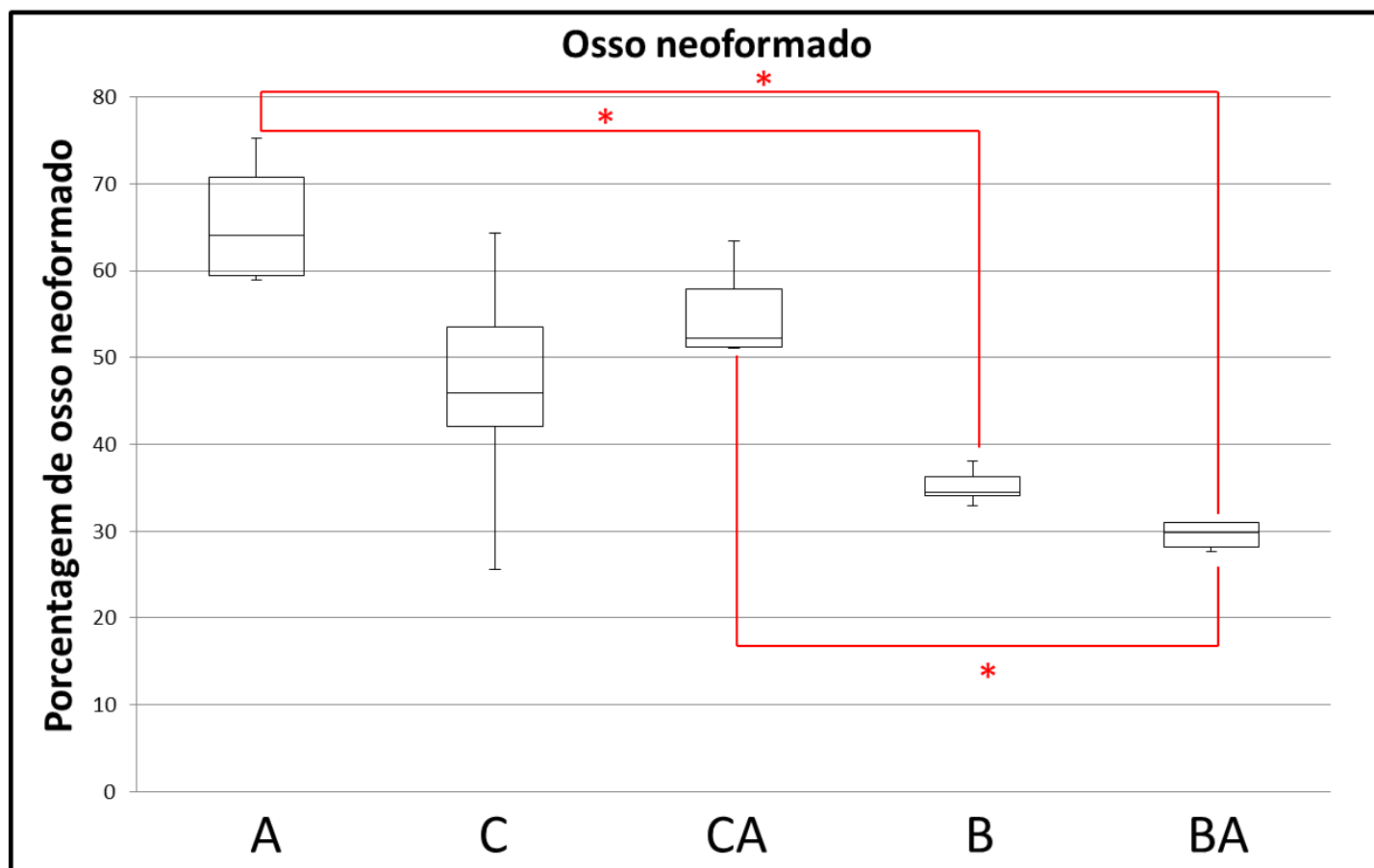


Figura 1 - Boxplot dos resultados da área de osso neoformado em porcentagem. Nota-se que os grupos C e CA são os grupos que apresentaram os resultados mais próximos do grupo controle (grupo A) e os grupos B e BA foram os grupos que apresentaram as menores taxas de neoformação óssea em comparação ao grupo A, com diferença estatisticamente significativa.

*Diferença estatisticamente significativa

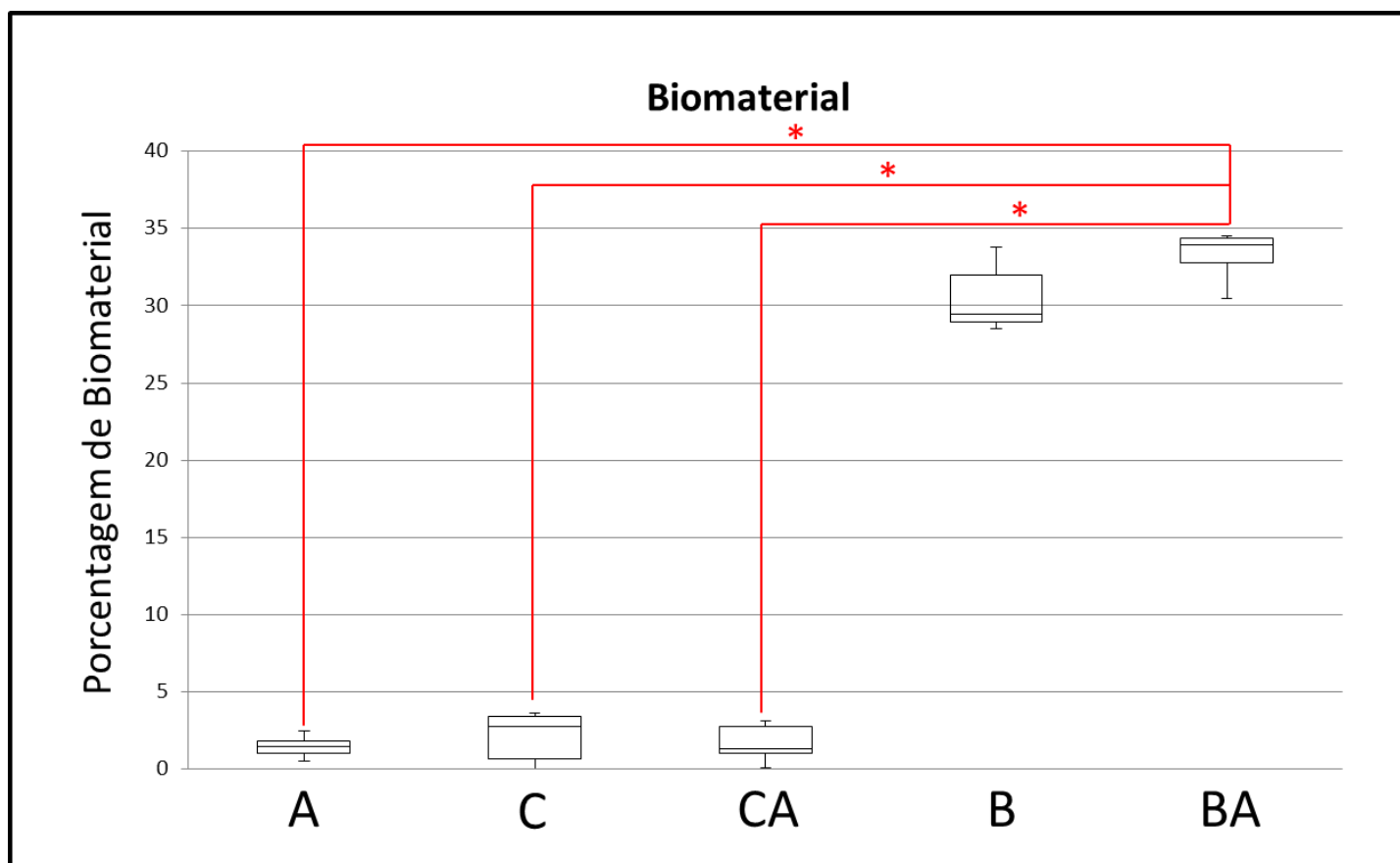


Figura 2. Boxplot dos resultados da área de Biomateriais em porcentagem. Nota-se que os grupos B e BA foram os grupos que apresentaram o maior número de partículas de biomateriais remanescentes quando comparado aos outros grupos e o grupo BA é o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa para os grupos A, C e CA.

*Diferença estatisticamente significativa

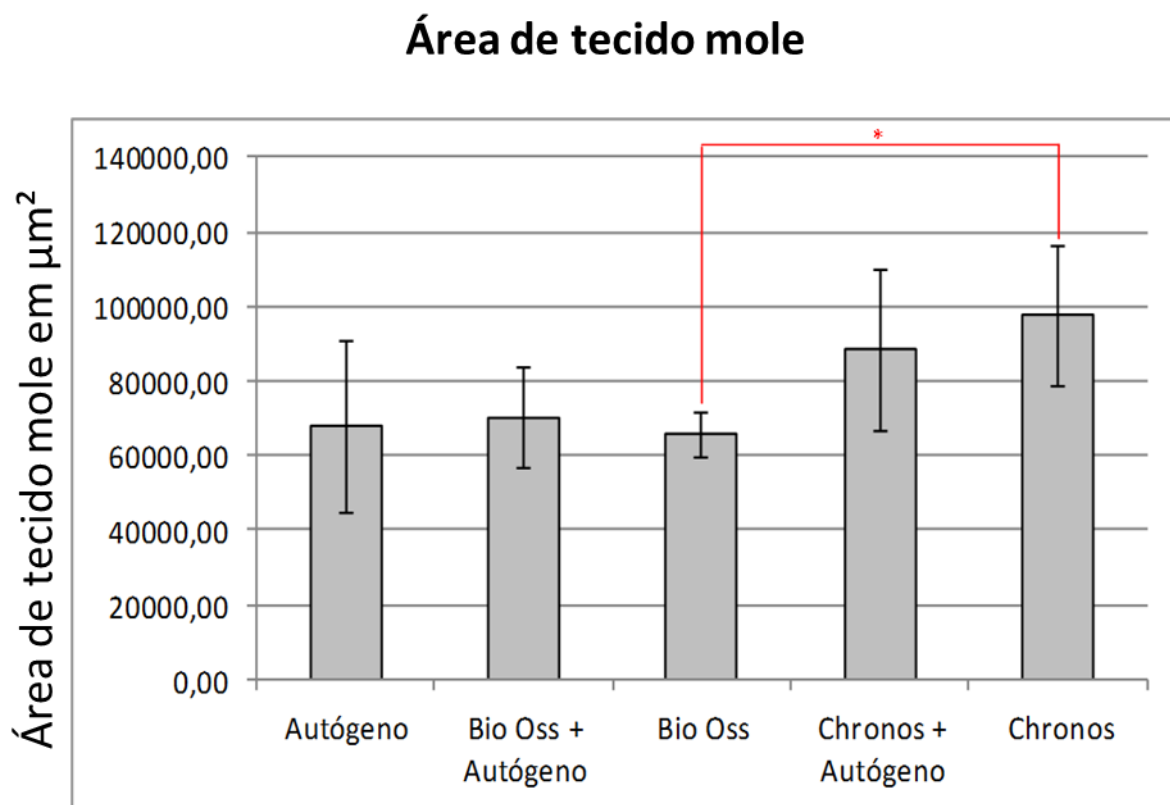


Figura 3 - Resultado da área de tecido mole. Nota-se que numericamente os grupos que apresentaram a maior quantidade de tecido mole foram os grupos C e CA. Foi encontrado diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos C e B.

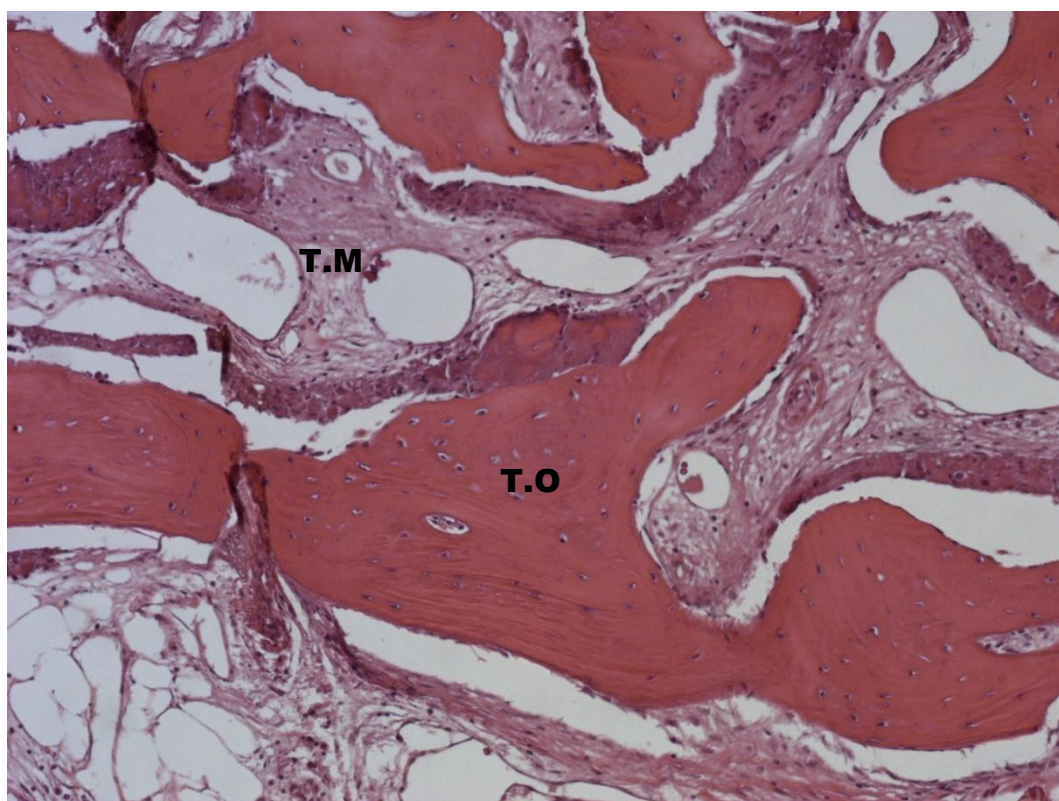


Figura 4 - Nota-se formação de tecido ósseo entremeado por tecido conjuntivo organizado, hipervascularizado com áreas de neoformação óssea em seu interior com grau adiantado de mineralização, por meio de osteócitos aprisionados na matriz extracelular. T.O (tecido ósseo). T.M (tecido mole). (Fotomicrografia do osso autógeno, aumento de 125x coloração Hematoxilina & Eosina)

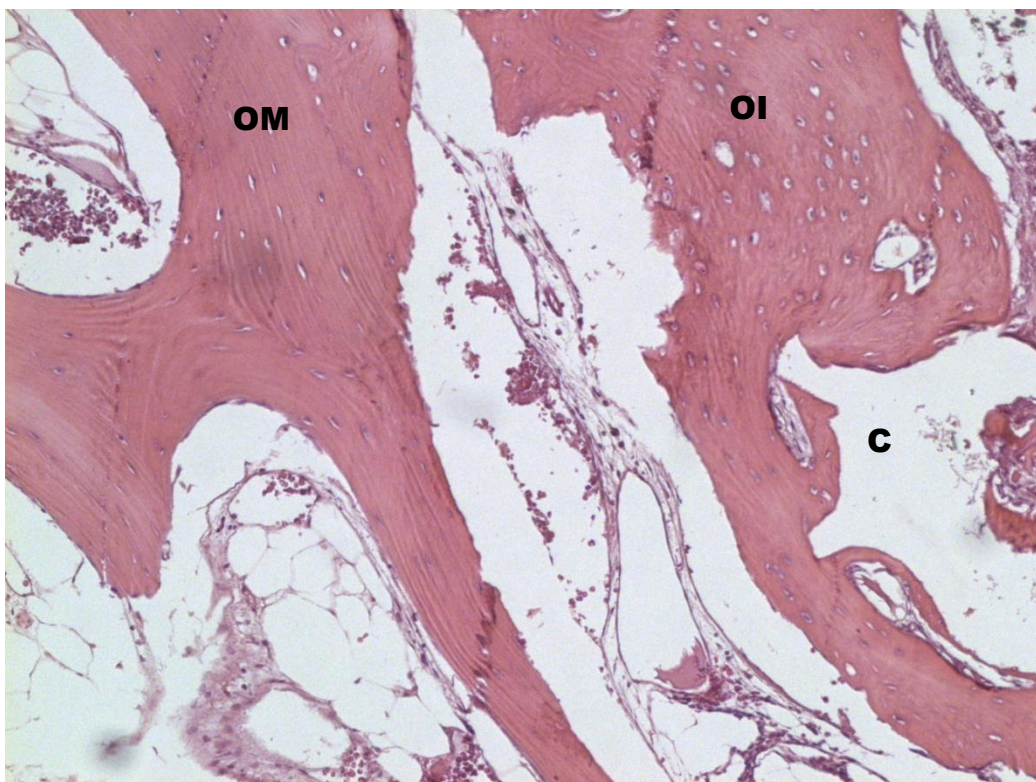


Figura 5 – Nota-se neoformação óssea ora com maior maturação (OM), mostrando organização lamelar, ora osso com menor grau de maturação (OI), ambas com osteócitos na matriz extracelular. De uma forma geral, as lâminas mostraram áreas sugestivas da presença de partículas do biomaterial (C), sendo reabsorvidas e permitindo neoformação óssea na periferia, foi notado tecido conjuntivo entre os focos de neoformação de tecido ósseo e partículas do biomaterial. (Fotomicrografia do Chronos, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina)

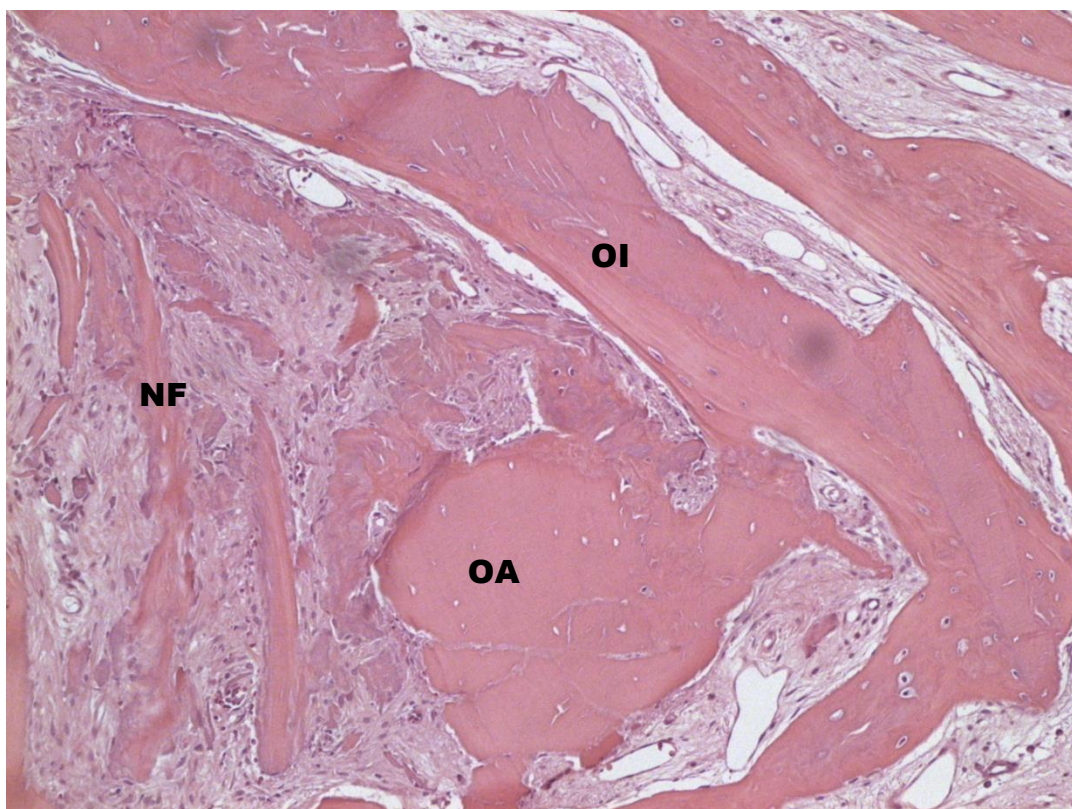


Figura 6 – Nota-se partículas de osso autógeno (OA) com osteoplastos vazios. Grande parte do tecido ósseo neoformado encontra-se em maturação (OI), com poucos osteócitos na matriz extracelular. No tecido conjuntivo notou-se áreas de neoformação de tecido ósseo (NF). (Fotomicrografia do Chronos+Autógeno, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina)

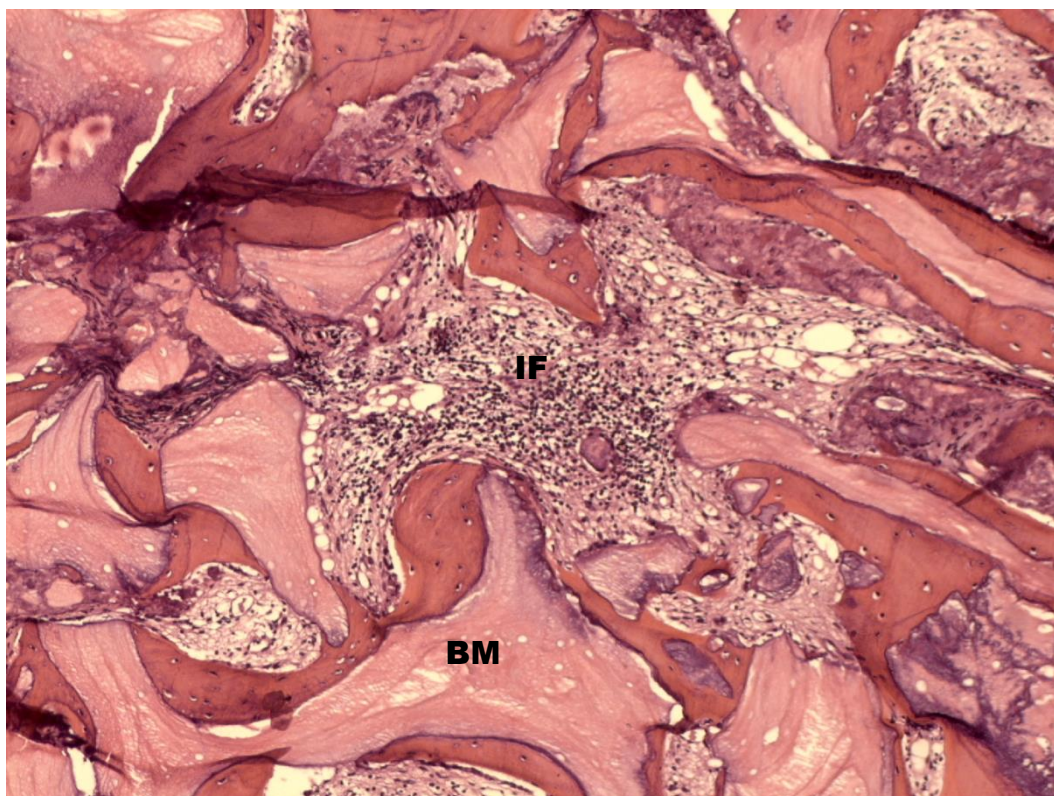


Figura 7 – Nota-se permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial (BM) envolta por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo em desenvolvimento com focos de infiltrado inflamatório (IF). (Fotomicrografia do Bio Oss aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina)

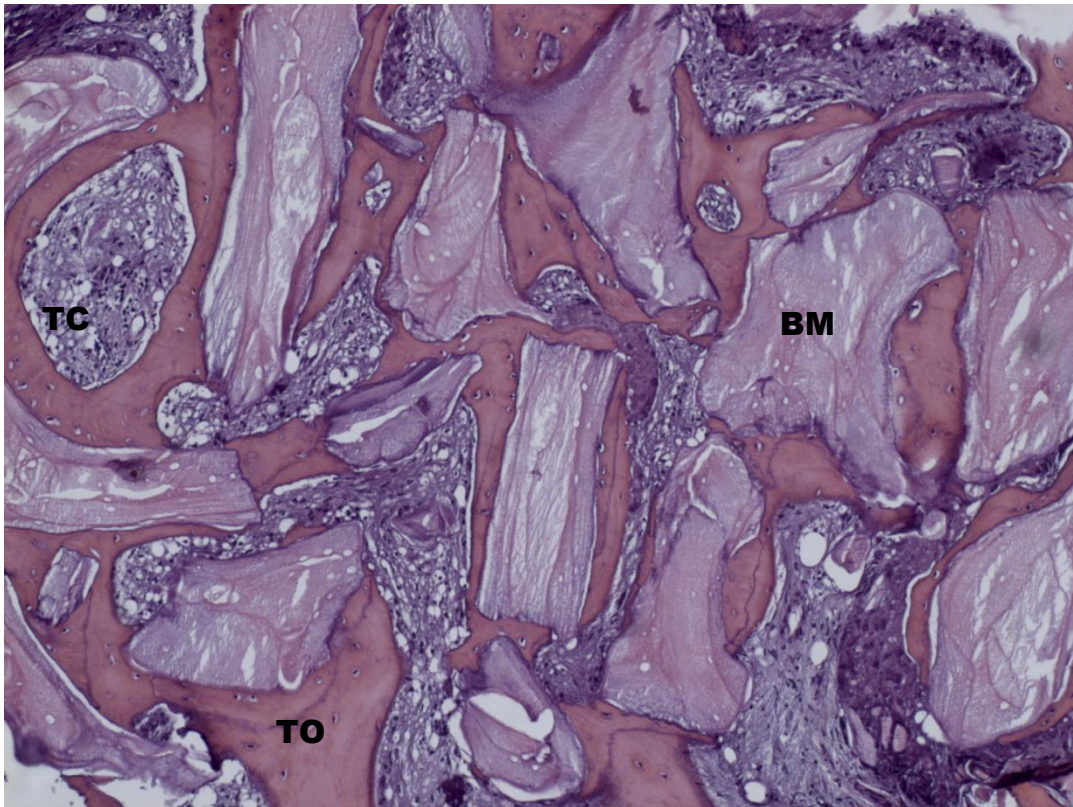


Figura 8 – Nota-se presença de grande quantidade de partículas de biomateriais (BM) envolto por neoformação óssea (TO) e tecido conjuntivo organizado com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório (TC). (Bio Oss+Autógeno, aumento de 125X coloração Hematoxilina & Eosina)

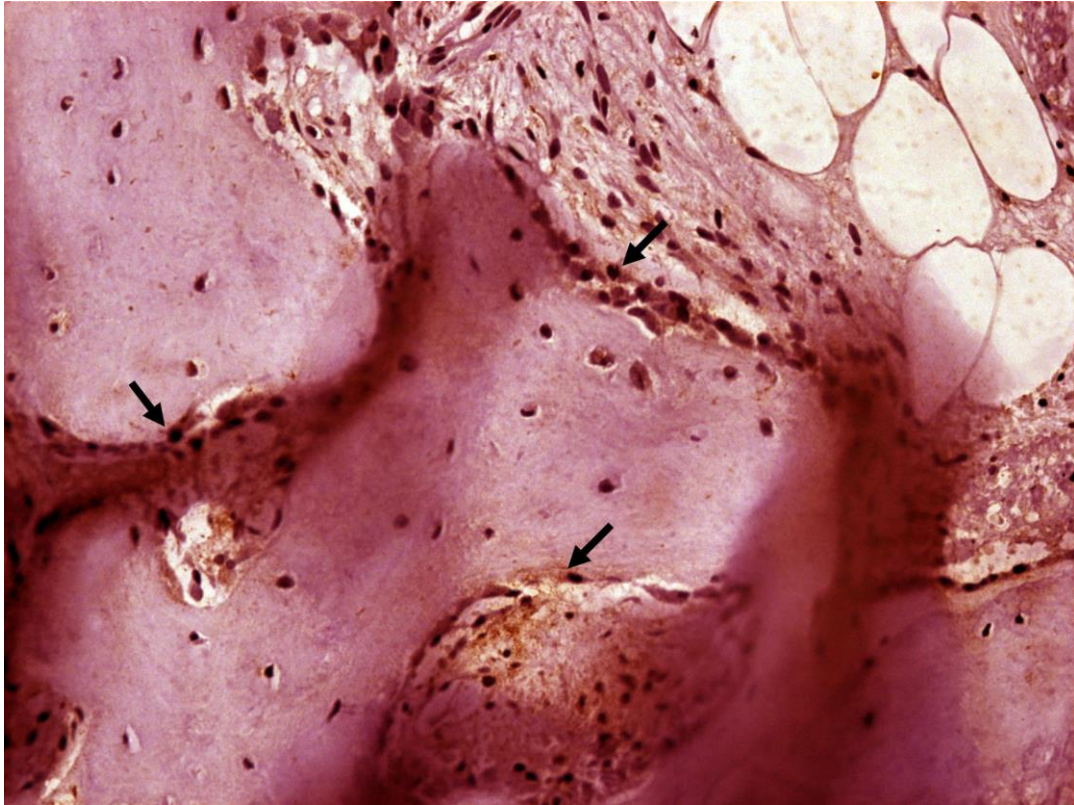


Figura 9 – Imunomarcações para RUNX2, aumento de 250X. Grupo ChronOs® + Autógeno , apresentando marcação moderada.

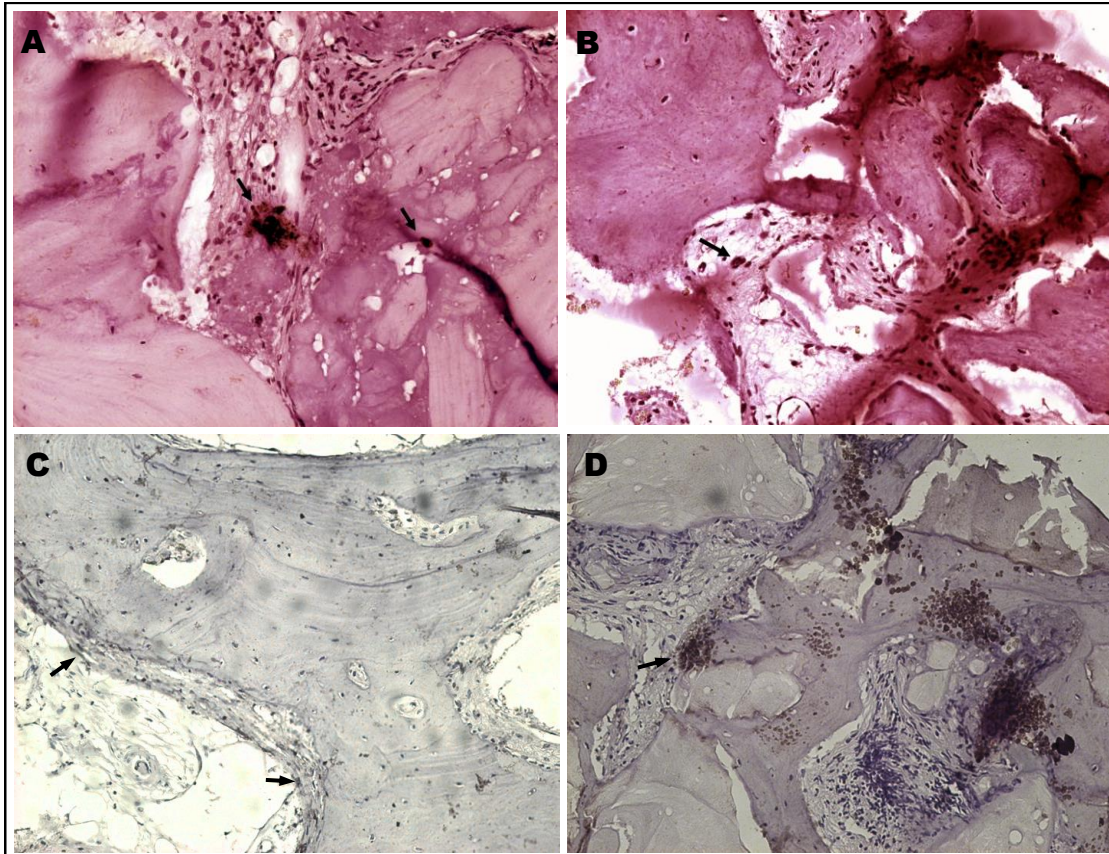


Figura 10 – Imunomarcações para RUNX2, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, em “C” Bio-Oss®, em “D” grupo Bio-Oss® + Autógeno, apresentando marcação fraca.

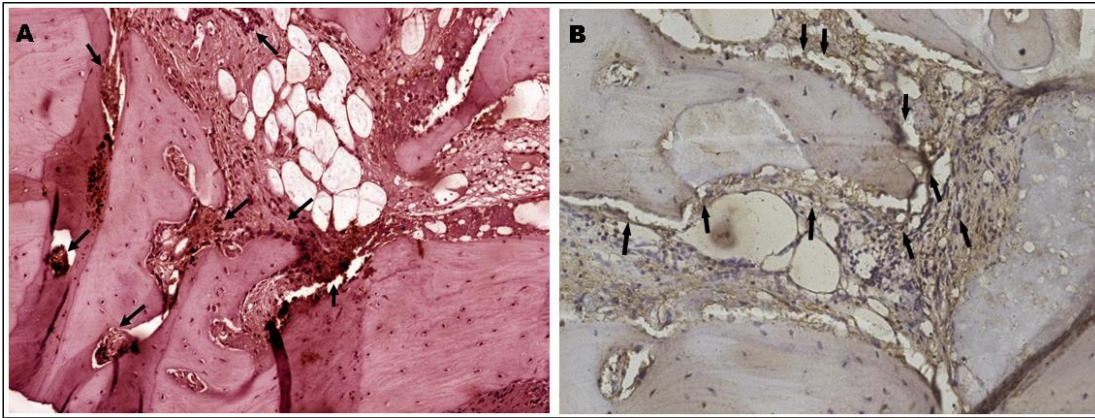


Figura 11 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Em “A” grupo ChronOs® + Autógeno, em “B” grupo Bio-Oss®, apresentando marcação intensa.

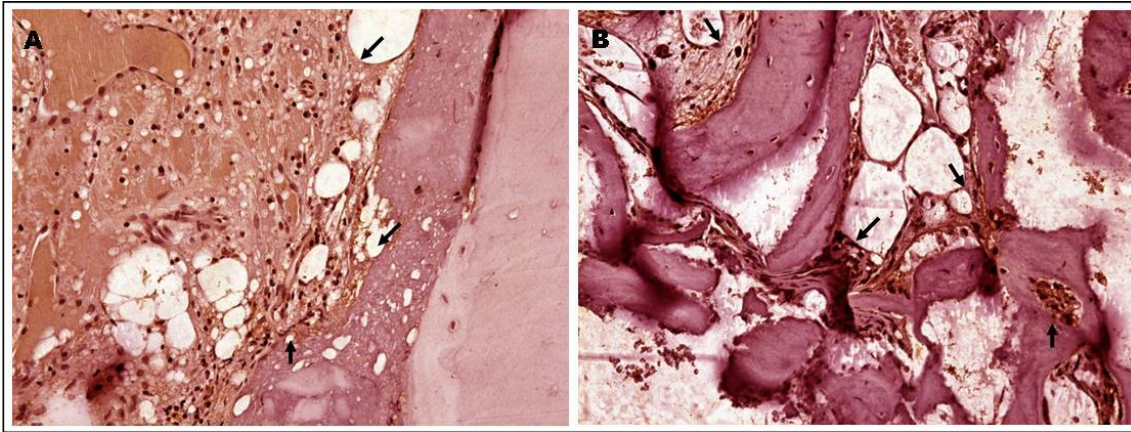


Figura 12 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, apresentando marcação moderada.

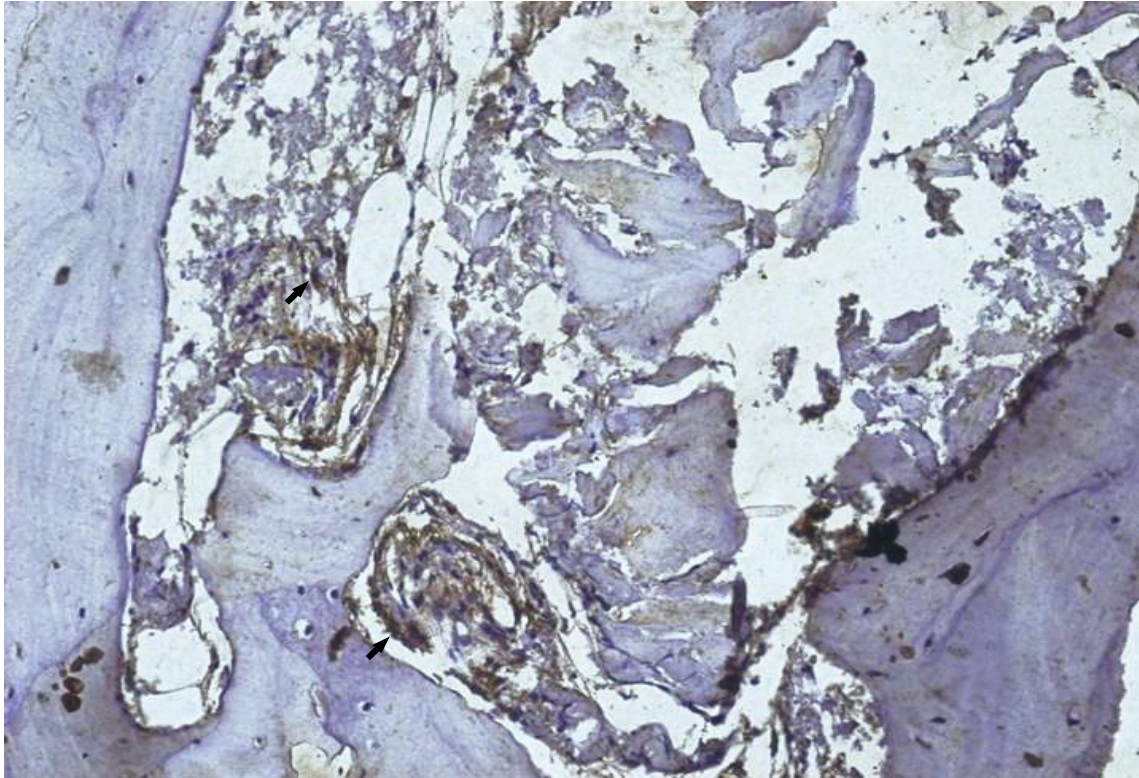


Figura 13 – Imunomarcações para VEGF, aumento de 250X. Grupo Bio-Oss® + Autógeno, apresentando marcação fraca.

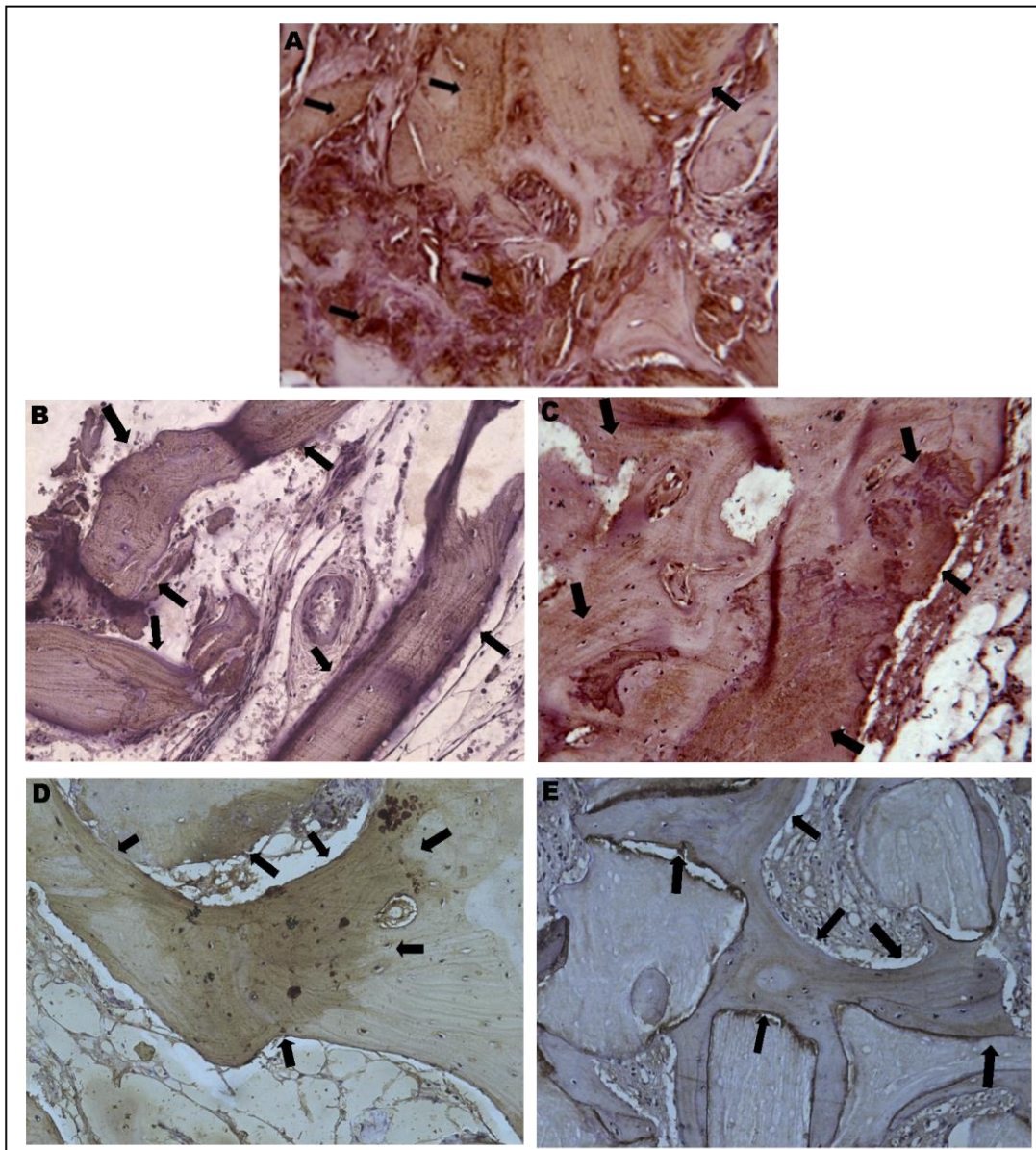


Figura 14 - Imunomarcações para Osteocalcina, aumento de 250X. Em “A” grupo Autógeno, em “B” grupo ChronOs®, em “C” grupo ChronOs® + Autógeno, em “D” grupo Bio-Oss®, em “E” grupo Bio-Oss® + Autógeno. Todos apresentando marcações intensas.



ANEXOS



1.8 Anexo. Aprovação do Comitê de ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo prospectivo da reparação óssea no seio maxilar de humanos.

Pesquisador: Eduardo Hochuli Vieira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47711015.4.0000.5420

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.807.656

Apresentação do Projeto:

Para o presente estudo serão convidados, através de termo de consentimento livre e esclarecido, voluntários com atrofia do rebordo alveolar da região posterior da maxila sendo altura óssea de 5mm ou inferior que queiram ser reabilitados com implantes dentais. O procedimento cirúrgico para o levantamento do assoalho sinusal será realizado em 90 seios maxilares onde 10 serão enxertados com osso autógeno sendo este o grupo controle, 10 com cada biomaterial proposto e 10 com os biomateriais com autogeno na proporção 1:1. Os critérios de exclusão do estudo serão pacientes que apresentam comprometimentos sistêmicos não controlados, problemas periodontais não tratados, patologias sinusais, tabagistas, irradiados na região da cabeça ou pescoço, com a presença de raízes residuais no seio maxilar ou que possuíssem volume ósseo inadequado no ramo ou mento mandibular onde será realizada a coleta do enxerto ósseo autógeno. Os pacientes serão submetidos à uma tomografia computadorizada da maxila e da mandíbula com o intuito de avaliar os requisitos propostos. O osso autógeno será coletado no local onde houver o volume ósseo adequado e os pacientes serão informados sobre o mesmo. O presente estudo será cadastrado na Comissão Nacional de Ética em

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.807.656

Pesquisa (CONEP) por meio da Plataforma Brasil e submetido ao comitê de ética em pesquisa local para apreciação. Após deliberação favorável, os voluntários catalogados na seção de triagem da Faculdade de Odontologia de Araçatuba serão convidados à clínica de cirurgia oral para avaliação.

Os que se enquadrarem nos requisitos da pesquisa serão convidados e, os que aceitarem, assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido

junto aos autores da pesquisa. Todo procedimento cirúrgico será realizado através de um rigoroso protocolo asséptico, incluindo esterilização de todo

material cirúrgico, delimitação da área a ser operada com campos estéreis e uso de aventais e luvas estéreis. Os procedimentos serão realizados

na clínica de cirurgia oral da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. A coleta do osso autógeno será feita nas regiões do mento e ramo

ascendente por meio de brocas trefinas de 10 mm de diâmetro (Neodent® - Curitiba/PR) (Fig. 1) e/ou brocas fissuradas 701 (KG Sorensen –

Cotia/SP) sob anestesia local com Lidocaína com adrenalina 1:100.000 (DFL – Jacarepaguá/RJ) ou Mepivacaína com adrenalina 1:100.000 (DFL

– Jacarepaguá/RJ) para pacientes alérgicos. Após a remoção do enxerto, este será triturado em particulador ósseo (Neodent® - Curitiba/PR) para

instalação puro ou misturado ao Biogran® nos seios maxilares. As feridas serão realizadas com fio absorvível de poligalactina 4.0 Ethicon (Johnson

& Johnson – São Paulo/Brasil). O acesso ao seio maxilar será realizado também por anestesia local com os mesmos anestésicos propostos e de

acordo com a técnica preconizada por Boyne & James (5). Com uma lâmina n° 15 (Solidor® - Barueri/SP) acoplada a um cabo de bisturi, uma

incisão crestal será realizada no osso maxilar para exposição da parede óssea lateral. Após, com uma broca diamantada esférica n° 8 (KG Sorensen

– Cotia/SP) sob irrigação copiosa com soro fisiológico 0.9% (ADV – Nova Odessa/SP), uma fenestração será feita para acesso à membrana do

seio maxilar (Fig. 2) Elevadores da membrana sinusal (Neodent – Curitiba/Brasil) serão utilizados para o cuidadoso processo de elevação da

mesma onde, a seguir, se enxertará o local com o enxerto ósseo proposto (Fig. 3). As feridas serão realizadas, também, com fio absorvível de

poligalactina 4.0 Ethicon. Após 10 dias, uma tomografia computadorizada será solicitada ao

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.807.656

paciente para obtermos o volume ósseo inicial enxertado (T1). O volume ósseo final (T2) será obtido com uma nova tomografia computadorizada, após 6 meses, previamente à instalação dos implantes dentais (Fig. 4). No momento da instalação dos implantes, serão realizadas biópsias do material enxertado por meio de brocas trefinas de 3.0 mm

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador solicita na presente emenda aumentar o numero de participantes e inclusão de mais 3 biomateriais diferentes 45 indivíduos e 10 grupos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco Moderado

Benefícios:

Aumento da altura óssea maxilar posterior para reabilitação protética oral dos pacientes com implantes osseointegrados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

neoformação óssea serão analisados e comparados aos grupos pré-existentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ndn

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP Aprova a alteração proposta.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_813183E1.pdf	20/10/2016 14:31:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	20/10/2016 14:19:33	Eduardo Hochuli Vieira	Aceito

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.807.656

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	20/10/2016 14:18:02	Eduardo Hochuli Vieira	Aceito
Folha de Rosto	Plataorma Brasil.pdf	23/07/2015 14:10:00		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 07 de Novembro de 2016

Assinado por:

André Pinheiro de Magalhães Bertoz
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

1.9 Anexo - Normas para publicação no periódico *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*

Link: <http://www.ijoms.com/content/authorinfo>

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed.

Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

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

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed.

Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms> A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent

correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

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

Declarations

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

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

Authorship

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Conflict of interest

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

Role of the funding source

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

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

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

The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate Ethical Committee related to the institution(s) in which the work was

performed, and that subjects gave informed consent to the work. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery requires institutional Ethics Committee approval for all human studies. For retrospective studies of records either a statement of approval or a statement of exemption from the Committee is appropriate. This statement should be provided upon submission of the manuscript.

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

Patient confidentiality

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

(including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Language Editing Services

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

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or

contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

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

- editorials (commissioned by the editor)
 - clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
 - research papers: no more than 6000 words and 40 references
 - review papers - no limit on length or number of references
 - technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no
-

more than 2000 words, 10 references and 4 figures

- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

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

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

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be:

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

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

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round. Each line must be numbered.

Format

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

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

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

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

title page

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Text

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

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

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

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

The minus sign should be -.

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

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

References

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

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

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

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov.uk) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

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

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style:

Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap.

Int J Oral Maxillofac Surg 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

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

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

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

Tables

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

Figures

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

minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.

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

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

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

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about

existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within **48 hours**. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your

responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

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

Accepted Articles

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

Instructions for Letters to the Editor

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

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a

reference to the IJOMS article being addressed.

2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.

3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.

4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.

5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.

6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.

7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.

8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.
