Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

"Uso do beta fosfato tricálcio *em levantamento da membrana de seio maxilar. Estudo histológico, histomorfométrico e imunoistoquímico em coelhos".*

PATRICIA ROTA BERMEJO

ARAÇATUBA

2014

PATRICIA ROTA BERMEJO

"Uso do beta fosfato tricálcio *em levantamento da membrana de seio maxilar. Estudo histológico histomorfométrico e imunoistoquímico em coelhos".*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de "Mestre em Odontologia" – Área de Concentração Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.
Orientador: Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara.

ARAÇATUBA
2014

Dedicatória

Dedico esta Dissertação...

Aos meus pais, ***Domingo*** *e* ***Maria Lina*** *que além de todo o amor, carinho, compreensão e educação que me confiaram desde o dia de meu nascimento, estiveram presentes em todos os momentos de minha vida, nos mais alegres, nos mais importantes e também nos mais difíceis, sempre me dando forças e me fazendo acreditar que eu conseguiria! Voces são o meu porto seguro, meu norte, a certeza de que vale a pena lutar e seguir os meus sonhos! Obrigada por me fazerem acreditar em mim mesma e por me receberem sempre de braços abertos, todas as vezes em que precisei recuar ... Amo vocês, mais do que tudo!*

Ao meu irmão, ***Rodrigo****, meu companheiro, amigo, irmão, obrigada por todos os conselhos, incentivos, paciência enfim, tudo! Sem você não teria chegado tão longe. Ainda bem que o tempo passa, que crescemos, que nossos sonhos mudam, que nos aproximamos, que nos separamos e que voltamos a nos encontrar! Ainda bem que no meio de tudo isso eu tenho você, meu príncipe! Sem você, já teria desistido há muito tempo!*

Agradecimentos especiais

*A **Deus**, que em Sua infinita bondade, me concedeu tantas alegrias, me deu forças para superar todos os obstáculos que me apareceram e me confortou nos momentos de angústia. Por ter me dado meu bem mais precioso que é minha família. Muito obrigada Senhor por me dar saúde e serenidade para enfrentar mais uma etapa da minha vida.*

*Aos meus avós **Carlo** e **Maria**, **Vicente** e **Esperanza**, que guardam no olhar e na pele as marcas de toda uma vida. Guardam em si uma infinidade de conhecimentos que não hesitaram em me ensinar. Aprenderam a lidar com as "feridas" de uma forma admirável. Dão-se intensamente em cada dia... Devolver-lhes o amor é o minimo que posso fazer. Tanto para dizer que faltam as palavras... meu amor e obrigada sempre!*

Aos meus tios, ***Paquita****,* ***Miguel****,* ***Marisa****,* ***Antonio Carlos*** *e* ***Cristiane****, eu agradeço pela união de nossa família, por defendermos uns aos outros, por nos apoiarmos em todos os momentos, por dividirmos tudo. Sou muito abençoada por ter cada um de vocês em minha vida!*

Aos meus padrinhos ***Carlos*** *e* ***Sandra****, que me abençoam desde o meu nascimento com seu amor, dedicação e proteção. Como é bom saber que tenho pessoas tão iluminadas como vocês ao meu lado!*

À minha madrinha ***Rose,*** *que está presente em minha vida em todas as etapas, conquistas, dores e aflições. Obrigada por sua proteção, amor e admiração, o privilégio é todo meu, em poder contar com uma pessoa tão maravilhosa como você!*

Aos meus primos ***Karina****,* ***Tatiana****,* ***Junior****,* ***Eduardo*** *e* ***Guilherme****, obrigada pelo amor, companheirismo, alegria e parceria de sempre, vocês sem dúvidas, tornam minha vida mais fácil, pois se tudo der errado, sei que com vocês, encontrarei a solução para qualquer problema, amo vocês!*

Às minhas bonecas ***Giulia*** *e* ***Valentina****, que tanto amor, doçura e alegria trouxeram para nossas vidas, vocês renovam minhas esperanças em um mundo melhor a cada dia!*

À minha cunhada, ***Camila****, minha irmã de coração, obrigada pela sua amizade, pela sua força, sua serenidade, seu companheirismo, paciência e incentivo!*

*À minha **Guadalupe**, anjinho que Deus mandou para cuidar de mim, que com sua pureza enche meu coração de amor e alegrias todos os dias!*

*À minha **Tata**, **Juliana**, presente que Deus colocou em meu caminho para me ajudar quando não acreditasse mais em mim. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho. Aprendo todos os dias com você a ser uma pessoa mais paciente, tolerante, calma e bem humorada. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, por me dar forças e acreditar em mim, amo você!*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara**. "Professor não é o que ensina, mas o que desperta a vontade do aluno aprender" (Jean Piaget). Agradeço profundamente por ter me aceitado como sua orientada, pela confiança, por acreditar nos meus ideais e pela paciência nos momentos difíceis. Admiro-lhe pela sua competência, inteligência, humildade e generosidade. Mais do que um grande professor você sempre foi para mim um exemplo. Muito obrigada pelas oportunidades cedidas, pelos ensinamentos transmitidos e principalmente por despertar em mim a vontade de aprender, cada vez mais, em todas as nossas conversas. Espero poder retribuir um dia, tudo o que aprendi, e ainda pretendo aprender com o senhor, meu mestre!*

*Ao **Prof. Dr. Wilson Roberto Poi**, que me despertou a paixão pelo ensino, e com o qual pude contar em todos os momentos decisivos durante es jornada. Um exemplo de mestre, de profissional e de pessoa justa, íntegra e humilde. Muito obrigada por tudo!*

*Ao **Prof Dr Renato Yaedu**, obrigada pela gentileza em aceitar compartilhar comigo seus conhecimentos e experiência.*

*À minha amiga **Giovanna**! Uma das melhores coisas que me aconteceram em Araçatuba, foi a nossa amizade. Obrigada pela sua alegria, por todos os momentos inesquecíveis que compartilhamos durante nosso mestrado. Saiba que contar com seu apoio, tornou o caminho mais fácil. Saiba que em mim você tem uma amiga para a vida toda!*

*À minha doutoranda preferida, **Bianca**, que me abençoou com sua amizade. Obrigada pelos conselhos, pelo colo, pelas risadas, pelas aventuras, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pela confiança, apoio e força. Voce é uma pessoa iluminada! Espero poder continuar aprendendo com você sempre!*

*À minha querida parceira **Juliana**, que tanto cresceu durante esses anos. Agradeço por me deixar fazer parte dessa etapa, e por tudo o que compartilhamos, sejam os bons ou os maus momentos, pois aprendemos com todos eles. Muito sucesso pra você minha amiga!*

*A querida **Lamis**, obrigada do fundo do coração, por toda paciência, atenção, ajuda e amizade, nunca esquecerei o que você fez por mim, quando eu mais precisei. Saiba que pode contar comigo sempre!*

*A **Profa. Dra. Roberta Okamoto** profissional extremamente competente e dedicada. Obrigada pelos ensinamentos e disponibilidade sempre!*

*À minha grande amiga **Selene**, que desde sempre esteve ao meu lado, sendo meu ombro amigo nos momentos em que mais precisei. Agora, não podia ser diferente. Obrigada querida, por ser tão especial, generosa e companheira.*

*Às minhas coleguinhas adoradas, **Maria Renata**, **Thamiris** e **Wendy**, obrigada por vocês existirem em minha vida! A saudade que sinto só não é maior do que a certeza da amizade para a vida toda! Obrigada por todas as risadas, aventuras, colos e idéias mirabolantes, sem vocês, não teria chegado tão longe!*

*Ao meu amigo **Bruno!** Obrigada pelo carinho, pelo incentivo de sempre, pela paciência, e por toda força que você me transmitiu, mesmo sem querer, ou saber, durante todos esses anos. Mesmo que nunca mais voltemos a nos encontrar, você sempre será uma pessoa muito querida e única pra mim! Saiba que ter você ao meu lado nos piores momentos, me fez uma pessoa muito mais forte! Que Deus abençoe sempre você!*

Agradecimentos

Aos Profs Drs da Cirurgia, Idelmo, Osvaldo, Alessandra, Daniela, Ana Paula, Francisley e Leonardo, pela dedicação ao departamento de Cirurgia e por terem contribuído com a minha formação. Agradeço de coração por cada orientação, seja profissional ou mesmo pessoal que vocês me deram nesse período.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP, que contribuiu de grande forma para minha formação profissional com a sua estrutura física, laboratórios, clínicas, salas de aula e centros cirúrgicos experimentais, onde pude complementar minha formação na área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, tanto na clínica como principalmente no ensino e na pesquisa.

Aos colegas da pós graduação, André, Rodrigo, Sabrina, Fernanda, Caroline, Laura, Adhara, Agda, Rodrigo, André, Aljomar, Júlio César, Rafael, Willian, que foram tão companheiros durante esses anos de aprendizados, plantões, aulas, expectativas, alegrias e decepções. Que tenhamos muito sucesso em nossas vidas. Obrigada pelo carinho de sempre!

Aos colegas do Doutorado, Gabriel, Pilar, Timoteo, Cristiano, Igor, Ellen, Willian, Julio Maciel e Gustavo pela amizade que construímos, pelos

inúmeros plantões e suas aveturas, enfim, por todo o trabalho que desenvolvemos juntos na pós graduação.

Aos funcionários da FOA, Gilmar, Paulo, Odair, Cleide, Dirce, João, Camilo e Renato que com tanto carinho me receberam. Pelo trabalho extremamente competente que desempenharam para que essa dissertação fosse concretizada. A vocês o meu carinho e admiração.

Aos estagiários da Cirurgia, por todo o apoio nas atividades laboratoriais e ambulatoriais. Espero que nossa convivência tenha despertado em vocês, o amor pela Cirurgia.

À, Camila, Fran, Michele, Patrícia e Paula, pela paciência, disponibilidade, alegria e interesse em nos ajudar sempre. Parabéns pela competência de vocês!

Às funcionárias da pós graduação, Valéria, Lilian e Cristiane, pela atenção, prestreza em nos orientar sempre que necessário. Parabéns pela competência de vocês!

À Fundação de Amparo a Pequisa do Estado de São Paulo -FAPESP, pelo apoio financeiro durante a realização desse trabalho, sem o qual o mesmo não seria possível.

"Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento!"

(Clarice Lispector)

BERMEJO, PR Uso do beta fosfato tricalcio em levantamento de membrana de seio maxilar. Estudo histológico, histomorfometrico e imunoistoquimico em coelhos. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

O beta fosfato tricálcio (β-TCP) é um biomaterial que possui excelente osteocondução, biocompatibilidade por ser química e cristalograficamente similar ao tecido ósseo humano, além de possuir rápida reabsorção o que diminui reações biológicas. O β-TCP vem sendo utilizado em cirurgias de enxertia óssea, principalmente em regiões superiores de maxila no intuito de favorecer a reabilitação protética com implantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a reparação tecidual de um biomaterial a base de beta fosfato tricálcio o β-TC em levantamento de membrana de seios maxilares de coelhos, através de análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquimica. Vinte coelhos *Albinus* foram submetidos à cirurgia de elevação da membrana do seio maxilar bilateral, onde o seio maxilar do lado direito foi preenchido por coágulo e do lado esquerdo por β-TCP. Após períodos de 3, 7, 15 e 45 dias os animais sofreram eutanásia e tiveram sua maxila removida para processamento e análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. Houve formação óssea para ambos os grupos somente a partir do período de 15 dias. Foi aplicado o teste estatístico de Tukey, e houve diferença estatística ($p<0,01$) entre o grupo controle e o grupo β-TCP. O melhor índice de formação óssea foi para o grupo β-TCP no perído 45 dias (0,0294 ± 33,011 %) em comparação ao grupo controle (1,824 ± 30,502%). Houve também diferença significativa dos grupos entre si, em relação aos períodos estudados. Sendo assim, comprovamos que o βTCP foi um substituto ósseo competente em relação à neoformação óssea e manutenção de área de defeitos clínicos, desejados para uma correta reabilitação oral.

Palavras- chave: seio maxilar, materiais biocompatíveis, regeneração tecidual guiada.

BERMEJO, PR *Beta tricalcium phosphate in sinus lifting. Histological, histomorfometrical and imunoistochimical study in rabbits.* Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

The beta tri calcium phosphate (β-TCP) is a biomaterial with excellent osteoconductive properties, biocompatibility by being chemically and crystallographically similar to the human bone tissue as well as having rapid reabsorption which reduces biological reactions. The β-TCP has been used in bone grafting surgery, especially in the upper regions of the maxilla in order to facilitate the prosthetic rehabilitation with implants. The aim of this study is to evaluate the healing of a biomaterial-based beta tri calcium phosphate, β-TC in sinus lifting of rabbits, using histological, histomorphometric and immunohistochemistry. Twenty Albinus rabbits underwent surgery to the bilateral maxillary sinus lift, where the right maxillary sinus was filled with blood clot and the left by β-TCP. After periods of 3, 7, 15 and 45 days the animals were euthanized and their jaw removed for processing and histological, immunohistochemistry and histometric analysis. There was bone formation for both groups only from the period of 15 days. The Tukey statistical test was applied, and there was statistical difference ($p < 0.01$) between the control group and the β-TCP group. The best index of bone formation was for the β-TCP group in period prescribed 45 days (33,011 ± 0.0294%) compared to the control group (30.502 ± 1.824%). There were also significant differences among groups in relation to the studied periods. Thus, we proved that the βTCP was a competent bone substitute in relation to bone formation and maintenance area, allowed for proper oral rehabilitation clinical defects.

Keywords: Maxillary sinus, Bone grafting, Tissue Repair

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Acesso cirúrgico para levantamento da membrana do seio maxilar de coelhos e defeito cirúrgico criado com broca trefina de 5 mm. pág. 47

Figura 2 - Preenchimento dos defeitos com coágulo sanguíneo (lado direito) e biomaterial (lado esquerdo). pág 48

Figura 3 - Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), das lâminas para histometria, analisando a formação óssea no período final de 45 dias, grupo βTCP (lado esquerdo) e grupo controle (lado direito). Aumento 6,3. x. pág 49

Figura 4 - Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 3 dias para o grupo CO e grupo βTCP (aumento 40.x). pág 49

Figura 5 - Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 7 dias para o grupo CO e grupo βTCP (aumento 40.x). pág 50

Figura 6 - Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 15 dias, para o grupo CO e grupo βTCP (aumento 40.x). pág 50

Figura 7 - Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 45 dias para o grupo CO e grupo βTCP (aumento 40.x). pág 51

Figura 8 - Escores e frequência de porcentagem para quantificação de imunomarcação das proteínas. pág 52

Figura 9 - Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC (coloração marrom), contendo porções de regiões previamente localizadas nos grupos controle em todos os períodos (aumento de 25. X). pág 52

Figura 10 - Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC (coloração marrom), contendo porções de regiões previamente localizadas nos grupos βTCP em todos os períodos (aumento de 25. X). pág 53

Figura 11 - Análise quantitativa de formação de tecido ósseo em levantamento de membrana de seio maxilar em coelhos: teste de Tukey. pág 54

Figura 12 - Porcentagem de tecido ósseo neoformado em relação a área total do levantamento da membrana de seio maxilar em coelhos, para ambos os grupos. pág 55

Figura 13 - Porcentagem de βTCP em decorrência do tempo de pós operatório, presente em levantamento de membrana de seio maxilar em coelhos (P<0,05) grupo βTCP. pág 55

LISTA DE ABREVIATURAS

Grupo CO- Grupo Coágulo Sanguíneo - Controle

βTCP - Beta fosfato tricalcio

SP – São Paulo

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

FOA - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

COBEA – Colégio Brasileito de Experimentação Animal

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

PVP-I - Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante

BV - *Bone Volume* – volume ósseo

HE- Hematoxilina e eosina

OPG- Osteoprotegerina

OC- Osteocalcina

RANKL- Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear κB

mm – Milímetro

ml – Mililitro

µm – Micrometro

mg - Miligrama

kg- Quilograma

% - Porcentagem

rpm – Rotações por minuto

® - Marca registrada

Ltda. – Limtada

MiliQ – Água deionizada

Co. – *Company*

Inc. – *Incorporated*

rhBMP-2 – Proteína óssea morfogenética 2

Cr-Co – Cromo – Cobalto

JPEG – Joint Photographics Exports Group

IgG – Imunoglobulina G

SUMÁRIO

1) Introdução 20

2) Material e Método 24

3) Resultados 32

4) Discussão 39

5) Conclusão 42

6) Referencias Bibliográficas 43

7) Figuras 47

8) Anexos 56

1) INTRODUÇÃO

As reabilitações protéticas implantosuportadas tonaram-se comuns em pacientes parcial e totalmente desdentados. Porém o osso alveolar remanescente pode não ter espessura e altura suficientes para a instalação de implantes osseointegrados, já que a ausência dental leva a graves e irreversíveis reabsorções do osso alveolar [1] *, principalmente em regiões posteriores de maxilas, onde normalmente ocorre pneumatização do seio maxilar devido às mesmas reabsorções, prejudicando a instalação de implantes [2-3].

Atualmente, com o avanço das descobertas na implantodontia, como melhoras nas técnicas cirúrgicas [4] e pesquisas com biomateriais, a reconstrução maxilar teve um avanço nas reestruturações do tecido ósseo [5], e tornou-se possível a reabilitação com próteses implantosuportadas, principalmente nas regiões posteriores.

Em 1997 Misch descreveu que a altura mínima de remanescente ósseo deveria ser de 10 mm para a instalação de implantes em região posterior de maxila. Em alturas de até 5 mm seria permitida a utilização de implantes concomitantemente com a realização de enxerto ósseo para aumento da altura. Em casos onde a disponibilidade óssea fosse de 5mm ou menos, seriam necessários procedimentos cirúrgicos para elevação da membrana do seio maxilar com realização concomitante de enxertos ósseos, e aguardar a consolidação dos mesmos [6].

O levantamento da membrana do seio maxilar foi primeiramente descrito por Boyne *et al*. em 1980, onde visavam a elevação da mucosa sinusal para a interposição

* Referencias bibliográficas de acordo com as normas de publicação da revista *Biomterials*

entre a mucosa e o assoalho da maxila, de enxertos ósseos associados ou não a outros materiais osteocondutores. Com esse procedimento esperava-se que houvesse formação óssea suficiente para permitir utilização de implantes osseointegraveis [7].

O osso autógeno é o ponto de partida para comparações com os demais biomateriais devido às suas propriedades osteogênicas, osteocondutivas e osteoindutivas. Entretanto possui algumas desvantagens, dentre elas, a quantidade limitada de tecido coletado, morbidade do leito doador e dificuldade de obter o desejado formato para o leito receptor [8 -9]. Sendo assim, o uso dos substitutos ósseos sintéticos tem se tornado uma pratica clinica comum já que se propõem a contornar as desvantagens do enxerto ósseo autógeno [10].

Geralmente os substitutos ósseos são osteocondutores, ou seja, permitem que ocorra formação óssea em sua superfície e, além disso, pelo tamanho de suas partículas, não são absorvíveis, permanecendo no local após o término do processo de reparo incrustados no tecido ósseo neoformado. Segundo Potter e Ellis III em 2004, as propriedades de um material ideal para enxerto ósseo são: inércia química, biocompatibilidade, não ser alergênico, não ser cancerígeno, possuir um custo acessível, ser passível de esterilização sem que haja alteração de sua composição química, ser de fácil manipulação e de fácil conformação durante a realização da cirurgia, apresentar boa estabilidade (quando da fixação por parafusos) e apresentar radiopacidade [11]. Além disso, o material não deve possibilitar crescimento bacteriano, que promoveria além de infecções, reabsorções ósseas que culminariam com o surgimento de degraus indesejáveis. Finalmente, o material deve ainda, ser totalmente reabsorvível e substituível por novo tecido ósseo.

Outras considerações específicas também influenciam na escolha dos biomateriais como: o tamanho do defeito, a adaptação do contorno interno, a restauração do volume adequado, a presença de cavitação dos seios da face, a prevenção do deslocamento do material, o risco de traumas futuros e reparo rápido *versus* tardio [12].

Com as descobertas do final da década de 60, a utilização de polímeros derivados de acido lático e glicólico, vem sendo defendida [13]. Os resultados mostraram boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica e toxicidade, excelente biocompatibilidade e uma cinética previsível de biodegradação, despertando a atenção de vários pesquisadores quanto as suas possíveis aplicações em tecnologia farmacêutica [14].

Nesse contexto, inserem-se os *scaffolds* biodegradáveis que são definidos como estruturas que permitem a neoformação óssea concomitantemente com a reabsorção de seu arcabouço, agindo como uma matriz temporária para a ancoragem-dependente de osteoblastos, além da função intrínseca de preenchimento [15]. Também pode agir como carreador para fatores solúveis e insolúveis que modulam a função celular local [16].

Um substituto compósito típico é o β-TCP, que possui excelente osteocondução e biocompatibilidade devido a sua similaridade química e cristalográfica com os dentes e ossos humanos. Além disso, atua como arcabouço para a migração celular, que juntamente com fatores de crescimento estimulam a regeneração óssea [17]. Outra característica significativa do β-TCP é sua rápida reabsorção durante o curso da regeneração óssea [17], minimizando as reações biológicas esperadas [18]. O grau de remodelação ao longo do tempo tem sido relatado dependendo do tipo de material

usado, variando de 13,9% a 26% para os materiais aloplásticos e de 16% a 49,5% para o osso autógeno [19].

Alguns substitutos ósseos sintéticos como o β-TCP têm sido combinados com o osso autógeno para estabelecer uma capacidade osteoindutora [20 e 21]. Estes materiais reúnem as vantagens de cada elemento como a propriedade osteocondutiva do material sintético e a capacidade osteoindutiva do osso autógeno [22].

OBJETIVOS

Este trabalho se propõe a avaliar a a taxa de remodelação e neofromação ósseas e reabsorção de um biomaterial a base de βTCP em levantamento de membrana de seios maxilares de coelhos, através de análises histológica, histomorfométrica e imunoistoquimica.

2) MATERIAL E MÉTODO

a) *delineamento experimental*:

Foram utilizados 20 (vinte) coelhos da raça Nova Zelândia, variação "*albinus"*, machos, com idade aproximada de 5 (cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 Kg. Os animais foram cedidos pelo Biotério da FOA-UNESP e mantidos 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, adotado pelo COBEA, submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP e aprovado sob o numero **2012-01103.**

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para levantamento de membrana de seios maxilares (bilateralmente) e sendo assim, divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo controle (CO): 20 seios. Consistindo no grupo que passou por cirurgia de levantamento de membrana em ambos os seios maxilares e que tiveram os mesmos preenchidos apenas pelo coágulo e as amostras foram distribuídas da seguinte maneira: análise no dia 3 (5 seios), dia 7 (5 seios), dia 15 (5 seios) e dia 45 (5 seios).

- Grupo βTCP: 20 seios. Após o procedimento de elevação da membrana sinusal o seio maxilar foi preenchido com β-TCP (Graftys® βTCP, LAS, SP, Brasil) e as

amostras distribuídas da seguinte maneira: análise no dia 3 (5 seios), dia 7 (5 seios), dia 15 (5 seios) e dia 45 (5 seios).

b) procedimentos cirúrgicos

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia geral 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 seguida realizada complementação anestésica através de 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.

Todos os animais deste estudo foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para elevação da sua membrana. Semelhante ao realizado clinicamente, primeiro os seios maxilares foram acessados. O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos. As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica.

c) levantamento da membrana do seio maxilar

Após prévia tricotomia e antissepsia pré-operatória no dorso nasal por fricção de gaze embebida em PVPI a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), o osso nasal foi acessado.

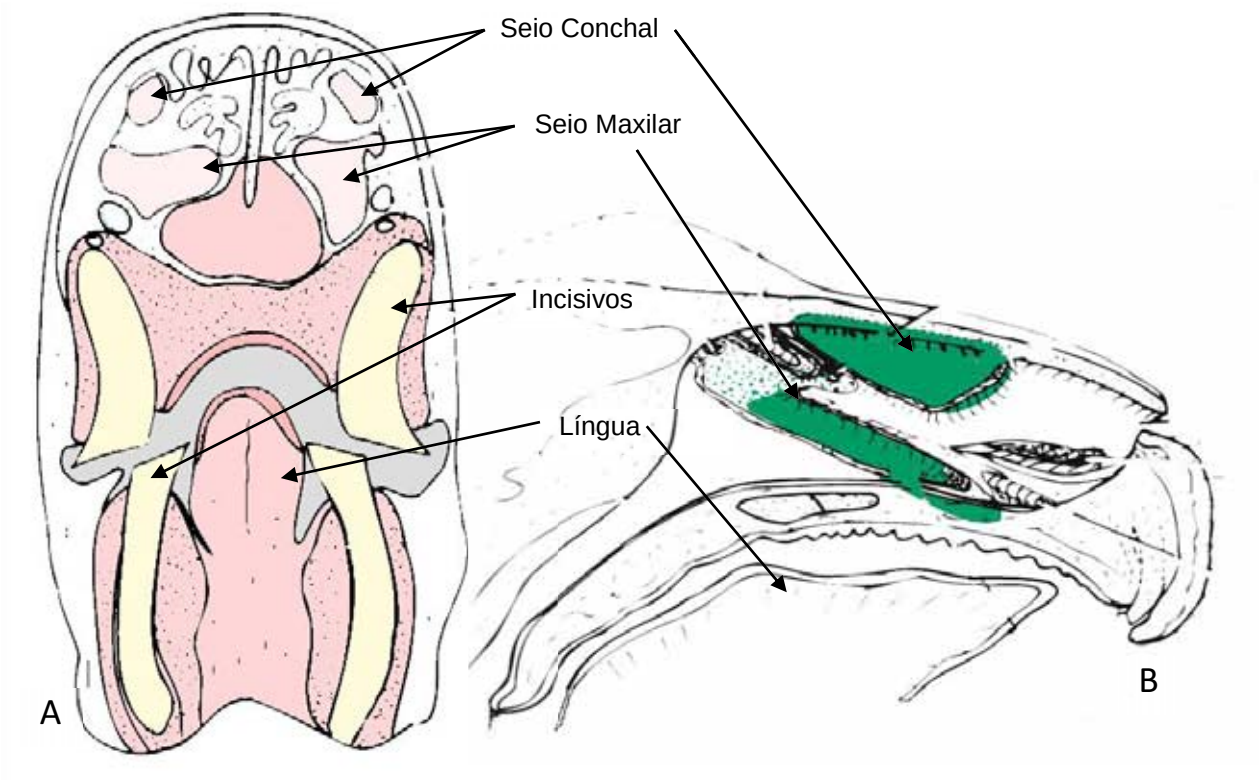


Ilustração de um (A) corte coronal e (B) sagital do crânio do coelho mostrando reparos anatômicos como os seios conchais, os seios maxilares, os incisivos e a língua.

O protocolo cirúrgico utilizado para o acesso a cavidade sinusal do animal foi o estabelecido por Asai, Shimizu e Ooya em 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 feita na linha mediana do dorso nasal. 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 nasoincisal [23]. Após exposição, uma janela circular de 5 mm de diâmetro foi confeccionada bilateralmente a linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 2 cm anterior a linha da sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente a linha média. 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 5mm 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, Joinvile, Brasil), que por sua vez conectava-se a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm (Figura 1).

A membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física fosse mantida. Após o levantamento da membrana , um seio maxilar foi preenchido com coágulo, e o lado contralateral com o β-TCP (Figura 2). Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura então realizada com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

d) cuidados Pós-Operatórios

No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,1ml/Kg e de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) na dosagem de 1mg/Kg/dia, sendo a primeira dose no pós-operatório imediato e as demais nos 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos no Biotério da 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 3, 7, 15 e 45 dias de pós operatórios.

e) 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 3, 7, 15 e 45 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.

f) preparo das peças

As peças foram fixadas em formol (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 90 dias, a 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, realizaram-se os cortes coronais das peças, a partir do centro do defeito cirúrgico criado e a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de cortes com 6 µm de espessura montados em lâminas. Foram separadas cerca de 6 lâminas de cada animal para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co. Inc.) e outras 6 de cada grupo experimental para as reações de imunoistoquímica.

g) 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 câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas.

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

h) análise imunoistoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina – OPG (OPG, Goat anti-opg – Santa Cruz Biotecnology), RANKL (Goat anti-rankl – Santa Cruz Biotecnology) e OC (OC, Goat anti-oc – Santa Cruz Biotecnology). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA). O anticorpo secundário biotinilado 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 (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Switzerland) bem como a expressão das proteínas OPG, RANKL e OC, acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Os escores atribuídos a presença de proteína foram 1 para marcação leve, 2 para marcação moderada e 3 para marcação intensa. Estes escores foram atribuídos de acordo com a área de células e tecido marcados positivamente.

i) análise estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. Os dados foram analisados com comparações múltiplas de médias por contrastes de Tukey. Diferença estatisticamente significativa foi atribuída ao nível de $P < 0,01$. Os testes foram conduzidos através de software GMC utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

3) RESULTADOS

O pós operatório transcorreu sem intercorrências em todos os coelhos. Não foram observadas complicações como aparecimento de reações alérgicas ou processos infecciosos em nenhum dos períodos do estudo.

4.1) Análise quantitativa e qualitativa da histologia

Para entender melhor as propriedades osteocondutoras dos biomateriais, as análises histológicas foram realizadas. Como esperado, não houve perfuração da membrana do seio maxilar de nenhum coelho e o defeito originalmente tratado com βTCP foi totalmente preenchido por um conglomerado de partículas do biomaterial, coágulo sanguíneo, tecido conjuntivo e osso neoformado. Remanescentes de βTCP eram visíveis e estavam em íntimo contato com o tecido ósseo inclusive visualizados ao final do período de 45 dias. Defeitos que foram preenchidos com coágulo apresentaram apenas um tecido conjuntivo delgado fechando o defeito ósseo, com organização estabelecida a partir do período de 15 dias.

Exames histomorfométricos mostraram que o volume total de tecido mineralizado (biomaterial + osso neoformado) reflete os resultados da análise imunoistoquímica. Novamente, o βTCP resultou em maior volume de tecido mineralizado comparado ao grupo coágulo. Estes dados sugerem que o βTCP apresenta propriedade osteocondutora favorável neste experimento.

O próximo passo foi o de distinguir entre tecido ósseo neoformado e biomaterial residual no local do defeito. O grupo βTCP apresentou maior volume de tecido ósseo neoformado. Curiosamente, a formação de tecido ósseo neoformado foi semelhante no grupo controle. Assim, o βTCP apoia a formação de tecido ósseo neoformado mais eficiente do que o grupo controle (Figura 3).

4.2 Análise Morfológica

4.2.1 – Período de 3 dias

Para ambos os grupos estudados, notamos presença de discreto infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo desorganizado e início de neoformação vascular (angiogênese). A membrana do seio maxilar foi preservada, discreto número de células inflamatórios agudas, caracterizando que o infiltrado inflamatório era em decorrência do próprio processo cirúrgico. No grupo βTCP os grânulos permaneceram inertes no tecido, preservando o volume da membrana do seio maxilar deslocada (Figura 4).

4.2.2 - Período de 7 dias

Para ambos os grupos, notamos presença de um infiltrado inflamatório crônico moderado, tecido conjuntivo em franco processo de maturação com organização de vasos sanguíneos neoformados, assim como reabsorção do coágulo presente no interior do tecido conjuntivo, causado pelo procedimento cirúrgico. No grupo βTCP os grânulos encontravam-se circundados por tecido conjuntivo, caracterizando início de atividade celular reparadora (Figura 5).

4.2.3 – *Período de 15 dias*

Decorridos 15 dias do pós operatório, no grupo CO, nota-se a etapa inicial do processo de reparo com a intensa proliferação de tecido conjuntivo e a presença de remanescente de coágulo sanguíneo. No grupo βTCP há presença de tecido conjuntivo em contato direto com a superfície dos grânulos de biomaterial (Figura 6). Apesar da intensa atividade celular, notamos raras células inflamatórias e algumas células gigantes, principalmente ao redor de coágulo remanescente. Início do processo de neoformação óssea, com abundância de osteoblastos e matriz óssea em processo de maturação em ambos os grupos.

4.2.4 - *Período de 45 dias*

No grupo CO aos 45 dias do pós operatório, observa-se em quase toda sua extensão a presença de tecido conjuntivo fechando o defeito cirúrgico criado. Em contrapartida, no grupo βTCP nota-se, a neoformação óssea com osteoblastos em quase todo o perímetro de contato conjuntivo/ βTCP e a discreta presença de tecido conjuntivo. Houve diminuição de volume de biomaterial caracterizando sua substituição por tecido ósseo com presença de osteócitos, porém observamos ainda a presença de biomaterial em abundância no tecido (Figura 7).

4.3 Análise Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra as proteínas OC, OPG e RANKL analisadas durante o processo de reparo na interação membrana seio maxilar/ βTCP.

4.3.1 OSTEOCALCINA - (OC)

A imunomarcação contra osteocalcina foi realizada nas biópsias do tecido ósseo com o intuito de avaliar o grau de mineralização do tecido ósseo na presença ou ausência do biomaterial testado (βTCP). O resumo dos dados obtidos está apresentado na forma de tabela de frequências absolutas para cada período e grupo experimental (Figura 8).

No grupo controle, foram observadas marcações leves e moderadas junto às células das biópsias coletadas no período de 3 dias de pós operatórios. A presença de osteocalcina caracteriza o fenótipo osteoblástico das células observadas. Aos 7 dias as imunomarcações para osteocalcina mostraram-se expressas de maneira leve e moderada, predominando a última. Foram observadas áreas com atividade de formação de tecido ósseo, presença de uma matriz extracelular em processo de organização e o início da mineralização em alguns pontos. Aos 15 dias, no grupo controle, foi observada a presença de trabéculas ósseas delgadas, mas com a presença de marcação positiva para osteocalcina, que se intensificou aos 45 dias de pós operatórios, onde as trabéculas apresentaram-se mais espessas e pôde-se notar a presença de um tecido maduro, com osteócitos também marcados positivamente para esta proteína (Figura 9).

No grupo βTCP, no período de 3 dias foram observadas marcações predominantemente leves nas células das biópsias analisadas. Aos 7 dias, a presença da osteocalcina mostrou-se variando entre leve e moderada, com predomínio deste último escore. Também foi possível notar a presença de uma matriz extracelular já em processo de organização e o início do processo de formação de tecido ósseo, principalmente próximo aos remanescentes do biomaterial avaliado. Aos 15 dias,

foram observadas trabéculas ósseas delgadas, com marcação intensa para osteocalcina. Aos 45 dias foi possível observar a presença de um tecido ósseo com trabéculas espessas e marcadas de maneira intensa para osteocalcina na maioria dos espécimes avaliados. Também foram observados osteócitos marcados postiviamente, caracterizando a maturidade do tecido ósseo formado junto ao biomaterial (Figura 10).

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas e histomorfométricas foram realizadas para ambos os grupos estudados e para os períodos de 3, 7, 15 e 45 dias de pós operatório. As médias dos valores de área de tecido ósseo neoformado (BV) e do material no interior no tecido (βTCP) foram transformadas em porcentagens em relação a área total do defeito cirúrgico criado a partir do levantamento da membrana do seio maxilar, e comparados entre si.

A formação óssea foi constatada a partir do período de 15 dias para ambos os grupos. Houve diferença estatística ($p<0,01$) entre o grupo controle e o grupo βTCP quando comparados entre si (Figura11). O grupo βTCP apresentou o maior percentual de formação óssea, tanto para o período de 15 dias, como para o período de 45 dias. Quando os valores foram comparados entre o mesmo grupo, houve diferença

estatística entre os períodos, sendo que o período de 45 dias foi superior em relação ao grupo 15 dias (Figura 12).

A mesma diferença estatística foi percebida levando-se em consideração a porcentagem de biomaterial no interior do tecido com o decorrer do tempo. Houve diminuição gradual significativa em relação a presença do biomaterial com o decorrer do tempo, do período de 3 dias para o de 45 dias (Figura 13). Assim como houve também uma diminuição na área total do levantamento de seio, no grupo controle, em relação ao tempo decorrido.

4) Discussão

A cirurgia de levantamento de membrana de seio maxilar tem como principal objetivo um ganho em dimensão vertical posterior em região de maxila [2] através da formação de osso vital que permita a integração do tecido pré existente com implantes osseointegrados, dando condições para os mesmos de suportarem as forças exercidas pelas próteses quando de sua instalação [24].

Para possibilitar a viabilidade dessa manobra, são utilizados os enxertos ósseos, em sua grande diversidade. O enxerto ideal deveria apresentar os seguintes critérios: habilidade de formação óssea - através de proliferação celular - com osteoblastos recrutados diretamente da corrente sanguínea ou por osteocondução de células ao longo da superfície do enxerto; manutenção de osso maduro ao longo do tempo, sem prejuízo funcional; habilidade em estabilizar os implantes quando instalados ao mesmo tempo; baixo risco de infecções; habilidade de avaliação e baixa antigenicidade [25]. De acordo com os nossos resultados o βTCP possui a maioria das propriedades descritas acima e, principalmente, as propriedades osteocondutoras ocorreram de forma mais favorável do que para o grupo controle.

Ueda e colaboradores em 2001 utilizaram 30 coelhos machos em cirurgia de levantamento de membrana de seio maxilar e compararam o uso do βTCP associado a rhBMP-2 e osso autógeno de crista ilíaca. Em seus resultados observaram não haver diferença significativa entre os grupos quanto a neoformação óssea, e além disso, o grupo βTCP apresentou vantagens quanto a manutenção da área criada com o levantamento da membrana do seio [26]. Fato este que observamos também em nosso estudo, onde o grupo coágulo apesar de também conseguir uma formação óssea consistente, perdeu consideravelmente em relação a área total.

Okamoto e Russo em 1973 descreveram a reparação alveolar em ratos durante 21 dias. Eles dividiram o processo de reparo em 3 fases distintas (período de formação de coágulo e proliferação celular, período de formação de tecido conjuntivo e período de ossificação). Ao final do período do estudo, o alvéolo encontrava-se completamente preenchido por tecido ósseo. Em 1987, Carvalho e Okamoto acrescentaram uma quarta fase à reparação alveolar [27]. Esta fase representa a maturação do tecido conjuntivo que ocorre antes do período de ossificação.

O βTCP por ser considerado bifásico devido a sua estrutura com microporos (<10 μm) e macroporos (100 a 500 μm) permite um aporte celular muito grande, por possibilitar a perfusão de fluidos biológicos em seu interior, ocorrendo adesão celular à sua estrutura [28]. A formação óssea ocorre através do material e simultaneamente ao processo de reabsorção celular [27-29]. Com base na literatura e em nosso estudo, o βTCP apresenta propriedades de osteocondução e osseointegração, o que indicam o seu uso.

De acordo com estudos anteriores, o βTCP e o enxerto de osso autógeno igualmente apoiam a neoformação óssea [3]. Também, a literatura mostra que o βTCP associado ao osso autógeno particulado apresentou melhor desempenho que o osso autógeno particulado sozinho [17], suportando a potente propriedade osteocondutora deste biomaterial.

Considerando-se as limitações deste estudo, estes achados são baseados em um modelo experimental em seio maxilar de coelhos, que não representa totalmente todos os defeitos em maxilares humanos. Porém a composição histológica dessas membranas apresenta semelhança histológica, além de o seio maxilar dos coelhos apresentar os istmos na mesma localização dos seios maxilares humanos, favorecendo sua biologia. Mesmo que o volume do defeito ósseo criado para o acesso

à membrana seja de tamanho crítico e as condições para a neoformação óssea sejam mais severas, o local do defeito é limitado a 5 mm de diâmetro, o qual pode ser menor do que os defeitos que acometem os seres humanos. Além disso, o suprimento vascular e a presença de células osteoprogenitoras são fatores inerentes de coelhos adultos, que não é o caso de pacientes idosos que apresentam comprometimento da capacidade de regeneração óssea.

Diferentemente do mencionado pelo fabricante do βTCP, o mesmo ainda permaneceu, embora em menor volume, no interior dos tecidos após o período de 45 dias, embora sua porosidade e dissolução na presença de tecido conjuntivo tenha permitido uma maior perfusão de vasos sanguíneos e, com isso, um maior recrutamento de células envolvidas no processo de reparo e regeneração óssea. Porém admitimos que talvez o período máximo deveria ser de 60 e não 45 dias, para percebemos já um maior grau de reabsorção e substituição do biomaterial por tecido ósseo.

5) Conclusão

Ao final de nosso estudo, pudemos chegar as seguintes conclusões:

- O βTCP é um substituto ósseo que se presta muito bem ao papel de neoformação óssea e manutenção de área, desejados para uma correta reabilitação oral, mesmo quando utilizado sozinho, o que viabiliza seu uso por minimizar custos e transtornos decorrentes do uso de enxertos autógenos.

- Os resultados aqui apresentados indicam que a neoformação óssea atingiu um nível máximo quando os defeitos de levantamento de membrana de seio maxilar em coelhos foram preenchidos com βTCP em comparação ao simples preenchimento com coágulo. Novos estudos devem ser realizados com o βTCP para desvendar o potencial osteocondutor deste biomaterial na regeneração óssea, aumentando o tempo final do estudo.

6) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AGHALOO TL, MOY PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for the implant placement? The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 2007; 22 (1): 49–70.

[2] BOYNE PJ, JAMES RA, LINDA, L. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone**.** J Oral Surg. 1980; 38: 613-616.

[3] KELLER EE, VAN ROEKEL NB, DESJARDINS RP, TOLMAN DE. Prosthetic-surgical reconstruction of the severely resorbed maxilla with iliac bone grafting and tissue-integrated prostheses. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants. 1987; 2: 155–165.

[4] BRANEMARK PI. Introducción a la osseointegracion in: Protesis tejido integradas la osseointegracion en la odontologia clínica. Quintessence books. 1987; 11-75.

[5] SEGUNDO, TK. Avaliação dos enxertos ósseos e homólogos utilizados em Implantodontia. RGO. 2000; 48: 217-22.

[6] MISCH, CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. Int J Oral & Maxillofac Implants. 1997; 12767-776.

[7] NISHIBORI M, BETTS, NJ, SALAMA H, LISTGARTEN MA. Short-term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. J Periodontol. 1994; 65: 958-66.

[8] ONO D, JIMBO R, KAWACHI G, IOKU K, IKEDA T, SAWASE T. Lateral bone augmentation with newly developed β-tricalcium phosphate block: an experimental study in the rabbit mandible. Clin Oral Impl Res. 2011; 22: 1366–1371.

[9] PIKDOKEN L, GURBUZER B, KUÇUKODACT Z, URBAN M, Baris E, Tezulas E. Scintigraphic, Histologic, and Histomorphometric analyses of bovine bone mineral and

autogenous bone mixture in sinus floor augmentation: Randomized controlled trial—Results. J Oral Maxillofac Surg. 2011; 69:160-169.

[10] BURG KJL, PORTER S, KELLAM JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials. 2000; 21: 2347–2359.

[11] POTTER JK, ELLIS III E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. J Oral Maxillofac Surg. 2004; 62: 1280-97.

[12] PARK JB, LAKES RS. Biomaterials: An Intoduction. Plenum Press, New York, NY,394, 1992.

[13] HISAYA O, SHINICHI S, JIANI C, JUYONG W, KENICHI S. Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. J Med Dent Sci**.** 2005; 52: 51-57.

[14] JAIN R, SHAH NH, MALICK AW, RHODES CT. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. Drug Dev Ind Pharm. 1998; 24: 703-727.

[15] TEMENOFF JS, LU L, MIKOS AG. Bone-tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: DAVIES, J.E. Bone Engineering. 1999; 1a ed. Toronto: Rainbow Grafic and Printing Ltd, chap. 42, p. 454-461.

[16] CHICUREL, ME, CHEM CS, INGBER DE. Cellular control lies in the balance of forces. Curr Opin Cell Biol. 1998; 10: 232-239.

[17] ZAMBUZZI WF, OLIVEIRA RC, PEREIRA FL, CESTARI TM, TAGA R, GRANJEIRO JM. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. Braz Dent J. 2000; 17(4): 274-8.

[18] HORCH HHR, SADER, C, PAUTKE A, NEFF H, DEPPE A., Kolk: Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb1) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006; 35: 708–713.

[19] SBORDONE C, SBORDONE L, TOTI P, MARTUSCELLI R, CALIFANO L, GUIDETTI F. Volume Changes of Grafted Autogenous Bone in Sinus Augmentation Procedure. J Oral Maxillofac Surg. 2011; 69:1633-1641.

[20] BROWAEYS H, BOUVRY P, DE BRUYN H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. Clinical Implant Dentistry & Related Research. 2007; 9: 166–177.

[21] KLIJN, R.J., MEIJER, G.J., BRONKHORST, E.M., JANSEN, J.A. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. Tissue Engineering Part B Reviews. 2010a; 16: 493–507.

[22]KLIJN, R.J., HOESKSTRA, J.W.M., VAN DEN BEUCKEN, J.J.J.P., MEIJER, G.J., JANSEN, J.A. Maxillary sinus augmentation with microstructured tricalcium phosphate ceramic in sheep. Clin Oral Impl Res. 2012; 23; 274–280.

[23]ASAI, S, SHIMIZU, Y, OOYA, K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effects of occluded nasal ostium on new bone formation. Clin Oral Implants Res 2002. Aug; 13:405-9.

[24] MAZOR, Z, PELEG, M, GARG, AK. The use of hydroxyapatite bone cement for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the atrophic maxilla. A report of 10 cases. J Periodontal 2000. July; 71(7):1187-94.

[25] XU, H, SHIMIZU, Y, OOYA, K. Histomorphometric study of the stability of newly formed bone after elevation of the floor of the maxillary sinus. Br J Oral Maxillofac Surg 2005. Dec; 43(6): 493-9.

[26] UEDA, M, TONHAI, I, NAKAI, H. Tissue engineering research in oral implant surgery. Artif Organs, 2001. Mar; 25(3):167-71.

[27] DE LONG WG, EINHORN TA, KOVAL K, McKEE M, SMITH W, SANDERS R, WATSON TJ. Bone grafts and bone grafts substitutes in orthopaedic trauma surgery: A critical analysis. Bone Joint Surgery Am. 2007; 89:649-58.

[28] PASSUTI N, DELÉCRIN J, DACULSI G. Experimental data regardin macroporous biphasic calcium phosphate ceramics. Eur J Orthop Surg Traumatol. 1997; 7:79-84.

[29] GAUTHIER O, BOULER JM, AGUADO E, PILET P, DACULSI G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials. 1998; 19: 133-39.

FIGURAS



Figura 1 *suplemento:* Acesso cirúrgico para levantamento da membrana do seio maxilar de coelhos e defeito cirúrgico criado com broca trefina de 5 mm.



Figura 2 *suplemento*: Preenchimento dos defeitos com coágulo sanguíneo (lado direito) e biomaterial (lado esquerdo).

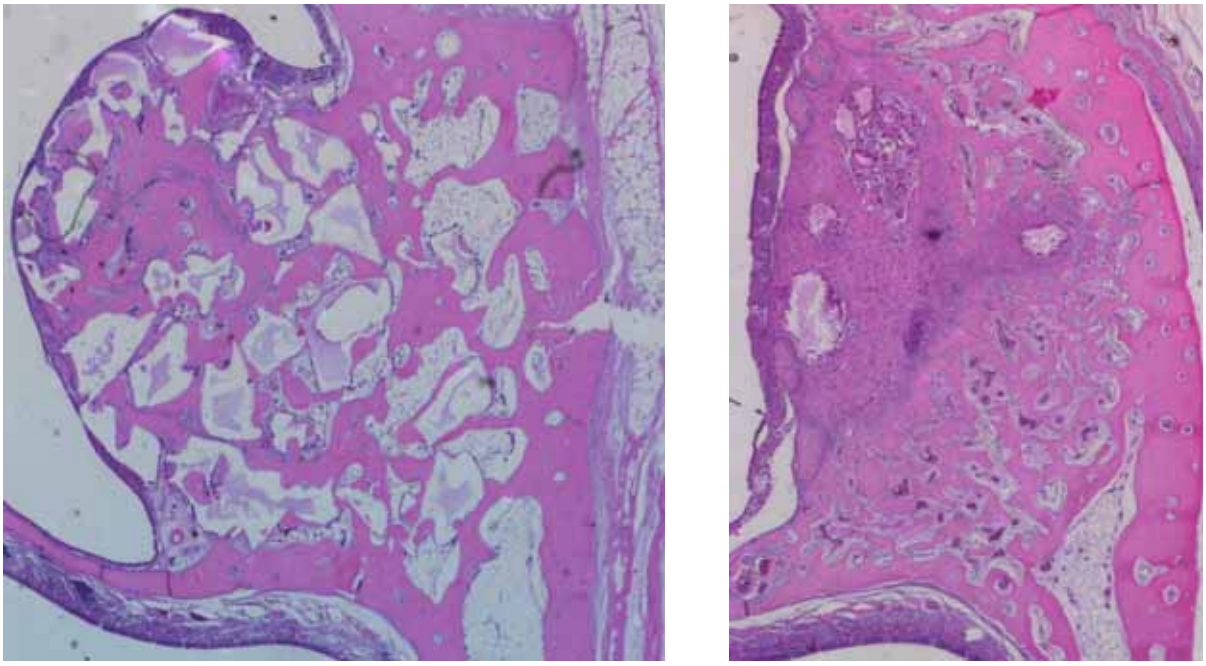


Figura 3 Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE), das laminas para histometria, analisando a formação óssea no período final de 45 dias, grupo βTCP (lado esquerdo) e grupo controle (lado direito). Aumento 6,3.x.

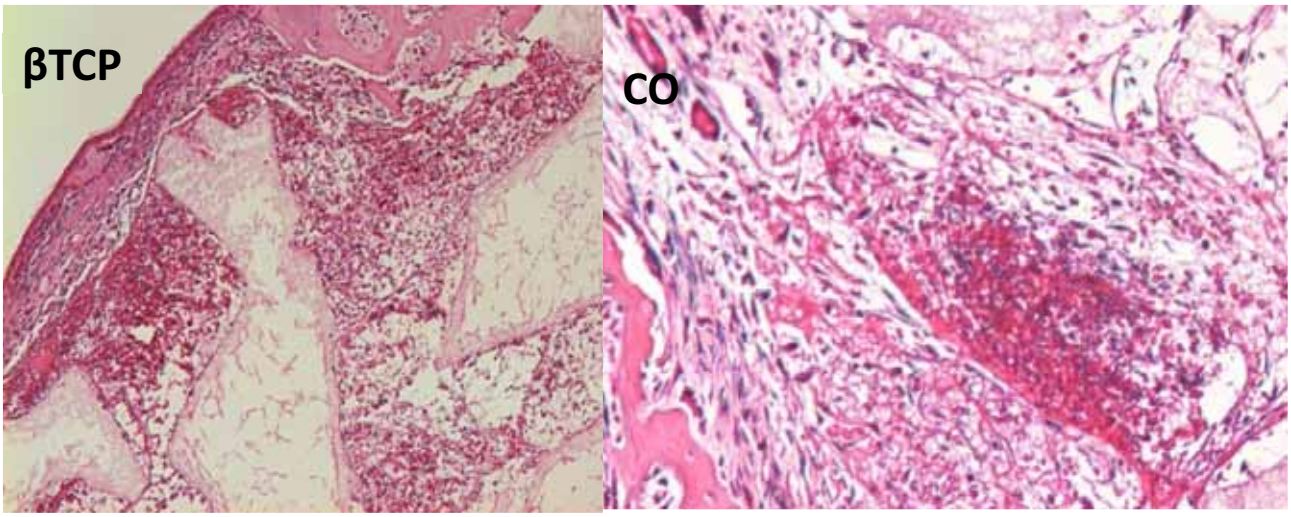


Figura 4 Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 3 dias, da periferia do defeito cirúrgico. No grupo βTCP observa-se a presença de remanescentes de coágulo e biomaterial (aumento 40. x). No grupo controle, notamos abundancia celular e coágulo sanguíneo (aumento 40. x).

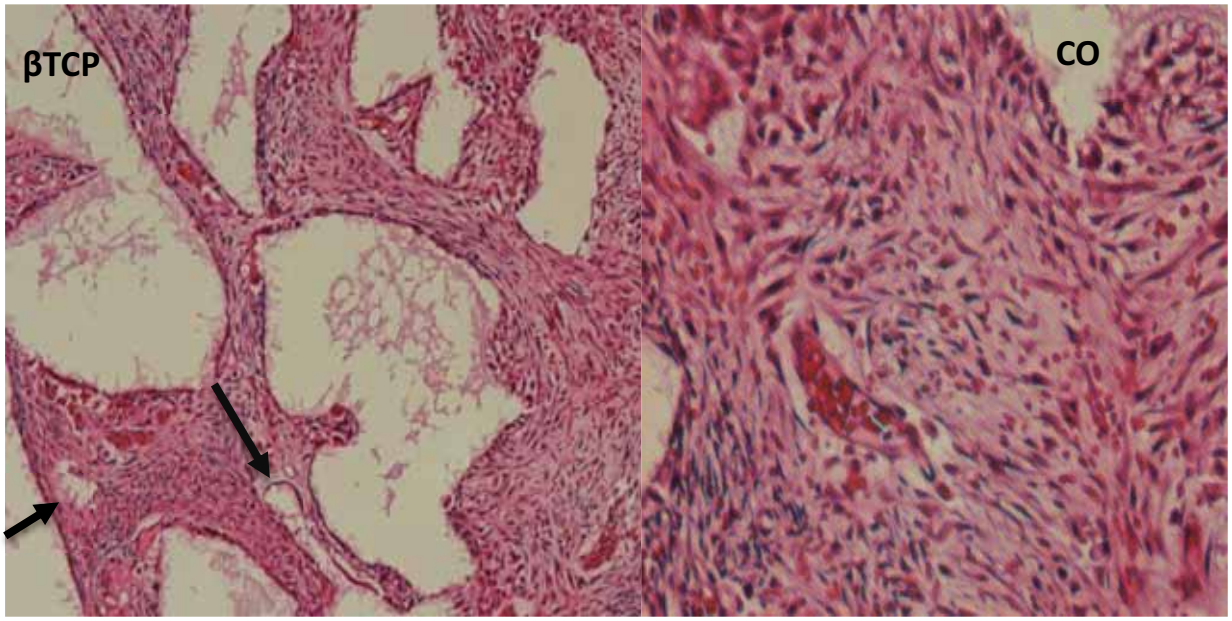


Figura 5: Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 7 dias, do centro do defeito cirúrgico. No grupo βTCP observa-se angiogenese (ponta da seta) e organização do tecido conjuntivo (aumento 40. x) maxilar. No grupo controle, notamos reabsorção de remanescentes do coágulo (aumento 40. x).

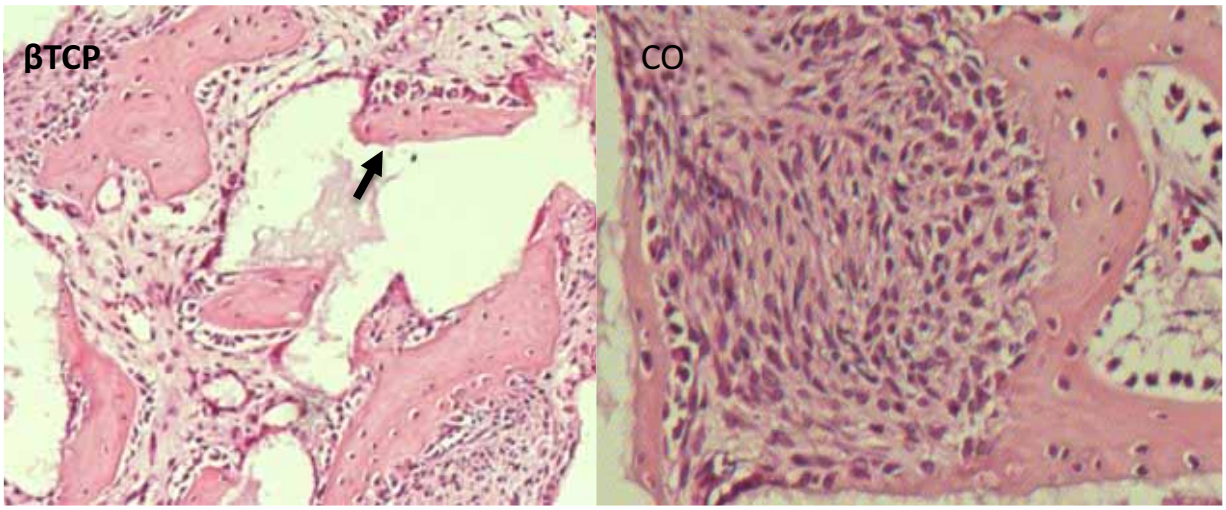


Figura 6: Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 15 dias, do centro do defeito cirúrgico. No grupo βTCP observa-se a neoformação óssea ao redor do material (ponta da seta) (aumento 40. x). No grupo controle, organização de tecido conjuntivo, abundancia de células e neoformação óssea (aumento 40. x).

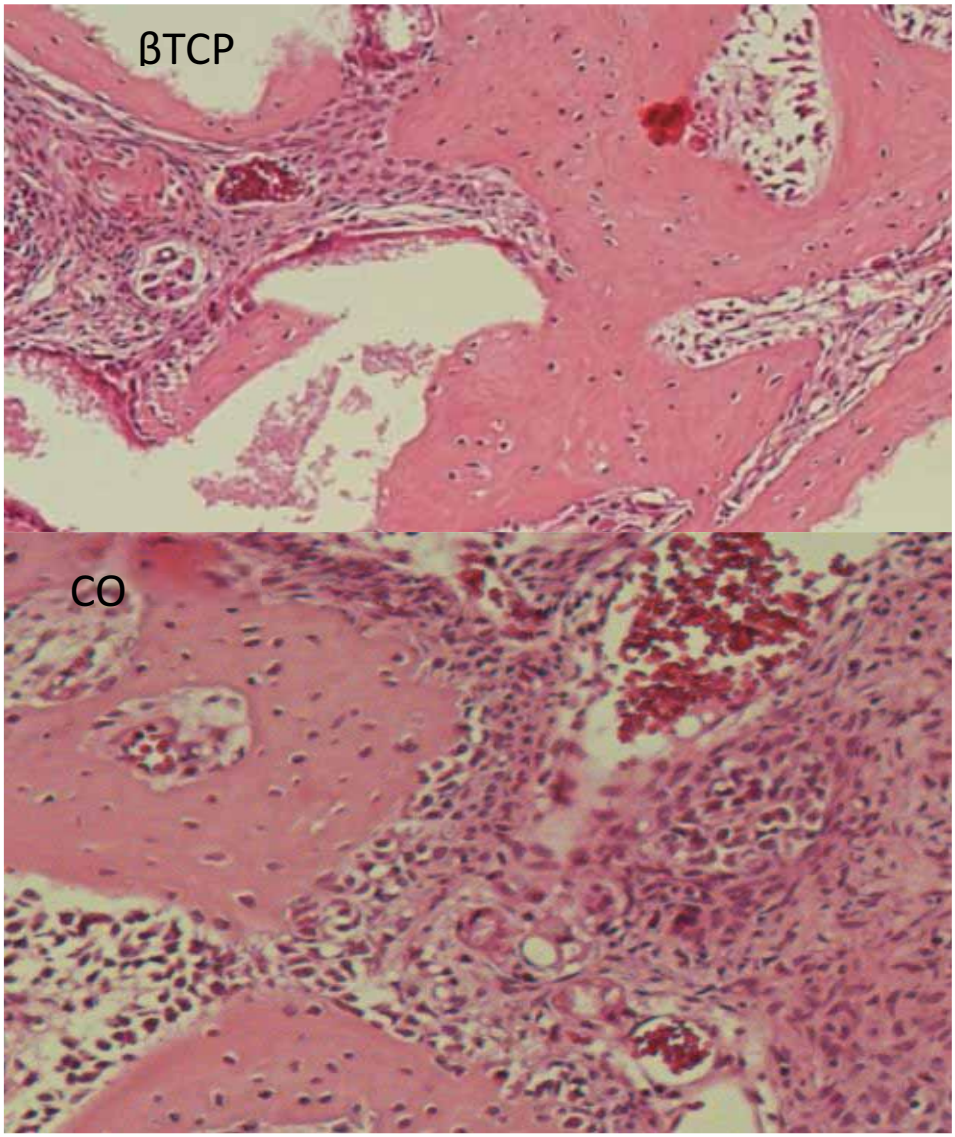


Figura 7: Fotomicrografia de cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) no período de 45 dias, do centro do defeito cirúrgico. No grupo βTCP observa-se a maturação óssea ao redor do material (aumento 40. x). No grupo controle, organização de tecido conjuntivo, abundancia de células, neoformação óssea e reabsorção de remanescentes de coágulo (aumento 40. x).

GRUPO βTCP				GRUPO CONTROLE			
	1	2	3		1	2	3
3 dias	6	0	0	3 dias	3	3	0
7 dias	2	4	0	7 dias	2	4	0
15 dias	0	0	6	15 dias	0	0	6
45 dias	0	1	5	45 dias	0	2	4

Figura 8: Escores e frequência de porcentagem para quantificação de imunomarcação das proteínas.

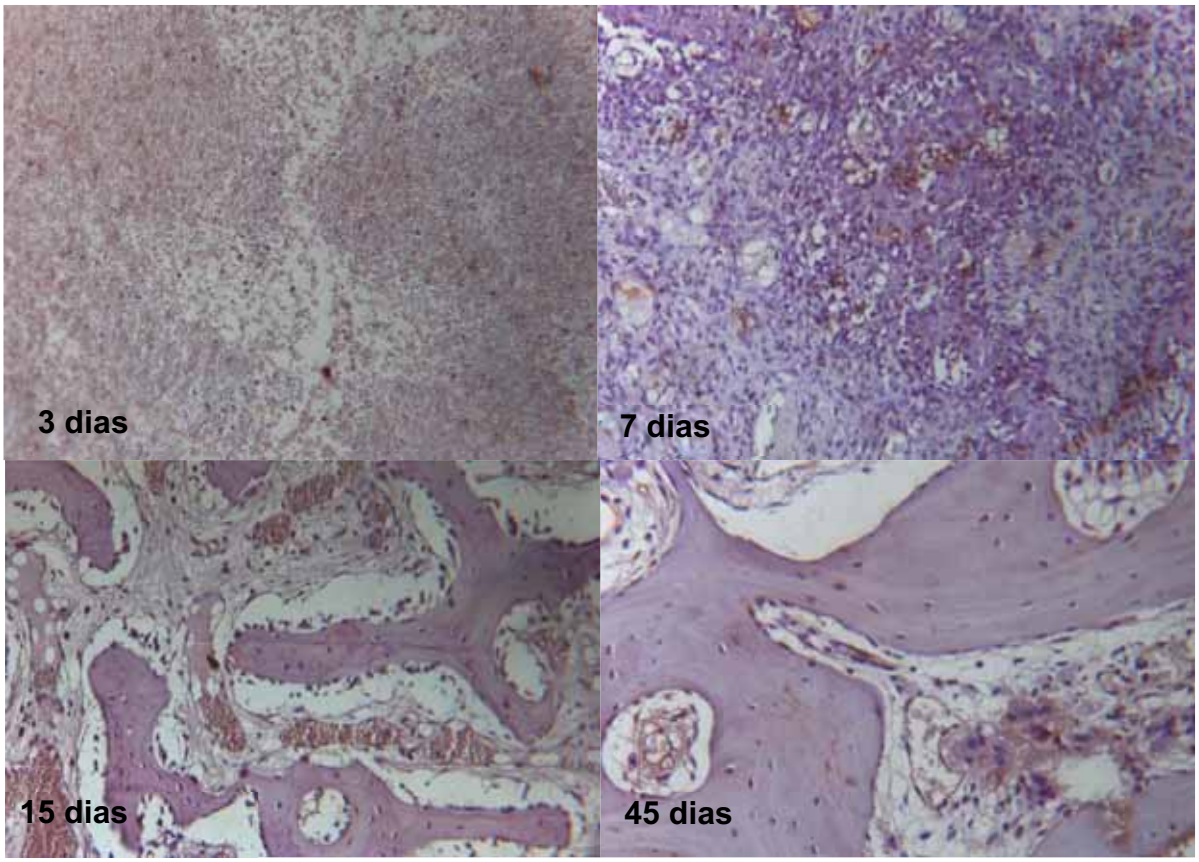


Figura 9: Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC (coloração marrom), contendo porções de regiões previamente localizadas nos grupos controle em todos os períodos (aumento de 25. X).

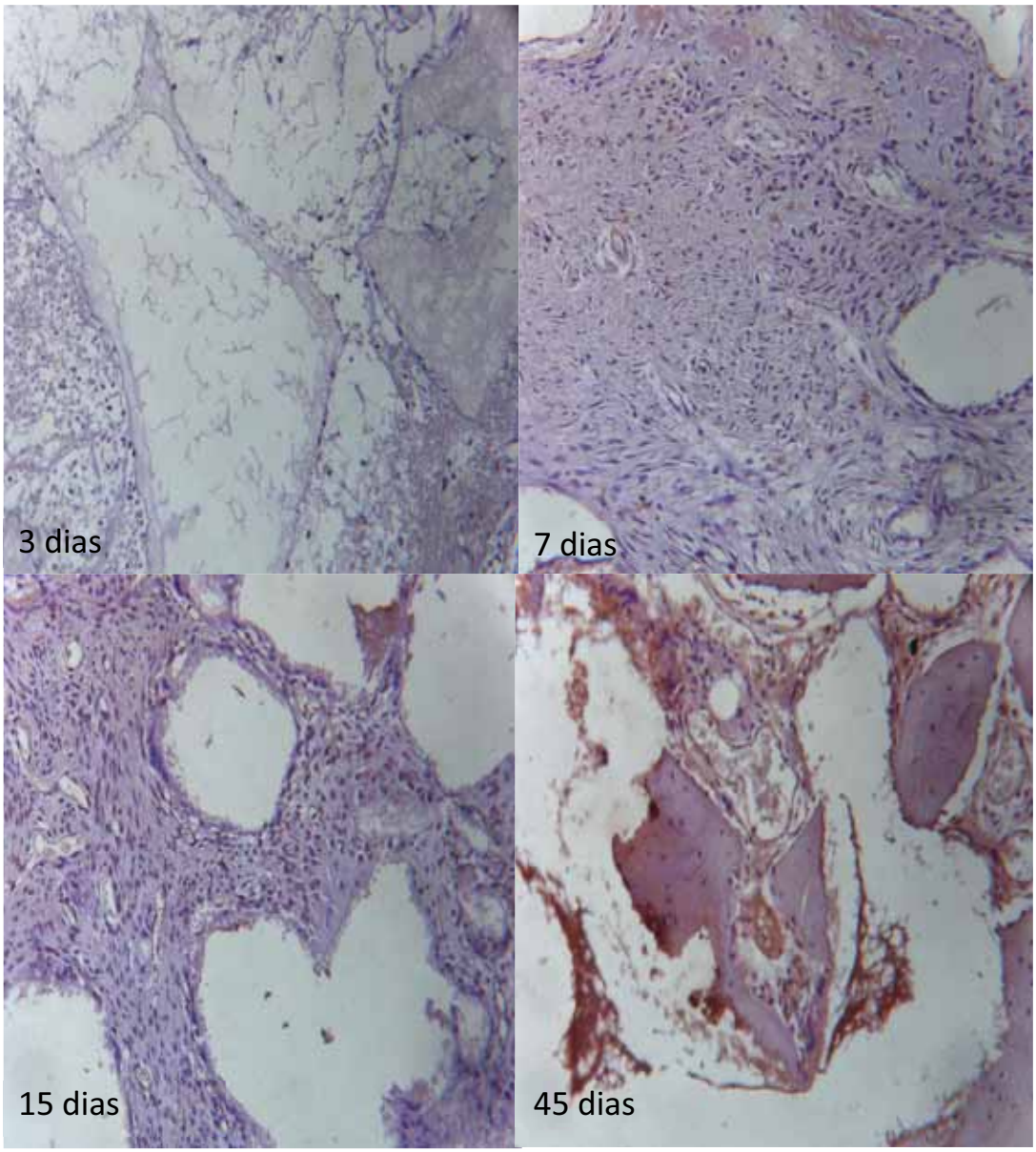


Figura 10: Fotomicrografias de cortes imonistoquímicos representando a expressão de OC (coloração marrom), contendo porções de regiões previamente localizadas nos grupos βTCP em todos os períodos (aumento de 25. X).

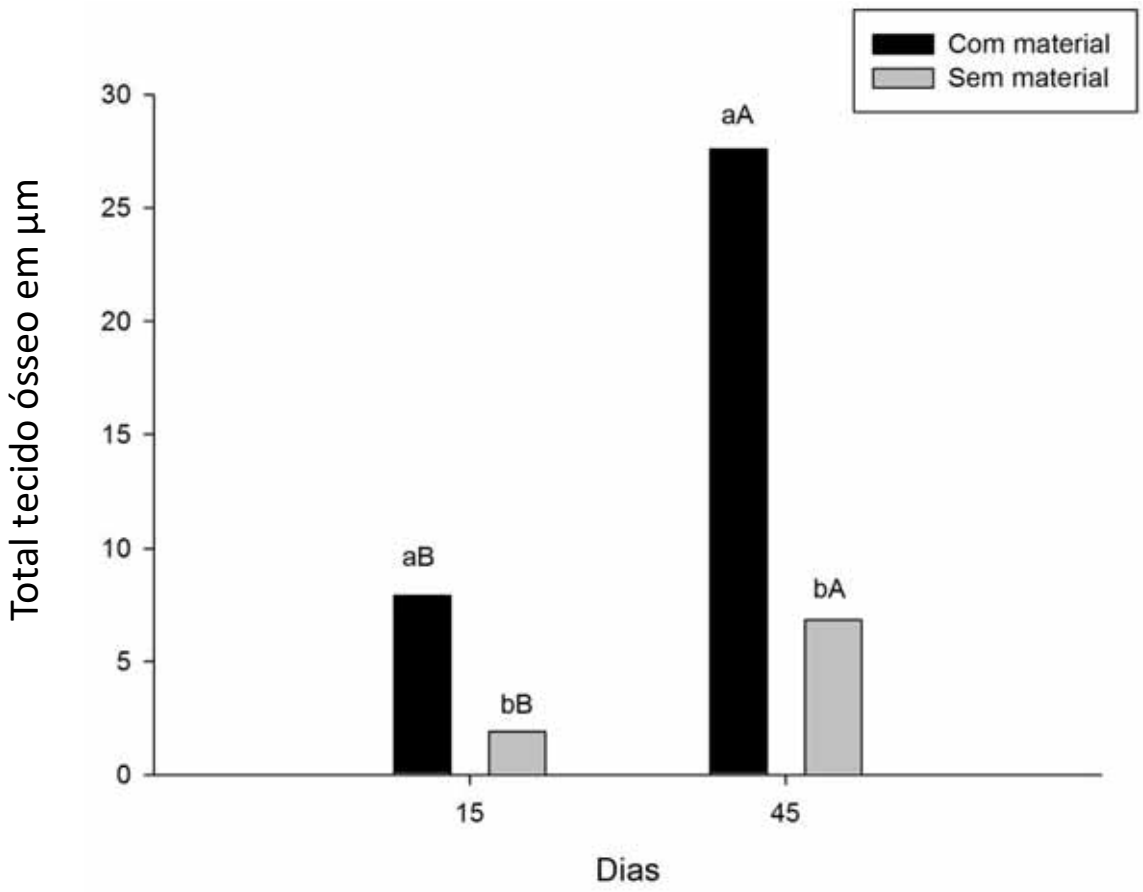


Figura 11: Análise quantitativa de formação de tecido ósseoem levantamento de membrana de seio maxilar em coelhos: Houve maior neoformação no grupo βTCP e no período de 45 dias. A análise estatística indicou significância estatística * P <0,01 entre βTCP e CO entre os perídos 15 e 45 dias, por comparações múltiplas de médias: teste de Tukey.

PERIODO	GRUPO CONTROLE	GRUPO βTCP
15 DIAS	6,716% ± 0,212	14,451% ± 0,0443
45 DIAS	30,502% ± 1,824	33,011% ± 0,0294

Figura 12: Porcentagem de tecido ósseo neoformado em relação a área total do levantamento da membrana de seio maxilar em coelhos, para ambos os grupos

PERÍODO	% βTCP
3 DIAS	66,6621% ± 0,0559
7 DIAS	49,340% ± 0,0125
15 DIAS	36,684% ± 0,1246
45 DIAS	31,682% ± 0,0257

Figura 13: Porcentagem de βTCP em decorrência do tempo de pós operatório, presente em levantamento de membrana de seio maxilar em coelhos, houve diferença significativa entre os períodos ($P<0,05$) caracterizando reabsorção do material.

Anexo A: Certificado do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA)

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Uso do Beta Tri Cálcio Fosfato em levantamento da membrana do seio maxilar. Estudo histológico, histomorfométrico e imunoistoquímico em coelhos"** sob responsabilidade do Pesquisador **ELIO HITOSHI SHINOHARA** e colaboração de Patricia Rota Bermejo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01103-2012**.

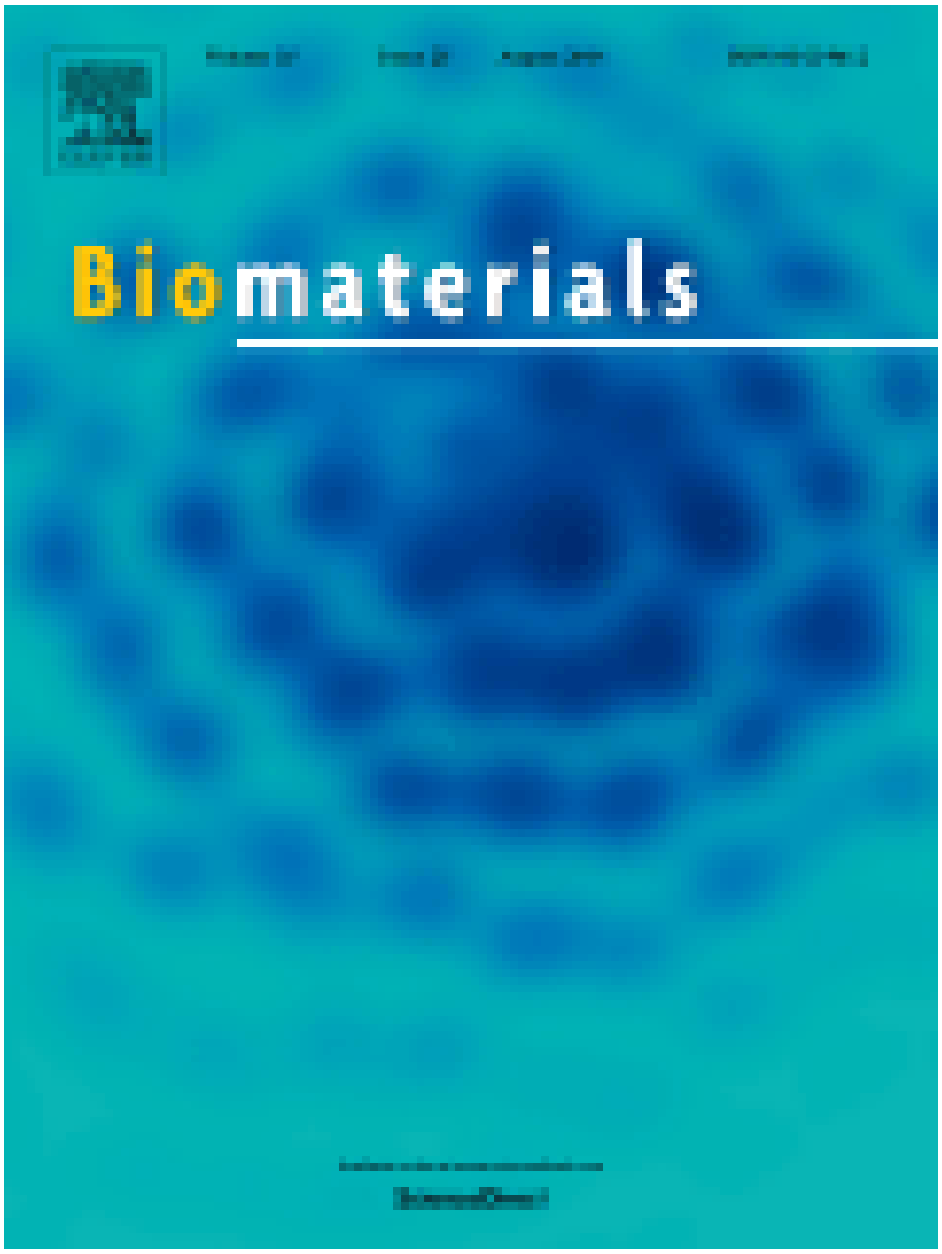
CERTIFICATE

We certify that the research **"Beta Tricalcium Phosphate in maxillary membrane sinus lifting. Histological, histomorphometric and immunohistochemistry study in rabbits"**, process number **01103-2012**, under responsibility of **ELIO HITOSHI SHINOHARA** and with collaboration of Patrícia Rota Bermejo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – **Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal** – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@mva.unesp.br

ANEXO B: Normas da revista para publicação do artigo final



GUIDE FOR AUTHORS

The peer review submission system for *Biomaterials* is located here: http://ees.elsevier.com/biomat/

The Elsevier Editorial System (EES) is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Please register at: http://ees.elsevier.com/biomat/

Referees, whose names are not normally disclosed to the authors, will study all contributions which the Editor-in-Chief deems to be of sufficient significance and interest to be sent for peer review. The criteria by which this initial assessment is made include relevance to the scope of the journal, the originality of the work and its significance to the broad development of the field of biomaterials.

BeforeYouBegin All authors, especially those submitting to the journal for the first time, are encouraged to read the following document authored by the Editor in Chief, which gives an overview of the journal as well as the writing and selection process of academic publishing as it relates to *Biomaterials*: Writing Papers for *Biomaterials*.

Ethics in Publishing: For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication seehttp://www.elsevier.com/authorethics and http://www.elsevier.com/ethicalguidelines.

Changes to authorship This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Mandatory Author Declaration: In addition to uploading manuscripts and figures, it is required that the corresponding author of each manuscript uploads a separate Author Declaration. All authors must sign this declaration; the corresponding author may not sign on behalf of other authors.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. Please use the template given above for this Declaration. Authors may save this template, obtain the required signatures and then upload it as an integral part of their submission. The editorial process will not begin until and unless all authors have signed the declaration.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

Amendments to Manuscripts In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

Copyright All authors must sign the "Journal Publishing Agreement" before the article can be published. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with an agreement

form or a link to the online version of this agreement. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: http://www.elsevier.com/authorsrights.

The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult http://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult http://www.elsevier.com/permissions.

Role of the Funding Source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please seehttp://www.elsevier.com/funding.

Funding Bodies Agreements and Policies Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visithttp://www.elsevier.com/fundingbodies.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. Files prepared in LaTEX are not supported. Figure captions should be in Arial font 9pt. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. The preferred style is: Surname, Initials, Department, Institution, City/State, Postal Code, Country. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

English Language: Manuscripts should be proof-read and have English language errors corrected before submission as we may have to return papers due to poor language usage. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visithttp://www.elsevier.com/languagepolishing for more information.

Paper Length: Authors are urged to write as concisely as possible.

Abstracts: All manuscripts are to be supplied with an Abstract of about 100-200 words in length.

Keywords: Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes. A keyword list can be found at the end of these instructions. click here).

Text: Follow this order when typing manuscripts:Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The

unit 'billion' (109 in America, 1012 in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to references by a number in square brackets on the line (e.g. Since Peterson[1]), and the full reference should be formatted according to the permutation of the Vancouver reference system with numbers in the text. It is suggested that authors refer to the following link for a comprehensive overview of the Vancouver reference styles: Vancouver Reference Styles

Examples of formatting follow:

1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. J Mater Sci: Mater Med 1993;4:503-508.
2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. Biomineralization. Chemical and biochemical perspectives. New York: VCH, 1989. p. 157-182.
3. Brown W, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.

N.B.: â€œEt alâ€• must be used after the first 6 authors have been named. *Biomaterials* does not use the publication month or day.

Online Sources: References to online sources, including articles in press, should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication.

Examples of formatting follow:

1. UK House of Commons Science and Technology Committee. Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL:http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/399/39902.html
   2. Wellcome Trust. Economic Analysis of Scientific Research Publishing. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html
   3. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. Curr Opin Biotechnol. 2011. Available from URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531126 (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003).

Artwork

Electronic artwork *General point* Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font. Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol. Number the illustrations according to their sequence in the text. Use a logical naming convention for your artwork files. Provide captions to illustrations separately. Produce images near to the desired size of the printed version. Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: http://www.elsevier.com/artworkinstructions You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*
Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics". TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is". **Please do not:** Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document; Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low; Supply files that are too low in resolution; Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.