

MARIA DEL PILAR RODRIGUEZ SANCHEZ

**Imunomarcacão da OPG e RANKL no reparo ósseo após a cirurgia de elevação
do seio maxilar com Bio-Oss**

Araçatuba

2015

MARIA DEL PILAR RODRIGUEZ SANCHEZ

**Imunomarcção da OPG e RANKL no reparo ósseo após a cirurgia de elevação
do seio maxilar com Bio-Oss**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obter o título de “Doutor em Odontologia” - Área de Concentração: Implantodontia

Orientadora: Prof^a. Ass. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Rodriguez Sánchez, Maria Del Pilar.
R696r Imunomarcção da OPG e RANKL no reparo ósseo após a
cirurgia de elevação do seio maxilar com Bio-Oss/ Maria Del
Pilar Rodriguez Sánchez. - Araçatuba, 2015
64 f. : il. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Seio maxilar 2. Transplante ósseo 3. Materiais biocom-
patíveis I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus Pai, Filho e Espírito Santo, a luz que me guia, o caminho pelo qual devo percorrer e coloca anjos que facilitam minha estrada.

A meus pais Elba e Antonio, sempre presentes no meu coração, vocês quem me ensinaram o valor das asas e a direção dos ventos pelos quais eu teria que buscar meus sonhos. Vocês são exemplo de força, disciplina e amor.

A meus Irmãos, Beatriz, Elba, Paul, meus primeiros amigos e cúmplices. Vocês sempre estão presentes em cada momento da minha vida, não importa qual longe ou perto esteja, a distância de nossos corações sempre será a mesma. Apoio incondicional, especialmente o de meu querido irmão, que assegurou tudo o que foi necessário para que eu pudesse voar.

Agradecimentos Especiais

A minha Profa. Dra. Orientadora Roberta Okamoto, agradeço a sua orientação e conselho e me ajudar a ver as coisas de outra forma. A melhor forma de agradecer é pedindo que Deus abençoe seu caminho.

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, infinitamente agradecida pela oportunidade e confiança em mim depositada. Eu admiro profundamente a sua preocupação com os alunos em na sua essência humana. Você é um grande exemplo.

Às professoras, do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Ana Paula Farnezzzi Bassi, Daniela Ponzoni, agradeço a oportunidade de trabalhar juntas, sempre de mãos abertas para entregar de si o melhor e crescer juntas. Agradeço o tempo compartilhado o seu conhecimento.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Francisley Ávila Souza, Alessandra Marcondes Aranega, Oswaldo Magro Filho, Leticia Helena Theodoro, Juliano Milanezi de Almeida, por estarem dispostos a me ajudar quando necessário.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, Alaíde Gonçalves, Edilson Ervolino, pela amizade e por compartilhar seu conhecimento de forma desinteressada.

Aos técnicos de laboratório e clínica, Paulo, Odair, e ao secretário, Renato, obrigada pela ajuda quando necessária, assim como os momentos de descontração espontânea que facilitaram nossa rotina diária.

A Dirce e Cleide, agradeço o acolhimento, vocês fizeram os dias mais alegres e me fizeram sentir o calor de família

À minha amiga Juceléia Maciel, a quem considero uma irmã, com quem duplico as minhas alegrias e divido as tristezas. Você é um presente do céu. Peço que tuas asas te levem além dos teus sonhos.

Ao meu amigo Leonardo Pérez Faverani, alma nobre e grande exemplo, quem conhece o valor do esforço, obrigada pela ajuda desinteressada e sincera. Você também é um grande presente do céu. Sempre te levarei no meu coração.

À minha Amiga Lamis Meorin Nogueira, dadiva valiosa e única, foi muito grato compartilhar muitos momentos da minha vida com você, de quem aprendi muito. Sempre estás presente nas minhas orações. Minha alegria também é ver que você vai no caminho certo no cumprimento dos seus sonhos.

Ao Geraldo Luiz Griza, novamente nos encontramos no caminho, e desta vez você me ajudou muito. Agradeço pela oportunidade que me destes, pela qual me dei conta que ainda a muito por aprender. Obrigada, pois sem você tudo isto não teria sido possível. Deus sempre ilumine teu caminho ao igual que a tua família.

À Rodrigo Pereira, Giovanna Francisconi, Regis Melo, Fabrizio Cabrera, Cristian Statkievicz, Obrigada pela oportunidade que me deram por compartilhar a minha pouca experiência e conhecimento na vida acadêmica. Obrigada por ajudar-me a crescer. Do lado de vocês passei momentos maravilhosos. Peço a Deus que vocês sejam pessoas vitoriosas.

Aos meus amigos Liliana Baez, Regis Melo e Rosse Mary Falcón, assim como aprecio a boa música, da mesma forma os aprecio, pois vocês são as cordas com quem toquei doces melodias. Obrigada por ser a minha família em Araçatuba.

Ao André Luís Fabris, Gabriel Ramalho e Sabrina Ferreira, foram muitos momentos de alegria que compartilhamos. Vocês também têm um espaço especial no meu coração, obrigada pela amizade e confiança.

Aos alunos de graduação, Jadison Júnior, Veronica Honda, Bruno Mendes, Debora Galafassi, Camila Telles. Sem vocês não teria sido possível

realizar grande parte dos trabalhos que desenvolvemos juntos. Agradeço a eficiência de vocês. Vocês fazem parte desta conquista, e meu sonho é também saber que vocês terão as suas.

As estagiárias de Ciências Básicas, Danila de Oliveira, Karen Lumi Nakasato, Fernanda Yogui que fizeram possível este trabalho. Obrigada pelo carinho, vocês estão no meu coração.

Agradecimentos

Aos meus colegas Melyna de Almeida, Vanessa da Silva, Eliana Caliente, Vivian Noronha, Yeselin Miranda, Amalia Moreno, Igor Puttini, agradeço o tempo compartilhado, tudo é bem mais fácil quando conseguimos rir juntos de nós mesmos. Deus seja sempre seja a sua luz e guia.

Aos meus colegas de turma Fernanda Boos, Carlos Timóteo, Helen Esper, Flávia Pereira, Eduardo Faco, Rodolpho Valentini Neto, Patrícia Bermejo, Juliana Zorzi, Bianca Bravin William Moraes, William Caetano, Júlio Cesar, Julherme Ferrerira, Cristian Statkievicz, William Ricardo, Júlio Maciel, Rafael Santiago, Carulina Moraes, Monica Palácio, Ana Paula Simões, Elisa Sartori e, Tarik Polo. Agradeço a Deus por ter colocado no meu caminho, pois de cada um aprendi alguma coisa. Os recordarei com muito carinho.

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, sem vocês nada teria sido possível, pois cada um de vocês com o seu sim, nos permitiram dar aportes de alta qualidade a ciência, ao mesmo tempo conseguiram um novo e belo sorriso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado.

Não sou obrigado a vencer mas tenho o dever de ser verdadeiro. Não sou obrigado a ter sucesso mas tenho o dever de corresponder à luz que tenho.

Abraham Lincoln

**Imunomarcacão da OPG e RANKL no reparo ósseo
após a cirurgia de elevação do seio maxilar com
Bio-Oss**

*Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periodico Internantional
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Anexo B)*

RESUMO

Rodriguez-Sánchez MP. Imunomarcacão da OPG e RANKL no reparo ósseo após a cirurgia de elevação do seio maxilar com Bio-Oss [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015

A reabilitação protética com implantes dentais tornou-se um tratamento comum, contudo a presença de áreas edêntulas favorece o processo natural de reabsorção, resultando em rebordos alveolares com volume ósseo deficiente para um bom planejamento cirúrgico e protético. A elevação da membrana do seio maxilar com abordagem pela parede lateral é a técnica cirúrgica melhor documentada para a reconstrução desta região, com utilização de enxertos de origem autógena, xenógena, homóloga ou aloplástica. O objetivo deste estudo foi avaliar a neoformação óssea e caracterizar os eventos que marcam a remodelação óssea após a realização de cirurgias de elevação de seio maxilar, utilizando o Bio-Oss® associado a osso autógeno ou isolado, através de imunomarcacão das proteínas dos novos membros do fator de necrose tumoral, osteoprotegerina e o ligante do receptor ativador para o fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL). 25 pacientes com bom estado de saúde geral foram selecionados para realizar procedimentos reconstrutivos da região posterior da maxila e posteriormente realizar a instalacão de implantes osseointegrado em um segundo tempo cirúrgico. Os seios maxilares foram divididos em 3 grupos, dependendo do material de enxerto: Grupo B: Bio-Oss®; Grupo BA: 1:1 Bio-Oss® + osso autógeno; Grupo A: Osso autógeno. Biopsias das áreas de instalacão de implantes foram coletadas para avaliacaão histomorfométrica e imunoistoquímica. Os dados da avaliacaão histométrica foram submetidos à análise estatística paramétrica pelo análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para determinar diferenças entre os grupos. A avaliacaão imunoistoquímica foi realizada por análise qualitativa ordinal através da atribuiçaão de diferentes “scores”. Na avaliacaão histológica foi observada neoformacão óssea nos três grupos, com presença de trabéculas de osso maduro, nos grupos B e BA, foi observada a presença de grânulos do biomaterial com tecido ósseo ao redor. A análise estatística apontou diferença significativa (ANOVA $p=0.002$), sugerindo uma maior neoformacão óssea no grupo de osso autógeno. Na avaliacaão imunoistoquímica foi

observado intensa imunomarcção das proteínas OPG e RANKL no grupo tratado com Bio-Oss®, na matriz extracelular próximo aos grânulos como nos osteoblastos. Dentro das limitações deste estudo pode se concluir que o BioOss, promove altas taxas de remodelação óssea, caracterizado pela intensa imunomarcção da OPG e RANKL, mostrando que as propriedades deste biomaterial, quando utilizado na região de seio maxilar favorece a produção destas proteínas que comandam os eventos envolvidos no turnover ósseo num período de 6 meses.

Palavras-chave: . Seio maxilar, Transplante ósseo, Materiais biocompatíveis

ABSTRACT

Rodriguez-Sánchez MP. OPG and RANKL immunolabeling of bone healing after maxillary sinus lifting with Bio-Oss [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015

The prosthetic rehabilitation with dental implants has become a common treatment, to replace missing teeth, after that the alveolar process go through the natural process of resorption, resulting ridges with poor bone volume for a good surgical and prosthetic planning. Sinus lifting technique, by the lateral window technique is well documented, using autogenous bone grafts, xenogenous, homogenous or alloplastic materials. The aim of this research was to assess new bone formation and the events of bone remodeling after maxillary sinus lifting surgery using Bio-Oss® associated with autogenous bone or isolated by immunolabeling of the new members of necrosis tumoral factor Osteoprotegerin (OPG) and the Receptor Activator for Nuclear Factor $\kappa\beta$ (RANKL). Twenty-five patients with good general health status were selected to perform reconstructive surgeries of the posterior maxilla and later performed the installation of osseointegrated dental implants in a second surgical time. Maxillary sinus were divided in 3 groups, depending on the graft as follow: Group B: Bio-Oss®; Group BA: 1;1 Bio-Oss® + bone graft; Group A: Autogen bone graft. Biopsies of implant placement areas were collected for histometric and immunohistochemical assesses. Histometric data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey parametric test, to establish differences among groups. The immunohistochemical assess was qualitative ordinal, giving scores to the protein stained. Histologic findings showed new bone formation in all groups, particles of Bio-Oss were observed on groups Bio-Oss and Bio-Oss-autogenous bone graft 1;1, surrounded by new bone. There were significant differences among groups related to new bone formation (ANOVA $p=0.002$), pointed out more new bone formation on the autogenous group. Intense immunolabeling was observed in OPG and RANKL protein in-group treated with Bio-Oss®, nearby the extracellular matrix granules and the osteoblasts. Within the limitations of this study it can be concluded that Bio-Oss increases bone remodeling rate, characterized by the intense immunostaining of OPG and RANKL, showing that the properties of the biomaterial used in the maxillary

sinus region favors the production of these proteins, which control the events involved in bone turnover within 6 months.

Keywords: Maxillary sinus, bone transplantation, biocompatible materials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ortopantomografia utilizada para avaliação e seleção do paciente para a pesquisa.....	46
Figura 2a	Representação esquemática da coleta da biopsia, após a elevação do seio maxilar.....	46
Figura 2b	Esquema do conteúdo da biópsia: osso residual, área enxertada.....	47
Figura 3	Mensuração de porcentagem de osso neoformado, utilizando o programa ImageJ, através da marcação e contagem dos pontos presentes no osso neoformado.....	47
Figura 4	Imagens representativas das biópsias coletadas dos seios maxilares reconstruídos com: A: Bio-Oss® (DAB, original 63X); B: Bio-Oss ® 1:1 osso autógeno (DAB, original 63X); C: Osso autógeno. (DAB, original 63X); D Bio-Oss® (DAB, original 400X); E: Bio-Oss ® 1:1 osso autógeno (DAB, original 400X); F: Osso autógeno (DAB, original 400X). Coloração: hematoxilina e eosina em escala de 100 µm.....	48
Figura 5	Representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea nos grupos avaliados.....	49
Figura 6	Microfotografia corada em hematoxilina de Harris, em escala de 100 µm, (DAB, original 200X) mostrando a dinâmica do processo de remodelação óssea em seios maxilares reconstruídos. Símbolos: as apontam as áreas de imunomarcação positiva em A : Bio-Oss ® - OPG; B: Bio-Oss ® 1:1 osso autógeno –OPG; C: Osso autógeno - OPG; D: Bio-Oss ® -RANKL; E: : Bio-Oss ® 1:1 osso autógeno - RANKL; F: Osso autógeno -RANKL.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos grupos do estudo.....	45
Tabela 2:	Resultados das análises estatísticas dos dados histomorfométrico....	45
Tabela 3	Escores representativos da análise imunoistoquímica realizada nos grupos experimentais: B: Bio-Oss; AB: Bio-Oss ®, 1:1 osso autógeno; A: Osso autógeno.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Osso autógeno
B	Bio-Oss
BA	Bio-Oss + osso autógeno
BMU	Unidades celulares multifuncionais
Cbf1	Core binding fator 1
CT	Connective tissue (Tecido conjuntivo)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FOA UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Ltd	Limitada
mm	milímetros (unidade de medida)
M	Molaridade
MPRS	Maria del Pilar Rodriguez Sánchez
NB	New bone formation (osso neoformado)
OPG	osteoprotegerina
PBS	Solução de tampão fosfato salina
RANKL	Ligante do receptor ativador para o fator nuclear $\kappa\beta$
RANK	Receptor ativador para o fator nuclear $\kappa\beta$
RO	Roberta Okamoto
TGF- β	Fator de crescimento de transformação- β
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	Mililitros ($1\text{L} \times 10^{-3}$)
ppm	Partes por Milhão (mg / L)
pH	Potencial Hidrogeniônico
μg	Micrograma ($1\text{g} \times 10^{-6}$)
Kg	quilograma
L	Litro
m	Metro
min	Minuto
mg	Miligramma
mm	Milímetro
%	Percentual
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. PROPOSIÇÃO	22
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 Procedimentos Cirúrgicos	24
3.1.1 Coleta do enxerto autógeno	25
3.1.2 Elevação da membrana sinusal	25
3.1.3 Instalação de implantes e Coleta das amostras	26
3.2 Análise Histomorfológica	26
3.3 Análise Histométrica	26
3.4 Análise Imunoistoquímica	27
3.5 Análise das imunomarcações	28
3.6 Análise Estatística	28
6 RESULTADOS	31
4.1 Análise Histomorfológica	31
4.2 Análise Histométrica	31
4.3 Análise Imunoistoquímica	32
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	48

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O processo fisiológico de remodelação óssea após as exodontias é caracterizado por altas taxas de reabsorção dos processos alveolares, fato este que pode comprometer o sucesso dos implantes osseointegráveis ⁽¹⁾. Ainda assim, a região posterior da maxila apresenta o agravante da pneumatização do seio maxilar ^(2, 3), o que torna necessária a realização de procedimentos reconstrutivos permitindo o aumento de volume ósseo com a capacidade de promover estabilidade primária dos implantes ⁽⁴⁾. O conhecimento da biologia óssea assim como a fisiologia do enxerto são cada vez mais críticos, e a maxila difere da mandíbula na sua função, fisiologia e densidade óssea ⁽⁵⁾.

Os enxertos de osso autógeno continuam sendo o padrão ouro para os procedimentos de reconstrução óssea ⁽⁵⁻⁸⁾ mas o uso de substitutos ósseos é indicado para diminuir a quantidade de volume a ser removido da área doadora. Em seios maxilares com maiores dimensões é necessário de 5 a 6ml de osso autógeno, mas quando se usam os substitutos ósseos em combinação com o osso autógeno estas quantidades diminuem ⁽⁹⁾. Diferentes substitutos ósseos como osso homogêneo, β tricalcio fosfato, vidro bioativo, hidroxiapatita bovina entre outros são usados para obter resultados a longo prazo quanto a resistência à reabsorção do enxerto autógeno, mantendo maiores volumes na área enxertada ^(7, 10-12).

BioOss® (Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland) é um osso cortical bovino desproteinizado, com características químicas e estruturais similares ao osso humano e boas propriedades mecânicas ⁽¹³⁾. Apresenta propriedades osteocondutoras, e se integra de forma natural no processo de regeneração óssea ^(14, 15). Bio-Oss® é o biomaterial mais utilizado e estudado para aumento das maxilas atroficas na elevação de seio maxilar ⁽¹⁶⁾. O volume aumentado permanece por tempo prolongado devido a sua lenta reabsorção resultando em tecido duro permanente ^(14, 15). Apresenta resultados favoráveis na formação óssea ao redor dos implantes, quando comparado com osso autógeno da crista ilíaca ⁽¹⁷⁾.

A integração do enxerto ósseo sofre um processo de remodelação similar ao processo fisiológico do osso inclusive após uma fratura ⁽⁸⁾. A remodelação óssea começa com a fase de ativação, em que há migração dos osteoclastos que

promovem a reabsorção óssea, posteriormente a fase de reversão caracterizada pela apoptose dos osteoclastos, seguida pela fase de formação óssea por osteoblastos novos ⁽¹⁸⁾. A fase inicial deste processo com o desenvolvimento dos osteoclastos deve ser sob o controle dos pré-osteoblastos para assegurar o processo de reabsorção e neoformação óssea esteja estreitamente relacionado, permitindo que a cada ciclo de reabsorção seja seguido de neoformação, mantendo a integridade esquelética ⁽¹⁹⁾.

Em nível molecular, a cascata de eventos que acontecem de forma coordenada para promover as respostas de remodelação óssea está relacionada à liberação de proteínas que fazem parte da família de novos membros do fator de necrose tumoral a osteoprotegerina (OPG) e o ligante do receptor ativador para o fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), como mediadoras da fase final da osteoclastogenese ^(8, 18-23).

A diferenciação e ativação dos osteoclastos, células especializadas que degradam a matriz óssea é regulada de forma definitiva pelo sistema paracrino OPG/RANKL. A OPG é uma proteína solúvel que age como receptor chamarriz do RANKL, sua atividade biológica é antagônica aos efeitos da RANKL ao competir pela ativação do receptor ativador para o fator nuclear $\kappa\beta$ (RANK), inibindo assim a diferenciação, ativação dos osteoclastos e consequentemente diminuindo a reabsorção óssea. O papel deste sistema na regulação do metabolismo ósseo permite respostas de remodelação óssea satisfatória ^(24, 25).

O processo de neoformação óssea na elevação de seio maxilar têm sido amplamente estudado na presença de enxertos ósseos com diferentes biomateriais no intuito de melhorar as respostas biológicas do tecido ósseo ^(7, 14, 16, 26, 27), porém o processo de remodelação do ponto de vista das vias de sinalização envolvidas tem sido pouco explorado. O Bio-Oss®, é um biomaterial de uso consagrado para as cirurgias de elevação de seio maxilar, apresentando bons resultados na sobrevida precoce dos implantes ^(11, 14, 27, 28), fato que pode estar relacionado à lenta taxa de reabsorção do biomaterial. Este aspecto pode interferir na taxa de remodelação do tecido ósseo, o que justifica a necessidade em se avaliar o papel das proteínas que fazem parte da família dos novos membros do fator de necrose tumoral o que encontram-se relacionadas diretamente à sinalização para as respostas de remodelação do tecido ósseo.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a neoformação óssea através de análise histomorfométrica e caracterizar os eventos que marcam a remodelação óssea após a realização de cirurgias de elevação de seio maxilar, utilizando o Bio-Oss associado a osso autógeno ou isolado, através de imunomarcação das proteínas OPG e RANKL.

Material e método

3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob número 05509112.4.0000.5420 e seguiu as regulamentações da norma de Helsinki (Anexo A).

Vinte e cinco pacientes de ambos gêneros, (12 masculino e 13 feminino), variando entre 41 a 65 anos de idade, que foram atendidos na Associação Brasileira de Odontologia-Regional Cascavel- Pr, com volume ósseo inadequado na região posterior da maxila, com rebordo remanescente menor ou igual a 5mm de altura, avaliados radiograficamente, foram selecionados para realizar cirúrgicas reconstrutivas ósseas para posterior instalação de próteses implanto-suportadas. Para a seleção dos pacientes foram realizadas análises de imagens diagnósticas; radiográficas (Fig.1) e tomográficas das áreas receptora e doadoras (mento e ramo mandibular), sendo coletado o nas áreas de maior volume ósseo.

Pacientes com problemas sistêmicos não controlados, tabagistas, com história de radiação na área de cabeça e pescoço, doença periodontal ou patologias sinusais, foram excluídos desta pesquisa.

3.1 Procedimentos cirúrgicos

Trinta e oito elevações de seios maxilares foram realizadas na clínica de Implantodontia da Associação Brasileira de Odontologia-Regional Cascavel- Pr, sob rigoroso protocolo de assepsia. Os casos de elevação bilateral foram realizados em na mesma sessão cirúrgica. O material de enxerto foi assinado dependendo da altura residual do rebordo alveolar, para cada seio maxilar, sendo divididos de acordo com o material utilizado para a reconstrução (tabela 1).

Os procedimentos foram realizados sob anestesia local de lidocaína com adrenalina 1:1000.000 (Alphacaina –DFL/Brasil).

4.1.1 Coleta de enxerto autógeno

As áreas doadoras intra-bucais foram escolhidas de acordo a quantidade ou volume ósseo necessário para o leito receptor(Sínfise, ou ramo mandibular). O osso coletado foi particulado com triturador ósseo manual (Neodent – Curitiba/Brasil)

A coleta do enxerto do mento foi realizado com uma abordagem mucoperiosteal na região vestibular anterior da mandíbula entre os caninos, após a elevação do retalho, foi realizada osteotomia na tabua óssea cortical vestibular com broca 701 (KG Sorensen –Cotia/SP) sob continua irrigação de solução fisiológica 0,9% (ADV-Nova Odessa/SP). Os blocos dos enxertos foram desenhados 5mm abaixo das raízes dentarias, acima da protuberância mentoniana inferior e medial a raízes dos caninos lateralmente. Os blocos foram removidos com cinzeis.

A coleta do enxerto do ramo foi realizada através da abordagem mucoperiostico na linha oblíqua externa, estendendo-se do ramo da mandíbula até o segundo molar inferior. O osso foi coletado na linha oblíqua externa, seguindo o mesmo padrão de irrigação e remoção que o enxerto de mento. Os retalhos foram reposicionados e suturados por planos.

4.1.2 Elevação da membrana sinusal

Um retalho mucoperiosteal foi elevado com acesso a parede lateral do seio maxilar, posteriormente foi realizada uma janela óssea com broca esférica diamantada número 8 (KG Sorensen-Cotia/SP), para acessar ao seio maxilar como preconizado por Tatum, 1986 ⁽²⁹⁾. A janela foi empurrada medialmente, para elevar a membrana de Schneider com curetas específicas. A cavidade criada entre a membrana e o osso alveolar residual foi preenchida com o material selecionado em cada caso. Finalizados os procedimentos, os retalhos foram reposicionados e suturados com fios reabsorvíveis. Em nenhum dos casos foi utilizado nenhum tipo de membrana.

4.1.3 Instalação de Implantes e coleta das amostras

A instalação de 74 implantes foi realizada sob anestesia local, após abordagem mucoperiosteal na crista alveolar, 6 meses depois das cirurgias de elevação de seio maxilar. No momento da instalação dos implantes as biopsias foram coletadas com uma broca trefina de 2.0mm de diâmetro, em direção vertical na área enxertada (Fig. 2a, 2b), seguindo a posição planejada para instalação dos implantes. Foram utilizados implantes HE hibi rods de 3.75mm de diâmetro (P-I Brånemark® -Zimmer/Brasil) e 11.5mm de comprimento. Finalizados os procedimentos, os retalhos foram reposicionados e área foi suturada.

As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7 por 48 horas e descalcificadas em EDTA 5% (Ácido Etileno Diamino Tetracético - Merck-Frankfort/Alemanha) por 42 dias. As peças foram incluídas em parafina e submetidas à microtomia para a obtenção de cortes longitudinais com 6µm de espessura para a análise histomorfométrica e imunoistoquímica.

O processamento das peças foi realizada no Laboratório do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP

4.2 Análise Histomorfológica

Utilizou-se microscópio de luz convencional Carl Zeiss-Jenamed 2 (Jena/Alemanha) sob foco fixo e clareza de campo, com aumento inicial de 63X e 400X foram avaliados pelo menos quatro cortes histológicos de cada espécime. Um observador calibrado (MPRS) identificou a morfologia tecidual de cada grupo.

4.3 Análise Histométrica

As imagens dos cortes semi-seriados dos espécimes para avaliação da neoformação óssea da área enxertada, foram capturadas por câmera digital (Axiocam ICc1- Zeiss- Jena/Alemanha) acoplada ao microscópio óptico Carl Zeiss - Jenamed 2 (Jena/Alemanha), e conectado a um computador Itautec infowayST43443329 DC, monitor LG® E2355V, 800x600 dpi. As imagens foram capturadas em aumento de 63X imediatamente acima da interface entre o osso remanescente, capturando a área enxertada. As fotos foram avaliadas através do programa de processamento de imagem digital ImageJ. O programa foi calibrado em 8000 pixels, que permitiam a contagem de 192 pontos na área total da imagem. Os pontos presentes na área de osso neoformado foram contabilizados, verificando que não fossem áreas de osso enxertada. Foi transformada em densidade de área (%), considerando a área total de 192 pontos como 100%. (Fig.3)

4.4 Análise Imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Ciências Básicas da FOA-Araçatuba/UNESP.

O método de detecção por imunoperoxidase foi utilizado e os cortes em parafina foram selecionados para a realização da imunomarcagem contra as proteínas osteoprotegerina (OPG) e a ligante do receptor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), com o intuito de caracterizar a sinalização para a resposta de formação óssea (OPG) bem como para a resposta de reabsorção óssea (RANKL).

O processamento imunoistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos, seguidos de banhos em citrisolve e banhos em concentrações decrescente de álcoois) e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01M). A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) em calor úmido. Foi realizado ainda o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado por 20 minutos. Ainda como método de

bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%.

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina (OPG), (OPG, Goat, (cabra) anti-opg-Santa Cruz Biotechnology, SC21038), contra o Ligante do receptor nuclear κ B (RANKL) (Goat anti-rankl- Santa Cruz Biotechnology, SC7627), anticorpos policlonais, produzidos em cabra. O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotinilado anti-cabra, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). O sinal da reação foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC standard, Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a Diaminobenzidina (Dako An Agilent Technologies Compay, Glostrup/Dinamarca). Ao término das reações imunoistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris ou Methil Green. Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas em xilol, as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Benshein, Alemanha).

4.5 Análise das Imunomarcações

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes “scores” de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular com imunomarcação positiva, determinada por uma coloração marrom no citoplasma das células, durante o processo de remodelação óssea. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas mostrando o escore representativo dos grupos. O analisador (RO) foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. Os escores utilizados representaram 0 (ausência de marcação), 1 (marcação leve), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação intensa).

4.6 Análise Estatística

Após a obtenção dos resultados histométricos os dados foram tratados estatisticamente, baseados nos valores de percentagem de neoformação óssea, pelo programa Biostat 5.0 (IDSM- Amazonas/Brasil). O teste de Shapiro-Wilk para contrastar a normalidade dos dados. Confirmada a distribuição normal dos dados foi realizado o análise de variância ANOVA, e o Tukey com o intuito de verificar as diferenças entre os grupos. Para as análises, valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Resultados

4 RESULTADOS

Foram reconstruídos 25 pacientes, cuja idade variou de 41 a 65 (media 55.1 ± 5.7). Foram instalados 74 implantes, dos quais 30 biópsias foram coletadas e foram submetidas ao processamento histológico e imunoistoquímico para a detecção das proteínas OPG e RANKL no tecido ósseo analisado.

4.1 Análise Histomorfológica

Foi avaliado o padrão histomorfológico das lâminas coradas em HE, onde foi possível observar o processo de neoformação óssea nos três grupos avaliados. No grupo B observou-se entre os grânulos, trabéculas delgadas de osso maduro bem organizado, e caracterizado pela presença de osteocitos, assim como áreas de tecido conjuntivo. No grupo BA observou-se o mesmo padrão de neoformação óssea que no grupo anterior, entretanto, as trabéculas mostram-se mais espessas, caracterizando um maior grau de maturidade do tecido ósseo. No grupo A, foi possível observar o padrão de trabéculas ósseas espessas em maior quantidade que os outros grupos. Ainda neste grupo foram observados fragmentos de osso caracterizado pela ausência de osteocitos nas lacunas, sendo compatível com fragmentos de osso enxertado. Neste grupo também foram observadas áreas de tecido conjuntivo (Fig. 4).

4.2 Análise Histométrica

Os dados obtidos por meio da análise histomorfométrica permitiram quantificar a porcentagem de neoformação óssea em cada grupo estudado (Figura

5). Foram avaliados no mínimo quatro cortes de cada peça, tomando como referência a área acima da linha da interface entre o osso residual e a área enxertada.

Ao realizar a estatística dos dados coletados na histometria, estes apontaram diferenças estatísticas no teste ANOVA um fator ($p=0.002$). Para determinar a diferença entre grupos foi aplicada o teste de Tukey, apontando diferença estatística altamente significativa na comparação do grupo A com o B e A com AB ($p=0.001$ cada um). Os dados da estatística estão representados na Tabela 2.

4.3 Análise Imunoistoquímica

A taxa de remodelação óssea foi caracterizada pela análise conjunta da OPG e RANKL, (Figura 6). A remodelação óssea representa uma sequência de eventos que se inicia com reabsorção e seguida pela aposição óssea. Tanto a OPG como a RANKL são sintetizadas por osteoblastos. A imunomarcagem de ambas caracteriza a dinâmica do metabolismo ósseo.

A OPG é um receptor solúvel, sintetizado por células de linhagem osteoblástica e na matriz extracelular foi expressa em todos os grupos avaliados principalmente no B onde foi intensamente expressa na matriz extracelular, junto aos grânulos do biomaterial assim como junto aos fragmentos ósseos. No grupo de BA foi observada uma imunomarcagem variando de moderada a intensa e no grupo autógeno houve marcação moderada.

A RANKL é expressa nas células de linhagem osteoblástica, próximo ao tecido ósseo assim como nos osteócitos junto a matriz mineralizada do tecido ósseo. A RANKL foi intensamente expressa no grupo B, de moderada a intensa no grupo BA cujos escores foram equivalentes aos da OPG, e no grupo A houve imunomarcagem intensa.

O efeito osteocondutor do BioOss foi observado pela imuno marcação intensa tanto da OPG quanto da RANKL, da mesma forma que no grupo do osso autógeno, em que a taxa de reabsorção e formação apresentou-se equilibrada e de forma

articulada, sendo assim favorável para o metabolismo ósseo e a qualidade do osso neoformado

Houve uma elevação discreta na taxa de reabsorção óssea no grupo BA, aspecto que pode ser interpretado como uma atividade em maior escala das Unidades Celulares Multifuncionais (BMUs), o que a longo prazo pode melhorar a taxa de formação óssea. Os escores da análise imunoistoquímica estão representados na tabela 3.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A atrofia maxilar dificulta as reabilitações suportadas pelos implantes dentários^(5, 30). Desde o ponto de vista biológico o recrutamento de células ósseas será mais fácil quando há presença de uma altura óssea considerável de osso vital⁽³⁰⁾. Esta condição pode ser melhorada com o intuito de garantir estabilidade primária dos implantes. Na região posterior da maxila através de técnicas de elevação do assoalho do seio maxilar, na qual se cria um espaço entre a janela que foi realizada para o acesso a membrana sinusal e o assoalho do seio maxilar, o preenchimento pode ser realizado com enxerto, biomateriais ou a mistura dos dois^(7, 8, 12, 31).

O processo de reparo e remodelação óssea dos enxertos depende da vascularização da membrana sinusal, do retalho mucoperiosteal e do osso do assoalho do seio maxilar, a manutenção da janela óssea vestibular assim como as características do tipo de enxerto ou biomaterial⁽²⁹⁾ utilizado e sua correta indicação⁽³⁰⁾.

A metodologia utilizada neste trabalho incluiu pacientes que apresentaram atrofia na região posterior da maxila com rebordo remanescente menor ou igual a 5mm de altura, para ser reconstruídos com Bio-Oss®, a mistura 1:1 de osso autógeno e Bio-Oss® e um terceiro grupo com osso autógeno por representar o padrão ouro das reconstruções ósseas, posteriormente foram instalados implantes osseointegrados (P-I Brånemark® -Zimmer/Brasil) em um segundo tempo cirúrgico.

Trinta biopsias da área reconstruída foram coletadas durante as cirurgias de instalação de implantes, para avaliar a neoformação óssea e seu processo de remodelação após 6 meses pós-operatórios, através da análise imunoistoquímica da expressão das proteínas OPG/RANKL dos 3 grupos avaliados.

O osso autógeno confirmou seu potencial como enxerto ideal para as reconstruções ósseas, apresentando a maior porcentagem de neoformação óssea em relação a uso do Bio-oss® ou da sua associação com ele. Sendo isto confirmado através do teste estatístico aplicado ANOVA, ($p=0.002$) e o test de Tukey nas comparações intra-grupos.

A interação biológica entre a interface osso-biomaterial são essenciais para o sucesso clínico a longo prazo. A neoformação óssea em contato com as partículas do Bio-Oss® tem sido relatada em diferentes estudos^(13, 14, 32), fato observado neste estudo, onde houve neoformação óssea ao redor das partículas além de apresentar

uma maior porcentagem de neoformação óssea no grupo B (32.26%) quando comparado com o grupo AB (29%), embora não tenha apresentado diferença estatística na comparação destes grupos.

Cabe destacar que a neoformação óssea imediatamente acima da interface, é maior nos 3 grupos diminuído na medida que se aproxima da membrana de schneiderian. As trabéculas de osso no grupo AB são menores quando comparadas com as do grupo B, podemos explicar isto pela presença de partículas de osso autógeno que exercem seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor, pelo transplante de células vitais, e ao mesmo tempo acreditamos que menores taxas de neoformação óssea foram encontradas no grupo AB devido a mistura com o biomaterial que não favorece a sobrevivência das células mais apicais, isolando as do leito nutritivo vascular.

Ainda não é conhecido o tempo necessário para a total reabsorção deste biomaterial, parece que ele sofre um processo fisiológico de remodelação com reabsorção lenta ou sem a sua completa reabsorção. Estudos clínicos a longo prazo tem demonstrado a reabsorção limitada do material desde 9 meses até 5 anos pós-operatórios ^(7, 13, 14, 28, 32).

Na análise histológica assim como na imunoistoquímica após 6 meses pós-operatórios foi possível observar a presença dos grânulos do Bio-Oss® em contato direto com osso neoformado. Os grânulos de Bio-Oss® são reabsorvidas gradualmente pelos osteoclastos ⁽³³⁾ e posteriormente é depositado osso neoformado. Acredita-se que a microestrutura do Bio-Oss® favoreça a deposição de proteínas que beneficiem a neoformação óssea na superfície do biomaterial, especialmente alguns fatores de crescimento e proteínas da matriz óssea que podem infiltrar a camada superficiais do biomaterial e ligar-se à hidroxiapatita deste ⁽³⁴⁾.

A presença dos grânulos parece favorecer as a intensa imunomarcação das proteínas Core binding fator-1 (Cbfa-I)/RuNX-2, quando comparado ao β tricalcio fosfato em coelhos após 3 e 6 meses pós-operatórios, permitindo assim maior diferenciação osteoblástica ⁽²⁶⁾. Nosso resultado pode complementar esta informação, pois as maiores taxas de remodelação óssea foram observadas no grupo B, onde houve imunomarcação intensa tanto da OPG quanto da RANKL e no grupo de BA foi observada imunomarcação de moderada a intensa tanto da OPG quanto da RANKL. Cabe destacar que a imunomarcação de OPG foi observada na

matriz extracelular próximo aos grânulos do biomaterial, isto sugere que a presença dos grânulos de Bio-Oss podem favorecer a taxas altas de remodelação ao longo do tempo.

Os hormônios e citocinas que favorecem o processo de reabsorção óssea, com diferentes mecanismos de sinalização convergem para promover a produção de RANKL. O receptor OPG apresenta um papel fisiológico importante como inibidor parácrino da formação de osteoclastos, que é produzido por osteoblastos e liga-se a RANKL para limitar a formação de osteoclastos através de seu receptor RANK. A formação de osteoclastos, a partir dos precursores hematopoiéticos precisa de contato com as células da linha osteoblástica para providenciar a sua ligação com RANKL ⁽²⁰⁾. Foi proposto que os osteoblastos controlam a formação e ativação dos osteoclastos, assim como foi evidenciado que as citocinas e hormônios que promovem a formação de osteoclastos agem primeiro nas células de linhagem osteoblástica para promover a produção de um ligante de membrana que regule a osteoclastogênese. RANKL é um membro da família de ligantes de necroses tumoral que age sobre seu receptor RANK na linhagem hematopoiética, com a interação restrita pelo receptor solúvel OPG, também produto da linhagem osteoblástica. O papel fisiológico destes fatores foi estabelecida por estudos genéticos e farmacológicos ^{(20), (33)}.

Sendo assim tem sentido a intensa imunomarcação encontrada com Bio-Oss do Core binding fator-1 (Cbfa-I)/RuNX-2 em coelhos após 3 e 6 meses pós-operatórios, assim como nosso resultado após 6 meses de OPG e RANKL. A diferenciação osteoblástica está seguida de ciclos de remodelação óssea coordenado.

Os grânulos de Bio-Oss® não afetam o processo de osseointegração dos implantes já que estes estão em contato direto com o osso neoformado, e a presença dos grânulos parece ser uma vantagem por que garante a manutenção do volume do enxerto ⁽²⁸⁾, e provoca um composto de biomaterial e osso neoformado em vez de uma estrutura óssea homogênea ⁽⁷⁾.

A quantidade de osso neoformado no grupo B foi suficiente para adquirir estabilidade primária dos implantes instalados, isto pode estar relacionada à altas taxas de remodelação no leito receptor. Uma das limitações do estudo é curto período de acompanhamento, que não permitam avaliar as taxas de sucesso dos implantes instalados nas áreas enxertadas. Estudos futuros podem ser direcionados

para avaliar a longo prazo as taxas de sucesso dos implantes instalados, assim como estudos experimentais que avaliam a qualidade óssea do osso neoformado, quando o Bio-Oss é utilizado.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados neste estudo pode se concluir que:

- O osso autógeno apresenta maiores taxas de neoformação óssea que o Bio-Oss® ou a combinação 1:1 de osso autógeno e Bio-Oss®.
- O Bio-Oss®, suscita altas taxas de remodelação óssea, caracterizado pela intensa imunomarcagem da OPG e RANKL, mostrando que as propriedades deste biomaterial utilizado na região de seio maxilar favorece a produção destas proteínas que comandam os eventos envolvidos no turnover ósseo.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Kolerman R, Goshen G, Joseph N, Kozlovsky A, Shetty S, Tal H. Histomorphometric Analysis of Maxillary Sinus Augmentation Using an Alloplast Bone Substitute. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(8):1835-43.
2. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, et al. De Novo Bone Induction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in Maxillary Sinus Floor Augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2005;63(12):1693-707.
3. Allegrini Jr S, Yoshimoto M, Salles MB, König Jr B. The effects of bovine BMP associated to HA in maxillary sinus lifting in rabbits. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2003;185(4):343-9.
4. Moon SH, Um HS, Lee JK, Chang BS, Lee MK. The effect of implant shape and bone preparation on primary stability. *J Periodontal Implant Sci*. 2010;40(5):239-43.
5. Tiwana PS, Kushner GM, Haug RH. Maxillary sinus augmentation. *Dental Clinics of North America*. 2006;50(3):409-24.
6. Voss P, Sauerbier S, Wiedmann-Al-Ahmad M, Zizelmann C, Stricker A, Schmelzeisen R, et al. Bone regeneration in sinus lifts: comparing tissue-engineered bone and iliac bone. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;48(2):121-6.
7. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann(R) BoneCeramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(5):576-85.
8. Tete S, Vinci R, Zizzari VL, Zara S, La Scala V, Cataldi A, et al. Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. *Eur J Histochem*. 2013;57(1):e10.
9. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008;35(s8):216-40.
10. Hallman M, Hedin M, Sennerby L, Lundgren S. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with

- bovine hydroxyapatite and autogenous bone. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2002;60(3):277-84.
11. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):328-43.
 12. Mordenfeld A, Albrektsson T, Hallman M. A 10-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with an 80:20 mixture of deproteinized bovine bone and autogenous bone. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(3):435-46.
 13. Ewers R, Goriwoda W, Schopper C, Moser D, Spassova E. Histologic findings at augmented bone areas supplied with two different bone substitute materials combined with sinus floor lifting. Report of one case. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(1):96-100.
 14. Orsini G, Traini T, Scarano A, Degidi M, Perrotti V, Piccirilli M, et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74(1):448-57.
 15. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):706-18.
 16. Esposito M, Grusovin MG, Rees J, Karasoulos D, Felice P, Alissa R, et al. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 2010;3(1):7-26.
 17. Haas R, Donath K, Fodinger M, Watzek G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(2):107-16.
 18. Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010;5:345-54.
 19. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
 20. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015.
 21. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219-27.

22. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 473. United States 2008. p. 139-46.
23. Tanaka H, Mine T, Ogasa H, Taguchi T, Liang CT. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(4):690-4.
24. Lenneras M, Palmquist A, Norlindh B, Emanuelsson L, Thomsen P, Omar O. Oxidized Titanium Implants Enhance Osseointegration via Mechanisms Involving RANK/RANKL/OPG Regulation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014.
25. Muñoz-Torres M, Higuera López-Frías Mdl, Fernández García D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *Medicina Clínica.* 2004;122(2):75-7.
26. De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, Nary Filho H, Ribeiro DA, Matsumoto MA. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(6):584-90.
27. Wagner W, Wiltfang J, Pistner H, Yildirim M, Ploder B, Chapman M, et al. Bone formation with a biphasic calcium phosphate combined with fibrin sealant in maxillary sinus floor elevation for delayed dental implant. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(9):1112-7.
28. de Vicente JC, Hernandez-Vallejo G, Brana-Abascal P, Pena I. Maxillary sinus augmentation with autologous bone harvested from the lateral maxillary wall combined with bovine-derived hydroxyapatite: clinical and histologic observations. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(4):430-8.
29. Tatum H, Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am.* 1986;30(2):207-29.
30. Chiapasco M, Zaniboni M, Rimondini L. Dental implants placed in grafted maxillary sinuses: a retrospective analysis of clinical outcome according to the initial clinical situation and a proposal of defect classification. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(4):416-28.
31. van den Bergh JP, ten Bruggenkate CM, Disch FJ, Tuinzing DB. Anatomical aspects of sinus floor elevations. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(3):256-65.
32. Pettinicchio M, Traini T, Murmura G, Caputi S, Degidi M, Mangano C, et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. *Clin Oral Investig.* 2012;16(1):45-53.

33. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli J, Botticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(9):789-93.
34. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(3):315-24.

Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos grupos

Grupo	Material	N de seios operados
Grupo B	Bio-Oss® (Geistlich AG)	12
Grupo BA	1:1 Bio-Oss® (Geistlich AG)+ enxerto autógeno	11
Grupo A	Enxerto autógeno	15

Tabela 2: Resultados das análises estatísticas dos dados histomorfométricos

Grupo	n	Média $\pm$ desvio padrão	p(ANOVA)	p (Tukey)
B	12	32.26 $\pm$ 6.02	0.002	B – A = 0.01 ^a
BA	11	29.00 $\pm$ 4.71		BA – B= ns
A	15	48.96 $\pm$ 25.6		A - BA p=0-01 ^{ab}

p<0.05

ns= não significante

a= Estatisticamente significante em relação ao grupo B e A

b= Estatisticamente significante em relação ao grupo BA e A

Tabela 3. Escores representativos da análise imunoistoquímica realizada em todas as biópsias dos 3 grupos experimentais.

	BioOss	BioOss + Osso autógeno	Osso Autógeno
OPG	3	2/3	2
RANKL	3	2/3	3

Figuras



Fig.1 Ortopantomografia, utilizada para avaliação e seleção do paciente para a pesquisa.

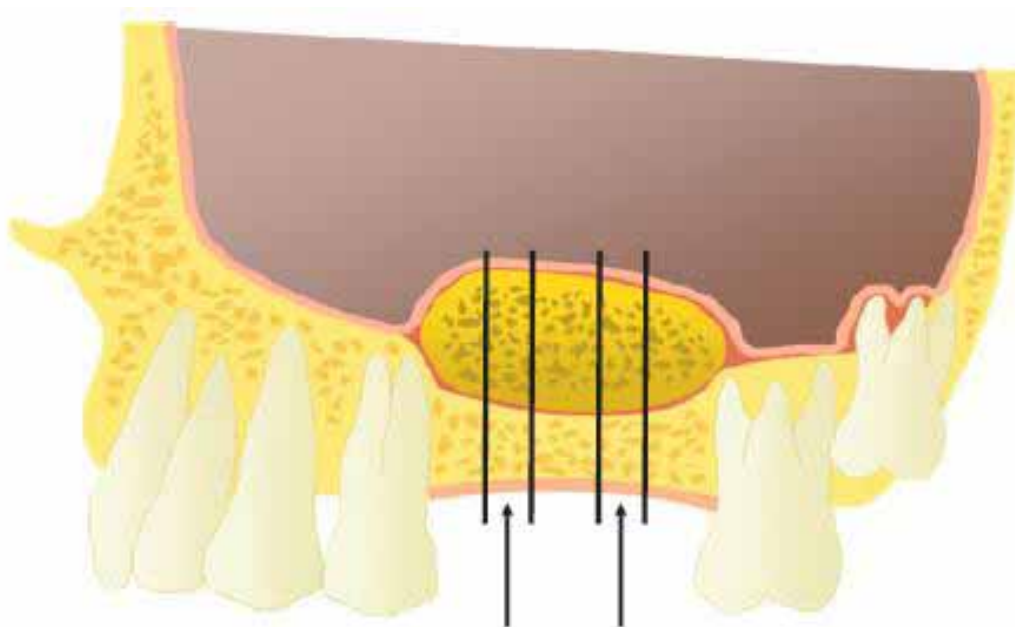


Fig. 2a Representação esquemática da coleta da biópsia, após a elevação do seio maxilar. (Schmitt, 2013)

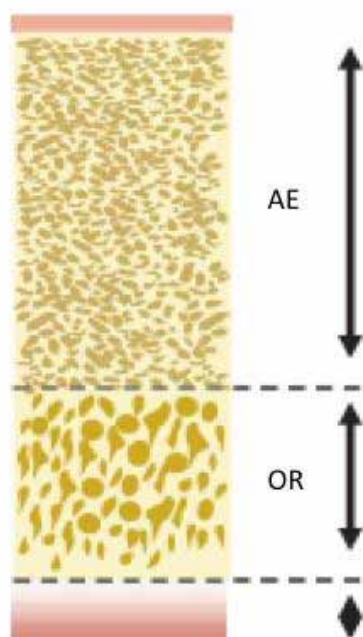


Fig. 2b Esquema do conteúdo da biópsia: osso residual, área enxertada. OR: Osso residual; AR: área enxertada. (Schmitt, 2013)

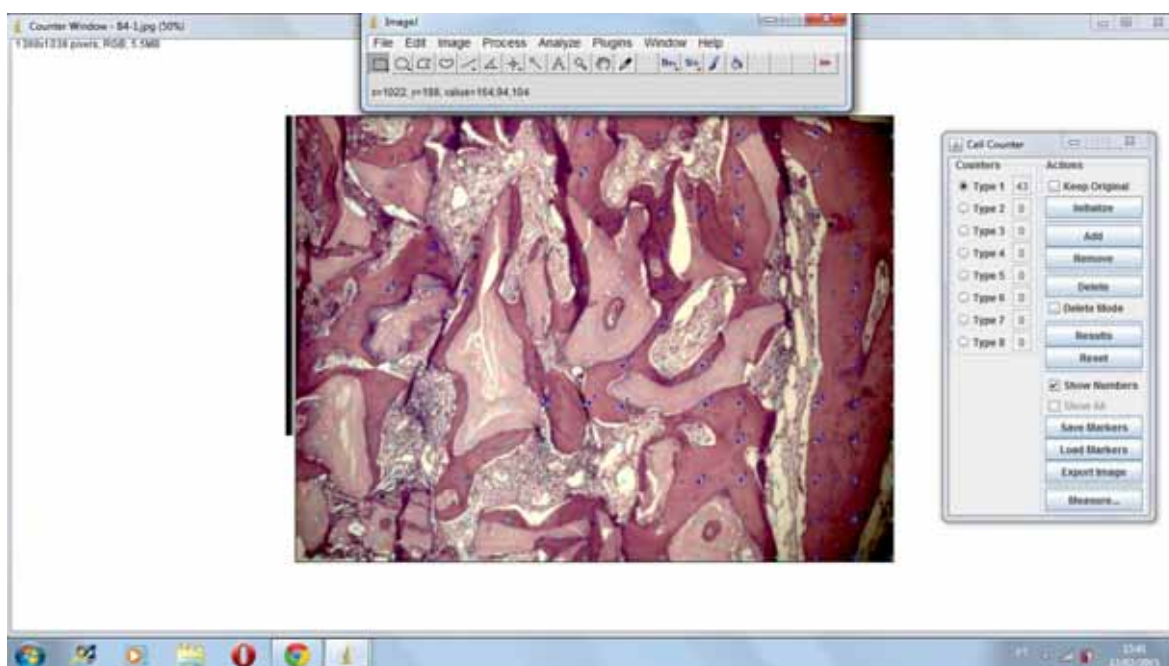


Fig. 3. Mensuração de porcentagem de osso neoformado, utilizando o programa ImageJ. Através da marcação e contagem dos pontos presentes no osso neoformado

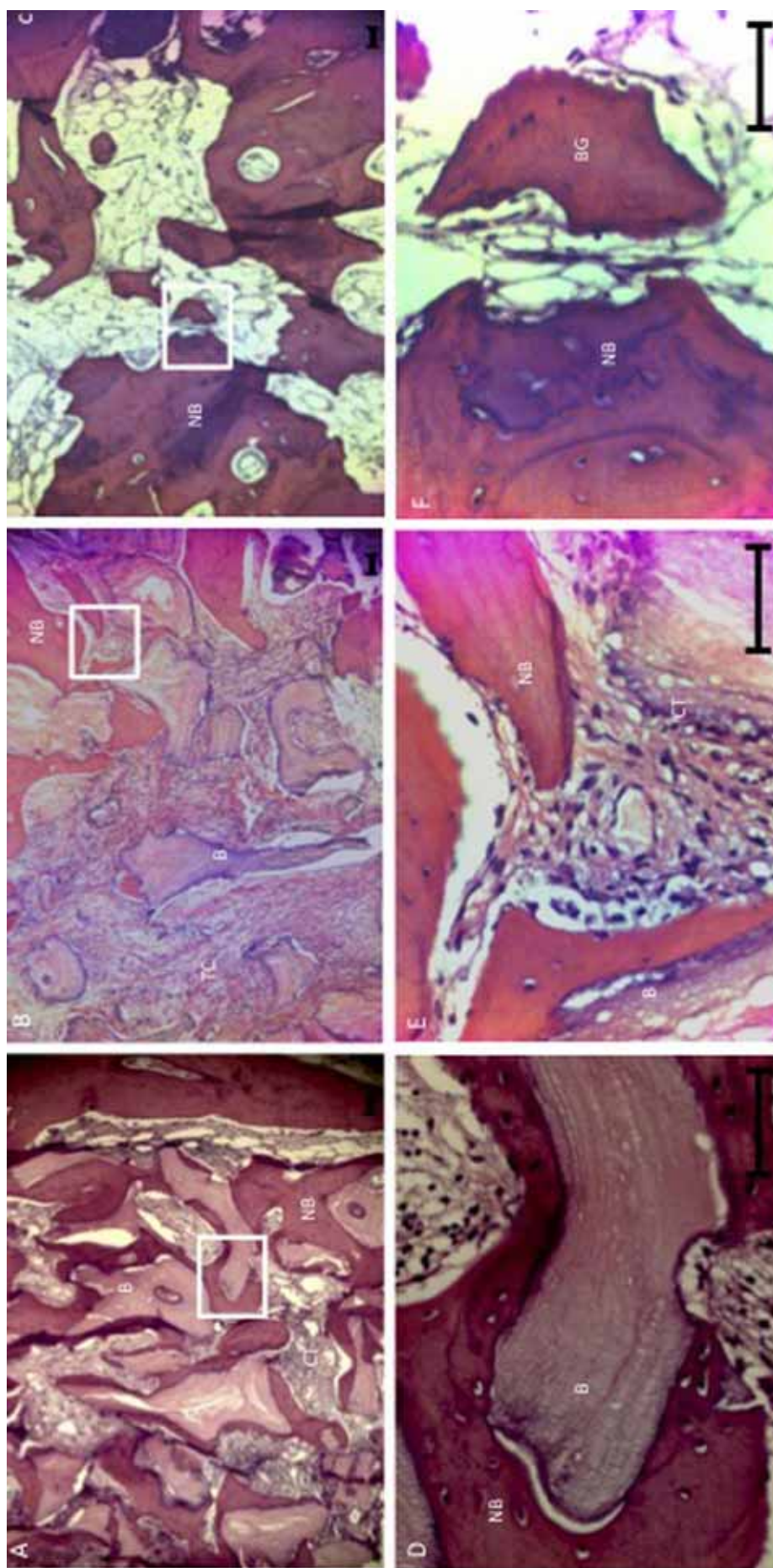


Figura 4 - Imagens representativas das biópsias coletadas dos seios maxilares reconstruídos com: **A:** Bio-Oss® (DAB, original 63X); **B:** Bio-Oss® @ 1:1 osso autógeno (DAB, original 63X); **C:** Osso autógeno. (DAB, original 63X); **D:** Osso autógeno. (DAB, original 400X); **E:** Bio-Oss® @ 1:1 osso autógeno (DAB, original 400X); **F:** Osso autógeno (DAB, original 400X). Coloração: hematoxilina e eosina em escala de 100 µm Estruturas indicadas B: partículas de Bio-Oss, CT: tecido conjuntivo, BG: Enxerto ósseo SeM

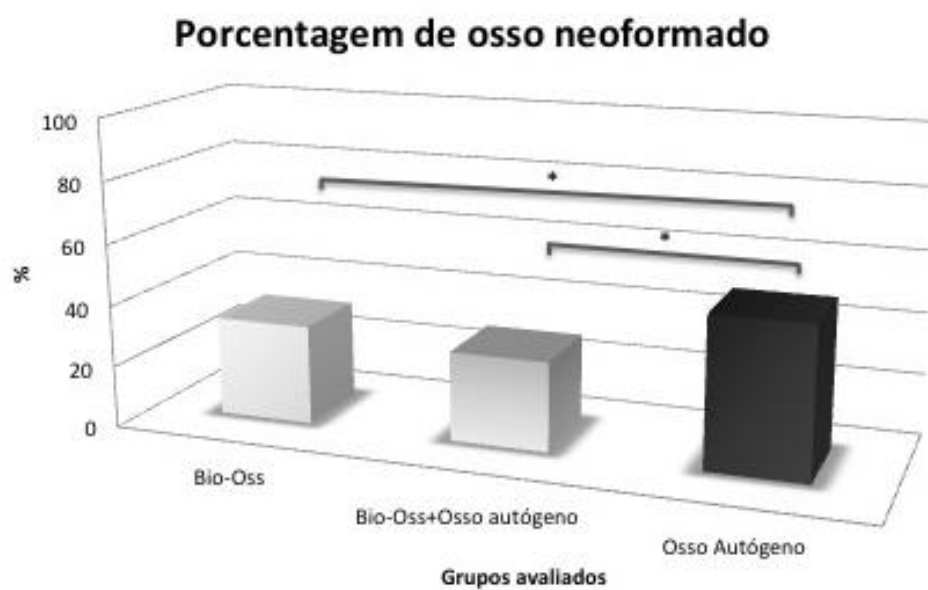


Fig. 5 Representação gráfica da porcentagem de neoformação óssea nos grupos avaliados.
Símbolo:* diferenças estatísticas

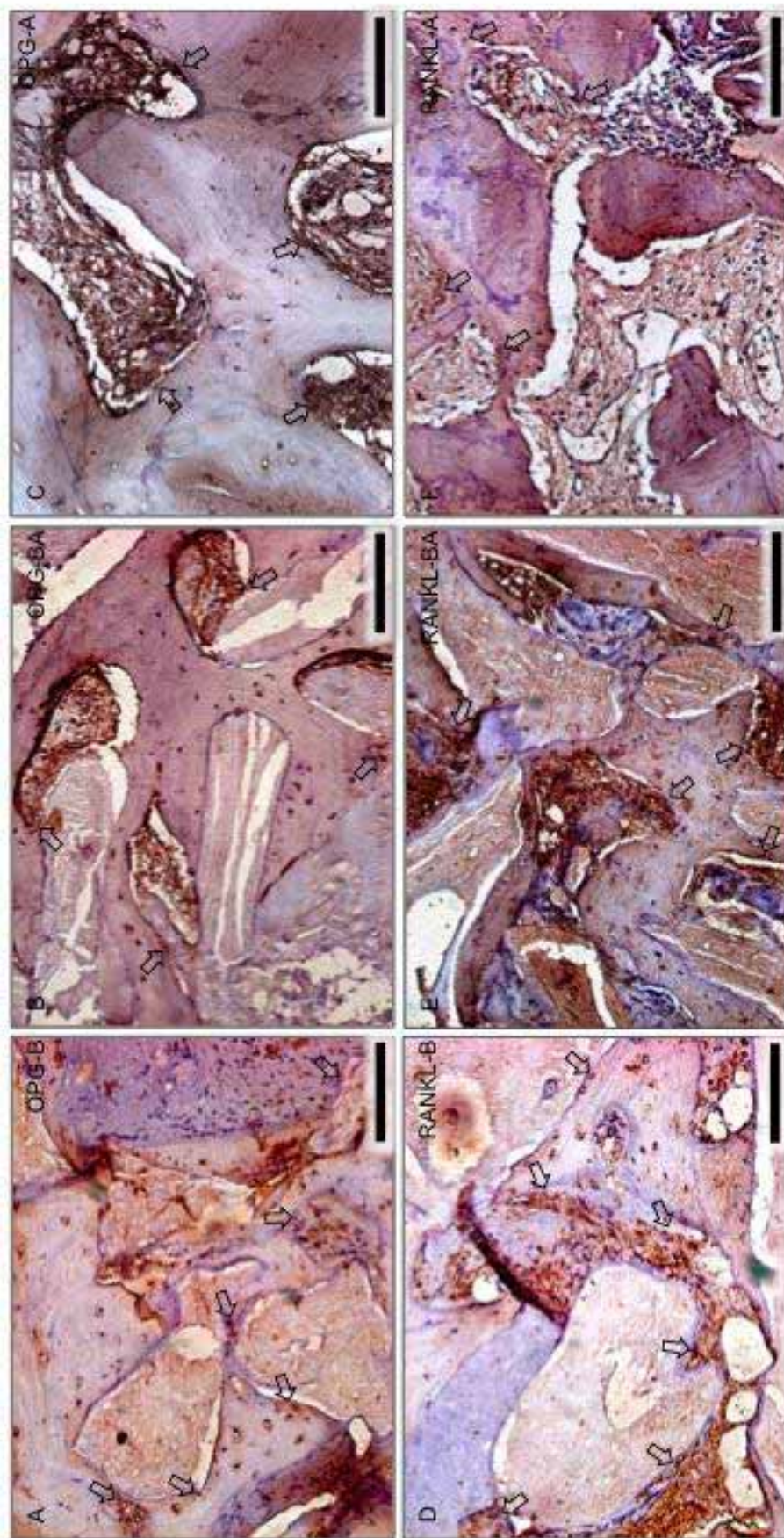


Figura 6 - Microfotografia corada em hematoxilina de Harris, em escala de 100µm, (DAB, original 200X) mostrando a dinâmica do processo de remodelação óssea em seios maxilares reconstruídos. Símbolos: as apontam as áreas de imunomarcção positiva em **A** : Bio-Oss® - OPG; **B** : Bio-Oss® 1:1 osso autólogo -OPG; **C** : Osso autólogo - OPG; **D** : Bio-Oss® -RANKL; **E** : Bio-Oss® 1:1 osso autólogo -RANKL; **F** : Osso autólogo -RANKL

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterógeno para levantamento de seio maxilar. Avaliação histológica e imunoistoquímica em humanos.

Pesquisador: Geraldo Luiz Griza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05509112.4.0000.5420

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 632.219

Data da Relatoria: 28/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata o presente parecer de avaliação de emenda proposta para o projeto de pesquisa intitulado "Estudo comparativo do uso do osso autógeno e heterógeno para levantamento de seio maxilar: Avaliação histológica e imuno-histoquímica em humanos", aprovado por este CEP em 14/12/2014. O pesquisador solicita autorização para avaliar no mesmo material obtido dos participantes da pesquisa, mais dois parâmetros do metabolismo ósseo. Justifica o pedido pela necessidade de ampliação dos resultados, para melhor elucidação da problemática apresentada. Solicita ainda ampliação de 12 meses no prazo final.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será comparar o reparo ósseo, aos 6 meses pós-operatórios, do levantamento de seio maxilar preenchido com três modalidades de enxerto ósseo: osso autógeno particulado; Osso autógeno e heterógeno (Bio-oss) e apenas osso heterógeno (bio-oss). Para tanto serão realizadas avaliações histológica e imuno-histoquímica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco adicional, uma vez que não serão coletadas novas amostras dos participantes da pesquisa.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

UF: SP

Município: ARACATUBA

CEP: 16.015-050

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARACATUBA - JÚLIO DE**



Continuação do Parecer: 632.219

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há considerações.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP aprova a inclusão das análises e a ampliação do prazo. Salaria que, de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 05/11/2014.

ARACATUBA, 05 de Maio de 2014

Assinador por:

**Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)**

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

ANEXO B

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 whether ethical approval was sought. 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 sought. 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, Fontaleza, 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.