

LUARA TEIXEIRA COLOMBO

Análise histomorfométrica e imunoistoquímica da regeneração óssea com enxerto de Bio-Oss® e Gingostat® em seio maxilar de coelho

ARAÇATUBA-SP

2016

LUARA TEIXEIRA COLOMBO

Análise histomorfométrica e imunoistoquímica da regeneração óssea com enxerto de Bio-Oss® e Gingostat® em seio maxilar de coelho

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Junior.

ARAÇATUBA-SP

2016

Agradecimentos

É difícil lembrar-me de todas as pessoas que de algum modo fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Agradeço a Deus que foi quem permitiu que tudo isso acontecesse.

Aos meus pais, Luís Alberto Colombo e Lúcia Helena Teixeira que apesar das dificuldades e diferenças, me ofereceram o que foi preciso para que eu pudesse percorrer todo o caminho da graduação da melhor maneira possível. Obrigada por todo amor, incentivo e apoio incondicional durante toda essa jornada.

Aos meus avós, Wilson e Roseli Teixeira que proporcionaram todo o amor e amparo necessário desde o meu nascimento. Devo grande parte da pessoa que me tornei a vocês.

Ao meu irmão, Bruno Teixeira Maldonado, que mesmo à distância, sempre fez tudo que esteve ao seu alcance para me fazer feliz. Obrigada por ser o melhor irmão do mundo.

Agradeço também a minha tia, Cristiane Teixeira, que teve grande influência para que eu escolhesse a profissão de Cirurgiã Dentista.

Ao meu primo Iago, suas visitas, conversas e rodízios de temaki (haha). Obrigada por me tratar como a irmãzinha que você nunca teve.

E a todos os familiares, que direta ou indiretamente contribuíram nessa caminhada.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, seu corpo docente, direção e administração, pelo ambiente acolhedor, no qual tive oportunidade de enriquecer tanto meu conhecimento quanto minhas relações humanas.

Ao meu orientador, Prof. Idelmo Rangel Garcia Junior pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. À aluna de doutorado Sabrina Ferreira, por todo o apoio no desenvolvimento deste. À Profa. Roberta Okamoto, por toda a paciência e pelo auxílio na análise imunoistoquímica. E ao Prof. Léo

Faverani, por disponibilizar seu tempo e atenção para participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos Ass. Suporte Acadêmico Marco Aurélio de Oliveira Ianner e Ass. Suporte Acadêmico Paulo Roberto Gratão, pelo suporte técnico que forneceram durante o período do desenvolvimento das etapas laboratoriais. Ao Secretário Renato Gomes de Oliveira, pela contribuição burocrática do processo.

A todos os amigos que fiz durante a graduação, ao 'Supino', 'Camila' e Luiz Guilherme que fizeram papel de irmãos pra mim enquanto o meu estava longe. Às minhas amigas Betina Commar, Bruna Nagay, Carolina Barros, Isabela Catanoze, Lara Cervantes, Leticia Capalbo, Mariana Pereira e Thayane Businari, por todo companheirismo, carinho e momentos únicos que ficarão para sempre na minha memória, obrigado pelos momentos tristes e felizes, festas e estudos, gordices e períodos curtos na academia (haha). E também ao meu namorado 'Coragem', que além de muito amor teve muita paciência nesse momento estressante que é o desenvolvimento do TCC, não sei o que teria feito sem todo esse apoio. Vocês não fazem ideia de quanto são especiais pra mim e marcaram essa fase tão única da minha vida, vou morrer de saudades de ter vocês no meu dia a dia!

Às minhas amigas da época do colégio, Marina Akuri, Luíza Akuri, Paula Vitelli, Ioana Bittencourt e Ana Flávia Guillen que permaneceram presentes em minha vida durante o período de graduação e me mostraram o quanto a amizade pode superar a distância.

Por fim, o meu muito obrigada a todos, que em algum momento passaram pela minha vida, deixaram sua marca, estimularam meu amadurecimento e contribuíram de alguma forma para que este e muitos dos meus sonhos fossem concretizados.

COLOMBO, LT. **Análise histomorfométrica e imunoistoquímica da regeneração óssea com enxerto de Bio-Oss® e Gingistat® em seio maxilar de coelho.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Resumo

Bio-Oss® é um osso bovino desproteinizado, que é química e estruturalmente comparável ao osso humano mineralizado. Um sistema de poros interligado favorece o crescimento ósseo sem nenhuma reação adversa do tecido associado que está sendo relatado. Gingistat® é um material a base de colágeno equino. A proposta deste estudo foi avaliar o processo de ossificação de dois substitutos ósseos, Bio-Oss® e Gingistat® em levantamento do assoalho do seio maxilar através de análises histomorfométrica e imunoistoquímica. Para tal foram utilizados 16 (dezesesseis) coelhos *Albinus*, que foram submetidos à cirurgia de elevação da membrana do seio maxilar bilateral por acesso nasal. O seio maxilar do lado direito foi preenchido por Bio-Oss® e do lado esquerdo pelo Gingistat®. Após períodos de 7, 14, 21 e 40 dias os animais sofreram eutanásia e a maxila foi removida para processamento e análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre os grupos tratados. O teste estatístico empregado dependeu da distribuição dos dados em relação à curva de normalidade. A porcentagem de neoformação óssea só possui significância estatística entre os grupos no período de 7 dias, onde o grupo Bio-oss® teve resultados superiores. Ao fim do estudo, ambos os grupos tiveram formações ósseas semelhantes, entretanto o Gingistat® foi reabsorvido mais rapidamente, levando à uma grande perda na área elevada.

Palavras-chave: Substitutos ósseos. Biomateriais. Formação óssea. Imunoistoquímica. Coelhos

COLOMBO, LT. **Histomorphometric and immunohistochemical analysis of bone regeneration with Bio-Oss® and Gingistat® bone graft in rabbit maxillary sinus.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Abstract

Bio-Oss® is a deproteinized bovine bone, which is chemically and structurally comparable to mineralized human bone. A system of interconnected pores promotes bone growth without any adverse tissue reaction associated with being reported. Gingistat® is a collagen-based material equine. The purpose of this study was to evaluate the ossification process two bone substitutes, Bio-Oss® and Gingistat® in maxillary sinus floor lifting through histomorphometric and immunohistochemical analyzes. For it were used 16 (sixteen) Albino rabbits undergoing surgery for lifting the membrane of bilateral maxillary sinus nasal access. The maxillary sinus on the right side was filled by Bio-Oss ® and the left was filled by Gingistat®.After periods of 7, 14, 21 and 40 days the animals were euthanized and jaw has been removed for processing and histomorphometric and immunohistochemical analyzes. Statistical analysis were made conducted through the comparison between the control group and the treated group.The statistical test that was used depend on the distribution of the results in relation to the normal curve. The percentage of new bone formation only has statistical significance using between groups in the period of seven days where the Bio -Oss® group had superior results. At the end of the study, both groups had similar bone formation , however the Gingistat® was reabsorbed ais quickly , leading to a great loss in the high area.

Keywords: Substitutes bone. Biomaterials. Bone formation. Immunohistochemistry. Rabbits

Lista de Figuras

- Figura 1 Delineamento experimental dos grupos de estudo.
- Figura 2 Procedimentos Cirúrgicos. (A) Exposição do osso nasal e a da sutura nasoincisa. (B) Demarcação bilateral das janelas ósseas de 5mm com broca trefina. (C) Finalização das osteotomias com broca esférica. (D) Colocação do biomaterial nas janelas ósseas, Bio-Oss® (seta amarela) e Gingistat® (seta verde).
- Figura 3 Imagem da lâmina histológica sobreposta pela grade de Merz para calcular a porcentagem de cada tecido ou material presente na área.
- Figura 4 Porcentagem de tecido ósseo neoformado.
- Figura 5 Período 7 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).
- Figura 6 Período 14 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).
- Figura 7 Período 21 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).
- Figura 8 Período 40 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).
- Figura 9 Lâmina do seio preenchido com Gingistat® no período de 21 dias mostrando pico intenso (+++) de Osteocalcina.
- Figura 10 Lâmina do seio preenchido com Bio-Oss® no período de 40 dias mostrando pico moderado (++) de Osteocalcina.
- Figura 11 Lâmina de seio preenchido com Gingistat® no período de 14 dias mostrando Rankl moderado (++) .

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Frequências médias percentuais.
- Tabela 2 Porcentagem de tecido ósseo neoformado.

Sumário

1. Introdução	10
2. Proposição	12
3. Materiais e Métodos	13
4. Resultados	20
5. Discussão	24
6. Conclusão	26
Referências	27
Anexos	30

1. Introdução

A expectativa de vida mundial vem aumentando com o passar dos anos. Assim, com uma população mais idosa, é notado o aumento da necessidade de reabilitação oral, principalmente por próteses implantossuportadas. E para a instalação de implantes dentários é preciso uma quantidade e qualidade óssea mínima remanescente.

Quando um indivíduo possui a ausência de um elemento dental o processo alveolar sofre graves e irreversíveis reabsorções ósseas. A distância entre o assoalho do seio maxilar e a crista óssea alveolar diminui com o processo de pneumatização do seio, tornando a altura óssea remanescente desta região imprópria para receber implantes (BOYNE, JAMES, 1980). E quando a disponibilidade óssea fosse inferior a 5 mm em maxila, dever-se-ia lançar mão da realização concomitante de enxertos ósseos e de procedimentos cirúrgicos para elevação da membrana do seio maxilar (MISCH, 1997).

A técnica de levantamento do assoalho do seio maxilar consiste na elevação da mucosa sinusal interpondo enxertos ósseos entre a mucosa e o assoalho da maxila, com o objetivo de formação óssea suficiente para permitir a realização de implantes osseointegráveis (BOYNE et al. 1980).

No que se diz respeito aos enxertos ósseos, o enxerto autógeno é considerado padrão ouro para a maioria das técnicas. Isso porque não só a qualidade como a quantidade do osso neoformado se apresentam superiores quando comparado a aloenxertos (NISHIBORI et al., 1994). Entretanto, outros estudos mostram que o uso de um biomaterial foi tão capaz de manter dimensão óssea após o enxerto quanto o osso autógeno (DE SANTIS E, 2016).

O enxerto autógeno é o único que contém osteoblastos, fornece proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento que irão induzir a formação óssea (GOLDBERG, STEVENSON, 1993). No entanto, possui limitações, como a necessidade de um segundo passo e sítio cirúrgico, aumentando a morbidade; limitada disponibilidade para grandes reconstruções e uma taxa de reabsorção imprevisível, que levou pesquisadores a

considerarem como alternativa o uso de biomateriais (HENCH, 1998; SBORDONE et al., 2009).

Diversos tipos de biomateriais de enxerto ósseo têm sido utilizados para a reparação de defeitos ósseos em seio maxilar (SARTORI et al. 2003). Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) é um material de osso bovino desproteínizado, que é química e estruturalmente comparável ao osso humano mineralizado. Um sistema de poros interligado favorece o crescimento ósseo sem nenhuma reação adversa do tecido associado. Vários estudos experimentais e clínicos demonstraram o potencial osteocondutor deste material (HAAS et al., 1998; PIATTELLI et al., 1999). Seus grânulos são mantidos por um longo período pós-operatório, e em contato com o osso neoformado, estimulam sua mineralização (CANEVA M, 2016).

Estudos mostram que a esponja de colágeno é outro material utilizado para defeitos ósseos em humanos e pesquisas em animais (AGABITI & BOTTICELLI, 2015). Gingistat® (GabaVebas, San Giuliano Milanese, Itália) é uma esponja de colágeno tipo I liofilizado de origem equina. O colágeno liofilizado sob a forma de compressas apresenta atividade hemostática devido à sua aderência, absorção de líquidos e propriedade de gelificação, auxiliando na formação do coágulo sanguíneo. A membrana de colágeno equino se mostra eficaz na regeneração óssea guiada e permite a remodelação óssea (PISTILLI R, 2013). Um exemplo encontrado na literatura foi o uso desse material para enxertia de um defeito ósseo após remoção de cisto maxilar e colocação de um implante na região. Quando realizado o controle, notou-se osso perimplantar mantido e histologicamente remodelação óssea associada ao material (DI STEFANO DA, 2012). Entretanto, apesar de suas propriedades positivas, tem por característica ser absorvido mais rapidamente, sendo esperada uma redução na neoformação óssea, quando comparado a outros tipos de enxerto (CANEVA M, 2016).

2. Proposição

O sistema estomatognático, é composto por ossos, dentes, pela articulação temporomandibular, músculos, por um sistema vascular e nervoso e espaços orgânicos. Este sistema é responsável por desempenhar as funções neurovegetativas de sucção, mastigação, deglutição, respiração e fonação. Qualquer alteração, principalmente sobre os dentes, tenderá a levar a um desarranjo de todo o sistema.

Tendo em vista a importância da reabilitação protética oral para as funções do sistema estomatognático, além dos motivos estéticos, e considerando que a população idosa mundial aumenta cada vez mais em função da alta da expectativa de vida, é preciso considerar quais métodos são mais eficazes para garantir uma melhora da qualidade de vida.

E dentro deste contexto, a implantodontia vem tentando solucionar deficiências encontradas com os tratamentos reabilitadores convencionais. Mas o grande desafio desta especialidade é que a perda do elemento dental ainda ocorre em idade muito precoce e, como resultado, observa-se grandes reabsorções dos rebordos alveolares restando, em muitas situações, apenas o osso basal.

O desenvolvimento de técnicas de enxertia óssea criou prognósticos melhores para a reabilitação protética destes casos de grandes deficiências ósseas. Muitos estudos mostram a superioridade do osso autógeno sobre outros materiais. No entanto, nem sempre é possível sua utilização pela existência de fatores limitantes como a disponibilidade de área doadora, a quantidade de material a ser coletado e a maior morbidade em função de um segundo tempo e sítio cirúrgicos.

Estudos mostram a possibilidade de considerar como alternativa o uso de biomateriais. No entanto, todos os aspectos de um material substituto devem ser estudados e uma análise de risco concluída antes que este material seja colocado em uso clínico.

A proposta deste estudo foi avaliar o processo de ossificação de dois substitutos ósseos, Bio-Oss® e Gingitast® em levantamento do assoalho do seio maxilar através de análises histomorfométrica e imunoistoquímica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Delineamento Experimental

Foram utilizados para a realização deste estudo 16 (dezesesseis) coelhos da raça Nova Zelândia, variação “*albinus*”, machos, adultos, com idade aproximada de 5 (cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 Kg. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP, e foi aprovado pelo CEUA de acordo com o protocolo 2013-00444.

Os animais tiveram os seios maxilares acessados bilateralmente e foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 1):

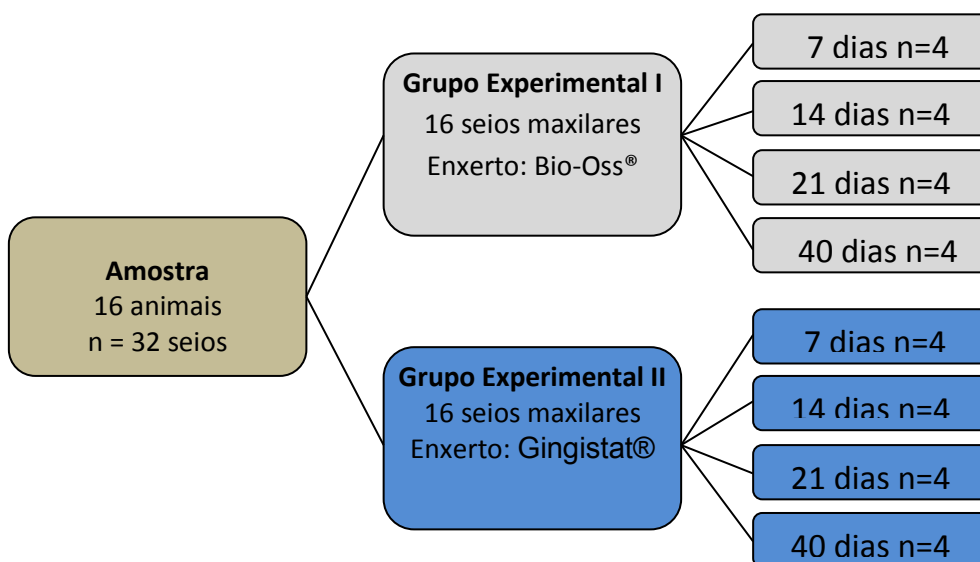


Figura 1. Delineamento experimental dos grupos do estudo.

Grupo Experimental I (GBO): após o procedimento de elevação da membrana sinusal o seio maxilar direito foi preenchido por Bio-Oss®.

Grupo Experimental II (GGT): após o procedimento de elevação da membrana sinusal o seio maxilar esquerdo foi preenchido com Gingistat®.

3.2. Procedimentos Cirúrgicos

Inicialmente os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de 8 horas. A anestesia geral foi realizada por administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Foi realizado em complementação anestésica a infiltração de solução de Cloridrato de Mepivacaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepiadre 100®, DFL LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) na dosagem de 0,3 ml/Kg na linha mediana do dorso nasal.

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.

3.2.1. Elevação da membrana do seio maxilar

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

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (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 perióstio foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German) o suficiente para a exposição do osso nasal e a da sutura nasoincisa (Figura 2A). 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 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 5 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para a demarcação da área (Figura 2B) e uma broca diamantada esférica nº 1011 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) para a finalização das osteotomias (Figura 2C), ambas montada em contra-ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil), que por sua vez estava conectado a um motor elétrico rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm.

A membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física fosse mantida. Com o auxílio das mesmas curetas, o seio maxilar direito foi preenchido com Bio-Oss®, e o lado contralateral com Gingistat® (Figura 2D). Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura foi realizada com fio Poliglactina 910 5-0 (Vicryl 5-0®, Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

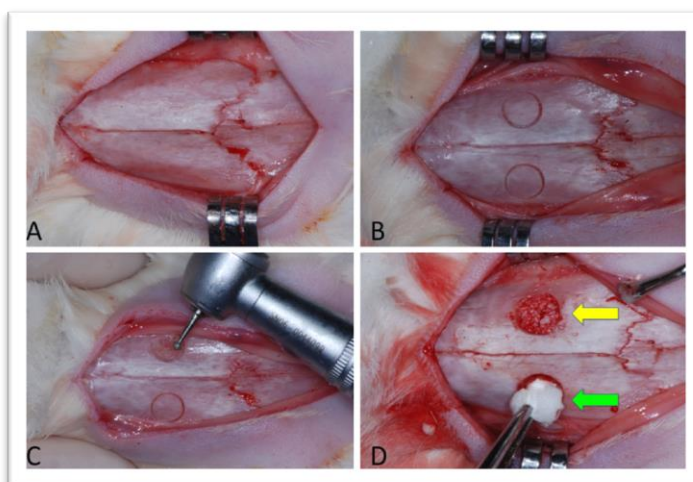


Figura 2. Procedimentos Cirúrgicos. (A) Exposição do osso nasal e a da sutura nasoincisal. (B) Demarcação bilateral das janelas ósseas de 5mm com broca trefina. (C) Finalização das osteotomias com broca esférica. (D) Colocação do biomaterial nas janelas ósseas, Bio-Oss® (seta amarela) e Gingistat® (seta verde).

3.2.2. 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 Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, até a eutanásia animal nos períodos de 7, 14, 21 e 40 dias pós-operatório.

3.3. 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 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, Nova Jersey, EUA) durante 40 minutos, usando uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – Parmer Instrument Company, EUA) na velocidade de 45ml/min. Os períodos de eutanásia foram aos 7, 14, 21 e 40 dias após o procedimento de elevação 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.

3.4. Preparo das Peças

As peças foram fixadas em formol neutro a 10% tamponado (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e

sofreram descalcificação em EDTA 5% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, com trocas periódicas em um período de 30 a 60 dias, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de alcoóis 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, realizou-se diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 6 µm de espessura montados em lâminas de vidro. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc., NJ, EUA), servindo como referência para a citoarquitetura dos cortes processados para imunohistoquímica.

Previamente à realização das análises histométricas e imunohistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceria quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

3.5. Análise Histomorfométrica

Após as lâminas terem sido coradas com HE (Merck & Co., Inc., NJ, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (Zeiss® Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação de imagem (Zeiss® AxioCam Icc 1, Oberkochen, Alemanha) e conectado a um microcomputador Windows Vista com um software analisador de imagens digitalizadas, AxioVision® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Oberkochen, Alemanha).

Foi avaliada a área de tecido ósseo de cada animal em cada um dos períodos. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

As imagens foram capturadas em um aumento de 12,5x e sobrepostas com a grade de Merz no *software* Power Point®, que apresenta distribuída em

sua estrutura 100 pontos representando 100%. Nas imagens foi avaliado o que estava relacionado a cada um dos pontos, mostrando assim a porcentagem presente de cada tecido ou material (Figura 3).

Os valores obtidos foram transferidos para o *software* Excel®, onde foi feita a média da presença de tecido ósseo para cada período, sendo posteriormente transferidas para o *software* SigmaPlot 12.0, onde foi realizada a análise estatística ANOVA 2 fatores.

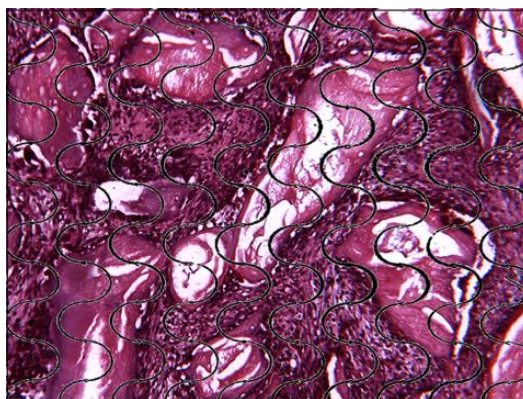


Figura 3. Imagem da lâmina histológica sobreposta pela grade de Merz para calcular a porcentagem de cada tecido ou material presente na área

3.6. Análise Imunoistoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina – OPG (OPG, Goat anti-opg SC21038 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), Osteocalcin–Oc (OC, Goat anti-oc SC18319 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e Rankl (R, Goat anti-R SC7629 - Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). O anticorpo secundário biotilado foi o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin-SP-AffiniPure, donkey anti-goat IgG 705065147– Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, EUA). Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de burro a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Zeiss® Oberkochen, Alemanha) bem como a expressão das proteínas OPG, OC e R acoplado a

uma câmera de captura de imagem (Zeiss® AxioCam Icc 1, Oberkochen, Alemanha) e conectado a um microcomputador Windows Vista com um software analisador de imagens digitalizadas AxioVision® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Oberkochen, Alemanha). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente foram envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunohistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação, para ambos os grupos (Tabela 1). O avaliador desconhecia o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise.

Quantidade de marcação	Escore	Correspondente em %
Ausência de marcação	-	0%
Marcação positiva	+	20% (entre 10 à 30%)
Marcação superpositiva	++	60% (entre 50 à 70%)
Marcação hiperpositiva	+++	90% (entre 80 à 100%)

Tabela 1. Frequências médias percentuais

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação entre os dois grupos de biomateriais. O teste estatístico a ser empregado dependeu da distribuição desses dados em relação à curva de normalidade. O teste de normalidade usado foi o Shapiro-Wilk, sendo $P = 0,880$. Os testes foram conduzidos através de *software* SigmaPlot 12.0 utilizado para análise estatística em estudos na área de saúde.

4. Resultados

4.1. Histomorfométrico

Quando comparada a porcentagem de tecido ósseo neoformado (Tabela 2) entre os grupos Bio-Oss (22,84%) e Gingistat (1,75%), os valores estatisticamente significantes apareceram somente no período de 7 dias ($p < 0,001$) (Figura 5).

	Bio-Oss(%)	Gingistat(%)	P < 0,05
7 dias	22,835	1,75	$p < 0,001$
14 dias	33,025	38,925	$p = 0,226$
21 dias	34,425	43,475	$p = 0,069$
40 dias	48,5	50,675	$p = 0,653$

Tabela 2. Porcentagem de tecido ósseo neoformado.

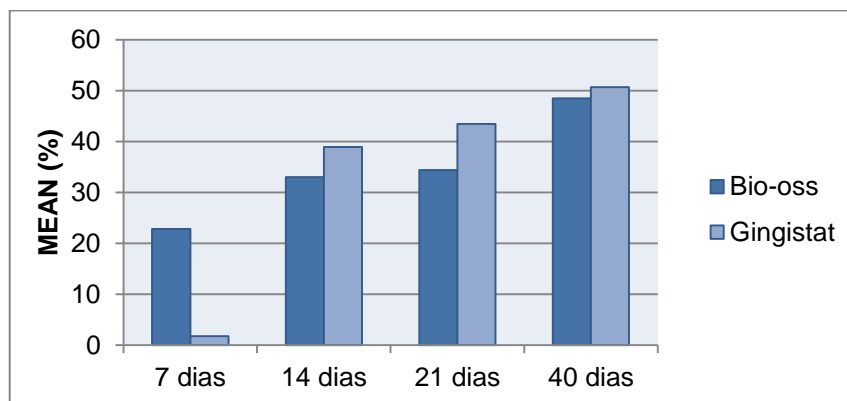


Figura 4. Porcentagem de tecido ósseo neoformado.

Nos períodos de 14, 21 e 40 dias (Figuras 6, 7 e 8) a diferença na porcentagem de osso formado não teve significância estatística (Figura 4).

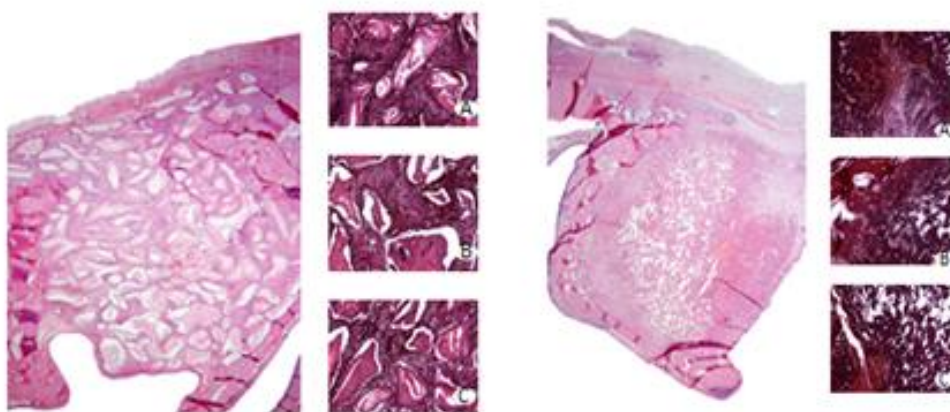


Figura 5. Período 7 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).

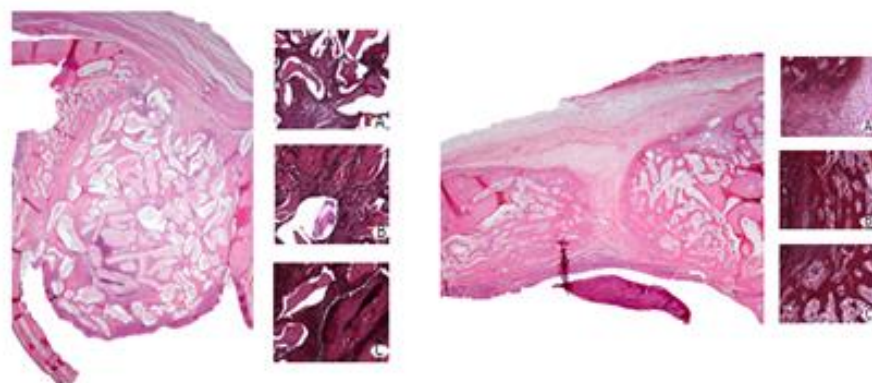


Figura 6. Período 14 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).

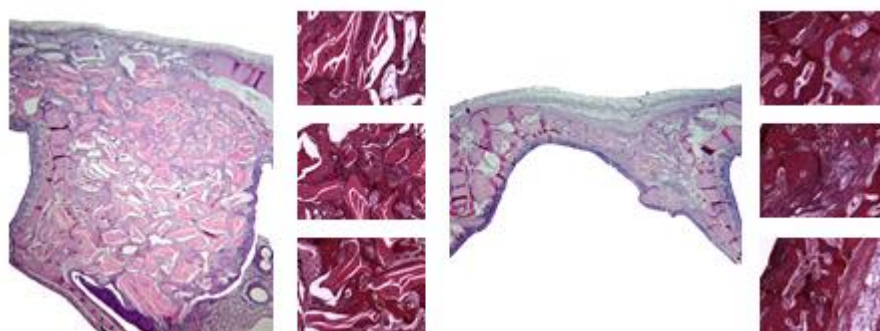


Figura 7. Período 21 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).

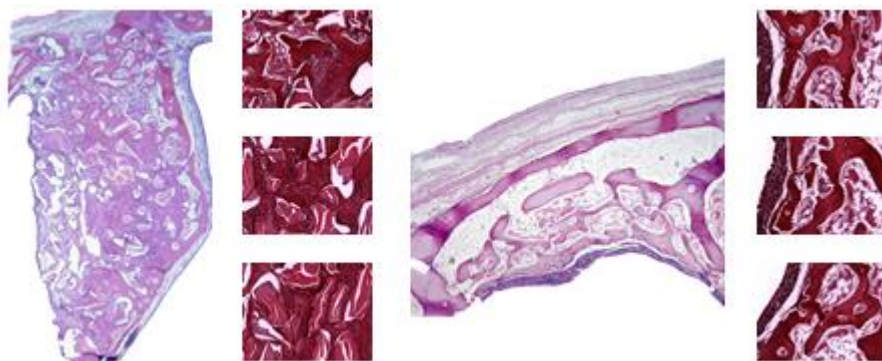


Figura 8. Período 40 dias. Coradas em HE. Aumento de 1x e 12,5x. Bio-Oss (direita) Gingistat (esquerda).

4.2. Imunohistoquímico

A proteína Osteocalcina (OC) é comum para todos os períodos, exceto aos 21 dias onde ela não foi observada no seio maxilar onde se usou Gingistat®. E ao longo do período, a marcação para Osteocalcina vai se intensificando, conforme o osso vai se tornando mais maduro.

A marcação para OC desde os 7 dias é moderada no lado do Gingistat até atingir os 21 dias onde o pico de escore é intenso (Figura 9). Já do lado que se usou Bio-Oss, a OC se encontra leve aos 7 dias e aos 14, para que depois aos 40 dias, como esperado, se encontra moderada (Figura 10).

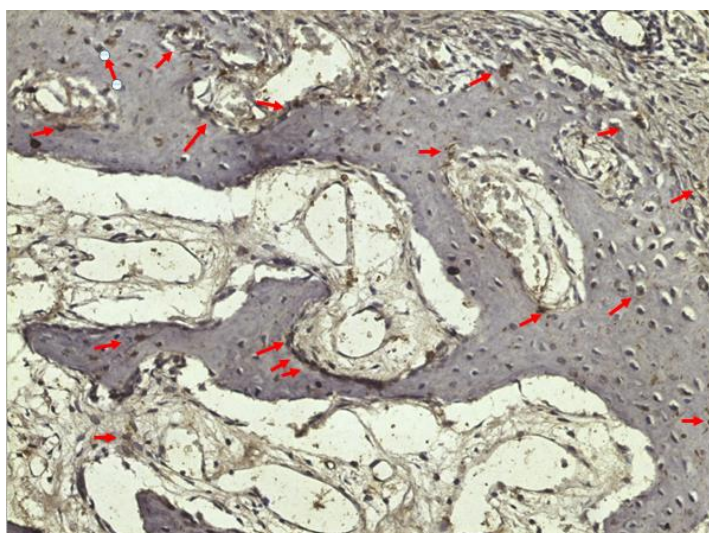


Figura 9. Lâmina do seio preenchido com Gingistat® no período de 21 dias mostrando pico intenso (+++) de Osteocalcina.

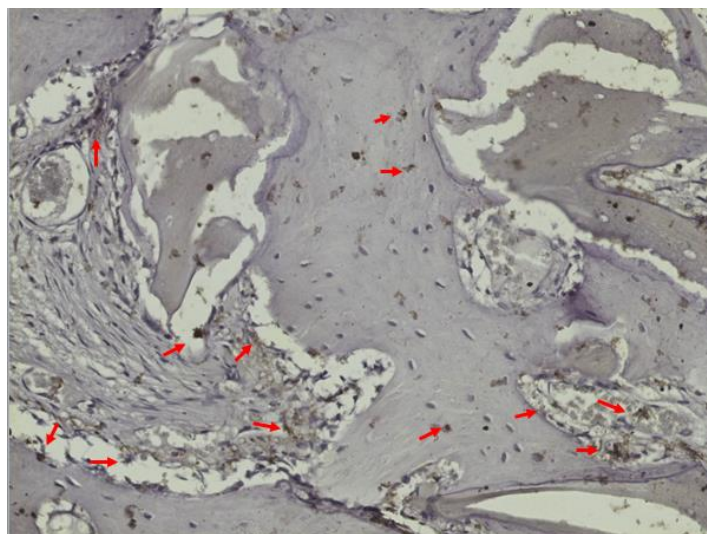


Figura 10. Lâmina do seio preenchido com Bio-Oss® no período de 40 dias mostrando pico moderado (++) de Osteocalcina.

Com isso, nota-se que o Gingistat® tem maior positividade para OC que o Bio-Oss®.

Quando se trata da Osteoprotegerina (OPG) e Rankl (R), as proteínas tem o início de sua marcação as 14 dias, onde se observa as mesmas em equilíbrio, com escore semelhante (moderado x moderado) relacionado aos dois materiais, e permanecendo assim nos períodos subsequentes. Isso indica que o tecido ósseo está sofrendo neoformação e reabsorção de formas equilibradas.

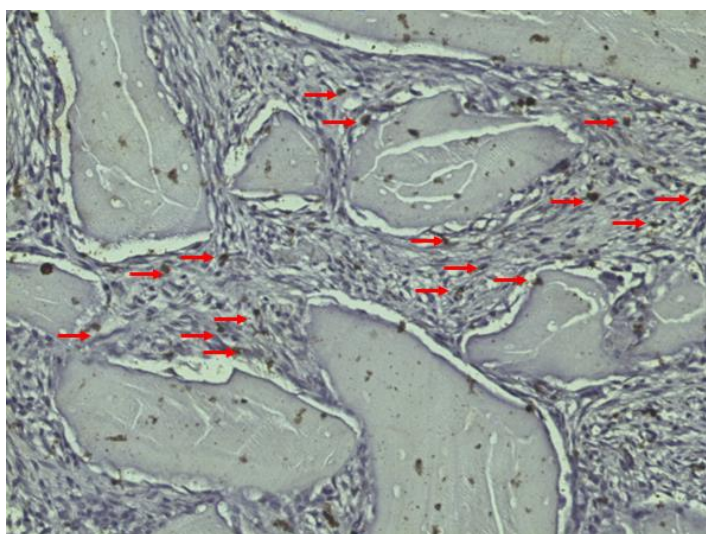


Figura 11. Lâmina de seio preenchido com Gingistat® no período de 14 dias mostrando Rankl moderado (++).

Nota-se que aos 21 dias, o pico de Osteocalcina para o Bio-Oss® coincide com o pico de Osteoprotegerina. Ambas intensas, indicando que se pode relacionar o aumento da Osteocalcina com o aumento da Osteoprotegerina.

5. Discussão

O presente estudo avaliou o desenvolvimento do reparo ósseo após a realização da técnica de levantamento de seio maxilar, usando como material de preenchimento o Bio-Oss® e o Gingistat®. Enquanto aos sete dias a porcentagem de osso formada no seio maxilar onde se usou o Bio-Oss® foi de 22,84%, a porcentagem para Gingistat® foi de 1,75%, sendo este período o único com diferença estatisticamente significativa. Este resultado está de acordo com outros estudos que utilizaram materiais semelhantes (XU, 2004; TAPETY, 2004.)

Em um estudo também com coelhos (XU, 2004), em que foi realizado o levantamento de seio maxilar usando osso bovino desproteínizado e coágulo sanguíneo para o preenchimento das cavidades, seguido por instalação de implante, constatou-se que no pós-operatório de 6, 8 e 10 semanas, o grupo do biomaterial possuía maior quantidade de osso recém-formado quando comparado ao grupo coágulo. Em contrapartida, outro estudo com coelhos (DE SANTIS 2016) em que também foi realizado o levantamento de seio maxilar usando Bio-Oss e osso autólogo como preenchimento, não foi notada diferença significativa entre os grupos na neoformação óssea no pós-operatório de 7 dias.

Outro trabalho (TAPETY, 2004), agora usando o Bio-Oss em defeitos ósseos artificiais de fêmur de rato, constatou que no pós-operatório de 7 dias havia tecido ósseo ocupando toda a cavidade. O resultado desse estudo mostra o potencial desse material como andaime para as células osteogênicas, assim como para promover a diferenciação dos osteoblastos e a síntese da matriz óssea.

No que se diz respeito à esponja de colágeno, um estudo em humanos (AHN, 2011), em que foi realizado levantamento de seio maxilar e o uso desse

material como substituto ósseo, foi notado pouca ou nenhuma neoformação óssea, mesmo com 6 meses de pós-operatório. Além disso, em um estudo com ovelhas (FAVERO, 2015), em que foi utilizada uma membrana de colágeno associada a um enxerto de fosfato de cálcio bifásico em um dos seios e no seio contralateral somente o enxerto de fosfato, ambos para cobrir uma perfuração de membrana sinusal em uma elevação de seio maxilar, constatou que não houve significância na diferença de cura entre os sítios. Assim, mesmo que houvesse tendências para mais formação óssea ao aplicar uma membrana de colágeno em uma perfuração da mucosa do seio, este estudo não demonstrou a necessidade absoluta de tal procedimento para alcançar preenchimento ósseo na cavidade sinusal.

Quando se compara determinados biomateriais com o coágulo sanguíneo no papel de alicerce para o desenvolvimento ósseo após um levantamento de seio maxilar, estudos mostram (XU, 2004; SCALA, 2010) a ineficácia do coágulo em manter a altura óssea com o passar do tempo. Em uma pesquisa desenvolvida com macacos (SCALA, 2010), foi realizado o levantamento de seio maxilar e colocação de implante, sendo o preenchimento do vazio do seio feito somente com coágulo, foi observado no pós-operatório de 30 dias o colapso total da membrana sinusal ao redor do parafuso. Além de alguns biomateriais serem lentamente reabsorvidos, os mesmos tem o papel de inibir a reabsorção óssea contribuindo para o aumento estável do assoalho do seio maxilar, como avaliado em um estudo com coelhos onde se usou osso bovino desproteínizado e coágulo sanguíneo para o preenchimento dos seios após seu levantamento (XU, 2004).

Na avaliação imunoistoquímica, os achados do estudo corroboram com o que outros trabalhos também evidenciaram. Em um estudo (DOS SANTOS PL, 2016) em que foram instalados implantes em defeitos ósseos de tíbias de ratos, e foi usado como substituto ósseo o Bio-Oss®, a expressão da proteína Osteocalcina também esteve presente em todos os períodos e foi se intensificando com o passar do tempo. Quando analisada a razão entre as proteínas Osteoprotegerina e Rankl os resultados também se assemelham, pois as proteínas se mantiveram estáveis durante todos os períodos.

O substituto Gingistat® mostrou uma maior positividade para a proteína Osteocalcina quando comparado com o Bio-Oss®, indicando uma capacidade de mineralização e a maturação do tecido ósseo superior, o que pode estar associado ao efeito osteocondutor que a esponja de colágeno possui (BOMFIM, 2015). Esse material apresenta uma maior disponibilidade de células sanguíneas, um dos fatores responsáveis pela maturação óssea, pois é permeável e permite que o sangue embeba toda sua extensão.

6. Conclusão

Pode-se concluir com este estudo que mesmo havendo neoformação de tecido ósseo em ambos os seios ao fim dos 40 dias, e sendo o Gingistat® o material que apresentou maior osteocondutividade na avaliação imunoistoquímica, foi o Bio-Oss® que se manteve na cavidade por mais tempo, mantendo assim a altura óssea na região. Diferente do Gingistat®, que foi mais rapidamente reabsorvido, levando a uma grande perda da área elevada após a técnica de levantamento de seio maxilar.

Referências

BOYNE, P.J., JAMES, RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. 1980, v. 38, n. 8, 613-63

MISCH, CM. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. 1997, v. 12 n. 6, 767-76.

NISHIBORI, M. et al. Short-term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. **Journal of Periodontology**. 1994, v. 65, n.1º, p. 958-66.

DE SANTIS, E. et al. Healing at implants installed concurrently to maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histomorphometric study in rabbits. 2016. **Clinical Oral Implants Research**

GOLDBERG, VM.; STEVENSON, S. The biology of bone grafts. **Semin Arthroplasty**. 1993, v.4, n.2, p. 58-63.

HENCH, L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials** 1998.

SBORDONE, L. et al. Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. 2009, v. 24, n. 4, p. 695-703.

SARTORI, S. et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clinical Oral Implants Research**. 2003, v. 14, n. 3, p. 369-72.

CANEVA, M. et al. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingostat® collagen sponge: An experimental study in rabbits. **Clinical Oral Implants Research**, 2016.

AGABITI, I. & BOTTICELLI, D. Transcrestal sinus floor elevation performed twice with collagen sponges and using a sonic instrument. **Journal of Oral Science & Rehabilitation**. 2015.

PISTILLI, R. et al. Case of severe bone atrophy of the posterior maxilla rehabilitated with blocks of equine origin bone: histological results. **Implant Dentistry**. 2013, v. 22, n.1, p. 8-15.

DI STEFANO, DA. et al. Treatment of a bone defect consequent to the removal of a periapical cyst with equine bone and equine membranes: clinical and histological outcome. **Minerva Stomatologica**. 2012, v. 61, n.11-12, p. 477-90.

TAPETY, FI. et al. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clinical Oral Implants Research**. 2004, v. 15, n. 3, p. 315-24.

XU, H. et al. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. **Clinical Oral Implants Research**. 2014, v. 15, p. 126–133.

XU, H. et al. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. **Clinical Oral Implants Research**. 2013, v. 14, p. 548–555.

AHN, JJ. et al. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**. 2011, v. 26, n. 1, p. 83-90.

FAVERO, V., et al. Sinus floor elevation outcomes following perforation of the Schneiderian membrane. An experimental study in sheep. **Clinical Oral Implants Research** . 2015, v. 27, n. 2, p. 233-40.

SCALA, A et al. Early healing after elevation of the maxillary sinus floor applying a lateral access: a histological study in monkeys. **Clinical Oral Implants Research**. 2010, v. 21, p. 1320–1326.

DOS SANTOS, PL. et al. Evaluation of bone substitutes for treatment of peri-implant bone defects: biomechanical, histological, and immunohistochemical analyses in the rabbit tibia. **Journal of Periodontal & Implant Science**. 2016, v. 46, n. 3, p. 176-96

BOMFIM, B.B. **Análise do processo de reparo após enxerto de hidroxiapatita e esponja de colágeno em seio maxilar de coelhos**. Exame geral de qualificação. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2015.

ANEXO A- Certificado da Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Campus de Aracatuba

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise da regeneração óssea após elevação do assoalho do seno maxilar de coelho com Bio-Oss® e Gingitast®. Análise histomorfométrica, imunohistoquímica e tomográfica" sob responsabilidade do Pesquisador **IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR** e colaboração de Francisley Ávila de Souza, Sabrina Ferreira, André Luiz da Silva Fabrís e Daniele Botticelli está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COREA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2013-00444**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Analysis of bone regeneration after in rabbit maxillary sinus augmentation with Bio-Oss® and Gingitast®, Histomorphometric, immunohistochemistry and tomographic analysis", protocol number **2013-00444**, under responsibility of **IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR** and with collaboration of Francisley Ávila de Souza, Sabrina Ferreira, André Luiz da Silva Fabrís and Daniele Botticelli agree with Ethical Principles in Animal Research (COREA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edilson Cavallini
 CEUA Coordenador

Faculdade de Tecnologia e Faculdade de Medicina, Unesp
 Rua Prof. Escobar, 1170 - CEP 13605-900 - Aracatuba - SP
 Tel (15) 3336-2001 Fax (15) 3336-2200 E-mail: unesp@fca.unesp.br