

Ricardo Garcia Mureb Jacob

**Avaliação de duas formas de hidroxiapatita e beta-tricálcio
fosfato em enxertos sinusais com concomitante instalação
de implantes em coelhos**

**ARAÇATUBA - SP
2018**

Ricardo Garcia Mureb Jacob

**Avaliação de duas formas de hidroxiapatita e beta-tricálcio
fosfato em enxertos sinusais com concomitante instalação
de implantes em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Odontologia (Área de concentração em Implantodontia).

Orientador: Prof. Dr. Daniele Botticelli

**ARAÇATUBA - SP
2018**

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

J15a

Jacob, Ricardo Garcia Mureb.

Avaliação de duas formas de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em enxertos sinusais com concomitante instalação de implantes em coelhos / Ricardo Garcia Mureb Jacob. – Araçatuba, 2018

80 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Daniele Botticelli

1. Fosfatos de cálcio 2. Hidroxiapatitas 3. Implantes dentários 4. Regeneração óssea 5. Seio maxilar I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICATÓRIA

Ao meu filho amado Matheus Yuji,
que veio a esse mundo para me ensinar o verdadeiro significado do amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Oldemar e Denise,

Os meus maiores professores. Cada qual, desempenhando o seu papel dentro de nossa família. Ensinarão-me, através de exemplos, os verdadeiros valores da vida. Abdicaram de suas próprias vidas para viver em função da minha e das minhas irmãs. Tenho plena consciência de que, por mais que eu faça, jamais conseguirei retribuir. Mas Deus é perfeito, por eles darei continuidade em prol dos meus filhos. É a vida que segue...

À minha amada esposa Vivien,

De uma inteligência admirável, possuidora de uma carreira acadêmica impecável, foi apoio fundamental para que eu não desistisse. Somente alguém com sua força e resiliência para, ao mesmo tempo, conciliar com perfeição as funções de mãe, esposa e profissional. Com amor...

À minha irmã Flávia, ao meu cunhado Luiz Roberto e às minhas amadas sobrinhas Heloísa e Maria,

Não tenho palavras para externar o meu amor e admiração por vocês enquanto seres humanos, profissionais e família. Tão novos já conseguiram construir uma linda família e, ao mesmo tempo, alcançar o degrau mais alto da profissão. Às minhas sobrinhas todo o meu amor e carinho. Que a pureza de suas almas contagie todos à sua volta.

À minha irmã Silvia e ao meu cunhado Rodrigo,

À minha irmã que desde pequena demonstrou ser a minha maior fã, sempre me inspirando a fazer melhor, a ser o melhor exemplo. Hoje, seu sucesso profissional me trouxe muito orgulho e inverteu os papéis: de ídolo a fã! Bigo, grande irmão de coração puro. Nossa afinidade faz parecer que nos conhecemos desde sempre.

À minha Tia Odeli,

Ao meu lado desde que nasci, exercendo verdadeiramente o papel de madrinha e, porquê não, a minha Fada Madrinha? Amiga e confidente, presente em todos os momentos de minha vida, me ajudando e socorrendo nas horas mais difíceis. Realizando os meus sonhos de criança quando, financeiramente, meus pais não podiam realizar. Dando as “mesadas” na adolescência e, assim, pôde me proporcionar um convívio social sadio, o que também contribuiu e muito para minha formação. Minha eterna gratidão!

Aos meus avós,

Agradeço a Deus todos os dias de minha vida por ter me dado esse presente ao poder ter conhecido e convivido com todos os meus avós: Vó Jacyra, Vó Cida, Vô Jacó (Malandrinho) e Vô Garcia (Nhonho). A saudade de vocês é muito grande!

Ao meu tio Osmar e à minha prima Lenita (tio e sobrinha),

Vocês nos deixaram muito cedo, mas tenho certeza de que cumpriram plenamente o papel de cada um aqui nesse mundo. Não tive a oportunidade de dizer-lhes isso, mas desde bem pequeno, foram minhas primeiras fontes de inspiração e maiores exemplos para me dedicar aos estudos. Saudades!

Aos meus tios Quito e Omery,

Exemplo de casal, profissionais, pai e mãe. Não existe um só dia de minha vida em que não estejam em minhas orações. Serei eternamente grato, pois durante os anos mais difíceis de nossas vidas, nós tínhamos o que comer graças às cestas básicas que enviavam para meu pai. Gratidão infinita!

Aos meus primos Eduardo e Marcelo,

Primos, irmãos e melhores amigos. A vocês também não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Atuando nos bastidores, fizeram parte de todos os momentos, bons e ruins, de minha vida. Obrigado por tudo!

Aos meus sogros Emílio e Sônia,

Exemplos de luta, garra e determinação. Vivem para a família e para o trabalho. Seu amor pelos filhos e netos é contagiante. Muito obrigado por nos acolherem sempre e por me fazerem sentir parte da família de vocês. Muito obrigado pelo amor e dedicação para com o meu filho!

Aos meus cunhados Gi, Rafa, Gra e Lu e sobrinhos Fefê, Lipe e Gui

Seres humanos admiráveis, cada qual com suas qualidades. Sempre por perto e alertas para ajudar no que for preciso. Amáveis e carinhosos com meu filho. Exemplos de pais e profissionais batalhadores e vencedores. Essas crianças lindas, sobrinhos de coração, os quais também amo muito. Agradeço de coração por fazerem parte de minha vida!

À minha querida amiga-irmã Miriam,

A cada dia, a cada conquista pessoal e profissional, tenho mais certeza de que foi Deus quem a colocou em minha vida. Seu alto astral, seus pensamentos sempre positivos, seu dom para ajudar e se doar e sua crença na minha capacidade (muitas vezes, mais do que eu mesmo) me ajudaram e muito a me tornar uma pessoa e profissional melhores. Deus a abençoe sempre!

Aos meus professores e grandes mestres de toda vida,

Meu muito obrigado, pois graças a vocês eu tive um excelente ensino público e consegui vencer todas as etapas até chegar a essa pós-graduação. Graças a vocês, hoje, tenho plena consciência de que faço parte de uma imensa minoria em nosso país! Gratidão eterna!

À Bianca e à Lucélia,

Por todos esses anos de dedicação ao trabalho. Pela assiduidade e honestidade com os quais conduziram a clínica nos momentos de minha ausência. Meu muito obrigado de coração!

Aos meus pacientes,

Por toda a confiança depositada em mim ao longo desses 18 anos de implantodontia. Por confiarem sua boca e, muitas vezes, sua vida a mim. Muito obrigado!

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniele Botticelli,

Hoje, referência de pesquisa em Implantodontia no mundo. Pelo seu saber, pela sua experiência e pelas notáveis qualidades humanas. Com amizade, respeito e grande admiração, agradeço-lhe!

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior,

Mestre de mente brilhante e espírito nobre e humilde, que marcou uma etapa muito importante em minha vida e a quem associo momentos inesquecíveis de aprendizagem e de referência para a profissão. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Roberta Okamoto,

A seriedade e a motivação com as quais trabalha são contagiantes. Obrigado por todo seu apoio durante a elaboração deste trabalho, pelo pronto atendimento e inúmeras orientações que me deu. Você apareceu em minha vida no momento mais difícil do meu curso. Sem a sua ajuda eu não estaria aqui agora. Minha eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. Adolfo Embacher Filho,

Com sua retidão de caráter, com profundo conhecimento na área de Implantodontia e imensa habilidade clínica, é um modelo de profissional a ser seguido. A mim, seus ensinamentos extrapolaram o universo da implantodontia. O marco inicial de minhas conquistas profissionais enquanto implantodontista está diretamente relacionado ao início de nossa amizade. Obrigado, que deus o abençoe sempre!

Aos Profs. Drs. Francisley Ávila Souza e Ana Paula Farnezi Bassi,

Grandes mestres e amigos. Exemplos de bondade e simplicidade enquanto seres humanos, educadores e pesquisadores. Pessoas de fácil convívio, não hesitam em ajudar e fazem tudo possível aos alunos, totalmente desprovidas de qualquer capricho. Assim o nosso país tivesse milhares de “Francisleys” e “Ana Paulas” espalhados pelas universidades. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Paulo Perri de Carvalho,

Pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição na minha formação profissional enquanto especialista em implantodontia.

Ao amigo e parceiro Ciro,

Amigo e parceiro incansável em todas as etapas desse trabalho. Obrigado pela dedicação e companheirismo!

Ao amigo Prof. Dr. André Fabris, à Da Ivone e ao Gustavo

André, sempre solícito e disposto a ajudar a todos. Extremamente dedicado ao que faz, exala a paixão pela CTBMF. À sua mãe e ao seu irmão, meu muito obrigado por me acolherem em todas as vezes que precisei.

Ao amigo Prof. Dr. Willian Ricardo Pires,

Grande companheiro. Possuidor de humildade, tranquilidade e paciência ímpares. Sempre quieto foi galgando cada degrau de seu sucesso profissional. Minha admiração sempre! Arrasa amigo!

Aos amigos Valthierre e João Paulo,

Grandes exemplos de garra e determinação. Não medem esforços para cumprir com excelência as suas obrigações. Deixar tudo nas suas respectivas cidades, se mudar com a família e os filhos pequenos para Araçatuba e, ainda, viver de bolsa, não é para qualquer um. Têm a minha admiração e respeito!

Aos professores da UNIFENAS-MG

Muito obrigado pelo carinho com o qual me receberam e acolheram ao longo desse ano de 2018.

À Profa. Dra. (e amiga) Patrícia Furtado Gonçalves

Não tenho palavras para agradecer toda sua ajuda, suporte e disponibilidade quando ingressei na UNIFENAS. Muito obrigado de coração!

Aos meus alunos da UNIFENAS-MG

Saibam que são duas vezes especiais! A primeira por serem os meus primeiros alunos de graduação, pois até então, minha experiência com o ensino da Odontologia se deu somente em nível de pós-graduação. Confesso que, para mim, ensinar para a graduação é infinitas vezes mais realizador. A segunda por serem uma grande maioria de alunos inteligentes, esforçados e batalhadores. Estejam certos de que estou aprendendo com vocês tanto o quanto estão comigo. Meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Leonardo Faverani, Alessandra Aranega, Daniela Ponzoni e aos demais professores do Departamento de CTBMF e da pós-graduação.

Um agradecimento especial aos colegas Jonathan, Sabrina, Tárik, Gustavo Momesso, Fábio, Gabriel e Pedro que, ao longo dessa minha jornada tiveram disponibilidade em me orientar, ensinar, dar dicas e até mesmo, muitas vezes, só conversar.

Aos demais colegas da pós-graduação André Oliva, Erik, Léo Bahia, Rodrigo Carioca, Sormani, Ju Zorzi, Mônica, Pilar, Igor, Rodrigo Capalbo, Thiago, Willian Philip, Paulo, Lara, Luara, Bruna, Breno e Jaqueline pelo companheirismo durante o curso e pelos momentos de descontração.

À Michele e à Franciani, pelo importante papel de porta-vozes do Professor Idelmo. Indiretamente, nos bastidores, posso dizer que essas duas profissionais exercem um papel importantíssimo dentro da pós-graduação. Muito Obrigado!

Aos amigos Renan e Diego por me acolherem em sua casa durante esses anos de trabalho.

Ao Sr. João (biotério), pela atenção e solicitude com que sempre me tratou. Por tornar o nosso trabalho no biotério menos maçante. Obrigado!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, Dirce, Gilmar, Arnaldo, Odair, Tina, Paulo, Renato e Joilson.

À Valeria, à Cristiane e à Lilian por exercerem de maneira exemplar as suas funções. Pela paciência em ajudar os alunos da pós-graduação com todos os processos burocráticos.

Ao amigo Fábio Embacher por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho. Muito obrigado por doar, através da EMFILS, todos os implantes personalizados aos inúmeros pós-graduandos da FOA.

À Osteosynt também por acreditar em mim e assim doar os biomaterias da nossa pesquisa (minha e do Ciro).

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado.

***“Quem vence alguém torna-se um vencedor, mas
aquele que consegue vencer a si mesmo, torna-se
invencível”***

Morihei Ueshiba

Jacob RGM. Avaliação de duas formas de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato em enxertos sinusais com concomitante instalação de implantes em coelhos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar o tecido ósseo periimplantar formado após o enxerto sinusal com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (HA + β -TCP), nas apresentações em grânulos e em pasta, concomitante à instalação de implantes em coelhos. Trinta e quatro seios maxilares de coelhos foram enxertados com HA + β -TCP, sendo metade do grupo grânulos e metade do grupo pasta. Concomitantemente, foi realizada a instalação de implantes. Aos 7 e 40 dias pós-operatórios, realizou-se a eutanásia dos animais, e as amostras foram preparadas para as análises tomográfica, microtomográfica, histológica (coloração por hematoxilina e eosina - HE), imunoistoquímica (marcação de fator de transcrição Runt-2 – RUNX2 –, fator de crescimento endotelial vascular – VEGF –, osteocalcina – OCN – e fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP) e de torque de remoção dos implantes. Na tomografia, foi observada a manutenção da integridade da membrana sinusal, sem extravasamento de material, nos dois grupos e períodos. Parâmetros morfométricos de volume ósseo, porcentagem do volume ósseo e número de trabéculas foram significativamente superiores para o grupo pasta do que para o grupo grânulos aos 7 dias, enquanto que a porosidade foi maior para o grupo grânulos nesse mesmo período. Aos 40 dias, não houve diferença significativa entre os grupos para a maioria dos parâmetros microtomográficos estudados. Nos cortes histológicos corados por HE, observou-se que em ambos os grupos ocorreu a formação de tecido ósseo junto às espiras do implante aos 40 dias, favorecendo a osseointegração. Imunomarcações positivas semelhantes foram encontradas tanto para o fator de diferenciação osteoblástica RUNX2 quanto para o fator de mineralização OCN no osso neoformado nos dois grupos experimentais. A atividade osteoclástica evidenciada pela TRAP mostrou-se semelhante nos dois grupos, com discreto predomínio para o grupo grânulos. Já a marcação positiva para o VEGF mostrou-se aumentada no grupo grânulos, caracterizando um potencial osteocondutor superior nessa apresentação do biomaterial. Ademais, não houve diferenças nos valores de torque de remoção do implante entre ambos os grupos.

Logo, as duas apresentações da HA + β -TCP mostraram resultados favoráveis à osseointegração a longo prazo, com formação de tecido ósseo em quantidade e qualidade semelhantes junto aos implantes.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio. Hidroxiapatitas. Implantes dentários. Regeneração óssea. Seio maxilar.

Jacob RGM. Evaluation of two formulations of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate in rabbit sinus grafts with concomitant implant placement [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2018.

Abstract

This work aimed to evaluate the peri-implant bone tissue after maxillary sinus grafting with hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate (HA + β -TCP), in granular and paste formulations, concomitant with implant placement in rabbits. Thirty four rabbit maxillary sinuses were grafted with HA + β -TCP, being half of the granular group and half of the paste group. Concomitantly, the implant placement was performed. At 7 and 40 postoperative days, animals were euthanized, and the samples were prepared for tomographic, microtomographic, histological (hematoxylin and eosin staining), immunohistochemical (Runx-related transcription factor 2 – RUNX2, vascular endothelial growth factor – VEGF –, osteocalcin – OCN – and tartrate-resistant acid phosphatase – TRAP – staining) and implant torque removal analyses. In computed tomography, the maintenance of sinus membrane integrity, with no material extravasation, was observed in both groups and periods. Morphometric parameters of bone volume, percentage of bone volume and trabecular number were significantly higher for paste than granular group at day 7, while the porosity was higher for granular group in this period. At day 40, there were no significant differences between both groups for the majority of the microtomographic parameters studied. In the HE-stained histological sections, it was observed that bone healing around implant threads occurred for both groups at day 40, enhancing osseointegration. Similar positive immunostainings were observed for both the RUNX2 osteoblastic differentiation factor and the OCN mineralization factor in the neoformed bone in the two experimental groups. The osteoclast activity evidenced by TRAP was similar in both groups, with a slight predominance for the granular group. Positive staining for VEGF growth factor was increased in the granular group, characterizing a superior osteoconductive potential for this biomaterial formulation. Besides, there were no differences in the values of implant removal torque between both groups. Thus, the two formulations of HA + β -TCP showed favorable osseointegration results in the long term, with similar amount and quality of bone tissue formation around the implants.

Keywords: Calcium phosphates. Hydroxyapatites. Dental implants. Bone regeneration. Maxillary sinus.

Lista de Figuras

- Figura 1 Representação esquemática da interação complexa e dinâmica 31
entre os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs) e o ambiente biológico. Composição química e arquitetura do arcabouço das BCPs são parâmetros essenciais para controlar a adesão de células ósseas, incluindo os osteoblastos e osteoclastos. A ação concomitante dessas células medeia o processo de biodegradação e as propriedades de osteocondução e osteoindução das BCPs (modificado de Bouler et al., 2017).
- Figura 2: Sequência operatória do preenchimento sinusal com HA + β -TCP 40
em grânulos ou pasta e colocação de implante na região do seio maxilar esquerdo de coelhos. A) Demarcação do osso vestibular maxilar realizado com broca trefina a 2 cm anterior da sutura nasofrontal e 1 cm lateralmente a linha média. B) Desgaste do osso com broca diamantada para descolamento da membrana sinusal e exposição do interior do seio maxilar. C) Biomaterial aplicado no interior do seio maxilar. D) Instalação do implante com auxílio de chave bidigital. E) Implante instalado até o nível de sua plataforma protética. F) Reposicionamento e sutura dos tecidos moles.
- Figura 3: Fluxogramas da distribuição dos animais nos grupos experimentais 41
e respectivos procedimentos laboratoriais aos 7 e 40 dias pós-operatórios. A) Animais utilizados para as análises tomográfica, microtomográfica, histológica e imunoistoquímica. B) Animais utilizados para a análise do torque de remoção do implante.
- Figura 4: Imagens tomográficas (cortes axiais) de amostras dos grupos pasta 49
e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.
- Figura 5: Imagens microtomográficas (cortes axiais) de amostras dos grupos 51
pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.
- Figura 6: Imagens microtomográficas (cortes sagitais) de amostras dos 51
grupos pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.

Figura 7: Parâmetros morfométricos quantificados por meio de 52
microtomografia computadorizada nos grupos pasta e grânulos nos
períodos experimentais de 7 e 40 dias. A) Volume ósseo (mm³)
obtido pela análise do parâmetro BV. B) Porcentagem do volume
ósseo (%) obtida pela análise do parâmetro BV/TV. C) Espessura
do trabeculado ósseo (mm) obtida pela análise do parâmetro Tb.Th.
D) Número de trabéculas (/mm) obtido pela análise do parâmetro
Tb.N. E) Separação de trabéculas (mm) obtida pela análise do
parâmetro Tb.N. F) Porosidade total (%) obtida pela análise do
parâmetro Po(tot). G) Superfície de intersecção (mm²) obtida pela
análise do parâmetro iS.

Figura 8: Cortes histológicos corado por hematoxilina e eosina, 53
representativos dos grupos grânulos e pasta, aos 7 e 40 dias.

Figura 9: Fotomicrografias da região do seio maxilar de coelhos 40 dias após 56
o preenchimento com HA + β -TCP, nas apresentações em pasta e
grânulos, e concomitante instalação de implante, evidenciando as
imunomarcações das proteínas RUNX2, VEGF, OCN e TRAP.

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Escores representativos das imunomarcações para o Fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a Osteocalcina (OCN) e a Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nos grupos grânulos e pasta aos 40 dias. 54
- Tabela 2: Distribuição dos valores do torque de remoção do implante, em Newton centímetro, 40 dias após sua instalação em seios maxilares de coelhos preenchidos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (HA + β -TCP), nas apresentações em grânulos e pasta. 57

Lista de Abreviaturas

BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BMP	Proteína morfogenética óssea
BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem do volume ósseo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	Grama
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
IM	Intramuscular
iS	Superfície de intersecção
kg	Quilograma
LSMT	Laboratório para estudo de tecidos mineralizados
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Newton
nº	Número
°C	Graus Celsius
OCN	Osteocalcina
pH	Potencial hidrogeniônico
Po(tot)	Porosidade total
ROI	Região de interesse
rpm	Rotações por minuto
RUNX2	Fator de transcrição relacionado a Runt-2
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo

TIFF	Tagged Image File Format
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
β -TCP	Beta-tricálcio fosfato
μ A	Microampére
μ m	Micromolar

Sumário

1 Introdução	21
2 Revisão da Literatura	24
2.1 O modelo experimental	25
2.2 Enxertos ósseos para preenchimento do seio maxilar	27
2.3 Preenchimento do seio maxilar associado à instalação de implante	31
3 Proposição	34
4 Material e Métodos	36
4.1 Animais	37
4.2 Delineamento experimental	37
4.3 Procedimento cirúrgico	38
4.4 Análise tomográfica	42
4.5 Análise microtomográfica	42
4.6 Análise histológica	44
4.7 Análise imunoistoquímica	44
4.8 Análise do torque de remoção dos implantes	46
4.9 Análise estatística	46
5 Resultados	48
5.1 Estabilidade do biomaterial e do implante e integridade da membrana sinusal	49
5.2 Parâmetros morfométricos de volume ósseo e de contato osso-implante	50
5.3 Descrição morfológica da resposta tecidual frente aos materiais	53
5.4 Respostas de osteoindução, osteocondução, mineralização e atividade osteoclástica	54
5.5 Estabilidade primária dos implantes	57
6 Discussão	58
7 Conclusão	65
Referências	67
Anexos	77

Introdução

1 Introdução

Os implantes dentários têm sido cada vez mais utilizados para reabilitação de pacientes com ausência de um ou mais dentes na cavidade bucal. Contudo, a deficiência de volume ósseo apresenta-se como fator negativo para o planejamento de reabilitações com próteses implanto-suportadas na região posterior da maxila devido à presença do seio maxilar e perda de altura óssea alveolar (Kim et al., 2012; Espósito et al., 2014; De Santis et al., 2017). Tal perda pode ser causada por atrofia após longo tempo de edentulismo, reabsorção de osso alveolar em pacientes com periodontite e pneumatização das cavidades sinusais (Kolerman et al., 2012; Peng et al., 2013; Sverzut et al., 2015) ou ainda pela combinação desses fatores.

Com o intuito de promover um aumento do volume ósseo nessas regiões, uma das opções de tratamento é a elevação do seio maxilar previamente à instalação do implante, a qual pode ser realizada por meio de diferentes técnicas cirúrgicas que utilizam a cavidade sinusal para colocação de materiais de enxerto ósseo. Atualmente, a cirurgia de enxerto ósseo é bastante previsível e considerada um procedimento seguro (Peng et al., 2013).

Vários materiais têm sido utilizados para o enxerto sinusal, podendo ser divididos em 4 grupos de acordo com a origem: osso autógeno, alógeno, xenógeno ou sintético. Estes podem ser utilizados isoladamente ou combinados uns aos outros (Peng et al., 2013; Moon et al., 2014; Trbakovic et al., 2018).

O osso autógeno é considerado o “padrão ouro” dos materiais de enxerto devido a suas propriedades de osteogenicidade, osteocondutividade e osteoindução (Rickert et al., 2012; Peng et al., 2013). Contudo, o uso de osso autógeno é limitado por problemas como área doadora intrabucal restrita, morbidade da área doadora intra e extrabucal, necessidade de hospitalização, anestesia geral, dor pós-operatória e alto custo das despesas médicas (Chaves et al., 2012; Peng et al., 2013; Sununliganon et al., 2014). Os ossos alógeno e xenógeno também apresentam limitações, como possibilidade de rejeição imune e de transmissão de doenças infecciosas (Reddy et al., 2015).

As cerâmicas à base de fosfato de cálcio bifásico (BCP) emergem como alternativas viáveis e bem aceitas devido a sua semelhança aos componentes

da matriz óssea, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. A associação de hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato (β -TCP) em cerâmicas garantem propriedades importantes, uma vez que cada componente apresenta propriedades físicoquímicas e vantagens biológicas distintas. O β -TCP é biocompatível, osteoindutivo, apresenta alta porosidade (Bettach et al., 2014), é mais solúvel e reabsorvido mais rapidamente que a HA; já esta é mais osteocondutiva e tão osteoindutiva quanto o β -TCP (Reddy et al., 2013).

A HA sintética e/ou o β -TCP vêm sendo testados em diferentes composições e formas físicas, tais como cimentos, particulados, cobertura de implantes metálicos e compósitos com ou sem polímeros para uso como matrizes em engenharia tecidual e propósitos clínicos (Kolerman et al., 2012; Reddy et al., 2013; Sverzut et al., 2015). No mercado brasileiro, é possível encontrar uma formulação composta por HA e β -TCP nas proporções de 60% e 40%, respectivamente, nas apresentações em grânulos e em pasta.

Além das características físicas, químicas e biológicas dos enxertos ósseos, outro fator importante para os tratamentos reabilitadores totais fixos implanto-suportados na maxila é o tempo. Em vista disso, a técnica de levantamento sinusal em humanos, instalando os implantes concomitantemente à realização do enxerto, é preferida para reduzir o tempo total de tratamento numa situação clínica (Kim et al., 2012; Jodia et al., 2014).

Desta forma, existe a necessidade de se estudar os procedimentos de reconstrução com o uso de diferentes apresentações de enxertos biocerâmicos à base de BCP e instalação imediata de implantes. Para isto, o modelo experimental de enxerto sinusal em coelhos (Stübinger, Dard, 2013), associado à instalação concomitante de implantes (De Santis et al., 2017), tem sido bastante utilizado, devido às propriedades de remodelação óssea semelhantes às dos humanos e volume ósseo suficiente para a instalação dos implantes (Pearce et al., 2007; Stübinger, Dard, 2013).

Revisão da Literatura

2 Revisão de Literatura

A fim de contextualizar o leitor sobre o assunto, este capítulo foi organizado em tópicos relacionados ao modelo experimental, aos tipos de enxertos ósseos utilizados em cirurgias de preenchimento do seio maxilar e à técnica de preenchimento de seio maxilar associada à instalação de implantes.

2.1 O modelo experimental

Coelhos são pequenos mamíferos da família Leporidae da ordem Lagomorpha encontrados em diversas partes do mundo. Dentre as várias raças, coelhos da raça branca Nova Zelândia são comumente utilizados para pesquisa por serem menos agressivos e por terem menos problemas de saúde em comparação às demais (Mapara et al., 2012).

Coelhos apresentam maturidade esquelética precoce alcançada por volta dos 6 meses de idade e alta taxa de compactação óssea (70% a 80%) em ossos longos e achatados (Mapara et al., 2012). Além disso, apresenta rápidas alterações esqueléticas, com ciclo de remodelação óssea (“turnover” ósseo) de 6 semanas, equivalente a 12 semanas em cães e 17 semanas em humanos (Roberts et al., 1984; Roberts et al., 1987; Roberts, 1988). A invasão vascular na cicatrização óssea em coelhos inicia-se nos primeiros 5 dias, com uma taxa de revascularização de 0,2 a 0,4 mm/dia, enquanto que a vascularização total e a completa cicatrização óssea ocorrem em 20 e 40 dias, respectivamente (Albrektsson, 1980 apud Sununliganon et al., 2014).

Assim como os humanos, coelhos metabolicamente normais mostram alterações na remodelação endosteal em idades específicas com significativa expansão da cavidade medular devido a uma atividade celular osteoclástica aumentada ao longo do tempo. De acordo com Stoker e Epker (1971, apud Stübinger, Dard, 2013), o conhecimento da perda óssea trabecular-endosteal com a idade tem influência decisiva na seleção de coelhos para alguns experimentos, uma vez que a taxa de formação óssea na superfície endosteal permanece constante ao longo da vida (Stübinger, Dard, 2013).

Outra característica comparável à de humanos refere-se à presença do óstio, o qual favorece a troca de ar entre as cavidades nasal e maxilar, possibilitando a manutenção da pressão absoluta do ar nessas cavidades (Scharf et al., 1995; Stübinger, Dard, 2013).

O modelo de preenchimento sinusal em coelhos foi introduzido pela primeira vez por Watanabe et al. (1999) com o objetivo de avaliar o reparo do enxerto autógeno no seio maxilar. Neste modelo, a abertura do seio é realizada através de osteotomia do osso nasal (o qual é facilmente acessível) e deslocamento da membrana antral para dentro da cavidade. O espaço formado entre a membrana e o seio serve como um arcabouço para a aplicação dos enxertos ósseos.

Asai et al. (2002) descreveram detalhadamente um modelo semelhante, porém obliterando o óstio com uma esponja de colágeno e utilizando coágulo sanguíneo para o preenchimento sinusal. Tinham por objetivo comparar a formação de novo osso e a estabilidade do coágulo entre dois grupos de animais: com óstio aberto e com óstio fechado. Análise histológica qualitativa revelou uma repneumatização da cavidade, com retorno quase que total da membrana para sua posição inicial nos animais com óstio aberto. Em contrapartida, os coelhos com óstio obliterado apresentaram osso trabecular maduro após um período de seis semanas.

A partir daí, vários trabalhos utilizaram o seio maxilar de coelhos para avaliar a formação de novo osso após enxerto de diferentes substitutos ósseos (Chaves et al. 2012; Moon et al., 2014; Sununliganon et al., 2014).

Em estudos envolvendo implantes, os fatores decisivos para mostrar a osseointegração são: as propriedades fundamentais de remodelação óssea e um volume ósseo suficiente para sua implantação. Como o coelho preenche esses critérios, não há necessidade de uso de animais de ordens superiores em testes iniciais com implantes (Stübinger, Dard, 2013). Além disso, o coelho é um modelo animal de primeira escolha para estudos na área de Implantodontia devido ao seu tamanho, fácil manipulação, vida útil curta e aspectos econômicos relacionados à sua compra e manutenção. O coelho oferece quantidade e qualidade de tecido ósseo adequadas, exibindo aproximação à situação humana (Stübinger, Dard, 2013). Vale ressaltar, contudo, que diferentemente de humanos, em que o acesso ao seio se dá por

uma abertura lateral da cavidade sinusal, com o levantamento da membrana de Schneider, em coelhos, o acesso ocorre por meio da cortical superior e a cavidade é criada a partir do abaixamento da membrana sinusal.

2.2 Enxertos ósseos para preenchimento do seio maxilar

Em humanos, durante o procedimento de levantamento do seio maxilar, o espaço criado entre a membrana sinusal e a ponte maxilar residual (assoalho do seio) é usualmente preenchido com material de enxerto ósseo. Assim, espera-se que uma fração óssea seja criada, permitindo a instalação segura de implantes, a qual pode ser realizada simultaneamente ao procedimento de elevação quando a ponte residual permite estabilidade primária do implante ou em um segundo estágio, após a cicatrização do enxerto (Rickert et al., 2012).

Enxertos de osso autógeno são amplamente utilizados devido às suas propriedades de osteogenicidade, osteocondutividade e osteoindução e à presença de grande número de células viáveis. Estas células consistem em osteoblastos, células mesenquimais indiferenciadas, monócitos e precursores de osteoclastos, as quais participam da remodelação e formação de novo osso (Rickert et al., 2012). Ademais, o osso autógeno libera fatores de crescimento osteogênicos, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), capazes de promover proliferação e diferenciação de células progenitoras, não apresentam risco de reações imunológicas ou transmissão de doenças e são um ambiente propício para a formação de novos vasos sanguíneos (Miron et al., 2016).

Entretanto, os enxertos autógenos requerem um segundo sítio cirúrgico, induzem morbidade e dor crônica e são associados a resultados imprevisíveis visto que, quando utilizados de forma exclusiva, sofrem uma reabsorção significativa, tendo o seu volume reduzido (John, Wenz, 2004; Lambert et al., 2013; Bouler et al., 2017). Sendo assim, algumas situações claramente demonstraram a equivalência clínica entre os substitutos ósseos sintéticos e os enxertos autógenos. Uma revisão sistemática apontou que as evidências científicas não suportam e nem refutam a superioridade do osso autógeno

sobre os substitutos ósseos, considerando os resultados de sobrevida de implante e as complicações inerentes ao procedimento (Nkenke, Stelzle, 2009).

Uma possibilidade é o uso combinado de osso autógeno e outros biomateriais, tendo como vantagens: a necessidade de menor quantidade de osso advindo da área doadora, a manutenção das propriedades osteoindutora, osteocondutora e osteogênica, a lenta remodelação do enxerto e a preservação de seu volume por um tempo maior (Artese et al., 2011; Ramos-Murguialday et al., 2015). Contudo, ainda permanece o inconveniente da necessidade de um segundo sítio cirúrgico (área doadora).

Um material alternativo ao osso autógeno considerado ideal deve reduzir ou evitar a morbidade da área doadora, induzir a osteocondução e/ou a osteoindução e, mais importante, manter o equilíbrio entre reabsorção e manutenção do volume, atuando como um arcabouço e evitando a repneumatização da cavidade sinusal (Trbakovic et al., 2018).

Substitutos ósseos alógenos e xenógenos têm sido propostos e são utilizados em algumas aplicações clínicas. O osso bovino desmineralizado é reabsorvido lentamente ou não é totalmente reabsorvido após um longo período de tempo (Xu et al., 2004). Contudo, a transmissão viral e a falta de disponibilidade de osso em grande escala em bancos de ossos são desvantagens que levaram ao desenvolvimento de biomateriais sintéticos, cujo uso cresceu drasticamente nos últimos 15 anos devido ao seu processo de fabricação confiável e à possibilidade de combiná-los com moléculas bioativas, agentes terapêuticos e células (Bouler et al., 2017). É importante ressaltar que os substitutos ósseos sintéticos ainda não fornecem os elementos celulares necessários para a osteogênese, sendo apenas osteocondutores e osteoindutores.

Biomateriais sintéticos para enxerto ósseo disponíveis atualmente são: metais, polímeros reabsorvíveis e não reabsorvíveis, cerâmicas inertes como alumina e zircônia, cerâmicas ou vidros bioativos, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio e fosfato de cálcio. Esses materiais inorgânicos diferem em composição e propriedades físicas entre si e do osso autógeno (Garcia-Gareta et al., 2015; Yunus Bacha et al., 2015; Bouler et al., 2017).

Uma vez que a porção mineralizada do osso humano é composta por apatitas de fosfato de cálcio, os materiais à base dessa substância são os de

preferência, pois participam do processo de remodelação óssea. Com base na sua composição, os fosfatos de cálcio sintéticos mais comumente usados são: hidroxiapatita (HA), alfa ou beta-tricálcio fosfato (α ou β -TCP) e os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs) nas misturas de HA e β -TCP (Newesely, Hayek, 1963 apud Bouler et al., 2017; Jarcho, 1981 apud Bouler et al., 2017).

A HA é um composto inorgânico muito semelhante à estrutura da fase mineral do osso, porém apresenta degradação lenta (de 1 a 2% ao ano) (Moore et al., 2001). Já o TCP apresenta uma taxa de biodegradação muito rápida (Ellinger et al., 1986), nem sempre concomitante com a deposição óssea (Buser et al., 1998). Estudos atuais com o β -TCP demonstraram que esse material acelera a regeneração óssea (Araújo et al., 2010).

As cerâmicas bifásicas compostas por HA e β -TCP estão sendo desenvolvidas a fim de melhorar o controle de dissolução de íons cálcio e fosfato quando destinada à regeneração óssea (Dalcusi et al., 1989). Trabalhos clínicos prévios com cerâmica de HA e β -TCP demonstraram uma correlação entre reabsorção do substituto ósseo e regeneração óssea, a qual foi dependente da densidade e pureza do material cerâmico, tamanho do defeito, tipo de leito receptor do implante e potencial osteogênico individual (Bettach et al., 2014).

Kolerman et al. (2012) avaliaram o potencial regenerativo de um material composto por HA e β -TCP, nas proporções de 60% e 40%, respectivamente, em procedimentos de elevação de seio maxilar em humanos. Avaliação histológica de material de biópsia mostrou 26,4% de osso neoformado, 27,3% de material de enxerto residual e 46,3% de osso medular após 9 meses do enxerto. Os autores concluíram que o material avaliado foi biocompatível e osteoindutivo em procedimentos de elevação de seio maxilar.

Algumas propriedades importantes para a modulação das atividades biológicas dos BCPs são: solubilidade, estrutura (macro/microestrutura e interconectividade) e granulometria (Figura 1).

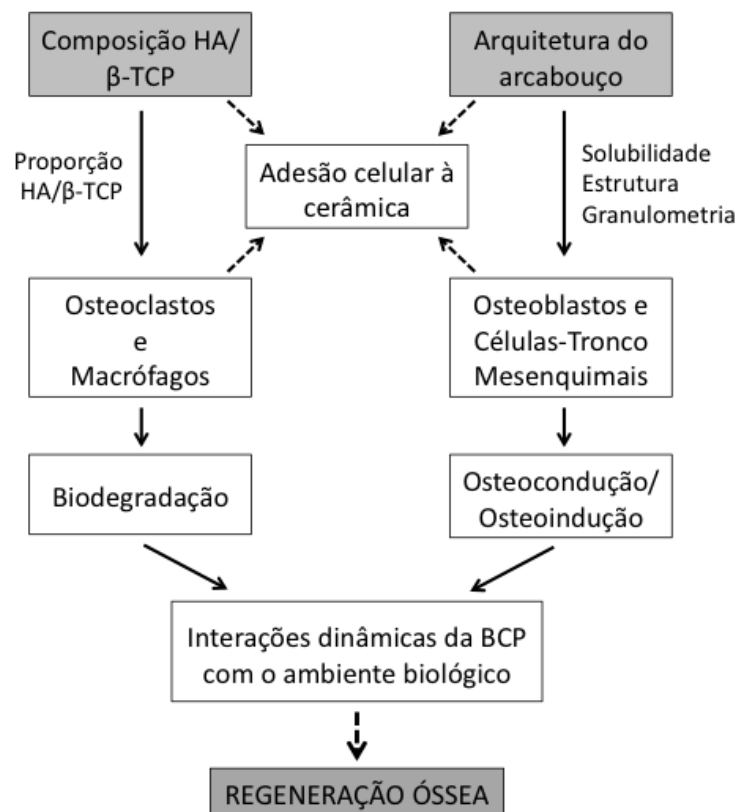
A solubilidade dos BCPs depende da proporção de β -TCP/HA no material, sendo que quanto maior essa razão, maior sua taxa de dissolução. A solubilidade influencia o padrão de atividade osteoclástica em relação à forma e à distribuição das lacunas de reabsorção. Em resposta à degradação dos

BCPs (solubilidade e reabsorção) e dependendo da proporção de β -TCP/HA, alguns íons livres (cálcio e fósforo) liberados podem subsistir nas intermediações de células progenitoras ósseas, as quais poderiam estimular a diferenciação osteogênica, participando da formação de novo osso. Portanto, determinar a proporção ideal de β -TCP/HA é a chave para controlar não apenas a taxa de reabsorção dos BCPs, mas também a liberação de íons ao redor das células ósseas, estimulando a atividade osteoblástica (Bouler et al., 2017).

A estrutura determina a interação do biomaterial com os fluidos biológicos e influencia o comportamento das células ósseas. A microporosidade tem papel importante tanto na adsorção de proteínas quanto na inibição da diferenciação osteoblástica. Já a macroporosidade e a interconectividade dão suporte à invasão celular nos BCPs, pois fornecem um ambiente apropriado para a diferenciação e crescimento de células progenitoras ósseas e subsequente formação de novo osso (Annaz et al., 2004; Bouler et al., 2017; Rh Owen et al., 2018).

Em relação à granulometria do biomaterial, uma característica importante é a presença de espaços intergranulares adequados para favorecer a angiogênese, a colonização celular por osteoblastos, a reabsorção do biomaterial e, finalmente, a sua propriedade osteocondutora (Gauthier et al., 1999; Bouler et al., 2017).

Figura 1: Representação esquemática da interação complexa e dinâmica entre os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs) e o ambiente biológico. Composição química e arquitetura do arcabouço dos BCPs são parâmetros essenciais para controlar a adesão de células ósseas, incluindo os osteoblastos e osteoclastos. A ação concomitante dessas células medeia o processo de biodegradação e as propriedades de osteocondução e osteoindução dos BCPs (modificado de Bouler et al., 2017).



2.3 Preenchimento do seio maxilar associado à instalação de implante

Quando a membrana sinusal é descolada e o seio maxilar é preenchido por coágulo sanguíneo, sem a instalação de implantes, mantenedores de espaço e/ou biomateriais, há uma tendência de que esta membrana retorne para sua posição original (repneumatização da cavidade sinusal) devido à rápida reabsorção do coágulo e à pressão positiva do ar (Asai et al., 2002; Xu et al., 2004; Lambert et al., 2013). Contudo, é possível, após o seu deslocamento, mantê-la em sua nova posição somente com instalação imediata de implantes, até mesmo sem a inserção de qualquer biomaterial

(Ellegaard et al., 1997; Lundgren et al., 2004; Ellegaard et al., 2006; Cricchio et al., 2011). Porém, nesses casos, foi demonstrado que quase sempre a mucosa entra em colapso e envolve toda a superfície do implante, limitando a extensão de osso neoformado e, conseqüentemente, a osseointegração (Scala et al., 2012). Assim, para superar esses inconvenientes, o uso de enxertos ósseos e, em particular, de biomateriais mais lentamente reabsorvíveis, parecem evitar a repneumatização do seio maxilar, promovendo uma estabilidade tridimensional a longo prazo (Lambert et al., 2013).

Tatum (1986) propôs, pela primeira vez em humanos, a instalação de implantes dentários concomitante à elevação do assoalho do seio através da abertura de uma janela lateral, o que levou à expansão das indicações dos implantes na região posterior de maxila. Esta técnica tem como vantagens: visão direta para realização da cirurgia, controle da elevação da membrana, proteção efetiva da mucosa sinusal e posicionamento preciso do enxerto ósseo (Peng et al., 2013).

Atualmente, existe uma dificuldade em analisar os estudos sobre a elevação do seio maxilar devido à grande variabilidade nos desenhos experimentais, diferentes tipos de implantes e tempo de acompanhamento, falta de detalhes sobre a carga funcional dos implantes em cada paciente e, ainda, a diversidade dos biomateriais utilizados como substitutos ósseos (Nkenke, Stelzle, 2009).

Revisões sistemáticas relataram que a instalação de implantes simultaneamente ao enxerto ósseo ou em um segundo tempo cirúrgico apresentam taxas de sobrevivência similares, sendo em torno de 92% (Wallace, Froum, 2003; Del Fabbro et al., 2004). Após três anos de acompanhamento, Pjetursson et al. (2008) relataram uma taxa de sobrevivência de 90,1% em casos de levantamento sinusal e instalação concomitante de implantes.

Do ponto de vista clínico e a fim de garantir resultados satisfatórios da osseointegração a longo prazo, o implante precisa manter-se estável (Thoma et al., 2018). A estabilidade primária de um implante é determinada pela quantidade e maturidade óssea periimplantar, a qual pode prever o prognóstico a longo prazo do implante (Joo et al., 2017). Se a estabilidade primária do implante é alcançada, a técnica de preenchimento sinusal concomitante à

instalação de implante (cirurgia única) é preferível devido ao menor tempo de tratamento, evitando uma segunda cirurgia apenas para colocação do implante (Cha et al., 2014; Joo et al., 2017).

Enquanto a cirurgia única tem vantagens visíveis, pode ser difícil alcançar a estabilidade primária do implante na região dos seios maxilares quando não existe uma altura óssea mínima (< 4 mm), lembrando que a região em questão apresenta características de osso tipo IV, ou seja, o tipo ósseo mais pobre do complexo maxilo-mandibular (Jodia et al., 2014). Portanto, em locais com quantidade insuficiente de osso residual (< 4 mm), a técnica cirúrgica em dois estágios (levantamento do seio e posterior instalação do implante) é recomendada (Bruggenkate, Bergh, 1998). Contudo, alguns estudos mostraram não haver relação entre a falha do implante e a altura óssea alveolar residual (Peleg et al., 1998; Geurs et al., 2001).

A evolução das técnicas cirúrgicas, bem como os avanços tecnológicos nas características da superfície do implante, desenho da rosca e equipamentos cirúrgicos, facilitaram para o clínico alcançar a estabilidade primária do implante. Adicionalmente, o desenvolvimento de substitutos ósseos para promover a regeneração e a osseointegração tornou o procedimento mais previsível e estendeu a aplicabilidade desta técnica de um único tempo cirúrgico (Joo et al., 2017).

Proposição

3 Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o tecido ósseo periimplantar formado após 7 e 40 dias do enxerto sinusal de coelhos com um biomaterial à base de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (HA + β -TCP), nas apresentações em grânulos e em pasta, concomitante à instalação de implantes.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar a estabilidade do biomaterial, bem como a integridade da membrana sinusal, por meio de tomografia computadorizada;
- Analisar os parâmetros morfométricos de volume ósseo e de contato osso-implante por meio de microtomografia computadorizada;
- Analisar morfolologicamente a resposta tecidual frente aos materiais testados por meio de análise histológica;
- Analisar as respostas de osteoindução, osteocondução, mineralização e atividade osteoclástica por meio de imunoistoquímica;
- Analisar a estabilidade dos implantes após 40 dias por meio da medição do torque de remoção.

Material e Métodos

4 Material e métodos

Este estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP - Processo FOA nº 506-2016, Anexo A).

4.1 Animais

Foram utilizados coelhos machos, da raça Nova Zelândia, com aproximadamente cinco meses de idade e peso variando entre 3 e 4 kg. Durante todo período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas identificadas no Biotério da FOA-UNESP, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo controlado de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e com o consumo de ração sólida e água *ad libitum*.

4.2 Delineamento experimental

Vinte e nove coelhos foram submetidos ao procedimento de enxerto do seio maxilar com um biomaterial composto por 60% de HA e 40% de β -TCP - Osteosynt® (EINCO Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) e concomitante instalação de implante. Do total de animais, vinte e quatro foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais de acordo com as apresentações do biomaterial empregado: grânulos (20 – 40 mesh) e pasta (100 – 200 mesh). Os implantes foram instalados aleatoriamente em um dos seios maxilares dos coelhos, sendo que o lado contralateral foi somente preenchido com o biomaterial aleatoriamente selecionado e avaliado em outra pesquisa. Nos outros 5 animais, ambos os seios maxilares foram preenchidos com os biomateriais (cada seio com uma das apresentações), sendo concomitantemente instalado um implante em cada seio.

4.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados e sedados por via intramuscular (IM) com cloridrato de cetamina 1% (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (5 mg/kg) (Francotar, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Jurubatuba, SP, Brasil). Posteriormente, foi realizada a tricotomia da maxila na região correspondente aos seios maxilares e a antissepsia executada com solução aquosa de polivinilpirrolidona 1%. Foi realizada anestesia local subcutânea com infiltração do anestésico mepivacaína 2% (0,3 mL/kg) e vasoconstritor epinefrina 1:100.000 com finalidade hemostática e analgésica no pós-operatório imediato.

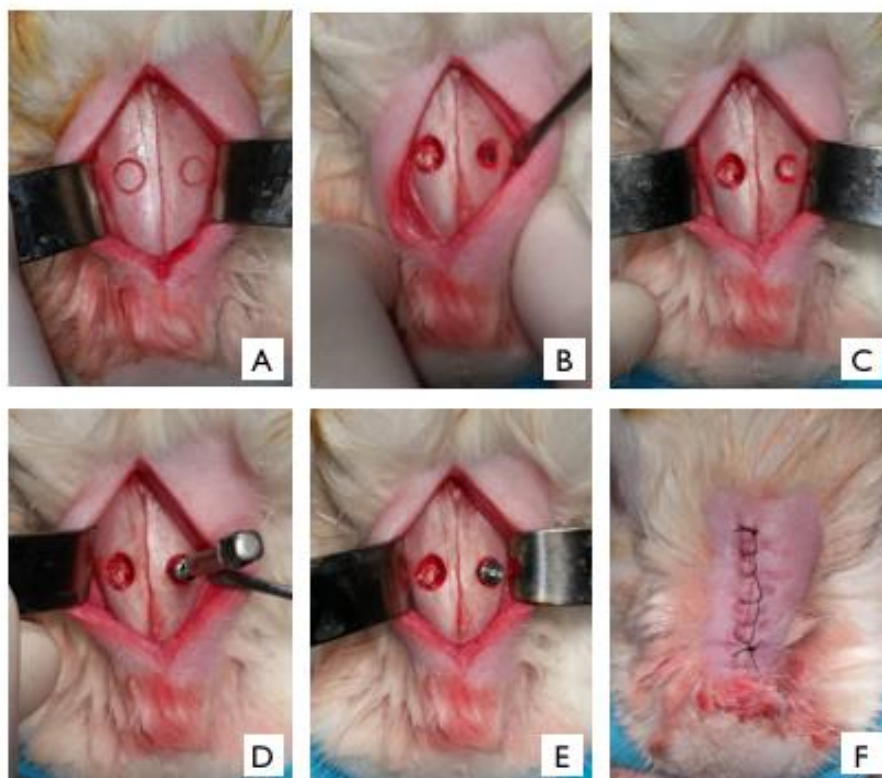
Com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15C (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy, Leimen, Alemanha), uma incisão linear de 5 cm foi feita na linha mediana do dorso nasal. A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Descolador Molt, Quinelato – 18 cm, nº 9, Rio Claro, SP, Brasil) para a exposição do osso nasal e da sutura nasoincisa. Após exposição, a cortical óssea superior da maxila dos animais foi inicialmente demarcada com broca trefina de 5 mm, aproximadamente a 2 cm anterior da sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente à linha média (Figura 2A), por meio de contra ângulo (Contra ângulo cirúrgico Koncept 20:1, Kavo® do Brasil, Joinville, SC, Brasil) com redução 20:1, conectado a um motor elétrico de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, SP, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação copiosa com soro fisiológico 0,9%. Em seguida, no interior da demarcação feita com a trefina, o osso foi delicadamente desgastado com broca diamantada de 2,9 mm de diâmetro por meio de peça angulada cirúrgica (Koncept 1:2, Kavo® do Brasil, Joinville, SC, Brasil) também conectada ao motor elétrico, até expor toda membrana sinusal. Esta foi descolada com o auxílio de curetas (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil), expondo o interior do seio (Figura 2B) para posterior colocação do biomaterial (Figura 2C). No grupo grânulos, foi utilizado um frasco de 2 g de HA + β -TCP, fracionado na quantidade de 0,2 g por seio. No grupo pasta, foi utilizada uma seringa contendo 2 g de HA + β -TCP, a qual foi fracionada igualmente na quantidade de 0,2 g por seio. A adaptação dos

grânulos no interior do seio maxilar se deu com o auxílio do descolador de Molt, enquanto que a adaptação da pasta foi realizada com a própria seringa. Em ambos os grupos, o biomaterial foi aplicado concomitantemente à instalação do implante.

Os implantes padrão comercial com hexágono externo de 3,6 mm de diâmetro por 6,5 mm de altura (ATRO 3606, Implalife Biotecnologia, Jales, SP, Brasil) foram instalados manualmente até o nível de sua plataforma protética com auxílio de chave bidigital (Implalife Biotecnologia, Jales, SP, Brasil) (Figuras 2D e 2E).

Os tecidos moles foram reposicionados, coaptados e suturados por planos com fio de nylon 5-0 (Figura 2F). Todos os animais foram medicados no pós-operatório imediato com dose única de pentabiótico, por via IM, de 1.200.000 unidades (0,1 mg/kg - Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e cloridrato de tramadol (0,10 mL/kg - Tramal, Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

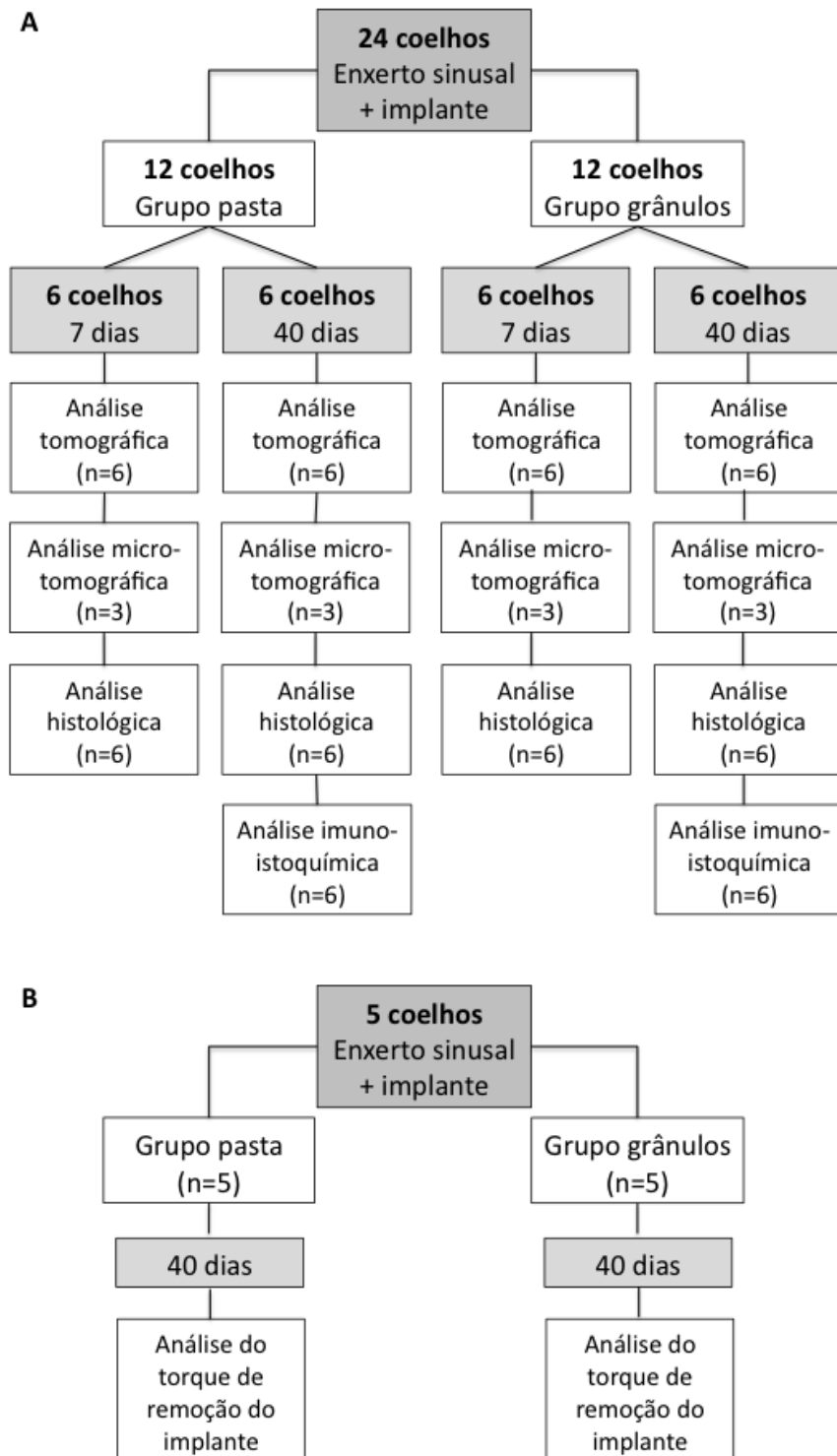
Figura 2: Sequência operatória do preenchimento sinusal com HA + β -TCP em grânulos ou pasta e colocação de implante na região do seio maxilar esquerdo de coelhos. A) Demarcação do osso vestibular maxilar realizado com broca trefina a 2 cm anterior da sutura nasofrontal e 1 cm lateralmente a linha média. B) Desgaste do osso com broca diamantada para descolamento da membrana sinusal e exposição do interior do seio maxilar. C) Biomaterial aplicado no interior do seio maxilar. D) Instalação do implante com auxílio de chave bidigital. E) Implante instalado até o nível de sua plataforma protética. F) Reposicionamento e sutura dos tecidos moles.



Seis coelhos do grupo grânulos e seis do grupo pasta foram submetidos à eutanásia após 7 dias da realização da cirurgia. Da mesma forma, seis coelhos do grupo grânulos e seis do grupo pasta foram submetidos à eutanásia após 40 dias (Figura 3A). Outros cinco coelhos foram submetidos à eutanásia aos 40 dias (Figura 3B). Para isto, os animais foram sedados, conforme descrito anteriormente, e eutanasiados por meio de injeção de pentobarbital sódico 200 mg/kg.

A figura 3 mostra a distribuição dos animais nos dois grupos experimentais e as análises laboratoriais realizadas após a eutanásia nos períodos de 7 e 40 dias.

Figura 3: Fluxogramas da distribuição dos animais nos grupos experimentais e respectivos procedimentos laboratoriais aos 7 e 40 dias pós-operatórios. A) Animais utilizados para as análises tomográfica, microtomográfica, histológica e imunoistoquímica. B) Animais utilizados para a análise do torque de remoção do implante.



4.4 Análise tomográfica

Imediatamente à eutanásia, o complexo naso-maxilar de todos os coelhos foi removido em bloco, preservando-se o periósteo, e armazenado em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) em frascos individuais e identificados durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram banhadas em água corrente por 24 horas e acondicionadas em álcool 70% para as análises tomográfica e microtomográfica.

Vinte e quatro peças (12 de cada grupo, nos dois períodos experimentais) foram escaneadas utilizando o tomógrafo cone beam i-CAT (i-CAT Digital Imaging, Hatfield, PA, EUA), e a análise tomográfica foi realizada com o auxílio do software Dolphin Imaging (Dolphin Imaging & Management Solutions, Chatsworth, CA, EUA). Em cortes coronais de 1 mm de espessura foram analisadas a estabilidade do biomaterial e do implante, bem como a integridade da membrana sinusal.

4.5 Análise microtomográfica

Três amostras representativas de cada grupo foram escaneadas por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica). O aparelho foi programado com os seguintes parâmetros: 90 kV de tensão e corrente de 111 μ A, filtro de alumínio 0,5 mm e cobre 0,038 mm, ângulo de rotação de 0,5, cortes de 0,6 μ m e resolução de aquisição de imagem de 2016 x 1344 pixels.

As maxilas foram posicionadas no porta-amostra do equipamento e fixadas com cera utilidade para sua estabilização. As imagens captadas foram armazenadas em formato TIFF e posteriormente reconstruídas a partir do ápice do implante, incluindo a região periimplantar, através do software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com as seguintes correções: atenuação de ruído do tipo Gaussiano de grau 5, artefato em anel de 7 pixels e endurecimento de feixe em 30%, proporcionando imagens ideais para análise.

Com o auxílio do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit), o conjunto sequencial das imagens foi emulado nos eixos X, Y e Z, sendo possível observar as imagens nas orientações coronal X-Z, sagital Z-Y e axial X-Y. Assim, as 3 imagens (coronal, sagital e axial) foram alinhadas em relação ao longo eixo e ao centro do implante, e o novo posicionamento foi utilizado para a análise por meio do software CT Analyser (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT, versão 1.12.4.0). Com este software, foram escolhidas as ferramentas para a construção dos parâmetros morfométricos de volume ósseo e de contato osso-implante.

A região para análise foi definida a partir dos limites do enxerto no plano coronal do seio maxilar do coelho e, no plano sagital, a partir da porção apical do implante desconsiderando sua parte cônica, ou seja, tendo início na porção cilíndrica e dirigindo-se para a porção coronal, até que fossem obtidos 100 cortes de 0,022 mm de espessura. Em seguida, a região de interesse (ROI) foi determinada de forma dinâmica na região anteriormente definida, percorrendo todas as imagens do intervalo selecionado dentro do limite dos 100 cortes.

O passo seguinte foi a interpolarização adaptativa dos polígonos e, na aba de seleção binária, foi determinado um valor máximo de 57% e mínimo de 16% para indexação da escala de cinza, definindo uma melhor nitidez das imagens no histograma. Desta forma, pôde-se concluir a pré-visualização da morfometria do volume a ser estudado e salvar as análises em formato de planilha para o software OpenOffice.org 1.1 (.csv).

Com finalidade ilustrativa, foi realizada a reconstrução e manipulação em três dimensões de todas as amostras por meio do software CTvox (SkyScan, Versão 2.7), permitindo a análise visual das reconstruções microtomográficas dos seios maxilares dos coelhos através de secções transversais, coronais e sagitais.

Por fim, foram analisados os seguintes parâmetros morfométricos: volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N), porosidade total [Po(tot)] e superfície de intersecção (iS) nos dois grupos (Bouxsein et al., 2010).

4.6 Análise histológica

Após as análises tomográfica e microtomográfica, as vinte e quatro peças foram descalcificadas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e hidróxido de sódio a 20%, trocada a cada 7 dias, por um período aproximado de 25 semanas. Em seguida, prosseguiu-se com a desidratação das peças pela passagem sucessiva em álcoois, diafanização com xilol e inclusão em parafina. Em cada bloco de parafina escavou-se cuidadosamente um acesso até expor totalmente o hexágono do implante. Uma chave bidigital previamente aquecida foi inserida no encaixe hexagonal de modo que o calor transferido por contato permitisse que o implante fosse desrosqueado e removido com o mínimo de danos ao tecido periimplantar. Por fim, os blocos foram novamente incluídos em parafina. Esses foram desgastados em micrótomo (RM2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH 2017, Nussloch, Alemanha) até a região de interesse para a obtenção de cortes seriados coronais de 6 µm de espessura, sendo uma lâmina utilizada para coloração de HE e quatro para imunoistoquímica. Para tanto, o material cortado foi distendido em banho-maria e colhido em lâminas, na qual foram levadas a uma estufa a 60°C, e após resfriarem, foi realizada uma sequência de banhos em alcoóis em diferentes concentrações para desparafinização.

As lâminas desparafinizadas foram imersas em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente para remover o excesso do corante. Após a remoção do excesso de água, os cortes foram imersos em eosina por cinco minutos, desidratados e clarificados, e as lâminas montadas. Os cortes corados por HE foram utilizados para a descrição morfológica da resposta tecidual frente aos materiais testados.

4.7 Análise imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório para estudo de tecidos mineralizados (LSMT) do Departamento de Ciências Básicas da FOA/UNESP apenas para as amostras correspondentes ao período experimental de 40 dias.

Foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase, e os cortes em parafina foram selecionados para a realização da imunomarcção contra as proteínas Fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Osteocalcina (OCN) e Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), com o intuito de avaliar, respectivamente, a atividade de diferenciação osteoblástica caracterizando a resposta de osteoindução, a proliferação vascular caracterizando a resposta de osteocondução, a etapa de mineralização do tecido ósseo e a atividade osteoclástica.

O processamento imunoistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos, seguidos banhos em citrisolv e banhos em concentrações decrescentes de álcoois) e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01 M). 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 anticorpos policlonais, produzidos em cabra, contra RUNX2 (SC8566), VEGF (SC1881), OCN (SC18319) e TRAP (SC 30832) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotinilado anti-cabra, produzido em burros (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, EUA). O sinal da reação foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC standard, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (Dako Laboratories, Santa Clara, CA, EUA). Ao término das reações imunoistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação e embebidas em xilol, e as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico (Nikon, Eclipse 80i, Shinagawa, Tóquio, Japão), com objetiva de 25X.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes escores de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de osseointegração. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas mostrando o escore representativo dos grupos e períodos experimentais analisados. O avaliador foi submetido ao teste Kappa, sendo obtido índice acima de 0,8, o que mostra que os escores observados foram consistentes. Os escores utilizados foram: 0 (ausência de marcação), 1 (marcação leve, onde até 25% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína estudada), 2 (marcação moderada, onde até 50% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína analisada) e 3 (marcação intensa, onde até 75% da área analisada apresentou marcação positiva para a proteína analisada).

4.8 Análise do torque de remoção dos implantes

Cinco amostras de cada grupo foram utilizadas para a aferição do torque de remoção dos implantes 40 dias após sua instalação. Para isto, os implantes foram removidos cuidadosamente por uma força anti-horária (torque de remoção ou contra-torque) com um torquímetro digital manual. O torque necessário para remover o implante do osso foi registrado em Newton centímetro (N.cm) e tabulado em uma planilha Excel.

4.9 Análise estatística

Os resultados referentes às análises tomográfica, histológica e imunoistoquímica foram apresentados descritivamente. Já aqueles referentes aos parâmetros microtomográficos e ao torque de remoção dos implantes foram analisados estatisticamente utilizando-se o software GraphPad Prism 7.04 (La Jolla, CA, EUA). A análise da homocedasticidade foi realizada através do teste de Shapiro Wilk para avaliar se os valores apresentavam distribuição normal. Em seguida, os dados microtomográficos foram comparados pela análise de variância e pós teste de Tukey, enquanto que os do torque de

remoção dos implantes pelo teste t pareado. Foi adotado nível de significância de 5%.

Resultados

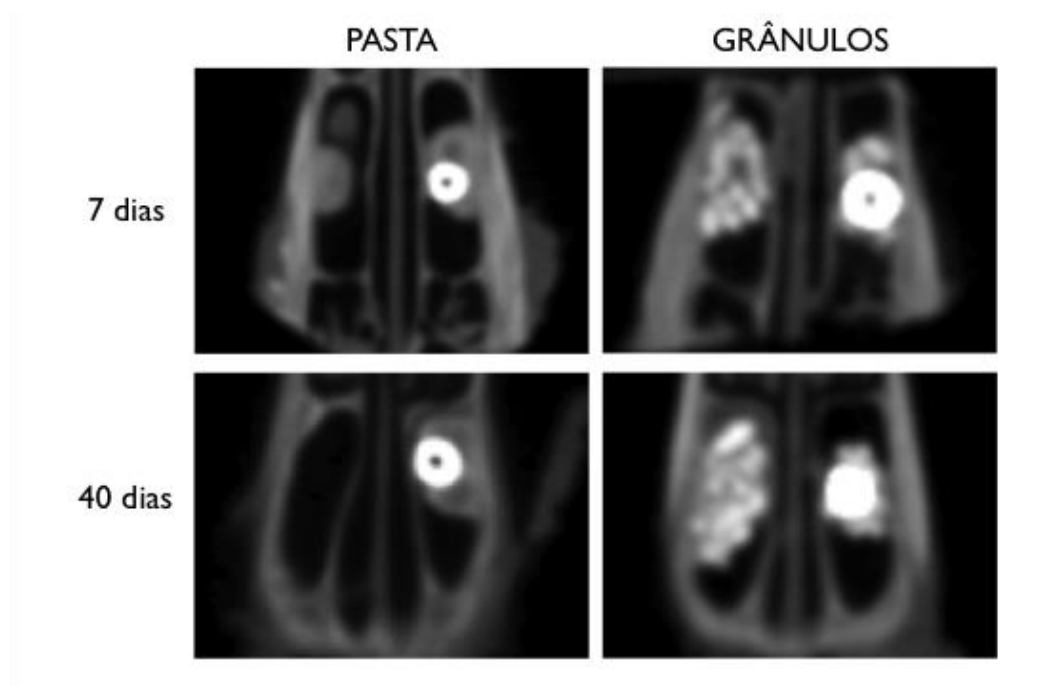
5 Resultados

O procedimento cirúrgico foi bem tolerado, e todos os coelhos se restabeleceram rapidamente. Nenhum cuidado intensivo ou alimentação forçada foi necessária, e nenhuma infecção clínica ocorreu.

5.1 Análise Tomográfica

Em todas as amostras estudadas, não houve rompimento ou espessamento da membrana sinusal dos coelhos após o procedimento cirúrgico. Consequentemente, os biomateriais enxertados ficaram contidos dentro dos seios maxilares, sem extravasamento para áreas adjacentes. Além disso, os implantes permaneceram estáveis aos 7 e 40 dias após sua instalação (Figura 4).

Figura 4: Imagens tomográficas (cortes axiais) de amostras dos grupos pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.



5.2 Análise Microtomográfica

As figuras 5 e 6 correspondem, respectivamente, aos cortes microtomográficos axiais e cortes sagitais (imagem polarizada) dos seios maxilares de coelhos preenchidos com o biomaterial nas apresentações em pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias. Aos 7 dias, os implantes estavam em contato com o osso cortical, enquanto que a maior parte do corpo do implante estava dentro do espaço do seio maxilar enxertado em ambos os grupos. Aos 40 dias, osso neoformado já ocupava o espaço do seio maxilar e envolvia o corpo do implante nos dois grupos.

Já os resultados dos parâmetros morfométricos quantificados por meio de microtomografia podem ser vistos na figura 7. O volume ósseo ($p=0,047$), porcentagem do volume ósseo ($p<0,0001$) e número de trabéculas ($p=0,0086$) foram significativamente superiores para o grupo pasta do que para o grupo grânulos aos 7 dias, enquanto que a porosidade foi maior para o grupo grânulos nesse mesmo período ($p=0,0126$). Aos 40 dias, não houve diferença significativa entre os grupos para a maioria dos parâmetros microtomográficos estudados, com exceção da porcentagem de tecido ósseo, que foi significativamente maior para o grupo pasta quando comparado com o grupo grânulos ($p=0,001$).

Considerando-se um mesmo grupo nos diferentes tempos experimentais, tanto a porcentagem de volume ósseo ($p<0,0001$) como o número de trabéculas ($p=0,0358$) foram significativamente maiores aos 40 dias do que aos 7 dias para o grupo grânulos.

Figura 5: Imagens microtomográficas (cortes axiais) de amostras dos grupos pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.

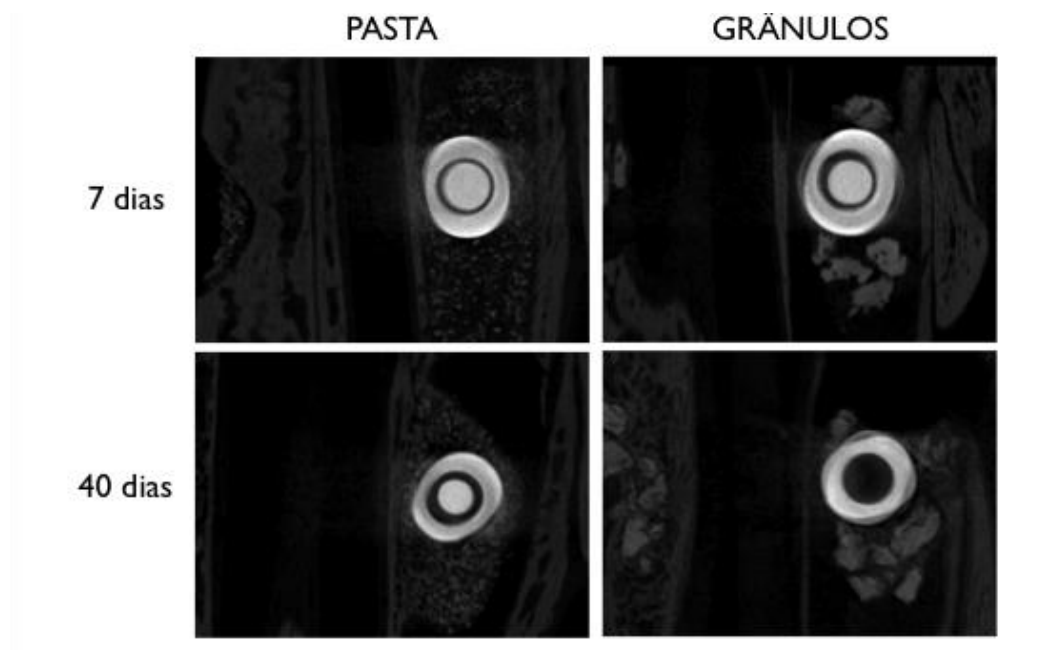


Figura 6: Imagens microtomográficas (cortes sagitais – imagens polarizadas) de amostras dos grupos pasta e grânulos nos períodos de 7 e 40 dias.

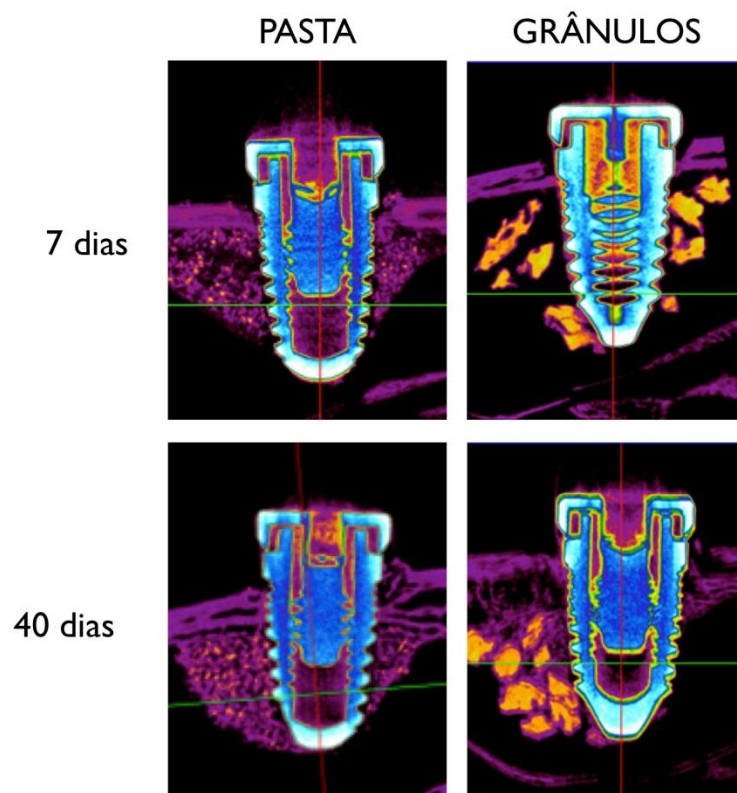
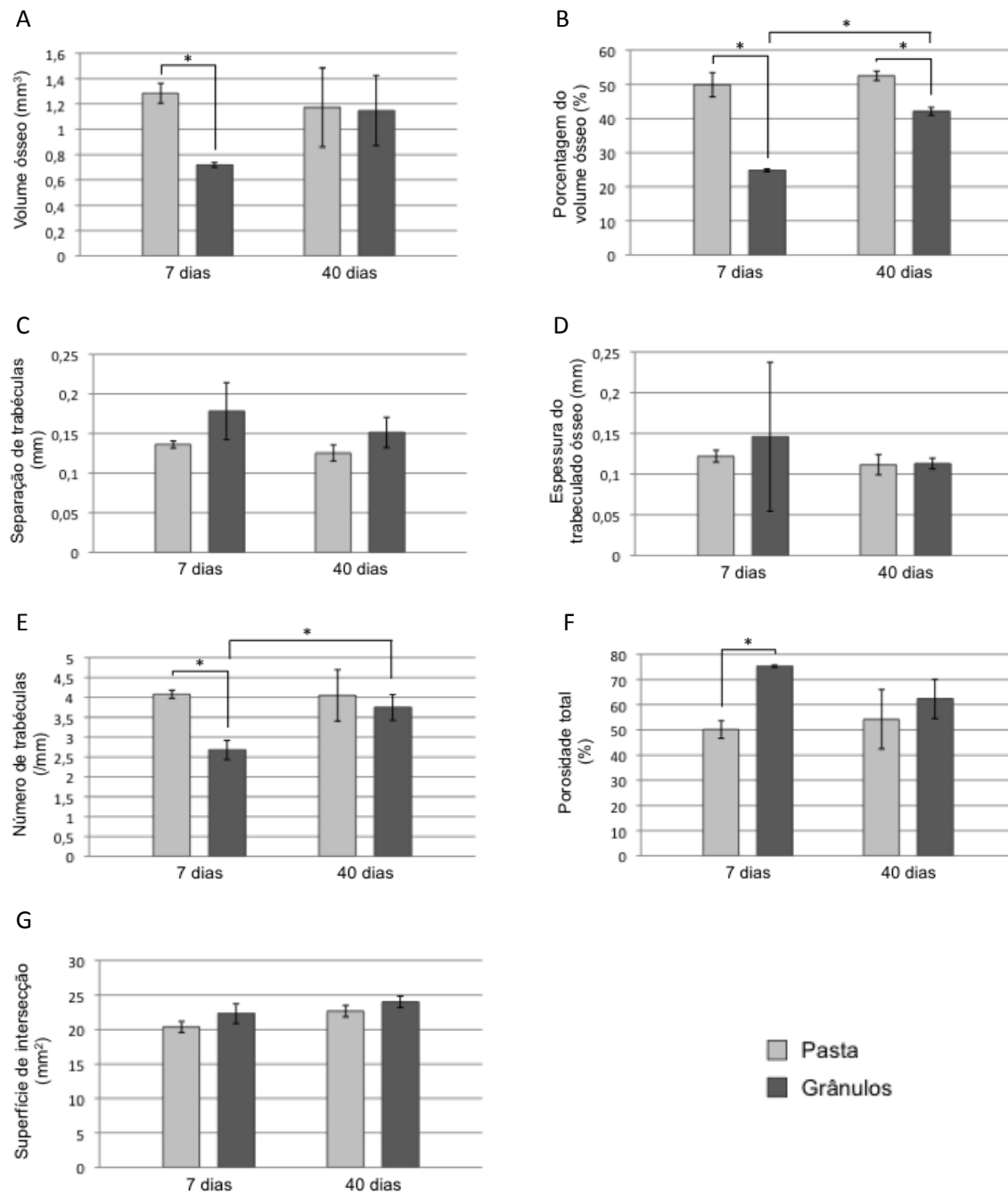


Figura 7: Parâmetros morfométricos quantificados por meio de microtomografia computadorizada nos grupos pasta e grânulos nos períodos experimentais de 7 e 40 dias. A) Volume ósseo (mm^3) obtido pela análise do parâmetro BV. B) Porcentagem do volume ósseo (%) obtida pela análise do parâmetro BV/TV. C) Espessura do trabeculado ósseo (mm) obtida pela análise do parâmetro Tb.Th. D) Número de trabéculas (/mm) obtido pela análise do parâmetro Tb.N. E) Separação de trabéculas (mm) obtida pela análise do parâmetro Tb.N. F) Porosidade total (%) obtida pela análise do parâmetro Po(tot). G) Superfície de intersecção (mm^2) obtida pela análise do parâmetro iS.

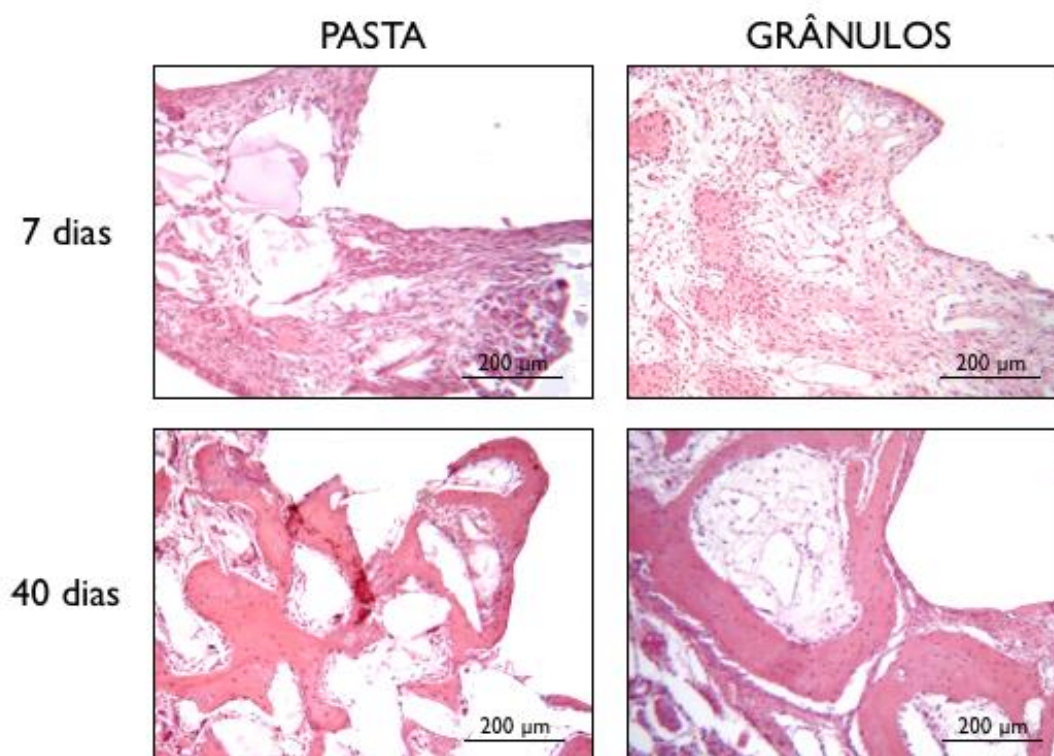


5.3 Análise Histológica

Aos 7 dias pós-operatórios, no grupo pasta, notou-se a presença de grânulos regulares e homogêneos e bastante formação de tecido conjuntivo, rico em células do infiltrado inflamatório. No grupo grânulos, foi observado um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e com algumas células gigantes (Figura 8).

Aos 40 dias, no grupo pasta, notou-se um padrão de granulometria residual homogêneo, sem sinais inflamatórios, finas trabéculas ósseas, boa organização celular e menor quantidade de vasos sanguíneos quando comparado a do grupo grânulos. Neste grupo, observou-se grande quantidade de grânulos remanescentes irregulares e um tecido ósseo bem formado, organizado e com trabéculas espessas (Figura 8).

Figura 8: Cortes histológicos corado por hematoxilina e eosina, representativos dos grupos grânulos e pasta, aos 7 e 40 dias.



5.4 Análise Imunoistoquímica

A Tabela 1 mostra os escores representativos das imunomarcações para o Fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a Osteocalcina (OCN) e a Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nos dois grupos estudados aos 40 dias.

Tabela 1: Escores representativos das imunomarcações para o Fator de transcrição relacionado a Runt-2 (RUNX2), o Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a Osteocalcina (OCN) e a Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) nos grupos grânulos e pasta aos 40 dias.

MARCADORES	PASTA (escores)	GRÂNULOS (escores)
RUNX2	2	2 e 3
VEGF	1 e 2	2
OCN	2 e 3	2
TRAP	1 e 2	2

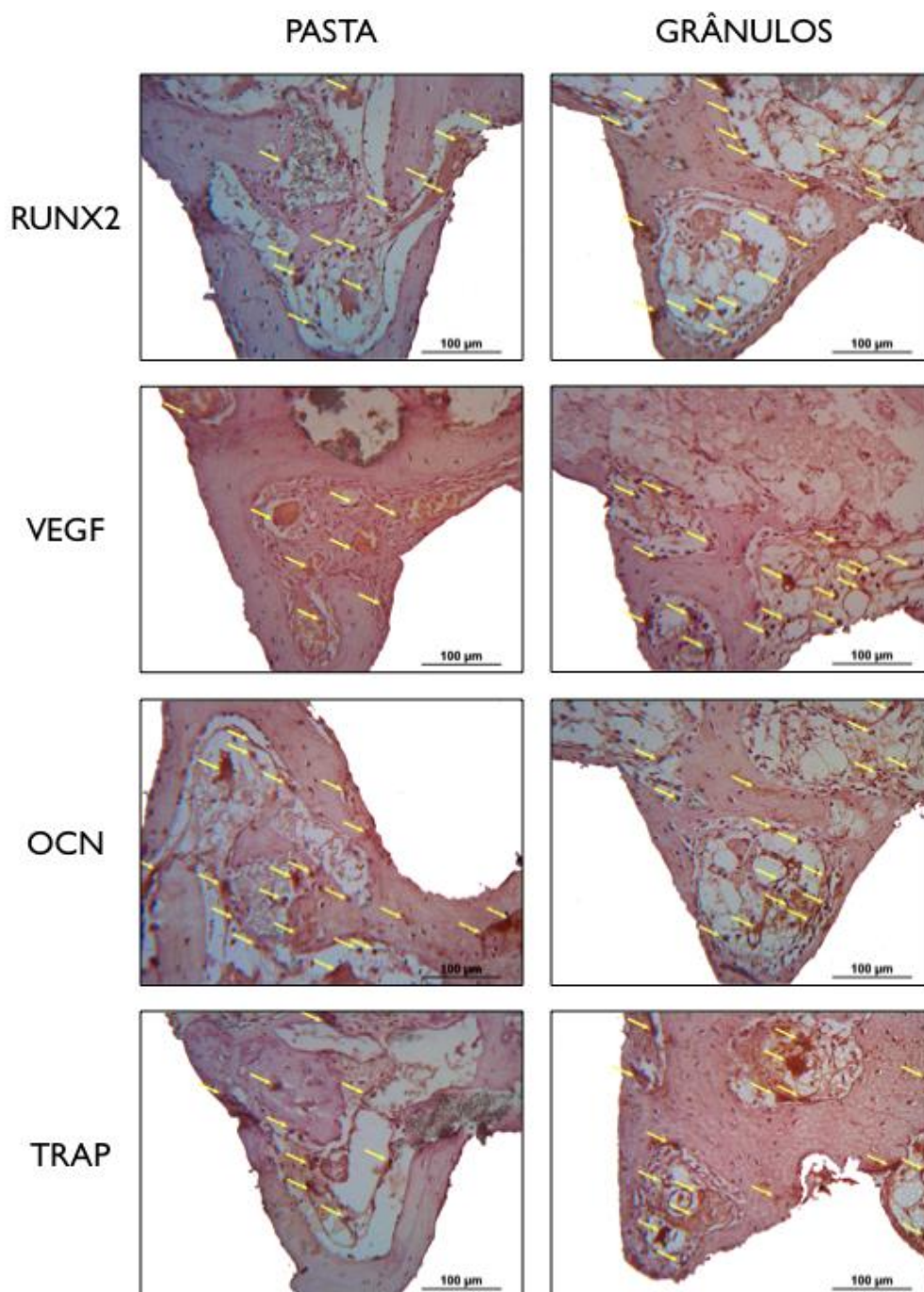
O fator de transcrição RUNX2 apresentou-se com marcação positiva em pré-osteoblastos e osteoblastos jovens, presentes junto às espiras dos implantes e também junto ao biomaterial estudado. Apresentou-se com marcação de moderada a intensa (escores 2 e 3) no grupo grânulos. Este mesmo fator, avaliado no grupo pasta mostrou-se com marcação moderada (escore 2). Destaca-se o tecido ósseo em atividade de remodelação óssea, característico em grande parte dos espécimes avaliados neste grupo (Figura 9).

O VEGF apresentou-se com marcação positiva para osteoblastos e células endoteliais. Importante destacar a marcação de vasos sanguíneos, especialmente no grupo grânulos, onde pode-se observar marcação moderada (escore 2) para este fator de crescimento. Já no grupo pasta, observou-se uma marcação de leve a moderada (escores 1 e 2) (Figura 9).

A OCN, evidenciadora da matriz extracelular mineralizada bem como dos osteoblastos numa etapa mais tardia de desenvolvimento, mostrou-se com marcação moderada (escore 2) no grupo grânulos e de moderada a intensa (escores 2 e 3) no grupo pasta (Figura 9).

A enzima marcadora da reabsorção óssea, TRAP, mostrou-se com marcação moderada (escore 2) para o grupo grânulos e de leve a moderada (escores 1 e 2) para o grupo pasta (Figura 9).

Figura 9: Fotomicrografias da região do seio maxilar de coelhos 40 dias após o preenchimento com HA + β -TCP, nas apresentações em pasta e grânulos, e concomitante instalação de implante, evidenciando as imunomarcações das proteínas RUNX2, VEGF, OCN e TRAP.



5.5 Análise de torque de remoção

Os valores médios ($\pm$ desvio padrão) do torque de remoção dos implantes após 40 dias da sua instalação foram $9,4 \pm 3,98$ N.cm para o grupo grânulos e $9,4 \pm 3,65$ N.cm para o grupo pasta, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A distribuição dos valores nos cinco animais de cada grupo podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos valores do torque de remoção do implante, em Newton centímetro, 40 dias após sua instalação em seios maxilares de coelhos preenchidos com hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato (HA + β -TCP), nas apresentações em grânulos e pasta.

PASTA	GRÂNULOS
(N.cm)	(N.cm)
14	16
9	10
9	6
4	7
11	8

Discussão

6 Discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou o tecido ósseo periimplantar após o preenchimento sinusal com as apresentações pasta e grânulos de um biomaterial composto por HA e β -TCP (nas proporções de 60% e 40%, respectivamente) concomitante à instalação de implantes em coelhos. Tal estudo se deu através das seguintes análises: tomográfica, microtomográfica, histológica, imunoistoquímica e de torque de remoção de implante.

A complicação transoperatória mais comum durante o procedimento de levantamento sinusal em humanos é a perfuração da membrana de Schneider, com uma ocorrência média de 19,5% (variando de 5 a 56%) (Cha et al., 2014). Alguns autores relataram uma associação entre perfuração da membrana com um aumento da taxa de falha dos implantes (Testori et al., 2008), enquanto que outros demonstraram que perfurações reparadas adequadamente não têm efeito na sobrevivência dos implantes (Ardekian et al., 2006).

A tomografia computadorizada é um método não invasivo de monitoramento da progressão, resolução ou variações anatômicas associadas com sinusite paranasal, pois proporciona imagens adequadas para reconhecimento de alterações sinusais, com menor tempo de tomada e menor custo quando comparada à ressonância magnética (Kerschner et al., 2000; Ozcan et al., 2011). No presente estudo, durante a avaliação das imagens tomográficas, nenhum animal apresentou perfuração da membrana de Schneider, espessamento da membrana e nem velamento do seio decorrente da presença de secreções (muco) no interior dos seios maxilares, indicando ausência de processos inflamatórios e/ou infecciosos. Além disso, observou-se que os implantes foram corretamente posicionados, apresentaram comprimento e diâmetro compatíveis com o tamanho do seio maxilar e foram travados na cortical óssea superior. Tais fatores, associados à quantidade correta do biomaterial, favoreceram a manutenção da integridade da membrana e da estabilidade dos implantes.

A fim de se avaliar alterações volumétricas e da microarquitetura do osso neoformado e do enxerto ósseo ao longo do tempo, utilizou-se a microtomografia computadorizada (Kühl et al., 2010; Kühl et al., 2013). A

microtomografia computadorizada para análise tridimensional da estrutura óssea *in vitro* foi primeiramente introduzida por Feldkamp et al. (1989). A principal vantagem desta técnica está na possibilidade de análise não destrutiva e com alta resolução de materiais porosos, deixando as amostras intactas para análises posteriores, em contraposição às análises histológicas, que requerem o corte das amostras e avaliações bidimensionais. Com seu amplo campo de visão, a microtomografia permite escanear toda a região de interesse na amostra (Lambert et al., 2013). Contudo, devido à grande exposição à radiação, o uso desta técnica tem sido limitado atualmente para a avaliação de tecidos mineralizados *post mortem* ou em estudos *in vivo* com animais de pequeno porte.

Neste estudo, a formação de novo osso pareceu começar do osso cortical superior do seio e progredir em direção ao centro no sentido apical, corroborando resultados de outros pesquisadores (Joo et al., 2017). Analisando os parâmetros morfométricos para cada grupo separadamente, observou-se um aumento significativo da porcentagem do volume ósseo e do número de trabéculas dos 7 aos 40 dias no grupo grânulos. Já no grupo pasta, o volume ósseo, a porcentagem de volume ósseo e o número de trabéculas aos 7 dias foram muito semelhantes aos valores obtidos aos 40 dias e significativamente maiores aos observados no grupo grânulos naquele período. Tal resultado aparentemente contraditório indica a ocorrência de falha na determinação desses parâmetros, principalmente no período inicial após o enxerto com o biomaterial na apresentação em pasta. Uma possível razão para a incapacidade de estimar a formação de novo osso neste grupo parece ser devido à radiodensidade similar entre o novo osso e o enxerto, ambos compostos predominantemente por HA e com maior compactação de partículas na apresentação em pasta em comparação àquela em grânulos.

Essa dificuldade em se delimitar cada tecido (enxerto residual e novo osso) após o preenchimento sinusal também foi relatada por Trisi et al. (2006). Em seu estudo, três pacientes receberam enxerto sinusal com vidro bioativo (Biogran®) misturado ao osso autógeno. Biópsia dos tecidos após vários períodos de cicatrização foram analisadas histomorfometricamente e por microtomografia computadorizada. Os autores observaram uma radiodensidade similar entre o osso e o enxerto, o que comprometeu a

separação entre os dois tecidos. O processo fundamental de delimitação de tecidos é ser capaz de extrair uma área ou tecido particular baseado em sua diferença na escala de cinza ou na intensidade de pixels em relação a outras áreas vizinhas. A presença de osso e substitutos ósseos compartilhando a mesma radiodensidade, isto é, a mesma escala de cinza, compromete o processo de delimitação dos tecidos (Trisi et al., 2006).

Para superar tal deficiência, a análise histológica foi fundamental. Aliás, a análise histológica continua sendo o padrão ouro para avaliar a consolidação do enxerto, pois permite visualizar enxerto residual, novo osso e tecido conjuntivo do seio enxertado. Além disso, é possível determinar o tipo de osso formado (primário ou lamelar). A grande desvantagem é que esta técnica não é clinicamente útil, uma vez requer biópsia.

No presente estudo, observou-se formação de tecido conjuntivo, rico em células do infiltrado inflamatório no grupo pasta aos 7 dias, enquanto que no grupo grânulos, um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e com algumas células gigantes. Aos 40 dias, o tecido reparacional mostrou-se mais organizado no grupo grânulos do que no grupo pasta, evidenciado pela presença de um tecido ósseo maduro e com trabéculas espessas, o que confere uma estrutura mais estável.

Tais características são compatíveis com os eventos celulares que ocorrem durante a cicatrização do enxerto, podendo variar conforme o material enxertado. De modo geral, a cicatrização em locais com material de enxerto ocorre via um complexo processo de hemorragia/coagulação, inflamação, angiogênese, diferenciação de células mesenquimais e deposição óssea (remodelamento ósseo). Após o preenchimento do seio maxilar com material de enxerto (osso ou substituto ósseo), um coágulo sanguíneo irá se formar. Isso é seguido por inflamação com a migração de células imunes e fibroblastos para formar uma matriz extracelular e novos vasos sanguíneos (angiogênese). Através desses vasos neoformados, células mesenquimais migram e se diferenciam em osteoblastos e osteoclastos. Estas células irão iniciar a deposição de osso e a reabsorção do enxerto (remodelação óssea). Inicialmente, osso primário (não lamelar) é formado, o qual será remodelado em osso lamelar, que é estruturalmente mais organizado. No grupo grânulos, era evidente a presença de grande quantidade de grânulos remanescentes

envoltos por osso neoformado, semelhante aos resultados de Caneva et al. (2017).

A taxa de incorporação do enxerto depende da porosidade do material, sendo que quanto maior a macro e microporosidade, maior a angiogênese, levando a uma mais rápida incorporação do enxerto (Aukhil, 2000; Dimitriou et al., 2005). Desta forma, a composição de BCP, bem como sua apresentação, pode ser usada para controlar o tipo de resposta inflamatória, tendo a capacidade de influenciar o curso da resposta de cicatrização da ferida (Rh Owen et al., 2018).

Vale ressaltar que nos dois grupos, foi possível observar grande quantidade de material residual aos 40 dias. Para avaliar o curso da indução óssea e possivelmente a transformação total do material, nas duas apresentações, em osso, seriam necessários estudos com períodos mais longos de acompanhamento. Schwarz et al. (2007) observaram reabsorção de grânulos de BCP, na proporção de 60% de HA e 40% de β -TCP, após 9 semanas em um estudo envolvendo regeneração óssea guiada em defeitos do tipo deiscência em cães.

Em relação à análise imunoistoquímica, a detecção das proteínas RUNX2, VEGF, OCN e TRAP nos dois grupos estudados mostrou que as duas apresentações do biomaterial estimularam a diferenciação osteoblástica (RUNX2), a osteocondução (VEGF), a mineralização (OCN) e a atividade osteoclástica (TRAP). Entretanto, a apresentação em grânulos estimulou respostas teciduais superiores, com evidentes renovação celular (evidenciada pela marcação de RUNX2) e osteocondução e moderadas mineralização (o que é aceito para o período de 40 dias) e atividade de reabsorção do material (evidenciada pela marcação de TRAP). Já no grupo pasta, observou-se muita atividade de remodelação óssea no tecido (diferente do grupo grânulos, onde o tecido estava mais organizado), sugerindo que a resposta tecidual estava cronologicamente um pouco atrasada em relação ao grupo grânulos. Neste grupo, houve também uma renovação celular marcante, pois há marcação positiva para RUNX2, sem, no entanto, uma resposta de osteocondução tão evidente como no grupo grânulos. Embora a mineralização tenha se apresentado num grau maior, isso ocorreu em apenas uma amostra, sendo que

nas demais a marcação foi moderada. Finalmente, a TRAP mostrou-se menos presente do que no grupo grânulos.

Considerando-se as análises mencionadas anteriormente, apesar das diferenças sutis entre a resposta tecidual das duas apresentações do biomaterial aos 7 dias, de modo geral, verificaram-se resultados bastante semelhantes aos 40 dias, o que foi corroborado pelos valores similares do torque de remoção do implante nos dois grupos. O torque de remoção de implantes é considerado um método objetivo para avaliação da osseointegração, sendo que os valores obtidos neste teste representam o travamento mecânico entre o implante e os ossos circundantes (Rittel et al., no prelo). Como este é o primeiro estudo em que foi avaliado o torque de remoção de implante do seio maxilar de coelhos, tornam-se difíceis as comparações com outros estudos, nos quais o implante havia sido instalado na tíbia ou no fêmur daquele animal (Klokkevold et al., 2001; Chacon et al., 2006; Lownie et al., 2008; Sirisa-Ard et al., 2015; Park et al., 2016; Ribeiro et al., 2018). Deste modo, verifica-se que os resultados a longo prazo são favoráveis tanto em relação à quantidade como à qualidade de osso neoformado junto aos implantes instalados concomitantemente ao preenchimento sinusal com o biomaterial à base de BCP nas duas apresentações.

Além da avaliação das respostas biológicas estimuladas pelas duas apresentações do biomaterial testado, as propriedades de manuseio também são decisivas durante a escolha do material para aplicação clínica. Neste trabalho, observaram-se diferenças relevantes em relação a tais propriedades durante a etapa cirúrgica entre os dois grupos estudados. A apresentação da HA + β -TCP em grânulos ofereceu certa resistência durante a sua colocação em áreas pequenas, dificultando seu manuseio, enquanto que a apresentação em pasta pôde ser facilmente injetada, mesmo em locais de difícil acesso, tornando o procedimento cirúrgico mais rápido. Isto é de grande relevância, especialmente quando há necessidade de enxerto em locais desafiadores, como defeitos periodontais, em que o material precisa ser aplicado em localização anatômica exata e o espaço tecidual precisa ser suportado pelo material de preenchimento (Trbakovic et al., 2018).

O tamanho das partículas bem como o espaço entre elas nas diferentes apresentações podem também ser fatores importantes para o resultado do

procedimento. Partículas menores podem ser reabsorvidas mais rapidamente e, portanto, têm uma vida útil menor como um mantenedor de espaço (Trbakovic et al., 2018). Para a elevação do seio maxilar concomitante à instalação de implante, a reabsorção progressiva poderia colocar em risco a estabilidade do implante (Kim et al, 2012). Além disso, na composição em pasta, as partículas apresentam-se compactadas, o que dificulta a angiogênese. Sendo assim, tal apresentação é indicada preferencialmente para o preenchimento de defeitos ósseos exclusivamente. Já na apresentação em grânulos, as partículas maiores propiciam a permeabilidade do coágulo em toda a região do enxerto, ou seja, cria-se uma condição favorável não apenas para a angiogênese, mas também para a osteoindução e para a osteocondução. Tais fatores, responsáveis pela primeira fase de osseointegração (3 a 4 meses), tornam o sítio enxertado apto a receber implantes osseointegráveis em casos de procedimentos cirúrgicos em duas etapas (preenchimento sinusal e posterior instalação de implantes).

Outro fator importante a ser considerado refere-se à quantidade de material necessária para o preenchimento de cavidades amplas, como seios maxilares e alvéolos pós-extração dentária (Trbakovic et al., 2018). Assim, é possível colocar menor quantidade do biomaterial em grânulos para resultar num mesmo volume do que o da apresentação em pasta, interferindo diretamente no custo do procedimento.

Conclusão

7 Conclusão

As apresentações em grânulos e pasta da HA + β -TCP mostraram resultados favoráveis à osseointegração a longo prazo, com formação de tecido ósseo em quantidade e qualidade semelhantes junto aos implantes.

A partir dos resultados de cada uma das análises realizadas neste estudo, conclui-se que:

- Ambas as apresentações garantiram a estabilidade do biomaterial, a integridade da membrana sinusal e ausência de processos inflamatórios/infecciosos;
- Ambas as apresentações favoreceram a formação de novo osso a partir da cortical óssea superior do seio maxilar, progredindo em direção ao centro no sentido apical. Em virtude das características de radiodensidade de cada formulação, o grupo grânulos foi o que propiciou uma melhor visualização da progressão de neoformação óssea ao longo do tempo;
- Ambas as apresentações mostraram resultados histológicos compatíveis com os eventos celulares que ocorrem durante a neoformação óssea;
- Ambas as apresentações induziram a ativação de proteínas importantes para o reparo, sendo que a apresentação em grânulos demonstrou potencial osteocondutor superior, evidenciado pela maior imunomarcação de VEGF;
- A estabilidade dos implantes foi semelhante nos dois grupos.

Referências

Referências

1. ANNAZ, B.; HING, K. A.; KAYSER, M.; BUCKLAND, T.; DI SILVIO, L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. **J. Microsc.**, v. 215, n. 1, p. 100-110, Jul. 2004.
2. ARAÚJO, M. G.; LILJENBERG, B.; LINDHE, J. beta-Tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 21, n. 4, p. 445-454, Apr. 2010.
3. ARDEKIAN, L.; OVIED-PELEG, E.; MACTEI, E. E.; PELED, M. The clinical significance of sinus membrane perforation during augmentation of the maxillary sinus. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 64, n. 2, p. 277-282, Feb. 2006.
4. ARTESE, L.; PIATTELLI, A.; DI STEFANO, D. A.; PICCIRILLI, M.; PAGNUTTI, S.; D'ALIMONTE, E.; PERROTTI, V. Sinus lift with autologous bone alone or in addition to equine bone: an immunohistochemical study in man. **Implant Dent.**, v. 20, n. 5, p. 383-388, Oct. 2011.
5. ASAI, S.; SHIMIZU, Y.; OOYA, K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 13, n. 4, p. 405-409; Aug. 2002.
6. AUKHIL, I. Biology of wound healing. **Periodontol.** 2000, v. 22, p. 44-55, Feb. 2000.
7. BETTACH, R.; GUILLAUME, B.; TASCHIERI, S.; DEL FABBRO, M. Clinical performance of a highly porous beta-TCP as the grafting material for maxillary sinus augmentation. **Implant. Dent.**, v. 23, n. 3, p.357-364, Jun. 2014.
8. BOULER, J. M.; PILET, P.; GAUTHIER, O.; VERRON, E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. **Acta Biomater.**, v. 53, p. 1-12, Apr. 2017.
9. BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, Jul. 2010.
10. BRUGGENKATE C. M.; BERGH, J. P. Maxillary sinus floor elevation: a valuable pre-prosthetic procedure. **Periodontol.** 2000., v. 17, p. 176-82, Jun.1998.

11. BUSER, D.; HOFFMANN, B.; BERNARD, J. P.; LUSSI, A.; METTLER, D.; SCHENK, R. K. Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 9, n. 3, p. 137-150, Jun. 1998.
12. CANEVA M., LANG N.P., GARCIA RANGEL I.J., FERREIRA S., DE SANTIS E., BOTTICELLI D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingistat® collagen sponge: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res.** v. 28, n. 7, p 21-30, Jul. 2017.
13. CHA, H. S.; KIM, A.; NOWZARI, H.; CHANG, H. S.; AHN, K. M. Simultaneous sinus lift and implant installation: prospective study of consecutive two hundred seventeen sinus lift and four hundrede sixty two implants. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, v. 16, n. 3, p. 337-347, Jun. 2014.
14. CHACON, G. E.; STINE, E. A.; LARSEN, P. E.; BECK, F. M.; MCGLUMPHY, E. A. Effect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 64, n. 7, p. 1005-1009, Jul. 2006.
15. CHAVES, M. D.; DE SOUZA NUNES, L. S.; DE OLIVEIRA, R.V.; HOLGADO, L. A.; FILHO, H. N.; MATSUMOTO, M. A.; RIBEIRO, D. A. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 40, n. 8, p. e315-320, Dec. 2012.
16. CRICCHIO, G.; PALMA, V. C.; FARIA, P. E.; DE OLIVERA, J. A.; LUNDGREN, S.; SENNERBY, L.; SALATA, L. A. Histological outcomes on the development of new space-making devices for maxillary sinus floor augmentation. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 13, n. 3, p. 224-230, Sep. 2011.
17. DACULSI, G.; LEGEROS, R. Z.; NERY, E.; LYNCH, K.; KEREBEL, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 23, n. 8, p. 883-394, Aug. 1989.
18. DEL FABRO, M.; TESTORI, T.; RANCETTI, L.; WEINSTEIN, R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 24, n. 6; p. 565-577, Dec. 2004.
19. DE SANTIS, E.; LANG, N. P.; FERREIRA, S.; RANGEL GARCIA, I. JR.; CANEVA, M.; BOTTICELLI, D. Healing at implants installed concurrently to

maxillary sinus floor elevation with Bio-Oss® or autologous bone grafts. A histo-morphometric study in rabbits. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 28, n. 5, p. 503-511, May 2017.

20. DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, Dec. 2005.
21. ELLEGAARD, B.; BÆLUM, V.; KOLSEN-PETERSEN, J. Non-grafted sinus implants in periodontally compromised patients: a time-to-event analysis. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 17, n. 2, p. 156-164, Apr. 2006.
22. ELLEGAARD, B.; KOLSEN-PETERSEN, J.; BÆLUM, V. Implant therapy involving maxillary sinus lift in periodontally compromised patients. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 8, n. 4, p. 305-315, Aug. 1997.
23. ELLINGER, R. F.; NERY, E. B.; LYNCH, K. L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 6, n. 3, p. 22-33, 1986.
24. ESPOSITO, M.; FELICE, P.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 5, p. CD008397, May 2014.
25. FELDKAMP, L. A.; GOLDSTEIN, S. A.; PARFITT, A. M.; JESION, G.; KLEEREKOPER, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, v. 4, n. 1, p. 3-11, Feb. 1989.
26. GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M. J.; BLUNN, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112-121, Dec. 2015.
27. GAUTHIER, O.; BOULER, J. M.; WEISS, P.; BOSCO, J.; AGUADO, E.; DACULSI, G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. **Bone**, v. 25, n. 2, p. 71S-74S, Aug. 1999.
28. GEURS, N. C.; WANG, I. C.; SHULMAN, L. B.; JEFFCOAT, M. K. Retrospective radiographic analysis of sinus graft and implant placement procedures from the Academy of Osseointegration Consensus Conference

- on Sinus Grafts. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 21, n. 5, p. 517-523, Oct. 2001.
29. JODIA, K.; SADHWANI, B. S.; PARMAR, B. S.; ANCHLIA, S.; SADHWANI, S. B. Sinus elevation with an alloplastic material and simultaneous implant placement: a 1-stage procedure in severely atrophic maxillae. **J. Maxillofac. Oral Surg.**, v. 13, n. 3, p. 271-280, Sep. 2014.
 30. JOHN, H. D.; WENZ, B. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 19, n. 2, p. 199-207, Mar.-Apr. 2004.
 31. JOO, M. J.; CHA, J. K.; LIM, H. C.; CHOI, S. H.; JUNG, U. W. Sinus augmentation using rhBMP-2-loaded synthetic bone substitute with simultaneous implant placement in rabbits. **J. Periodontal Implant Sci.**, v. 47, n. 2, p. 86-95, Apr. 2017.
 32. KERSCHNER, J. E.; CRUZ, M. J.; BESTE, D. J.; DONAHUE, K. M.; KEHL, S. K. Computed tomography vs. magnetic resonance imaging of acute bacterial sinusitis: a rabbit model. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 21, n. 5, p. 298-305, Sep.-Oct. 2000.
 33. KIM, Y. S.; KIM, S. H.; KIM, K. H.; JHIN, M. J.; KIM, W. K.; LEE, Y. K.; SEOL, Y. J.; LEE, Y. M. Rabbit maxillary sinus augmentation model with simultaneous implant placement: differential responses to the graft materials. **J. Periodontal Implant Sci.**, v. 42, n. 6, p. 204-211, Dec. 2012.
 34. KLOKKEVOLD, P. R.; JOHNSON, P.; DADGOSTARI, S.; CAPUTO, A.; DAVIES, J. E.; NISHIMURA, R. D. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 12, n. 4, p. 350-357.
 35. KOLERMAN, R.; GOSHEN, G.; JOSEPH, N.; KOZLOVSKY, A.; SHETTY, S.; TAL, H. Histomorphometric analysis of maxillary sinus augmentation using an alloplast bone substitute. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 70, n. 8, p. 1835-1843, Aug. 2012.
 36. KÜHL, S.; BROCHHAUSEN, C.; GÖTZ, H.; FILIPPI, A.; PAYER, M.; D'HOEDT, B.; KREISLER, M. The influence of bone substitute materials on the bone volume after maxillary sinus augmentation: a microcomputerized tomography study. **Clin. Oral Investig.**, v. 17, n. 2, p. 543-551, Mar. 2013.
 37. KÜHL, S.; GÖTZ, H.; HANSEN, T.; KREISLER, M.; BEHNEKE, A.; HEIL, U.; DUSCHNER, H.; D'HOEDT, B. Three-dimensional analysis of bone

formation after maxillary sinus augmentation by means of microcomputed tomography: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 25, n. 5, p. 930-938, Sep.-Oct. 2010.

38. LAMBERT F, LECLOUX G, LÉONARD A, SOURICE S, LAYROLLE P, ROMPEN E. Bone regeneration using porous titanium particles versus bovine hydroxyapatite: a sinus lift study in rabbits. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 15, n. 3, p. 412-426, Jun. 2013.
39. LOWNIE, J. F.; BETTS, P. A.; BRYANT, R. S.; CLEATON-JONES, P. Torque removal force for osseointegrated implants--two experimental studies. **S. Afr. J. Surg.**, v. 46, n. 1, p. 18-20, Feb. 2008.
40. LUNDGREN, S.; ANDERSSON, S.; GUALINI, F.; SENNERBY, L. Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 6, n. 3, p. 165-173, 2004.
41. MAPARA, M.; THOMAS, B. S.; BHAT, K. M. Rabbit as an animal model for experimental research. **Dent. Res. J.**, v. 9, n. 1, p. 111-118, Jan. 2012.
42. MIRON, R. J.; ZHANG, Q.; SCULEAN, A.; BUSER, D.; PIPPENGER, B. E.; DARD, M.; SHIRAKATA, Y.; CHANDAD, F.; ZHANG, Y. Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. **Clin. Oral Investig.**, v., 20, n. 8, p. 2259-2265, Nov. 2016.
43. MOON, Y. S.; SOHN, D. S.; MOON, J. W.; LEE, J. H.; PARK, I. S.; LEE, J. K. Comparative histomorphometric analysis of maxillary sinus augmentation with absorbable collagen membrane and osteoinductive replaceable bony window in rabbits. **Implant Dent.**, v. 23, n. 1, p. 29-36, Feb. 2014.
44. MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ J. Surg.**, v. 71, n. 6, p. 354-361, Jun. 2001.
45. NKENKE, E.; STELZLE, F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 20, n. 4, p. 124-133, Sep. 2009.
46. RH OWEN, G. R.; DARD, M.; LARJAVA, H. J Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. **Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 106, n. 6, p. 2493-2512, Aug. 2018.

47. OZCAN, K. M.; OZCAN, I.; SELCUK, A.; AKDOGAN, O.; GURGEN, S. G.; DEREN, T.; KOPARAL, S.; OZOGUL, C.; DERE, H. Comparison of histopathological and CT findings in experimental rabbit sinusitis. **Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 63, n. 1; p. 56-59, Jan. 2011.
48. PARK, S. H.; PARK, K. S.; CHO, S. A. Comparison of removal torques of SLActive® implant and blasted, laser-treated titanium implant in rabbit tibia bone healed with concentrated growth factor application. **J. Adv. Prosthodont.**, v. 8, n. 2, p. 110-115, Apr. 2016.
49. PEARCE, A. I.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **Eur. Cell. Mater.**, v. 13, p. 1-10, Mar. 2007.
50. PELEG, M.; MAZOR, Z.; CHAUSHU, G.; GARG, A. K. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the severely atrophic maxilla. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 12, p. 1397-1403, Dec. 1998.
51. PENG, W.; KIM, I. K.; CHO, H. Y.; PAE, S. P.; JUNG, B. S.; CHO, H. W.; SEO, J. H. Assessment of the autogenous bone graft for sinus elevation. **J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 39, n. 6, p. 274-282, Dec. 2013.
52. PJETURSSON, B.; TAN, W. C.; ZWALHEN, M.; LANG, N. P. A systematic review of the succes of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. Part I: lateral approach. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, n. 8, p. 216-240, Sep. 2008.
53. RAMOS-MURGUIALDAY, M.; CAUBET, J.; RAMIS, J. M.; MONJO, M. Evaluation of the ideal implant insertion time in human bone biopsies after sinus elevation using a combination of autologous bone and graft substitute. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 30, n. 4, p. 891-899, Jul.-Aug. 2015.
54. REDDY, S.; WASNIK, S.; GUHA, A.; KUMAR, J. M.; SINHA, A.; SINGH, S. Evaluation of nano-biphasic calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering applications: in vitro and preliminary in vivo studies. **J. Biomater. Appl.**, v. 27, n. 5, p. 565-575, Jan. 2013.
55. RIBEIRO, M.; FRAGUAS, E. H. BRITO, K. I. C., KIM, Y. J.; PALLOS, D.; SENDYK, W. R. Bone autografts & allografts placed simultaneously with dental implants in rabbits. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 46, n. 1, p.142-147, Jan. 2018.

56. RICKERT, D.; SLATER, J. J.; MEIJER, H. J.; VISSINK, A.; RAGHOEBAR, G. M. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 41, n. 2, p. 160-167, Feb. 2012.
57. RITTEL, D.; DOROGOY, A.; SHEMTOV-YONA, K. Modeling the effect of osseointegration on dental implant pullout and torque removal tests. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, no prelo.
58. ROBERTS, W. E. Bone tissue interface. **J. Dent. Educ.**, v. 52, n. 12, p.804-809, Dec. 1988.
59. ROBERTS, W. E.; SMITH, R. K.; ZILBERMAN, Y.; MOZSARY, P. G.; SMITH, R. S. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. **Am. J. Orthod.**, v. 86, n. 2, p. 95-111, Aug. 1984.
60. ROBERTS, W. E.; TURLEY, P. K.; BREZNIAK, N.; FIELDER, P. J. Implants: bone physiology and metabolism. **CDA J.**, v. 15, n. 10, p. 54-61, Oct. 1987.
61. SCALA, A.; BOTTICELLI, D.; FAEDA, R. S.; GARCIA RANGEL, I. JR.; AMÉRICO DE OLIVEIRA, J.; LANG, N. P. Lack of influence of the Schneiderian membrane in forming new bone apical to implants simultaneously installed with sinus floor elevation: an experimental study in monkeys. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 23, n. 2, p. 175-181, Feb. 2012.
62. SCHARF, K. E.; LAWSON, W.; SHAPIRO, J. M.; GANNON, P. J. Pressure measurements in the normal and occluded rabbit maxillary sinus. **Laryngoscope.**, v. 105, n. 6, p. 570-574, Jun. 1995.
63. SCHWARZ, F.; HERTEN, M.; FERRARI, D.; WIELAND, M.; SCHMITZ, L.; ENGELHARDT, E.; BECKER, J. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, n. 12, p. 1198-1206, Dec. 2007.
64. SIRISA-ARD, A.; WOODROFFE MICHAEL, S. N.; AHMED, K.; DUNSTAN, C. R.; PEARCE, S. G.; BILGIN, A. A.; DALCI, O.; DARENDELILER, M. A. Histomorphological and torque removal comparison of 6 mm orthodontic miniscrews with and without surface treatment in New Zealand rabbits. **Eur. J. Orthod.**, v. 37, n. 6, p. 578-583, Dec. 2015.

65. STÜBINGER, S.; DARD, M. The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. **J. Invest. Surg.**, v. 26, n. 5, p. 266-282, Oct. 2013.
66. SUNUNLIGANON, L.; PENG, L.; SINGHATANADGIT, W.; CHEUNG, L. K. Osteogenic efficacy of bone marrow concentrate in rabbit maxillary sinus grafting. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 42, n. 8, p. 1753-1765, Dec. 2014.
67. SVERZUT, A. T.; RODRIGUES, D. C.; LAURIA, A.; ARMANDO, R. S.; DE OLIVEIRA, P. T.; MOREIRA, R. W. Clinical, radiographic, and histological analyses of calcium phosphate cement as filling material in maxillary sinus lift surgery. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 26, n. 6, p. 633-638, Jun. 2015.
68. TATUM, H. JR. Maxillary and sinus implant reconstructions. **Dent. Clin. North Am.**, v. 30, n. 2, p. 207-229, Apr. 1986.
69. TESTORI, T.; WALLACE, S. S.; DEL FABBRO, M.; TASCHIERI, S.; TRISI, P.; CAPELLI, M.; WEINSTEIN, R. L. Repair of large sinus membrane perforations using stabilized collagen barrier membranes: surgical techniques with histologic and radiographic evidence of success. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 28, n. 1, p. 9-17, Feb. 2008.
70. THOMA, D. S.; YOON, S. R.; CHA, J. K.; LIM, H. C.; LEE, J. S.; CHOI, S.H.; JUNG, U. W. Sinus floor elevation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: micro-computed tomographic and histomorphometric analyses. **Clin. Oral Investig.**, v. 22, n. 2, p. 829-837, Mar. 2018.
71. TRBAKOVIC, A.; HEDENQVIST, P.; MELLGREEN, T.; LEY, C.; HILBORN, J.; OSSIPOV, D.; EKMAN, S.; JOHANSSON, C. B.; JENSEN-WAERN, M.; THOR, A. A new synthetic granular calcium phosphate compound induces new bone in a sinus lift rabbit model. **J. Dent.**, v. 70, p. 31-39, 2018.
72. TRISI, P.; REBAUDI, A.; CALVARI, F.; LAZZARA, R. J. Sinus graft with biogran, autogenous bone, and PRP: a report of three cases with histology and micro-CT. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 26, n. 2, p.113-125, Apr. 2006
73. WALLACE, S. S.; FROUM, S. J. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implant. **Ann. Periodontol.**, v. 8, p. 328-343, 2003.

74. WATANABE, K.; NIIMI, A.; UEDA, M. Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 88, n. 1, p. 26-32, Jul. 1999.
75. XU, H.; SHIMIZU, Y.; ASAI, S.; OOYA, K. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 15, n. 1, p. 126-133, Feb. 2004.
76. YUNUS BASHA, R.; SAMPATH KUMAR, T. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.**, v. 57, p. 452-463, Dec. 2015.

Anexos

Anexo A

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA	
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Regeneração óssea após elevação do assoalho do seio maxilar de coelhos com hidroxiapatita e beta-tricalcio fosfato em grânulos e pasta com implantes dentários: análise tomográfica, microtomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica" , Processo FOA nº 00506-2016, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Janeiro de 2018.		
VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 20 de Dezembro de 2018. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Janeiro de 2019.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Bone regeneration after maxillary sinus augmentation in rabbits with granules and paste of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate with dental implants: tomographic, micro tomographic, histomorphometric and immunohistochemistry analysis" , Protocol FOA nº 00506-2016, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on January 15, 2018.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 20, 2018. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 20, 2019.		
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		

Anexo B

Revista selecionada para a publicação do artigo

Clinical Oral Implants Research - COIR

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/16000501/homepage/forauthors.htm>