

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia

André Luiz Piola

**Análise comparativa entre enxertos ósseos aloplásticos
em grânulos vs pastas em cirurgias de levantamento de
seio maxilar. Estudo histológico e histomorfométrico em
coelhos.**

RIBEIRÃO PRETO
2022

André Luiz Piola

**Análise comparativa entre enxertos ósseos aloplásticos
em grânulos vs pastas em cirurgias de levantamento de
seio maxilar. Estudo histológico e histomorfométrico em
coelhos.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto, da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Porfírio
Xavier

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

André Luiz Piola

**Análise comparativa entre enxertos ósseos aloplásticos
em grânulos vs pastas em cirurgias de levantamento de
seio maxilar. Estudo histológico e histomorfométrico em
coelhos.**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de cirurgião dentista.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de ____.

DEDICATÓRIA

*A Deus, a ti toda honra e glória por ter me concedido
força e coragem para vencer essa jornada.
A vocês, amores da minha vida, meus pais, irmão e
minha noiva por estarem sempre presentes e que,
com muito carinho acreditaram no meu sonho e
viveram o mesmo junto comigo, onde não mediram
esforços para que eu fosse capaz de concluir mais
essa etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Porfírio Xavier, por todos os ensinamentos e oportunidades, por quem tenho profunda admiração e respeito.

A esta instituição, corpo docente e a todos os profissionais, que proporcionaram as condições necessárias e conhecimento para que eu alcançasse meus objetivos e que permitiram um ensino de extrema qualidade.

Aos meus amados amigos, Guilherme de Castro, Gunther Ricardo Bertolini, Diego Azevedo Moreira, Vitor Ferreira Balan, Eduardo Pires Godoy e Giovanna Fernandes por terem dividido comigo os melhores momentos da minha vida acadêmica e pessoal durante esses anos.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro e pela concessão da minha bolsa de Iniciação Científica (Processo nº 2020/14408-5).

A todos que estiveram presentes nessa jornada, meu muito obrigado.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar o reparo de seios maxilares em relação à incorporação, neoformação e remodelação óssea, após a realização de enxertia de dois tipos de formulações comerciais de um substituto ósseo aloplástico em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos. Neste estudo prospectivo, randomizado e do tipo boca dividida, vinte coelhos machos da raça *New Zealand*, com peso em torno de 3,5 – 4,0 kg e com idade de 5 – 6 meses, foram divididos em 2 grupos com 10 coelhos cada e submetidos à cirurgia em questão. Após o levantamento da membrana sinusal, foi enxertada na área elevada a mesma quantidade do substituto ósseo em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha), que constitui o grupo controle; ou em pasta (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha), representando o grupo teste. As áreas foram recobertas por uma membrana de colágeno porcino (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça). Cada grupo de animais tiveram eutanásia prevista para 2 e 10 semanas respectivamente. Os espécimes removidos foram encaminhados para o processamento histológico de tecidos duros utilizando o método de desgaste de precisão (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), obtendo lâminas com espessura de 50-60 μ m e coradas por Azul de Toluidina e com Azul de Stevenel e Vermelho de Alizarina. Foram realizadas fotografias das lâminas com magnificação de 10x nas seguintes áreas: parede medial, parede lateral, membrana sinusal, região central e região da antrostomia. A análise histomorfométrica foi realizada com auxílio do software ImageJ (Nacional Institutes of Health, EUA) calculando as porcentagens de: osso novo, tecido conjuntivo, grânulos e pasta além de uma análise descritiva dos achados histológicos: vasos, infiltrado celular inflamatório, osteoblastos e osteoclastos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância ANOVA ($p<0,05$) para avaliação intra e entre – grupos.

Palavras – chave: coelhos, substitutos ósseos, análise histológica, levantamento de seio maxilar.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the repair of maxillary sinuses in relation to bone incorporation, neoformation, and remodeling after grafting two types of commercial formulations of an alloplastic bone substitute in maxillary sinus lift surgeries in rabbits. In this prospective, randomized, split-mouth study, twenty male New Zealand rabbits weighing 3.5-4.0 kg and aged 5-6 months were divided into 2 groups of 10 rabbits each and submitted to the surgery. After lifting the sinus membrane, the same amount of bone substitute in granules (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany), which constitutes the control group, or in paste (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Germany), representing the test group, was grafted in the elevated area. The areas were covered with a porcine collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Switzerland). Each group of animals was euthanized at 2 and 10 weeks, respectively. The removed specimens were forwarded for hard tissue histological processing using the precision wear method (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Germany), obtaining slides with a thickness of 50-60µm and stained by Toluidine Blue and with Stevenel Blue and Alizarin Red. Photographs were taken of the slides at 10x magnification in the following areas: medial wall, lateral wall, sinus membrane, central region, and antrostomy region. The histomorphometric analysis was performed with the aid of ImageJ software (National Institutes of Health, USA) calculating the percentages of: new bone, connective tissue, granules and pulp besides a descriptive analysis of the histological findings: vessels, inflammatory cellular infiltrate, osteoblasts and osteoclasts. The data obtained were statistically analyzed using ANOVA ($p<0.05$) analysis of variance for intra- and inter-group evaluation.

Key words: rabbits, bone substitutes, histological analysis, maxillary sinus lift.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Sítio cirúrgico após tricotomia e antisepsia com de solução de iodo polivinil-pirrolidona a 1% (Riodeíne Tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Um adesivo transparente estéril (3M, Sumaré, São Paulo) foi utilizado para impedir a contaminação da ferida no transcirúrgico. Fonte: própria..... | 20 |
| Figura 2 – A. Marcação da anrostomia com broca trefina; B. Antrostomia (janela óssea) realizada por desgaste com ponta esférica diamantada, para posterior elevação da membrana sinusal. Fonte: Própria | 21 |
| Figura 3 - Substituto ósseo aloplástico em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha). Fonte: Própria | 21 |
| Figura 4- Substituto ósseo aloplástico em pasta (Maxresorb inject®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha). Fonte: Própria | 22 |
| Figura 5 - A. Enxertos ósseos alocados e parafuso de referência posicionado. B. Membrana de colágeno porcino posicionada (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça). Fonte: Própria | 22 |
| Figura 6 - A e B. Exemplo de corte trans axial realizado no equipamento Exakt (Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), no laboratório de Histologia da FORP-USP. | 24 |
| Figura 7 - Microscópio de luz Leica DMLB® (Leica, Wetzlar, Alemanha) do laboratório 3D Bio FORP-USP. | 25 |
| Figura 8 - Cinco áreas distintas do corte histológico foram utilizadas para análises histológica e histomorfométrica, como mostram os quadros na figura. A = região da antrostomia, C = região central do enxerto, S = região da membrana sinusal, M = região próxima à parede medial e L = região próxima à parede lateral. Azul de Toluidila e Vermelho de Alizarina, magnificação 16x. | 26 |
| Figura 9 - Uma grade contendo 80 pontos foi sobreposta às fotomicrografias das lâminas histológicas com auxílio do software Image J ® 1.50i (National Institutes of Health, EUA). Todos os pontos de intersecção entre os quadrados foram utilizados para contabilizar as estruturas histológicas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 100x..... | 26 |

| | |
|---|----|
| Figura 10 - Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 2 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x..... | 29 |
| Figura 11 - Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 10 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x..... | 30 |
| Figura 12 - Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença do gel a base de água. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x. | 31 |
| Figura 13 - Fotomicrografia histológica da região medial do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença da pasta envolta por tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x..... | 32 |
| Figura 14 - Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas do biomaterial e a pasta estavam preenchidos com osso novo e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x. | 32 |
| Figura 15 - Fotomicrografia histológica da região mais próxima da parede medial, em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. No grupo grânulos (A), observa-se grandes quantidades de partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se poucas partículas do biomaterial e uma diminuição da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x..... | 33 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo em 2 e 10 de reparo. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05: análise intragrupo; p < 0,05: análise entre grupos..... | 35 |
| Gráfico 2 - Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo de cada região avaliada (A = Região da antostomia; C = Região central do enxerto; S = Região próxima a membrana sinusal; M = Região medial e L = Região próxima a parede lateral), em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05: análise entre grupos..... | 36 |
| Gráfico 3 - Avaliação histomorfométrica com porcentagens comparativas de enxerto ósseo residual contidos no grupo grânulos, de pasta e quantidade de grânulos presentes na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05: análise intragrupo; p < 0,05: análise entre grupos. | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05: análise intragrupo e p < 0,05: análise entre grupos. | 34 |
| Tabela 2 - Porcentagem de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, através da análise histomorfométrica da média das regiões próximas as paredes ósseas (parede lateral + parede medial) e da região central do enxerto, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05..... | 36 |
| Tabela 3 - Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de enxerto ósseo residual do grupo grânulos, pasta e grânulos contidos na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média ± desvio padrão, p < 0,05: análise entre grupos.... | 37 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | PROPOSIÇÃO | 16 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 16 |
| 2.2 | Objetivo Específico | 16 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 | Seleção da Amostra | 18 |
| 3.2 | Manutenção dos Animais | 19 |
| 3.3 | Randomização | 19 |
| 3.4 | Procedimentos Cirúrgicos..... | 19 |
| 3.5 | Eutanásia | 23 |
| 3.6 | Processamento histológico..... | 23 |
| 3.7 | Calibração do Examinador | 24 |
| 3.8 | Análises histológicas e histomorfométrica | 24 |
| 3.9 | Análise estatística | 27 |
| 4 | RESULTADOS | 29 |
| 4.1 | Avaliação histológica descritiva | 29 |
| 4.2 | Avaliação histomorfométrica | 34 |
| 4.2.1 | Avaliação de osso novo | 34 |
| 4.2.2 | Avaliação de enxerto ósseo residual | 37 |
| 6 | Conclusões | 45 |
| | Referências Bibliográficas | 47 |
| | ANEXO..... | 52 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Como alternativa ao uso de próteses fixas e removíveis para a reabilitação oral, a implantodontia lança mão de algumas opções terapêuticas capazes de restabelecer a função e estética dos pacientes de modo mais eficaz e previsível. Para isso deve-se levar em consideração a quantidade e a qualidade de osso alveolar remanescente para o correto posicionamento tridimensional do implante, visando uma reabilitação protética mais favorável (SAKKAS et al., 2017).

A reabsorção do processo alveolar na região posterior da maxila e a consequente pneumatização dos seios maxilares podem dificultar a instalação de implantes osseointegráveis nesta região (ARAÚJO; LINDHE, 2005; FABBRO; WALLACE; TESTORI, 2013). Para solucionar esse problema, a utilização de enxertos e/ou substitutos ósseos têm sido empregados no intuito de restabelecer o volume ósseo perdido, dessa forma possibilitando a instalação de implantes osseointegráveis obtendo-se altas taxas de previsibilidade e sucesso nos sítios reconstruídos. (KONERMANN et al., 2013; DAWSON III et al., 2019).

Apesar da crescente utilização dos biomateriais, não há, até o momento, um substituto ideal para o enxerto ósseo autógeno (INTINI et al., 2008;

JENSEN; TERHEYDEN, 2009; SAKKAS et al., 2017), considerado o “padrão ouro” para os procedimentos de enxertia óssea, devido às suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas. (SANZSÁNCHEZ et al., 2015). Todavia, a utilização do osso autógeno nas cirurgias de aumento ósseo está associada a uma série de desvantagens, tais como: disponibilidade óssea limitada, morbidade cirúrgica aumentada, maior tempo cirúrgico, risco aumentado de parestesias e infecções, maior custo financeiro e necessidade de hospitalização nos casos de sítio doador extrabucal (AHLMANN et al., 2002; GAMRADT; LIEBERMAN, 2003; SOHN et al., 2009).

Visando minimizar as desvantagens da utilização do osso autógeno, enxertos xenógenos e alógenos têm sido amplamente utilizados nas cirurgias de levantamento de seio maxilar (MORDENFELD et al., 2015). No entanto, a possibilidade de indução de doenças no hospedeiro por meio de *príons* contidos no interior desses enxertos redirecionou o foco das pesquisas atuais para utilização de materiais sintéticos, denominados aloplásticos (KIM, RODRIGUEZ, NOWZARI, 2016).

A utilização de substitutos ósseos aloplásticos têm ganhado espaço, especialmente a hidroxiapatita (HA) e o fosfato beta tricálcico (β -TCP). Esses biomateriais são considerados biocompatíveis e com propriedades osteocondutoras, sendo ambos derivados do fosfato de cálcio. Apresentam-se na forma de blocos, grânulos ou pastas injetáveis (LINDGREN, 2009; WALLAC; FROUM, 2003).

Um enxerto com fosfato de cálcio bifásico com alta porcentagem de β -TCP na sua composição, pode induzir uma maior reabsorção do enxerto, e consequentemente, falha na estabilidade do volume ósseo. No entanto, uma baixa porcentagem de β -TCP pode reduzir o potencial de formação óssea. A rápida absorção do β -TCP permite a criação de espaços a serem preenchidos pelas células osteoprogenitoras, além de acelerar o processo de regeneração óssea (LIM et al., 2016).

Os substitutos ósseos de HA têm demonstrado resultados satisfatórios quando utilizados em cirurgias de levantamento de seio maxilar (MANGANO et al., 2013). A baixa taxa de absorção apresentada pela HA é considerada uma de suas principais vantagens em relação aos demais substitutos ósseos, conferindo a esse biomaterial estabilidade e resistência mecânica alongo prazo mantendo seu volume e forma durante o período de reparo (OHSAWA, 2000; ZIZZARI et al., 2016).

A associação entre HA e β -TCP em único produto combina a permanência prolongada da hidroxiapatita, importante para a manutenção do volume ósseo, com a rápida absorção do β -TCP, facilitando a formação de osso novo (JELUSIC et al., 2017; OHAYON, 2014; LIM et al., 2016). Estudos mostram que a taxa de absorção do β -TCP é três a doze vezes mais rápida que a da HA (SCHAEFER et al., 2011).

O Maxresorb® (Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha) é um substituto de enxerto ósseo de origem aloplástica, disponibilizado comercialmente na forma de grânulos ou pasta. A formulação em grânulos é composta por uma mistura de HA e β -TCP, na proporção 60:40 (OH, J. et al. 2019). Já formulação em pasta injetável (Maxresorb® Inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha) constitui-se de uma pasta contendo nanopartículas de HA e pequenos grânulos β -TCP (também na proporção 60:40), em um gel à base de água. Essas nanopartículas de HA (tamanho 15–50 nm) fornecem uma extensa área de superfície para interações celulares, promovendo assim nova formação óssea, além disso, os grânulos de HA contidos corroboram para manutenção volumétrica a longo prazo. Essa formulação é vantajosa do ponto de vista

clínico, por ser de fácil manuseio e por permitir uma boa adaptação ao sítio receptor (<<https://botiss-dental.com/products/maxresorb-inject/>>). Acesso em: 03 nov. 2019).

Oh et al. (2019) realizaram um estudo clínico prospectivo envolvendo 58 pacientes que foram submetidos a um procedimento cirúrgico de levantamento de seio maxilar, comparando dois materiais de enxerto ósseo, o fosfato de cálcio bifásico (composto por 60% de HA e 40% de β -TCP) com o enxerto mineral ósseo bovino desproteinizado (Bio-Oss®), através de análises microtomográfica e histomorfométrica. No pós-operatório de 6 meses, os resultados mostraram que a neoformação óssea foi superior no grupo de pacientes que utilizaram o fosfato de cálcio bifásico.

No entanto, não há até a presente data nenhum estudo comparando o comportamento biológico dessas duas formulações, dos pontos de vista histológico e histomorfométrico. Portanto, este será o primeiro a comparar a associação HA / β -TCP em forma de pasta ou grânulo em um modelo animal de levantamento de seio maxilar.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Comparar os processos de incorporação e neoformações ósseas de biomaterial aloplástico bifásico em grânulos ou pasta à base de hidroxiapatita (60%) e beta-fosfato tricálcio (40%) em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos, por meio de análise histológicas e histomorfométrica.

2.2 Objetivo Específico

Investigar se há diferenças a respeito da incorporação e neoformação óssea nas duas apresentações do enxerto aloplástico (pasta vs grânulos).

Descrever os eventos biológicos inerentes aos processos de incorporação, neoformação e remodelação óssea, quando utilizado o biomaterial na forma de grânulos ou pasta.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental do presente estudo foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil (Número CEUA: 2018.1.842.58.2).

3.1 Seleção da Amostra

Neste estudo, prospectivo, randomizado, do tipo boca dividida (lado teste e controle no mesmo animal), foram utilizados vinte coelhos adultos, machos, raça New Zealand White, pesando 3,5 a 4,0 kg, e com 5 a 6 meses de idade.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nos períodos pré e pós-operatórios, sob apropriados cuidados veterinários e suporte nutricional.

O modelo experimental do tipo boca dividida elimina a interferência entre indivíduos de um mesmo grupo e possibilita a utilização de um número reduzido de animais para garantir representatividade da amostra. A seguir, temos o resultado do cálculo amostral obtido pelo software G*Power 3.1 para este estudo (considerando alfa 0.05, poder do teste = 0.8, correlação entre medidas de 0.5), à semelhança do que foi realizado em estudos prévios:

```

F tests - ANOVA: Repeated measures, within factors
Analysis: A priori: Compute required sample size
Input: Effect size f = 0.4
 $\alpha$  err prob = 0.05
Power (1- $\beta$  err prob) = 0.80
Number of groups = 1
Number of measurements = 4
Corr among rep measures = 0.5
Nonsphericity correction  $\epsilon$  = 1
Output: Noncentrality parameter  $\lambda$  = 12.8000000
Critical F = 2.9603513
Numerator df = 3.0000000
Denominator df = 27.0000000
Total sample size = 10
Actual power = 0.8064365

```

Dessa forma, para esta configuração, o tamanho amostral foi de 10 animais por grupo (2 grupos, n=10), de modo que seja possível encontrar significância estatística entre os grupos experimentais.

3.2 Manutenção dos Animais

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais (1 animal/4500 cm²), sem forração específica. A sala onde ficaram alojados os animais, contava com ar condicionado *Split* (21º C), sem controle de umidade, 27 a 34 trocas de ar/hora, controle de iluminação automático 12/12h, ração e água filtrada *ad libitum*, estando disponíveis as seguintes barreiras sanitárias: autoclave, banheiros/sanitários/vestiário e tela para controle de insetos.

3.3 Randomização

A randomização entre os lados grânulos e pasta foi realizada eletronicamente (randomization.com) por um autor que não estava envolvido no manuseio dos animais e/ou nos procedimentos cirúrgicos. O tratamento a ser realizado foi informado ao cirurgião imediatamente após a realização das antrostomias dos seios maxilares bilateralmente.

3.4 Procedimentos Cirúrgicos

Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, sob anestesia geral, utilizando acepromazina (1,0 mg/kg; Acepran, Vetnil, Louveira, São Paulo), administrada por via intramuscular, e xilazina (3,0 mg/kg; Laboratório Calier S/A, Barcelona, Espanha) misturada à cetamina (50,0 mg/kg; União Química Farmacêutica Nacional S/A, EmbuGuaçu, São Paulo, Brasil), administradas por via intramuscular 15 minutos após a administração da acepromazina. Após a anestesia, os animais receberam uma dose profilática de oxitetraciclina (0,2 ml/Kg; i.m; Biovet, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), cetoprofeno 1% (Ketofen, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A., 3,0 mg/kg, i.m.; Monte-Mor, São

Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol (1,0 mg/kg; s.c.; Halexlstar; Goiânia, Goiás, Brasil). As medicações anti-inflamatória e analgésica foram mantidas nos primeiros três dias de pós-operatório.

Após a tricotomia, foi realizada antisepsia do dorso nasal por meio da aplicação tópica de solução de iodo polivinil-pirrolidona a 1% (Riodeíne Tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), e aposição de adesivo

transparente básico (3M, Sumaré, São Paulo), estéril, para proteção da ferida cirúrgica (figura 1). A anestesia infiltrativa subperiosteal da área operada foi realizada com Mepivacaína 2% com noradrenalina 1:100.000 (Mepinor, Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Uma incisão de aproximadamente 2,0 cm foi realizada ao longo da linha média do dorso nasal, seguida da divulsão dos tecidos até o periôsteo, o qual foi rebatido. O osso nasal foi exposto, tendo como limites a sutura naso-incisal e a sutura naso-frontal.

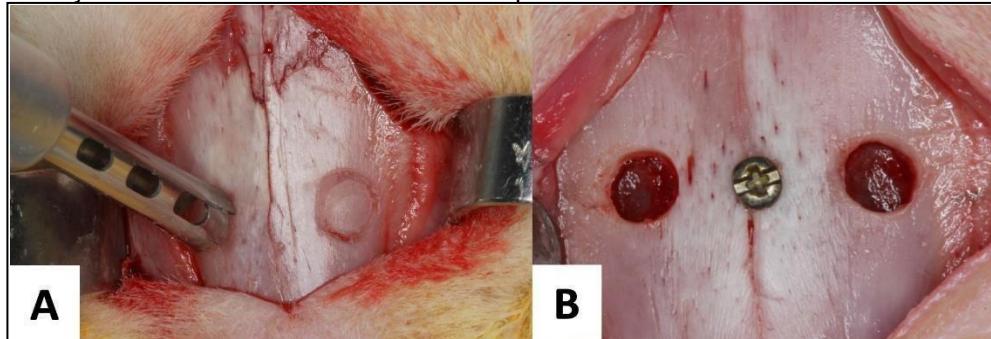
Figura 1- Sítio cirúrgico após tricotomia e antisepsia com solução de iodo polivinil-pirrolidona a 1% (Riodeíne Tintura, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Um adesivo transparente estéril (3M, Sumaré, São Paulo) foi utilizado para impedir a contaminação da ferida no transcirúrgico. Fonte: própria.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador.

Com o auxílio de trefinas e brocas, foram realizadas janelas ósseas de 3,5 a 4 mm de diâmetro, em ambos os lados do dorso nasal, conforme protocolo já realizado e publicado por nosso grupo de pesquisa (Figura 2; IIDA et al., 2017).

Figura 2 – A. Marcação da anstrostomia com broca trefina; **B.** Antrostomia (janela óssea) realizada por desgaste com ponta esférica diamantada, para posterior elevação da membrana sinusal. Fonte: Própria



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador.

Após a elevação da membrana sinusal, quantidades iguais de substituto ósseo aloplástico sintético foram introduzidas nos seios maxilares bilateralmente, de forma randomizada. Ambas as formulações são constituídas por uma associação de hidroxiapatita e beta fosfato tricálcio, na proporção 60:40, respectivamente.

Um lado recebeu o material em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha, Figura 3), composto de macroporos de 200- 400 µm e microporos de 10 µm e porosidade de 80%. Sua composição osteocondutora possibilita a perfusão sanguínea, facilitando a fixação e crescimento celulares (JUNG et al., 2017).

Figura 3 - Substituto ósseo aloplástico em grânulos (Maxresorb®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha). Fonte: Própria



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador.

O outro lado recebeu o material na forma de pasta injetável quadrifásica (Maxresorb® inject, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha, Figura 4), de absorção controlada, contendo nanopartículas de HA (15-50 nm) e pequenos grânulos de β -

TCP de máxima absorção (60% de HA / 40% de β TCP), em um gel a base água (<<https://botiss-dental.com/products/maxresorbinject/>>). Acesso em: 03 nov. 2019).

Figura 4- Substituto ósseo aloplástico em pasta (Maxresorb inject®, Botiss Biomaterials, Zossen, Alemanha). Fonte: Própria



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Como referência para o processamento histológico dos espécimes, um parafuso metálico foi posicionado na sutura nasal-incisal, ao nível do centro de ambas as janelas (figura 5.A).

Uma membrana de colágeno porcino absorvível (Bio-Guide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça) foi utilizada para cobrir as antrostomias bilateralmente (figura 5.B).

Para sutura, foram utilizados Vycril® 4-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) no periôsteo e nos planos musculares e Nylon 4-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) na pele. Todos os animais receberam medicação pós-operatória por 3 dias com cetoprofeno 1% (Ketofen, Bimeda-Mogivet Farmacêutica S.A., 3,0 mg/Kg, i.m.; Monte-Mor, São Paulo, Brasil) e cloridrato de tramadol (1mg/Kg, s.c., Halexlstar; Goiânia, Goiás, Brasil).

Figura 5 - A. Enxertos ósseos alocados e parafuso de referência posicionado. **B.** Membrana de colágeno porcino posicionada (Bio-Gide®, Geistlich, Wolhusen, Suíça). Fonte: Própria



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

3.5 Eutanásia

Cada animal recebeu uma sobredose endovenosa (2,0 mL) de tiopental 1,0 g (Thiopentax, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil). Biópsias dos sítios operados foram coletadas após 2 e 10 semanas ($n=10$ por período) e imediatamente submersas em solução de paraformaldeído 10%.

3.6 Processamento histológico

Após a fase de fixação, os espécimes foram levados ao laboratório de Histologia da FORP-USP, para ínicio da preparação histológica. Inicialmente, as peças foram lavadas em água corrente, para remoção completa do agente fixador. Em seguida, foram desidratadas em uma série de álcoois de concentrações crescentes, trocadas a cada 3 dias, sob agitação constante. Posteriormente, os espécimes foram embebidos em resina (LR WhiteTMHardGrid, Londo Resin Co Ltd, Berkshire, Reino Unido), para impregnação e posterior polimerização, em estufa a 60°. Concluída a fase de polimerização, cada bloco foi cortado em plano coronal, no centro da área elevada, utilizando como referência o parafuso metálico posicionado na sutura nasoincisal entre os centros dos dois enxertos. (Figura 6A).

Duas secções de aproximadamente 100 – 150 μm foram preparadas por meio de um equipamento de corte/desgaste de precisão (Exakt, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) (Figura 6B) e lixadas até obter-se lâminas histológicas com espessura aproximada de 50 – 60 μm . As lâminas foram coradas com Azul de Toluidina e com Azul de Stevenel e Vermelho de Alizarina, como realizado em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (OMORI et al., 2018; IIDA et al., 2017)

Figura 6 - A e B. Exemplo de corte trans axial realizado no equipamento Exakt (Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), no laboratório de Histologia da FORP-USP.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

3.7 Calibração do Examinador

Previamente ao início das medidas morfométricas, um histologista realizou a calibração do examinador responsável pelas análises (aluno de I.C). As medidas dentro de cada área foram tomadas duas vezes consecutivas e uma média foi calculada. Posteriormente ao treinamento, foi calculado um Kappa intraexaminador ($>0,8$).

3.8 Análises histológicas e histomorfométrica

Um microscópio óptico Leica DMLB ® (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com uma câmera digital (Digital Sight DS-2Mv, Nikon Corporation, Tókio, Japão) conectada a um computador, foi utilizado para realização das análises histológicas (Figura 7). Essas imagens analisadas foram obtidas através de lentes objetivas de aumentos 1.6x e 10x.

Figura 7 - Microscópio de luz Leica DMLB® (Leica, Wetzlar, Alemanha) do laboratório 3D Bio FORP-USP.

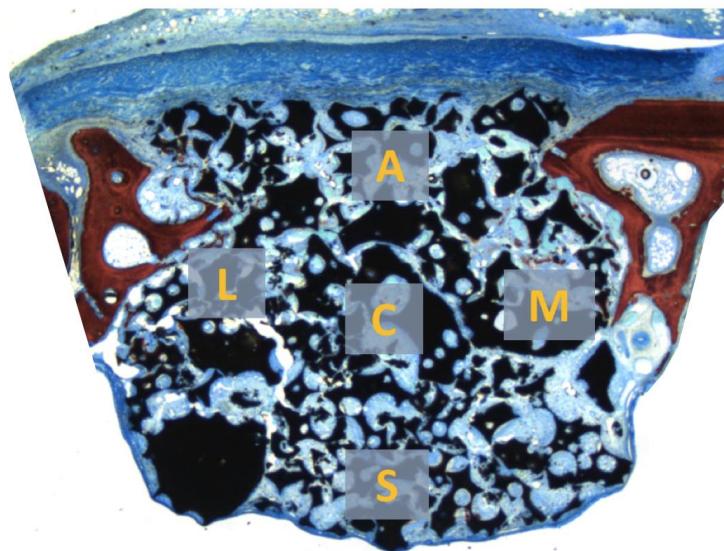


Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Para realização das análises, foram determinadas e utilizadas cinco áreas distintas do local enxertado. A área mais próxima à membrana de colágeno foi denominada “região da antrostomia (A)”, as áreas adjacentes às paredes ósseas de “parede lateral (L)” e “parede medial (M)”, a área central do enxerto de “região do centro (C)” e a área contígua à membrana sinusal de “região da membrana sinusal (S)” (Figura 8).

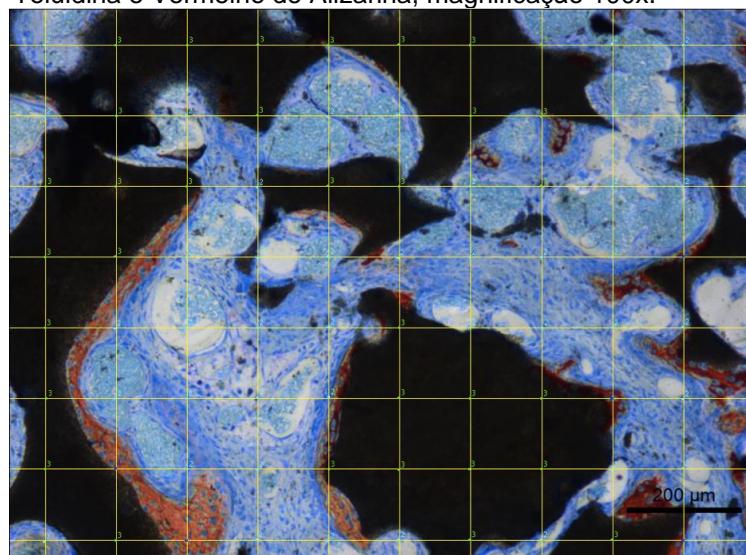
O software Image J 1.50i (Nacional Institutes of Health, EUA) foi utilizado para as mensurações. Foi sobreposta às imagens histológicas uma grade de 80 quadrados (Figura 9), e os pontos de intersecção entre estes quadrados foram utilizados como referência para que fossem contabilizadas as estruturas presentes, processo realizado em cada uma das cinco áreas determinadas anteriormente, com magnificação de 100x.

Figura 8 - Cinco áreas distintas do corte histológico foram utilizadas para análises histológica e histomorfometria, como mostram os quadros na figura. A = região da antrostomia, C = região central do enxerto, S = região da membrana sinusal, M = região próxima à parede medial e L = região próxima à parede lateral. Azul de Toluidila e Vermelho de Alizarina, magnificação 16x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Figura 9 - Uma grade contendo 80 pontos foi sobreposta às fotomicrografias das lâminas histológicas com auxílio do software Image J ® 1.50i (National Institutes of Health, EUA). Todos os pontos de intersecção entre os quadrados foram utilizados para contabilizar as estruturas histológicas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação 100x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Para cada área de interesse, foram calculadas separadamente as medidas histomorfométricas. Valores de média e desvio padrão foram calculados a fim de avaliar a neoformação óssea (variável primária) e também a reabsorção do enxerto. Dentre as estruturas avaliadas, incluíram porcentagens de osso novo mineralizado, de pasta, de grânulos e de grânulos presente na pasta. Ainda, foi calculada uma média da porcentagem de osso novo nas regiões das paredes ósseas (parede medial + parede lateral) e também a região central do enxerto. Logo após, foi realizada uma análise descritiva dos achados histológicos em ambos os períodos experimentais propostos.

3.9 Análise estatística

A partir dos dados obtidos, os mesmos foram tabulados e submetidos à análise estatística por meio do software IBM SPSS Statistic (IBM Inc., Chicago, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. A normalidade dos resíduos foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Para fins de comparação de em relação à neoformação óssea entre os grupos de grânulos e pasta e entre os dois períodos de avaliação propostos, foi utilizado um teste ANOVA *two-way*. Para comparação entre os grupos do mesmo período de avaliação, foi realizado o teste t de Student. O nível de significância foi de 5% ($p<0,05$).

RESULTADOS

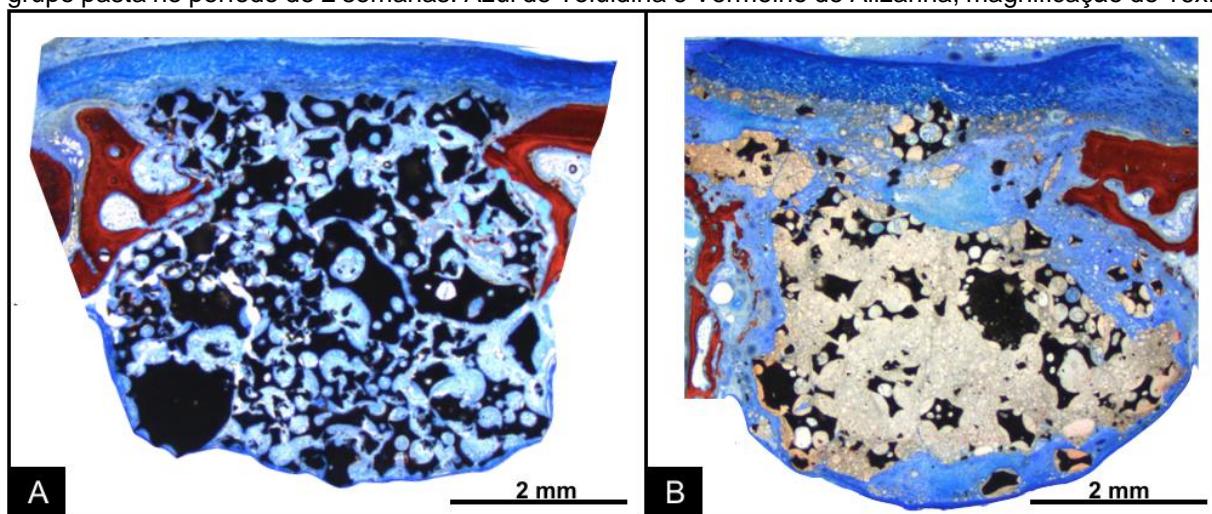
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação histológica descritiva

A avaliação do período de 2 semanas de reparo, revelou que a área dos seios maxilares levantados apresentava contorno uniforme e presença da integridade da membrana sinusal. Em relação à membrana colágena instalada estava posicionada na região das antrostomias, em ambos os grupos (Figura 10).

Tratando-se do grupo grânulos, foi possível observar na área enxertada uma quantidade relevante de partículas de biomaterial de variados tamanhos e formatos irregulares, circundadas por tecido conjuntivo, como observado na Figura 10A. No grupo pasta, observou-se uma quantidade diminuta de partículas de biomaterial de tamanho variado e formas irregulares. As lacunas entre as partículas mostraram-se preenchidas por pasta envolta de uma grande quantidade de tecido conjuntivo (Figura 10B).

Figura 10 - Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 2 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.



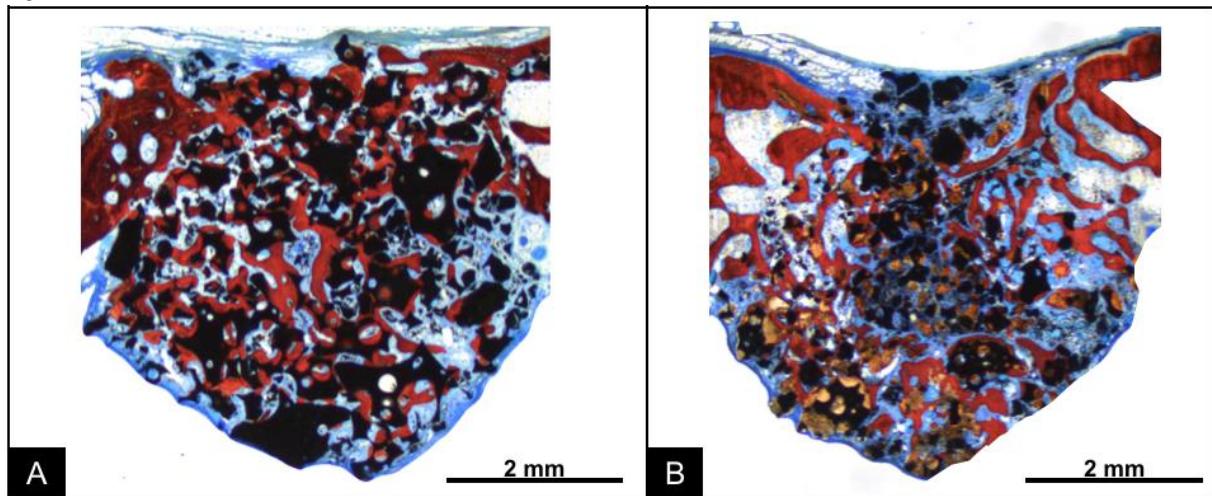
Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

No período de 10 semanas de reparo, foi observada a permanência do contorno uniforme da região enxertada, bem como a integridade da membrana sinusal. Em contraponto, as membranas colágenas encontravam-se reabsorvidas, sendo possível identificar apenas remanescentes de sua constituição original.

Em relação ao grupo grânulos, foi observado um fechamento total e mais regular da antrostomia através da formação de tecido ósseo entre os limites da janela óssea, em comparação com o grupo pasta. Foi verificado ainda, quantidade significativa de biomaterial, porém, as lacunas entre as partículas encontravam-se preenchidas por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo vascularizado (Figura 11A).

No grupo pasta, verificou-se um fechamento irregular da antrostomia com tecido ósseo neoformado. A dinâmica de formação de osso novo aconteceu sobre tudo das regiões das paredes medial e lateral em direção ao centro do enxerto. Em relação às partículas, não foi notado grandes sinais de absorção, onde as mesmas ocupavam parte da área enxertada. Em contra partida, a pasta é possível visualizar, em diminuta quantidade, devido a grande absorção (Figura 11B).

Figura 11 - Fotomicrografia histológica de dois seios maxilares elevados, (A) grupo grânulos e (B) grupo pasta no período de 10 semanas. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 16x.

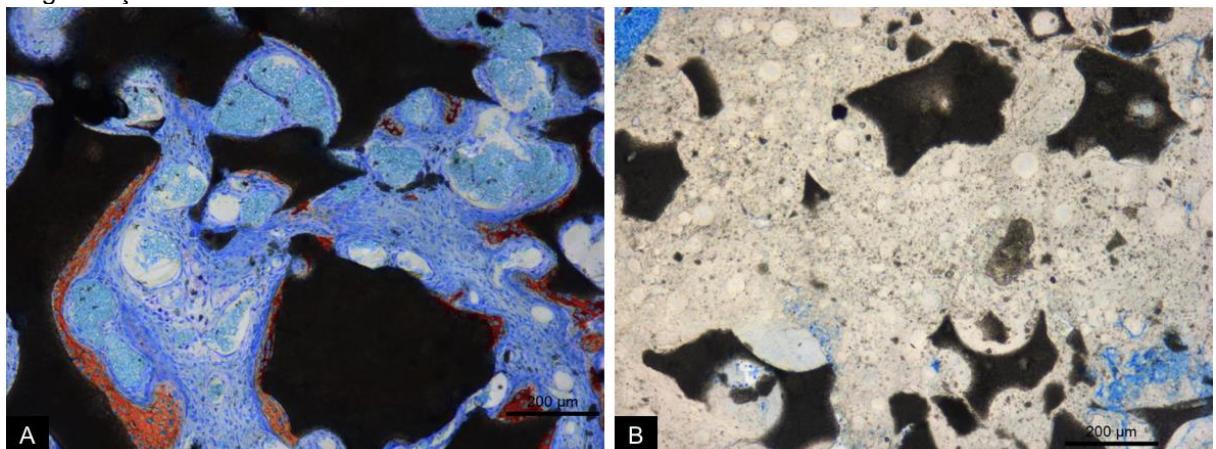


Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

No período de 2 semanas, em regiões adjacentes às paredes medial e lateral, observou-se no grupo grânulos, significativa quantidade de partículas de biomaterial envolta por tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Na superfície das partículas do biomaterial, notou-se a formação de uma delgada camada de tecido ósseo imaturo e

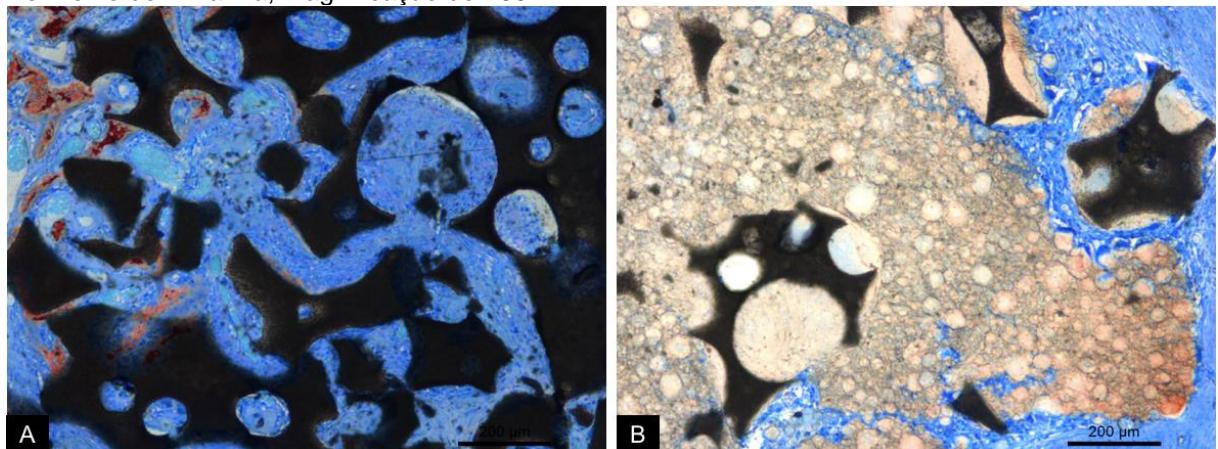
a presença de osteoblastos, como é exposto nas figuras 12A e 13A. Tratando-se do grupo pasta, observou-se uma considerável quantidade de gel à base de água contendo partículas de menor diâmetro do biomaterial e nanopartículas de HA, e circundada por tecido conjuntivo vascularizado, em quantidade menor. Não se verificou a presença de osso novo (Figura 12B e 13B).

Figura 12 - Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença do gel a base de água. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Figura 13 - Fotomicrografia histológica da região medial do enxerto em ambos os grupos com 2 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) neoformação óssea e os espaços entre as partículas preenchidos por tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se partículas de menor diâmetro e a presença da pasta envolta por tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

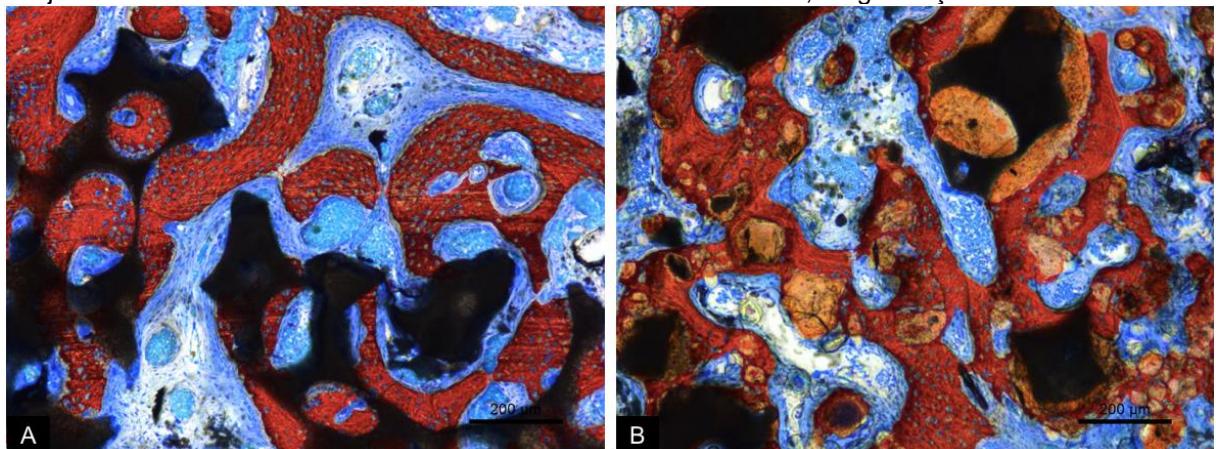
No período de 10 semanas, com relação aos arredores das regiões de paredes lateral e medial, observa-se maturação do tecido neoformado, porém com número reduzido de lacunas osteocíticas, em ambos os grupos (Figuras 14 e 15).

Em relação ao grupo grânulos, uma quantidade relevante de partículas de biomaterial foi observada, entretanto, os espaços entre as partículas estavam preenchidos por tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo vascularizado. Diminutas áreas de absorção do material enxertado puderam ser observadas na superfície do biomaterial com a presença de osteoclastos (Figuras 14A e 15A).

No grupo pasta, foi observado a presença de partículas do biomaterial e uma queda importante da quantidade de pasta, possibilitando a visualização de remanescentes da mesma. As lacunas entre as partículas e a pasta encontraram-se preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Também foram detectadas áreas de absorção do enxerto ósseo com a presença de osteoclastos na superfície do biomaterial (Figuras 14B e 15B).

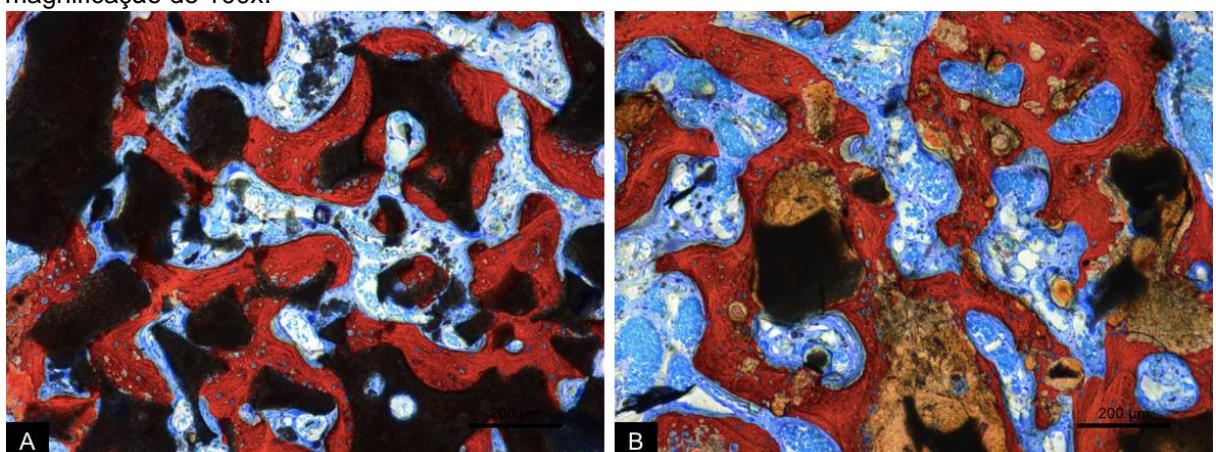
Figura 14 - Fotomicrografia histológica da região lateral do enxerto em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. Observa-se no grupo grânulos (A) partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo

pasta (B), notou-se partículas do biomaterial e uma diminuição expressiva da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas do biomaterial e a pasta estavam preenchidos com osso novo e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Figura 15 - Fotomicrografia histológica da região mais próxima da parede medial, em ambos os grupos com 10 semanas de reparo. No grupo grânulos (A), observa-se grandes quantidades de partículas do biomaterial e os espaços entre as partículas foram preenchidos por tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. No grupo pasta (B), notou-se poucas partículas do biomaterial e uma diminuição da quantidade de pasta. Os espaços entre as partículas e a pasta estavam preenchidos com tecido ósseo maduro e tecido conjuntivo vascularizado. Azul de Toluidina e Vermelho de Alizarina, magnificação de 100x.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

4.2 Avaliação histomorfométrica

4.2.1 Avaliação de osso novo

Os resultados histomorfométricos demonstraram um aumento considerável da quantidade de osso neoformado no decorrer do tempo para ambos os grupos, como evidenciado na tabela 1. Entre 2 e 10 semanas, o grupo grânulos ampliou de $1,96 \pm 1,35\%$ para $36,8 \pm 11,7\%$; e o grupo pasta de $0,08 \pm 0,12\%$ para $25,6 \pm 7,6\%$ ($p<0,05$).

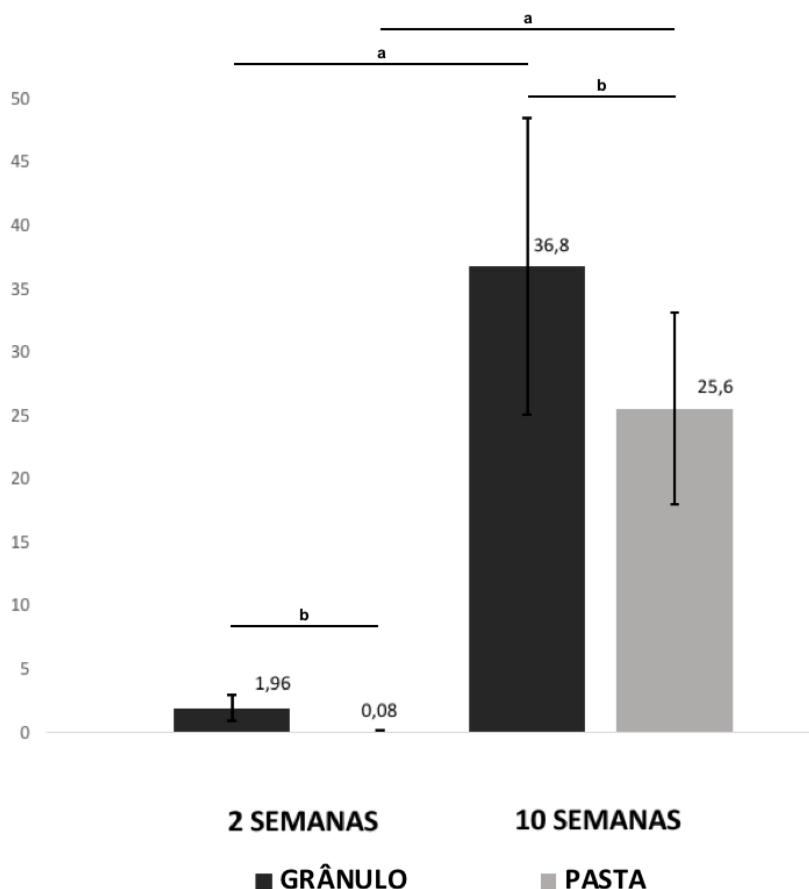
Tratando-se da análise intergrupos, foi constatado que o grupo grânulos em 2 semanas obteve uma maior porcentagem de osso novo ($p<0,05$). Em contra partida, em 10 semanas, houve uma discrepância menos significativa entre as formulações, com uma diferença de apenas 1,4 vezes para o grupo grânulos ($p<0,05$; tabela 1; gráfico 1)

Tabela 1 - Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$: análise intragrupo e $p < 0,05$: análise entre grupos.

| | Ossos novos (%) | |
|------------|------------------------|----------------------|
| | Grânulos | Pasta |
| 2 semanas | $1,96 \pm 1,35^{ab}$ | $0,08 \pm 0,12^{ab}$ |
| 10 semanas | $36,8 \pm 11,7^{ab}$ | $25,6 \pm 7,6^{ab}$ |

Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Gráfico 1 - Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo em 2 e 10 de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$: análise intragrupo; $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Em relação ao grupo grânulos, no período de 2 semanas, as porcentagens de osso novo nas regiões das paredes ósseas e do centro do enxerto foram de $3,5 \pm 2,1\%$ e $0,4 \pm 1\%$ ($p < 0,05$); e de $39,8 \pm 12,6\%$ e $36,6 \pm 8,2\%$ em 10 semanas ($p > 0,05$; Tabela 2).

No grupo pasta, em 2 semanas, foi observada a formação de osso novo apenas nas regiões das paredes ósseas de $0,1 \pm 0,3\%$. Em 10 semanas, as porcentagens de osso novo nas paredes ósseas e do centro foi de $35,0 \pm 7,6\%$ e $16,0 \pm 10,1\%$ ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de neoformação óssea dos grupos grânulos e pasta, através da análise histomorfométrica da média das regiões próximas as paredes ósseas (parede lateral + parede medial) e da região central do enxerto, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$.

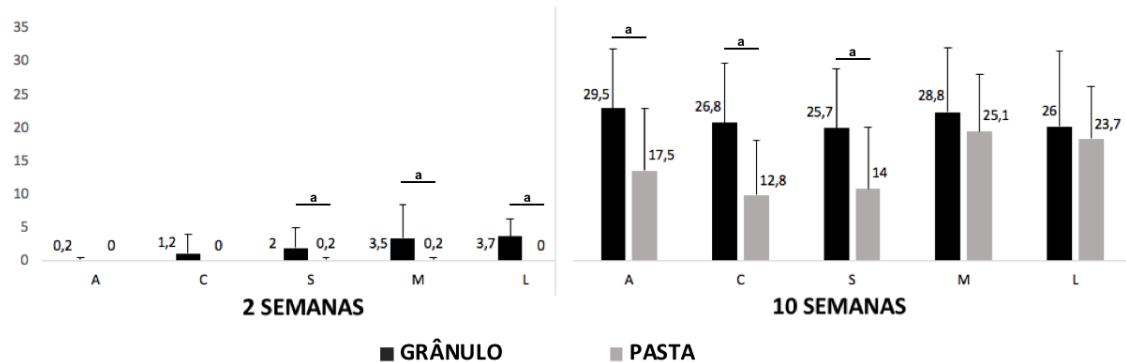
| Osso novo | | | | |
|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| | Grânulos | | Pasta | |
| | Paredes ósseas | Centro | Paredes ósseas | Centro |
| 2 semanas | $3,5 \pm 2,1^a$ | $0,4 \pm 1,0^a$ | $0,1 \pm 0,3$ | 0 |
| 10 semanas | $39,8 \pm 12,6$ | $36,6 \pm 8,2$ | $35,0 \pm 7,6^a$ | $16,0 \pm 10,1^a$ |

Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

No tempo experimental de 2 semanas, com relação a comparação entre os grupos, observou-se uma porcentagem mais vantajada de osso novo no grupo grânulos em todas as regiões analisadas. Porém, apenas as regiões circunjacentes à membrana sinusal e das paredes lateral e medial apresentaram resultado estatisticamente significante (Gráfico 2).

Em 10 semanas, o grupo grânulos perdurou com uma porcentagem mais significativa de osso novo, em todas as áreas analisadas, em relação ao grupo pasta. E as regiões próximas à antrostomia, do centro e da membrana sinusal apresentaram resultado estatisticamente significante, como pode-se observar no gráfico 2.

Gráfico 2 - Avaliação histomorfométrica com porcentagem comparativas de osso novo de cada região avaliada (A = Região da antostomia; C = Região central do enxerto; S = Região próxima a membrana sinusal; M = Região medial e L = Região próxima a parede lateral), em 2 e 10 semanas de reparo. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

4.2.2 Avaliação de enxerto ósseo residual

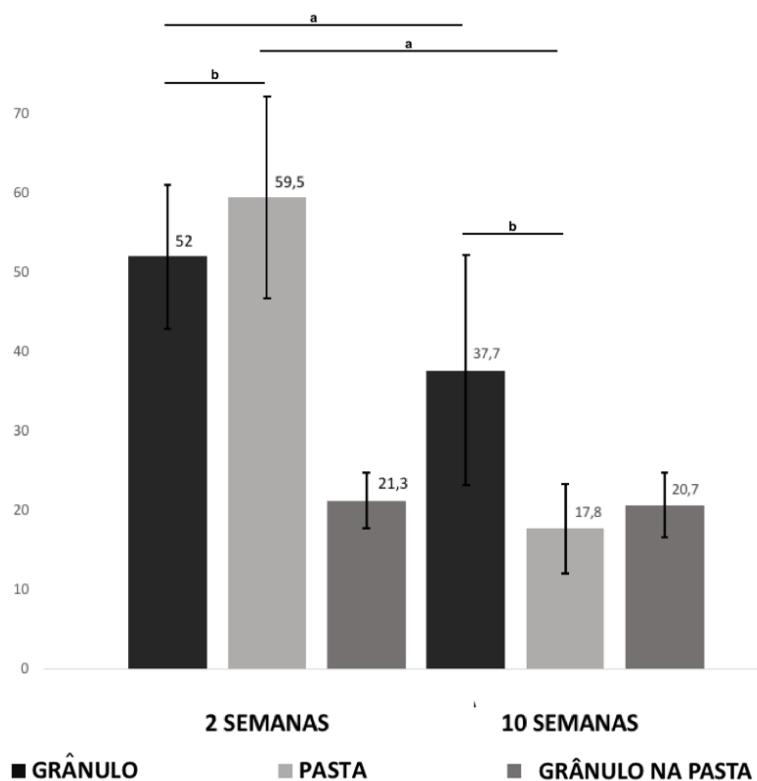
O enxerto residual decresceu em ambos os grupos após o tempo experimental de 10 semanas de reparo. A quantidade de enxerto remanescente no grupo grânulos diminuiu de $52,0 \pm 9,0\%$ para $37,7 \pm 14,5\%$; enquanto que a quantidade de pasta, de $59,5 \pm 12,7\%$ para $17,8 \pm 5,65\%$ ($p < 0,05$). Observou-se também, no decorrer dos períodos de 2 e 10 semanas, uma discreta diminuição dos grânulos presentes na formulação pasta. Entre a quantidade de grânulos e pasta, notou-se uma maior absorção da pasta ($p < 0,05$; Tabela 3; gráfico 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão de análise histomorfométrica de enxerto ósseo residual do grupo grânulos, pasta e grânulos contidos na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$: análise entre grupos.

| | Enxerto residual (%) | | |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | Grânulos | Pasta | Grânulos na pasta |
| 2 semanas | $52,0 \pm 9,0^{\text{ab}}$ | $59,5 \pm 12,7^{\text{ab}}$ | $21,3 \pm 3,5$ |
| 10 semanas | $37,7 \pm 14,5^{\text{ab}}$ | $17,8 \pm 5,65^{\text{ab}}$ | $20,7 \pm 4,1$ |

Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

Gráfico 3 - Avaliação histomorfométrica com porcentagens comparativas de enxerto ósseo residual contidos no grupo grânulos, de pasta e quantidade de grânulos presentes na pasta, em 2 e 10 semanas. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$: análise intragrupo; $p < 0,05$: análise entre grupos.



Fonte: Grupo de pesquisa do orientador

DISCUSSÃO

5. Discussão

O presente estudo teve como finalidade, a comparação do comportamento histomorfométrico de duas formulações (i.e., grânulos e pasta) de um determinado enxerto aloplástico composto por uma combinação entre hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico em cirurgias de levantamento de seio maxilar em coelhos. O modelo experimental abordado neste trabalho permite a avaliação da incorporação, bem como a neoformação óssea dos enxertos, com vista a estabelecer correlativamente o que ocorre nesses processos em humanos. Suplementarmente, tratando-se de um modelo do tipo boca dividida, foram reduzidas ao máximo as possíveis interferências que poderiam ocorrer. Essa metodologia está presente em trabalhos publicados a priori pelo mesmo grupo de pesquisa.

As técnicas de reconstrução óssea foram desenvolvidas para otimizar o resultado estético-funcional das reabilitações orais implanto-suportadas. Diversos estudos apresentam resultados satisfatórios em termos de sobrevivência de implantes e manutenção volumétrica do enxerto a longo prazo, em seios maxilares reconstruídos com enxerto ósseo sintético à base de fosfato de cálcio bifásico. (LEGEROS, *et al.*, 2003; LINDGREN, MORDENFELD, HALLMAN, 2012; MORDENFELD, LINDGREN, HALLMAN, 2016; CORBELLÀ, *et al.*, 2016).

Esse biomaterial é composto pela associação de hidroxiapatita (HA) de lenta reabsorção com o fosfato beta-tricálcico (β -TCP) de rápida reabsorção, facilitando a migração de células osteoprogenitoras e contribuindo para a formação de osso novo (CHIAPASCO *et al.*, 2008; MANGANO *et al.*, 2013; OHAYON, 2014; DUTTA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). No presente trabalho, foi utilizado o biomaterial Maxresorb® na proporção de 60HA e 40 de β -TCP nas formas de grânulos e pasta. Jelusic *et al.* (2017), através de um estudo clínico prospectivo e randomizado, lançando mão do mesmo biomaterial em grânulos, evidenciaram resultados positivos, tratando-se da neoformação óssea e incorporação do enxerto. Entretanto, até o presente momento, não há estudos clínicos e/ou experimentais ponderando o comportamento biológico da formulação na forma de pasta do Maxresorb®.

Do ponto de vista clínico, o biomaterial em pasta injetável apresenta alguns diferenciais, tais como a diminuição do tempo operatório, facilidade de manuseio e

melhor adaptação ao leito receptor (SOHN *et al.*, 2009). Por essa razão, o presente estudo será o pioneiro a comparar ambas as formulações de Maxresorb® histologicamente.

A análise histológica possibilitou a observação de uma discreta neoformação óssea após 2 semanas de reparo, situada nas adjacências das paredes ósseas do seio maxilar, no grupo grânulos. Entretanto, não foi detectada neoformação óssea no grupo pasta, observando-se significativa quantidade de enxerto ósseo residual. Também pode-se verificar uma maior quantidade de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório presente no grupo grânulos. Masuda *et al.* (2019) em um estudo conduzido com uso de seios maxilares de coelhos, também foi relatada uma discreta quantidade de osso novo formando-se a partir das paredes ósseas do seio maxilar após passadas 2 semanas de reparo.

Em relação ao período experimental de 10 semanas, foi inferido que houve um aumento da quantidade de tecido ósseo neoformado em relação ao período de 2 semanas em todas as regiões analisadas. Ainda, foi observado um contato íntimo entre o osso neoformado e as partículas do biomaterial, em ambos os grupos. Lambert *et al.* (2013), em um trabalho comparativo entre Bio-Oss® e um enxerto a base de fosfato de cálcio bifásico (60HA/40β-TCP) em seios maxilares de coelhos, expos resultados histológicos similares ao do presente estudo, no entanto, após um tempo experimental de 5 semanas.

Diante disso, verificou-se que o biomaterial Maxresorb® na forma de grânulos mostrou uma formação de osso novo adequada, por meio da reabsorção controlada do enxerto remanescente e também pela manutenção de certas quantidades de partículas do enxerto. Em contrapartida, notou-se que o gel aquoso presente na formulação em pasta injetável foi paulatinamente substituído por osso novo e as partículas foram reabsorvidas mais vagarosamente.

Com relação a utilização da membrana colágena para recobrimento das antrostomias, fez com que fossem garantidos os princípios da regeneração óssea guiada, podendo ser observada integralmente em 2 semanas. Ao final da décima semana, notou-se a reabsorção quase completa da membrana de colágeno em ambos os grupos, validando os resultados encontrados por outros autores recentemente (CHOI *et al.*, 2009; SCALA *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2017; MASUDA *et al.*, 2019). Aditivamente, observou-se a oclusão das antrostomias por meio de tecido ósseo neoformado na maioria das antrostomias analisadas, para os dois grupos

experimentais. O grupo de formulação grânulos mostrou um melhor fechamento, com formação óssea mais regular e uniforme. Contudo, em relação ao grupo pasta, notou-se um fechamento de forma irregular, caracterizado por formação de uma depressão óssea na região das antrostomias. Os padrões encontrados no presente estudo corroboram com os resultados obtidos por Masuda *et al.* (2019), que analisaram esse fechamento das antrostomias após um período experimental de oito semanas.

No presente trabalho, posteriormente a realização da análise histomorfométrica, foi verificada diferença estatística entre os grupos grânulos e pasta, em relação à quantidade de osso neoformado, demonstrando superioridade do grupo grânulos em ambos os períodos avaliados. Após o período de 10 semanas de reparo, a porcentagem de osso novo apresentada pelo grupo grânulos foi de $36,8 \pm 11,7\%$ e $25,6 \pm 7,6\%$ no grupo pasta. Lambert *et al.* (2013) realizaram análises por um tempo experimental mais longo (i.e 6 meses), observando uma formação de osso novo mais significante para o grupo fosfato de cálcio bifásico ($16,0 \pm 3,7\%$ vs $21,5 \pm 3,8\%$ respectivamente). Lim *et al.* (2015) constataram que o biomaterial na proporção de 70HA/30 β -TCP, gerou uma quantidade de osso neoformado de $21,1 \pm 4,8\%$. Diante disso, em relação a formação de osso novo, verificou-se uma superioridade do enxerto Maxresorb®.

Corbella *et al.* (2016), através de revisão sistemática e metanálise, avaliaram o padrão histomorfométrico de variados substitutos ósseos utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar. Esse grupo de pesquisadores inferiram, durante a comparação entre enxerto ósseo bovino e a associação de HÁ + β -TCP, uma quantidade mais significativa de osso neoformado por meio do material aloplástico. Durante um estudo clínico prospectivo, Jelusic *et al.* (2017), fizeram uma comparação histomorfométrica entre os enxertos beta fosfato tricálcio monofásico (100% β -TCP, Bioresorb®) e a associação de HÁ + β -TCP (em proporção de 60:40, Maxresorb®), os dois grupos na formulação de grânulos, utilizados em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Após 6 meses da cirurgia, foi constatado uma neoformação óssea maior (38,42%) para o grupo de pacientes que foram submetidos ao uso da associação de HÁ + β -TCP. A porcentagem em questão, assemelha-se à porcentagem observada no presente estudo, após o período experimental de 10 semanas. Em contra ponto, um estudo clínico diferente, fazendo uso do enxerto Osteon®, na proporção em questão (60:40), verificou uma porcentagem de osso neoformado (28,8%) menor após passarem-se 6 meses (OH, J. *et al.*, 2019).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que o padrão de formação de osso neoformado ocorreria primeiramente nas proximidades das regiões das margens das antrostomias e tomando seguimento em direção ao centro da área enxertada (SCALA et al., 2016; OMORI et al., 2018; TANAKA et al., 2019), demonstrações essas que corroboram com o presente estudo.

Tratando-se da reabsorção do enxerto ósseo remanescente, observou-se uma superioridade na quantidade total de enxerto para o grupo pasta em relação aos dois períodos avaliados, ressaltando que, nesse grupo, essa reabsorção se fez presente, principalmente pelo processo de degradação do gel à base de água. Até a presente data, a literatura carece de estudos cujo enfoque seja a reabsorção do beta fosfato tricálcico na forma de pasta que nos sirvam como parâmetro de comparação.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

Com base nos resultados demonstrados neste estudo, conclui-se que:

- Ambas as formulações (grânulos e pasta) do enxerto ósseo Maxresorb demonstraram resultados favoráveis quanto a neoformação óssea, tanto em qualidade quanto em quantidade e incorporação. Do prisma de formação de osso novo, o grupo grânulos demonstrou superioridade em relação a sua comparação com o grupo pasta, em todos as análises realizadas.
- A contração volumétrica e a reabsorção do enxerto ao decorrer do tempo estiveram presentes em ambos os grupos.
- A formação desse osso novo se deu partindo-se das paredes ósseas e migrando na direção central dos seios maxilares, em ambos os grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- AHLMANN, E. et al. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am*, v. 84, n.5, p. 716-720, 2002.
- ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*, v. 32, n. 2, p. 212-218, 2005.
- CAMPANA, V. et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*, v. 25, n. 10, p. 2445-2461, 2014.
- CHOI, K.S. et al. Effects of resorbable membrane on human maxillary sinus graft: a pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 24, n.1, p. 73–80, 2009.
- CORBELLA, S.; TASCHIERI S.; WEINSTEIN R.; FABBRO M. D. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*, v.27, n.9, p. 11106-1122, 2016.
- CHIAPASCO, M. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res*.v.19, n.8, p. 796-803, 2008.
- DAWSON III, R.D.; EL-GHANNAM. A.; VAN SICKELS, J.E.; NAUNG, N.Y. Tissue Engineering: What is New? *Dent Clin North Am*, v.63, n.3, p. 433-445, 2019.
- DEL FABBRO, M.; WALLACE, S.S.; TESTORI, T. Long-term implant survival in the grafted maxillary sinus: a systematic review. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 33, n. 6, p. 773-783, 2013.
- DELGADO-RUIZ, R.A.; CALVO GUIRADO, J.L.; ROMANOS, G. E. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*, v.29, n.6, p. 620-634, 2018.
- DONOS, N.; MARDAS, N., CHADHA, V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontal*, v.35. p. 173-202, 2008.
- DUTTA, S. R.; PASSI, D.; SINGH, P. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci*, v. 184, n. 1, p. 101-106, 2015.
- FARIÑA, N. M.; GUZÓN, F.M.; PEÑA, M.L.; CANTALAPIEDRA A.G. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med*, v. 19, n. 4, p. 1565-1573, 2008.
- GAMRADT, S.C.; LIEBERMAN, J. R. Bone graft for revision hip arthroplasty: Biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res*, v. 417, p. 183-194, 2003.
- IIDA, T. et al. Influence of a collagen membrane positioned subjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*, v. 28, n. 12, p. 1567-1576, 2017.

- INTINI, G. et al. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria criticalsize bone defects. *Journal Periontol*, v. 79, n. 4, p. 1217-1224, 2008.
- JELUSIC, D. et al. Monophasic B-TCP vs. biphasic HA/B-TCP in two-stage sinus floor augmentation procedures – a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, v. 28, n.10, p. e175-e183, 2017.
- JENSEN, S. S.; TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bonesubstitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 24, p. 218-236, 2009.
- JUNG, U. W. et al. Simultaneous lateral bone augmentation and implant placement using a particulated synthetic bone substitute around chronic peri-implant dehiscence defects in dogs. *Clin Periodontol*, v. 44, n. 11, p.1172-1180, 2017.
- KIM, Y.; RODRIGUEZ, A. E.; NOWZARI, H. The risk of prion infection through bovine grafting materials. *Clin Implant Dent Relat Res*, v. 18, n. 6, p. 1095-1102, 2016.
- KIM, Y.; NOWZARI H.; RICH S.K. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*, v.15, n.5, p. 645-653, 2013.
- KONERMANN, A. et al. Bone substitute material composition and morphology differentially modulate calcium and phosphate release through osteoclast-like cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 43, n. 4, p. 514-521, 2014.
- LAMBERT, F. et al. A comparison of three calcium phosphate-based space fillers in sinus elevation: a study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 28, n. 2, p. 393-402, 2013.
- LEGEROS, R. Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Med*, v. 14, n. 3, p. 201–209, 2003.
- LIM, H. C. et al. Effect of different hydroxyapatite: β -tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. v. 30, n. 1, p. 65-72, 2015.
- LIM, H. C. et al. Late-term healing in an augmented sinus with different ratios of biphasic calcium phosphate: a pilot study using a rabbit sinus model. *J Periodontal Implant Sci*, v. 46, n. 1, p. 57-69, 2016.
- LINDGREN, C. et al. Clinical histology of microimplants placed in two different biomaterials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 24, n. 6, p. 1093–1100, 2009.
- LINDGREN, C; MORDENFELD, A; HALLMAN, M. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with synthetic biphasic calcium phosphate or deproteinized bovine bone. *Clin Implant Dent Relat Res*, v. 14, n. 1, p. 41-50, 2012.
- MANGANO, C. et al. Maxillary Sinus Grafting with Biphasic Calcium Phosphate Ceramics: Clinical and Histologic Evaluation in Man. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 28, n.1, p. 51–56, 2013.
- Maxresorb inject – Four-phasic injectable bone graft. Disponível em: <<https://botissdental.com/products/maxresorb-inject/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

- MORDENFELD, A.; LINDGREN, C.; HALLMAN, M. Sinus Floor Augmentation Using Straumann® BoneCeramic™ and Bio-Oss® in a Split Mouth Design and Later Placement of Implants: A 5-Year Report from a Longitudinal Study. *Clinical Implant Dentistry & Related Research*, v. 18, n.5, 2016.
- OH, J. et al. A Comparative Study with Biphasic Calcium Phosphate to Deproteinized Bovine Bone in Maxillary Sinus Augmentation: A Prospective Randomized and Controlled Clinical Trial. *Int. J. Oral Maxillofac*, v. 1, n. 34, p. 233-242, 2019.
- OHAYON, L. Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Biphasic Calcium Phosphate: A histologic and Histomorphometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 29, n. 5, p. 1143–1148, 2014.
- OHSAWA, K.; NEO, M.; MATSUOKA, H. The expression of bone matrix protein mRNA around beta-TCP particles implanted into bone. *J Biomed Mater Res*, v. 52, n. 3, p. 460-466, 2000.
- OMORI, Y. et al. Reposition of the bone plate over the antrostomy in maxillary sinus augmentation: A histomorphometric study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*, v. 29, n.8, p. 821-834, 2018.
- SAKKAS, A. et al. Autogenous bone grafts in oral implantology – it is still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*, v.3, n.23, p. 1-17, 2017.
- SCHAEFER S. et al. How degradation of calcium phosphate bone substitute materials is influenced by phase composition and porosity. *Adv Eng Mater*, v. 13, n. 4, p. 342-350, 2011.
- SOHN, D. S. et al. Histomorphometric evaluation of mineralized cancellous allograft in the maxillary sinus augmentation: a 4 case report. *Implant Dent*, v. 18, n. 2, p. 172-181, 2009.
- SOHN D. S. Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: a histologic and clinical study in humans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.108, n. 5, p. 30-35, 2009.
- SCALA, A.; LANG, N.P.; VELEZ, J.U. Effects of a collagen membrane positioned between augmentation material and the sinus mucosa in the elevation of the maxillary sinus floor. An experimental study in sheep. *Clin Oral Implants Res*. v. 27, p. 1454–1461. 2016.
- TANAKA, K.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. Sinus Floor Elevation and Antrostomy Healing: A Histomorphometric Clinical Study in Humans. *Implant Dent*. v. 28, n. 6, p. 537-542, 2019.
- WALLACE, S. S.; FROUM, S. J. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol*, v. 8, n. 1, p. 328-343, 2003.
- WANG, Y. et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/beta-TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLoS One*, v.12, n. 4, p. 1-17, 2017.

ZIZZARI, V. et al. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 122, n. 4, 2016.

ANEXO

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA - FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Comparação entre substituto ósseo aloplástico em grânulos ou pasta em cirurgia de levantamento de seio maxilar. Estudo experimental em coelhos**”, Protocolo nº 2018.1.842.58.2, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 09/01/2019.

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/02/2019 a 31/01/2020 |
| Espécie/Linhagem | Coelho / Nova Zelândia |
| Nº de animais | 20 |
| Peso/Idade | 3,5 -4,5 kg / 5-6 meses |
| Sexo | Machos |
| Origem | Criadouro – Taquaritinga - SP |

Ribeirão Preto, 09 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA)**.

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

DADOS PESSOAIS

Nome: André Luiz Piola

Nº USP: 10294644

Período: 9º período

Telefone de contato: (16) 99134-7201

E-mail USP: andrepiola@usp.br

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome do Orientador(a): Samuel Porfírio Xavier

Departamento: DCTBMFP

Área de conhecimento: Cirurgia Buco Maxilo Facial

Subárea: Enxertos Ósseos

MODALIDADE

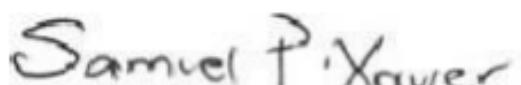
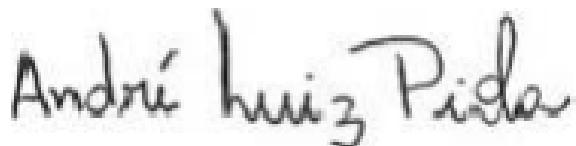
Modalidade:

Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional

ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)

Eu, Prof(a). Dr(a). Samuel Porfírio Xavier, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Nome Completo do aluno(a)

Nome Completo do Orientador(a)