

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO EM CLÍNICA
ODONTOLÓGICA

NAYANA FERREIRA VIDIGAL

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRIMÁRIA DE IMPLANTES
INSTALADOS EM REGIÕES PREVIAMENTE ENXERTADAS COM
OSSO BOVINO ANORGÂNICO NOS PERÍODOS DE
INCORPORAÇÃO E MATURAÇÃO ÓSSEA: ANÁLISE CLÍNICA,
HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA

Juiz de Fora

2017

NAYANA FERREIRA VIDIGAL

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRIMÁRIA DE IMPLANTES
INSTALADOS EM REGIÕES PREVIAMENTE ENXERTADAS COM
OSSO BOVINO ANORGÂNICO NOS PERÍODOS DE
INCORPORAÇÃO E MATURAÇÃO ÓSSEA: ANÁLISE CLÍNICA,
HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vidigal, Nayana Ferreira.

Avaliação da estabilidade primária de implantes instalados em regiões previamente enxertadas com osso bovino anorgânico nos períodos de incorporação e maturação óssea : análise clínica, histopatológica e histoquímica / Nayana Ferreira Vidigal. -- 2017. 83 f. : il.

Orientador: Henrique Duque de Miranda Chaves Netto
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica, 2017.

1. Enxerto ósseo. 2. Histopatologia. 3. Implantes dentários. 4. Imuno-histoquímica. 5. Seio maxilar. I. Chaves Netto, Henrique Duque de Miranda, orient. II. Título.

NAYANA FERREIRA VIDIGAL

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRIMÁRIA DE IMPLANTES
INSTALADOS EM REGIÕES PREVIAMENTE ENXERTADAS COM
OSSO BOVINO ANORGÂNICO NOS PERÍODOS DE
INCORPORAÇÃO E MATURAÇÃO ÓSSEA: ANÁLISE CLÍNICA,
HISTOPATOLÓGICA E HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

Prof^a. Dr^a. Gisele Maria Campos Fabri
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

Prof. Dr. Fabiano Vieira de Landa
(Faculdade Estácio de Sá – Juiz de Fora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Paloma e Fernando, meus pais, meus mestres, meus maiores incentivadores, que com amor e apoio incondicionais me permitiram chegar até aqui. Que me prepararam para os desafios da vida e que me ensinam, todos os dias, a lutar pelos meus sonhos. Tudo o que sou, devo a vocês. Serei eternamente grata.

Ian e Taynan, meu irmãos, meus companheiros, que estão sempre ao meu lado me fazendo entender o verdadeiro significado da palavra “amizade”.

Audilia, Luzia, Gerson e Francisco, meus queridos avós, que sempre torcem por mim e vibram com as minhas conquistas.

Nossos laços são eternos... A vocês, todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa etapa concluída, por todas as oportunidades que me concede e por me dar saúde e força para vencer as etapas difíceis da minha caminhada.

Ao meu mentor espiritual, por estar sempre comigo, me guiando pelo melhor caminho e auxiliando no meu progresso.

Aos meus pais, Paloma e Fernando, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais em todas as etapas da minha vida. Por sempre acreditarem em mim e por nunca medirem esforços para que eu realize meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ian e Taynan, pelo companheirismo, pela amizade, pela união e por todos os momentos incríveis que passamos juntos.

Aos queridos avós, Audilia, Luzia, Gerson e Francisco, por todo carinho e dedicação. Por sempre torcerem por mim. Por me fazerem acreditar que sou capaz.

Ao meu namorado, Mauro, pelo amor, carinho e companheirismo. Por torcer por mim e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos tios e primos, pela torcida e pelo incentivo.

Ao querido cunhado, Eduardo, pela ajuda nas ilustrações deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Henrique Duque Netto, por ter me acolhido como orientada e por ter confiado em mim. Por me passar tranquilidade e confiança. Por todos os ensinamentos práticos e teóricos. Pela oportunidade de poder aprender com um grande cirurgião.

À professora Gisele Maria Campos Fabri, por toda a dedicação e carinho com este trabalho. Por ter me acolhido na fase mais difícil da pesquisa e ter me passado, com seu jeito único, confiança e tranquilidade. Por se mostrar sempre disponível mesmo com inúmeros compromissos. Por ser uma professora/pesquisadora excepcional e uma pessoa iluminada.

À professora Beatriz Aarestrup, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo empenho na leitura das lâminas, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao querido professor Alexandre Zanini, por ter feito a análise estatística deste trabalho com todo carinho, atenção e eficiência. Pela paciência com que me tirou diversas dúvidas. Por ter tido disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

À querida amiga Ludmila, por ter me apresentado ao professor Henrique, possibilitando meu acesso ao PPG – Mestrado em Clínica Odontológica. Por ser verdadeiramente amiga e companheira. Por nunca medir esforços para me ajudar.

Aos professores Fabiano de Landa, Luís Felipe de Resende e Maria das Graças Chaves por aceitarem compor a banca de defesa desta dissertação. Sei que suas críticas e sugestões serão fundamentais para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Daiane Degan, por toda ajuda na seleção dos pacientes e por se mostrar sempre disposta a colaborar.

Aos colegas do PPG – Mestrado em Clínica Odontológica, pela companhia, pelas experiências trocadas e por me darem forças para concluir este trabalho.

A todos os professores do PPG – Mestrado em Clínica Odontológica, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos pacientes atendidos durante essa etapa, especialmente os que participaram da pesquisa, pela confiança em meu trabalho.

RESUMO

Esta pesquisa avaliou a estabilidade primária dos implantes instalados em regiões de enxerto heterógeno bovino utilizado no levantamento do soalho seio maxilar nos períodos de dois e seis meses após a enxertia, a fim de verificar a possibilidade de instalação de implantes no período de reparo ósseo primário. O estudo foi composto por sete pacientes. O mesmo paciente fez parte dos dois grupos analisados, sendo considerados os lados direito ou esquerdo (GT = grupo teste; avaliação do enxerto com dois meses) e esquerdo ou direito (GC = grupo controle; avaliação do enxerto com seis meses). O trabalho foi descrito nos artigos a seguir:

ARTIGO I: foi realizada análise clínica e histopatológica nos períodos de incorporação óssea (dois meses) e de maturação óssea (seis meses). A análise histopatológica mostrou neoformação óssea com presença de osteoblastos, osteócitos e neovascularização tanto no GT como no GC. A análise estatística apontou diferença significativa ($p = 0,007$) entre a quantidade de osso neoformado nos dois grupos. Clinicamente, não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT. Concluiu-se que houve diferença estatística na taxa de osso neoformado nos períodos de dois e seis meses após o procedimento de enxertia, porém não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT.

ARTIGO II: foi realizada análise clínica e histoquímica nos períodos de incorporação óssea (dois meses) e de maturação óssea (seis meses). Por meio da coloração *picrosirius red*, constatou-se a presença de colágeno tipo I (maduro) e tipo III (imaturo) em ambos os grupos, porém a análise estatística apontou diferença significativa entre o tipo I ($p = 0,002$) e o tipo III ($p = 0,014$) no GT e no GC. Clinicamente, não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT. Diante desses resultados, foi possível concluir que, apesar de o osso neoformado se mostrar mais maduro aos seis meses, não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT.

Palavras-chave: enxerto ósseo, histopatologia, implantes dentários, imuno-histoquímica, seio maxilar.

ABSTRACT

This study evaluated the primary stability of implants installed in areas of heterogenous bovine grafting used in lifting the maxillary sinus floor two and six months after grafting, in order to verify the possibility of implant installation during the primary bone repair stage. This study consisted of seven patients. The same patient was part of both analysis groups, where the right or left sides (TG = test group, two-month graft evaluation) and left or right sides (CG = control group, six-month graft evaluation) were considered. The work was described in the following articles:

ARTICLE I: clinical and histopathological analysis was performed in periods of bone incorporation (two months) and bone maturation (six months). The histopathological analysis showed new bone formation with osteoblasts, osteocytes and neovascularization in both groups. The statistical analysis showed a significant difference ($p = 0.007$) between the amount of newly formed bone in the TG and CG. Clinically, there was no impairment in the primary stability of implants installed in the TG (two months). We concluded that there was a statistical difference in the rate of newly formed bone in the periods of two and six months, but there was no impairment in the primary stability of the implants installed in the TG.

ARTICLE II: clinical and histochemical analysis were performed in periods of bone incorporation (two months) and bone maturation (six months). The presence of collagen type I (mature) and type III (immature) in both groups was observed through picosirius red staining, but the statistical analysis indicated a significant difference between type I ($p = 0.002$) and type III ($p = 0.014$) in TG and CG. Clinically, there was no impairment in the primary stability of the implants installed in the TG. We conclude that, although the newly formed bone showed to be more mature at six months, there was no impairment in the primary stability of the implants installed in the TG.

Key words: bone grafting, histopathology, dental implants, immunohistochemistry, maxillary sinus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	16
3.2 MATERIAIS UTILIZADOS.....	16
3.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	17
3.3.1 Critérios de inclusão	17
3.3.2 Critérios de exclusão	17
3.4 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS.....	17
3.5 ETAPAS CIRÚRGICAS.....	18
3.5.1 Primeira etapa	18
3.5.2 Segunda etapa	21
3.6 ANÁLISE CLÍNICA.....	23
3.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	24
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4 ARTIGO	26
5 ARTIGO	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	73
ANEXO B – Método de Coloração com Hematoxilina e Eosina	76
ANEXO C – Método do <i>Picrosirius Red</i> para Colágeno	83

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a instalação de implantes dentários é considerada uma técnica cirúrgica de alta previsibilidade que possibilita a reabilitação de regiões edêntulas (KIM *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2009). Para a realização dessa técnica, é necessário que haja uma quantidade suficiente de osso nas áreas que receberão os implantes. Quando não se dispõe desse volume ósseo, a cirurgia de reconstrução óssea pode ser empregada a fim de permitir a reabilitação com implantes (MAZZONETTO; NETTO; NASCIMENTO, 2012).

A redução do volume ósseo alveolar pode ser resultado de doença periodontal antes da perda dentária, uso prolongado de próteses removíveis, osteoporose, remodelação óssea fisiológica que ocorre após a exodontia e pneumatização do seio maxilar (BAGHERI; BELL; KHAN, 2013).

O seio maxilar tende a invadir os espaços dos dentes extraídos, tornando-se mais pneumatizado em pacientes desdentados na maxila (MADEIRA, 2004). A reabilitação de áreas posteriores atróficas da maxila tem sido considerada como um procedimento complexo devido à reabsorção óssea e ao aumento da pneumatização do seio maxilar (JOHANSSON *et al.*, 2010; LAMBERT; LECLOUX; ROMPEN, 2010). A aproximação entre o seio maxilar e a crista óssea reduz a quantidade de osso alveolar, o que dificulta a instalação de implantes (JOHANSSON *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2010).

Os procedimentos de reabilitação com implantes dentários em pacientes com a maxila edêntula e com altura óssea insuficiente estimularam o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e materiais para reconstrução e adequação de rebordos alveolares atróficos, como por exemplo, o levantamento do soalho do seio maxilar utilizando enxertos ósseos (SMILER e SOLTAN, 2006). Essa técnica cirúrgica consiste em localizar, divulsionar e reposicionar a membrana de Schneider, preenchendo o espaço criado com enxerto ósseo (CHAN e WANG, 2011; PEREIRA *et al.*, 2010; ZUBLER *et al.*, 2012).

O levantamento do soalho do seio maxilar é um método conhecido e altamente previsível na reabilitação bucal de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados na região de molares ou pré-molares superiores que apresentam volume ósseo insuficiente nessas regiões (SMILER e SOLTAN, 2006). Esse procedimento pode ser realizado por duas técnicas: técnica da janela lateral (técnica

traumática) ou técnica de elevação atraumática com osteótomos. A técnica a ser utilizada é definida pela quantidade e pela qualidade do osso remanescente (SUMMERS, 1994).

Segundo Rodriguez *et al.* (2003), a principal indicação para a cirurgia de elevação do soalho sinusal refere-se à criação de melhores condições para a instalação de implantes em regiões posteriores da maxila que apresentam altura óssea menor do que 8 mm.

Para Rickert *et al.* (2012), a técnica da janela lateral associada à instalação de implantes pode ser realizada em uma ou duas etapas cirúrgicas, dependendo da altura do rebordo alveolar remanescente. A cirurgia de enxertia com instalação dos implantes em duas etapas é realizada quando o rebordo residual não possuir altura óssea suficiente (menor que 4 mm) para oferecer estabilidade primária satisfatória.

Diversos tipos de enxertos podem ser utilizados no procedimento de elevação do soalho do seio maxilar e são classificados, de acordo com sua origem, em: autógeno (obtido do próprio indivíduo); homogêneo ou aloenxerto (obtido em banco de ossos humanos); xenógeno ou heterógeno (proveniente de doadores de espécies diferentes); aloplástico (possui origem sintética) (NKENKE e STELZLE, 2009).

Segundo Misch (2000), os materiais de enxerto também podem ser classificados de acordo com o modo de ação: 1) Osteocondução: é a invaginação do tecido vascular e células-tronco mesenquimais no enxerto; o crescimento ósseo ocorre pela reabsorção ou aposição a partir do osso adjacente pré-existente; 2) Osteoindução: envolve a neoformação óssea pela estimulação e recrutamento de células osteoprogenitoras derivadas de células-tronco mesenquimais indiferenciadas no local do enxerto; 3) Osteogênese: é a neoformação óssea induzida por células osteoprogenitoras que estão presentes no enxerto, sobrevivem ao transplante, proliferam e diferenciam-se em osteoblastos; o osso autógeno é o único material de enxerto com essa propriedade.

Dentre os materiais heterógenos, o osso bovino anorgânico é, comumente, utilizado na reconstrução de defeitos ósseos, pois apresenta características similares ao osso medular humano, como a morfologia e a composição mineral (GUTWALD *et al.*, 2010). Possui uma estrutura constituída por uma superfície ultraporosa e um sistema de poros interconectados, que funciona como uma microesponja, proporcionando a entrada de células sanguíneas, osteoblastos, osteoclastos e proteínas em suas partículas, permitindo, dessa forma, a

osseointegração eficaz de suas partículas (JANG *et al.*, 2010). Além disso, tem como vantagem a disponibilidade em grandes volumes, sem necessidade de área doadora. Porém, tem como desvantagem atuar apenas como osteocondutor (MAZZONETTO; NETTO; NASCIMENTO, 2012).

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente ativo, que sofre um processo contínuo de renovação e de remodelação, sendo constituído por uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação celular (MISCH, 2000). Além dessas células, o tecido ósseo também é composto por uma matriz extracelular que é formada por uma porção orgânica (proteica) que representa cerca de 35% da matriz e uma porção inorgânica (mineral) que compõe os 65% restantes da matriz (GARTNER e HIATT, 2003).

Os osteoblastos são células provenientes da diferenciação progressiva das células osteoprogenitoras e iniciam a atividade de síntese da matriz. Sintetizam a parte orgânica da matriz óssea: colágeno tipo I e proteoglicanos. O material produzido pelos osteoblastos não é a matriz mineral em sua totalidade, e sim um material orgânico proteico denominado osteoide (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; AARESTRUP, 2012). Inicialmente, os osteoblastos organizam-se lado a lado na superfície da matriz. À medida que sintetizam o osteoide, afastam-se uns dos outros sendo envolvidos pela matriz e ficando, dessa forma, aprisionados em uma lacuna. Nessa situação, o osteoblasto torna-se um osteócito (AARESTRUP, 2012).

Os osteócitos têm tempo de vida útil de, aproximadamente, três anos e, durante esse período, são responsáveis pela captação de nutrientes e pela manutenção iônica do tecido. Após esse período, a área em que se encontram é reabsorvida e nova matriz, com novos osteócitos aprisionados, surge para renovação do tecido ósseo (AARESTRUP, 2012).

Os osteoclastos são células de origem hematopoiética que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, sendo responsáveis pela reabsorção tecidual. Essa reabsorção da matriz envolve tanto a porção orgânica quanto a inorgânica. Morfologicamente, são fáceis de distinguir dos osteoblastos e dos osteócitos, pois são células gigantes multinucleadas, com citoplasma volumoso intensamente eosinofílico e de formato irregular (AARESTRUP, 2012).

A porção orgânica (proteica) da matriz extracelular, produzida pelos osteoblastos, é constituída, predominantemente, por proteínas colagenosas: colágeno tipo I (85%) e pequenas quantidades de colágeno tipo III e tipo V (5%). As

proteínas não colagenosas, juntas, perfazem os 10% restantes (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001). A porção inorgânica é composta por fosfato de cálcio organizado em cristais, além de magnésio, bicarbonato, sódio e potássio, em menor quantidade (GARTNER e HIATT, 2003).

De acordo com a disposição estrutural e amadurecimento dos elementos que constituem o tecido ósseo, são identificadas as fases de reparo ósseo primário (osso imaturo) e de reparo ósseo secundário (osso lamelar ou maduro). No reparo primário, o osso apresenta forma desorganizada, sem a estrutura lamelar dos sistemas haversianos e, portanto, tem pouca resistência biomecânica. Já no reparo secundário, o osso apresenta estrutura colágena mineralizada e de forma organizada, sendo capaz de suportar forças funcionais (MISCH e DIETSH, 1993).

O procedimento de levantamento do soalho do seio maxilar em duas etapas cirúrgicas é recomendado sempre que a obtenção da estabilidade primária do implante for inviável (LI e WANG, 2008). Nesses casos, quando se utiliza o osso bovino anorgânico, um período de seis meses é, frequentemente, aguardado antes da instalação dos implantes (ESPOSITO *et al.*, 2010; CABBAR *et al.*, 2011; XAVIER *et al.*, 2016). Em alguns estudos, observa-se um tempo de espera de sete a nove meses (LEE; CHEN; DARBY, 2012; MELONI *et al.*, 2015).

A estabilidade primária dos implantes instalados é um fator importante para se obter osseointegração, porém o torque mínimo para atingir essa estabilidade não é definido na literatura (GREENSTEIN e CAVALLARO, 2017). Segundo Sivoletta *et al.* (2012), o torque de inserção não é determinante para se obter osseointegração, mas sim a ausência de micromovimentação do implante.

Cada vez mais, cresce a exigência do paciente em relação à estética e a um plano de tratamento rápido. Dessa forma, faz-se necessário o estudo de novas técnicas com a finalidade acelerar o tempo de tratamento sem perder a eficácia do mesmo.

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de análise clínica, histopatológica e histoquímica, a estabilidade primária dos implantes instalados em regiões de enxerto heterógeno bovino utilizado no levantamento do soalho do seio maxilar nos períodos de incorporação óssea (dois meses) e de maturação óssea (seis meses), a fim de verificar a possibilidade de instalação de implantes no período de reparo ósseo primário para otimizar o tempo de tratamento do paciente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer nº. 1.397.315 (Anexo A). Os participantes, depois de informados e conscientizados sobre os objetivos da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice), concordando em participar da mesma.

3.2 MATERIAIS UTILIZADOS

No Quadro 1, encontram-se listados os materiais usados na pesquisa.

Quadro 1 - Demonstrativo do material usado na pesquisa

MATERIAIS	
Afastador Minnessota	Gaze
Agulha gengival curta	Implantes 3,5 x 10 mm (Conexão®)
Amoxicilina 500 mg	Implantes 3,75 x 10 mm (Conexão®)
Anestésico local com vasoconstritor (lidocaína 2% com adrenalina 1:100000)	Implantes 5 x 13 mm (Conexão®)
Broca esférica diamantada nº 6	Kit de implante (Conexão®)
Broca trefina nº 2	Lâmina de bisturi nº 15
Cabo de bisturi nº 3	Motor de implante
Campo operatório	Osso bovino anorgânico (Lumina-Bone Critéria®)
Clorexidina 0,12% e 2%	Peça reta
Contra-ângulo	Porta agulha
Curetas para seio maxilar	Seringa Carpule
Descolador de Molt nº 9	Seringa para irrigação
Dexametasona 4 mg	Solução de cloreto de sódio 0,9%
Dipirona sódica 500 mg	Solução de formalina 4%
Frasco de vidro para biópsia	Sugador cirúrgico
Fio de sutura absorvível (<i>catgut</i> cromado 4 – 0)	Tesoura Íris reta

3.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

3.3.1 Critérios de inclusão

Para a realização desta pesquisa, os critérios de inclusão utilizados foram: paciente desdentado posterior bilateral com altura do rebordo remanescente < 4 mm entre a crista óssea alveolar e o soalho do seio maxilar. Essa seleção foi realizada através de exames clínico e radiográfico (Figura 1).



Figura 1: Radiografia panorâmica para análise do rebordo remanescente. Fonte: autor.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo: pacientes que apresentavam doença sistêmica; pacientes tabagistas; pacientes que apresentavam patologia em região de seio maxilar; pacientes submetidos a procedimentos de enxertia prévia na região a ser operada; pacientes que não seguiram as orientações pós-operatórias; pacientes que apresentaram complicações trans e/ou pós-operatórias; pacientes que não deram continuidade ao tratamento.

3.4 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS

Trata-se de um ensaio clínico duplo-cego e caracterizado por um estudo intervencional e prospectivo. Para garantir o mascaramento que caracteriza um ensaio clínico duplo-cego, reduzir a probabilidade de erros sistemáticos e permitir a utilização de testes estatísticos, foi utilizado um processo de alocação dos pacientes

nos grupos da pesquisa da seguinte forma: o mesmo paciente fez parte dos dois grupos, pois o procedimento de elevação do soalho do seio maxilar foi bilateral, sendo considerados, de forma cega, os lados direito ou esquerdo (GT = grupo teste; avaliação da incorporação do enxerto com dois meses) e esquerdo ou direito (GC = grupo controle; avaliação da maturação do enxerto com seis meses).

Apenas o professor orientador tomou ciência do lado (direito ou esquerdo de cada paciente) que foi inserido nos grupos, definindo, assim, o tempo de espera para a instalação dos implantes (dois meses ou seis meses). Dessa forma, tanto o cirurgião quanto os pesquisadores do Departamento de Morfologia e Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, responsáveis, respectivamente, pelas cirurgias (elevação do soalho do seio maxilar e, posteriormente, coleta de amostra óssea) e pelas análises histopatológicas, não foram conscientizados dos períodos propostos (GT = dois meses; GC = seis meses).

3.5 ETAPAS CIRÚRGICAS

3.5.1 Primeira etapa – levantamento do soalho do seio maxilar (técnica da janela lateral) e preenchimento com enxerto heterólogo bovino

Como medicação pré-operatória, os pacientes receberam, uma hora antes do procedimento, 1 g de amoxicilina, 4 mg de dexametasona e 500 mg de dipirona sódica.

Para a antisepsia intra-bucal, os pacientes realizaram bochechos com solução de clorexidina 0,12% por 60 segundos. A antisepsia extra-bucal, por sua vez, foi realizada com clorexidina 2% em gel na face dos pacientes, ao redor da boca, com o auxílio de uma gaze estéril.

Os pacientes foram submetidos à anestesia local, sendo a lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000 o anestésico utilizado em todas as etapas cirúrgicas. Na maxila, foi realizado o bloqueio dos nervos alveolar superior posterior, alveolar superior médio e palatino maior, assim como anestesia infiltrativa na região que seria operada.

Após a anestesia, foi realizada uma incisão com uma lâmina de bisturi nº 15 sobre a crista do rebordo alveolar da maxila e uma incisão relaxante para expor a área que receberia o enxerto. O retalho mucoperiosteal foi defletido com um

deslocador tipo Molt nº 9 até a exposição total da parede lateral externa da maxila (Figura 2).



Figura 2: retalho mucoperiosteal defletido expondo a parede lateral externa do seio maxilar. Fonte: autor.

Posteriormente, foram realizadas osteotomias para a confecção de uma janela óssea de formato retangular que permitisse o acesso ao seio maxilar. Para isso, foi utilizada uma broca esférica diamantada nº 6 montada em instrumento rotatório sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9% estéril. A osteotomia horizontal inferior foi posicionada de 2 a 3 mm acima do soalho do seio maxilar. Em seguida, foram feitas as osteotomias verticais, respeitando uma distância de 2 mm das raízes dentárias, quando estas estavam presentes. A osteotomia horizontal superior foi posicionada de 3 a 5 mm além da altura do implante planejado para a região. Todas as osteotomias foram feitas até a exposição da membrana do seio maxilar (Figura 3).



Figura 3: osteotomias realizadas até a exposição da membrana do seio maxilar. Fonte: autor.

Depois da confecção da janela óssea na parede maxilar, a membrana do seio maxilar foi, cuidadosamente, descolada e elevada com auxílio de curetas específicas, criando um espaço necessário para o preenchimento da cavidade com o enxerto ósseo. Iniciou-se o descolamento com uma cureta angulada e, posteriormente, alterando as curetas de acordo com a angulação necessária, o remanescente ósseo da janela retangular foi deslocado para dentro do seio maxilar criando um novo soalho do seio maxilar (Figura 4). O enxerto foi, então, introduzido e compactado por toda extensão da cavidade formada.

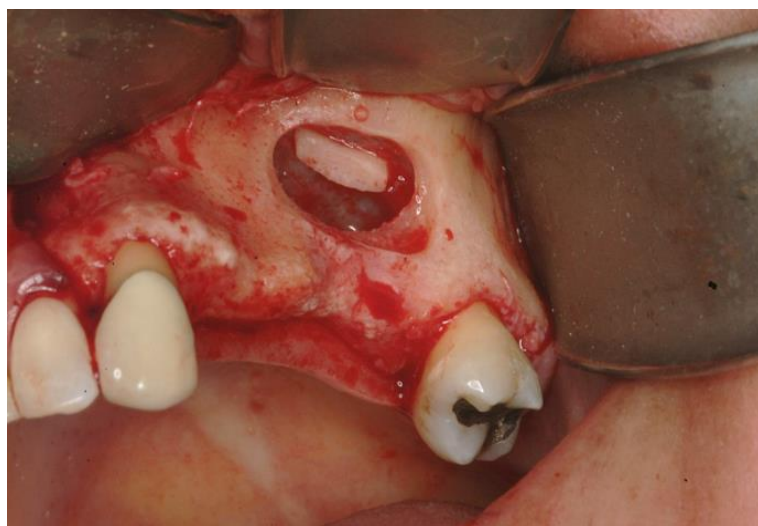


Figura 4: após descolada, a membrana foi elevada, criando-se um novo soalho para o seio maxilar. Fonte: autor.

O tipo de enxerto utilizado foi o osso bovino anorgânico de granulação fina (300 μm a 425 μm). Após a enxertia, a sutura do tecido gengival foi feita com fio absorvível (*categut* cromado 4-0) e realizada por meio de pontos simples em toda extensão da área incisada.

3.5.2 Segunda etapa – coleta de amostra óssea e inserção dos implantes

No GT, a segunda etapa cirúrgica foi realizada após dois meses do procedimento de levantamento do soalho do seio maxilar (período de incorporação óssea), enquanto que no GC essa etapa foi realizada após seis meses do procedimento de enxertia (período de maturação óssea).

A medicação pré-operatória, a antisepsia e a anestesia foram realizadas da mesma forma descrita na primeira etapa cirúrgica. Após anestesia local, foi realizada uma incisão linear com lâmina de bisturi nº 15, no sentido póstero-anterior, sobre a crista do rebordo alveolar da maxila e uma incisão relaxante para expor, respectivamente, a área onde os implantes seriam instalados e a área que recebeu o enxerto. Com o auxílio do descolador Molt nº 9, todo o tecido mucoperiosteal foi descolado para que essas áreas ficassem visíveis no campo operatório.

Previamente, para que fosse realizado um estudo histopatológico da área que recebeu o enxerto, um fragmento ósseo de 4 mm de comprimento foi retirado com auxílio de uma broca trefina de 2 mm de diâmetro interno montada em um contra-ângulo (Figura 5), sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9% estéril, e imediatamente armazenado em um recipiente com solução de formalina 4%.



Figura 5: broca trefina utilizada para obtenção das amostras ósseas. Fonte: autor.

A amostra óssea foi removida no sentido perpendicular à parede lateral da maxila para garantir uma padronização do comprimento de todos os fragmentos retirados (Figura 6).



Figura 6: amostra óssea sendo removida no sentido perpendicular à parede lateral da maxila. Fonte: elaborada pelo autor.

Seguiu-se, então, com a instrumentação para a instalação dos implantes utilizando as brocas de acordo com a preconização do fabricante do sistema de

implante (Conexão Sistemas de Prótese®) e de acordo com o tipo de implante selecionado, levando em consideração a altura e a espessura óssea do rebordo alveolar. Durante a instrumentação, irrigação abundante com soro fisiológico 0,9% estéril foi mantida para não haver super-aquecimento do tecido ósseo. A sutura do tecido gengival foi feita com fio absorvível (*catégut* cromado 4-0) e realizada por meio de pontos simples em toda extensão da área incisada.

3.6 ANÁLISE CLÍNICA

A análise clínica foi realizada durante a inserção dos implantes (segunda etapa cirúrgica) por meio da avaliação do valor do torque que foi medido pelo torquímetro manual presente no sistema de implante (Figura 7). O valor foi considerado satisfatório se fosse ≥ 30 N/cm, valor este indicado por Greenstein e Cavallaro (2017) para carregamento imediato dos implantes, mesmo os implantes do presente trabalho não tendo sido submetidos à carga imediata. Avaliou-se também, através de análise comparativa, os torques dos implantes instalados no GT e GC no mesmo paciente, sendo especificamente: toque igual ou diferente.



Figura 7: torquímetro manual (Conexão Sistemas de Prótese®). Fonte: autor.

3.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA/HISTOQUÍMICA

Após obtenção, as amostras ósseas foram, imediatamente, fixadas em formalina a 4% e submetidas ao processamento histológico de rotina, de acordo com

Timm (2005). O material embocado em parafina foi submetido à microtomia, em sentido longitudinal, de 5 µm de espessura. Após a confecção das lâminas, cortes correspondentes a cada amostra foram separados para realização de coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE) (Anexo B) e para realização de reação histoquímica de *picrosirius red* (Anexo C).

Nas amostras coradas por HE, realizou-se o estudo histopatológico para avaliação de presença de infiltrado inflamatório e edema, amadurecimento e organização do tecido de granulação, presença e amadurecimento de membrana osteogênica, presença de osso trabecular e de osso lamelar.

A coloração histoquímica de *picrosirius red* foi realizada para observação do amadurecimento da matriz colagenosa por polarização de luz, na qual os feixes (colágeno tipo I, evidenciado por margem vermelha brilhante contra fundo escuro) e as fibrilas (colágeno tipo III, evidenciado por margem amarelo esverdeada contra fundo escuro) são diferenciados.

Os cortes foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 250X, 400X e 1000X em toda sua extensão por dois diferentes observadores com experiência e formação em histopatologia, para avaliação descritiva das características histopatológicas gerais da amostra, conforme citado anteriormente.

A partir dessa avaliação, as amostras foram digitalizadas em toda sua extensão (AxioCam acoplada em microscópio Zeiss, Alemanha) e submetidas à histomorfometria semi-automática para quantificação de área de osso neoformado por meio do software Zen2012 (Zeiss, Alemanha). A mesma digitalização foi realizada para quantificação automática dos feixes e fibrilas de colágeno. Os resultados foram expressos em micrômetros quadrados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram transpostos para uma planilha eletrônica utilizando o programa Microsoft Excel® 2003.

Realizou-se uma análise de identificação de pontos discrepantes (*outliers*) através de análise gráfica (diagrama de Tukey). Após identificados, esses pontos foram excluídos.

A fim de se verificar a normalidade dos dados foi empregado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, na qual a normalidade dos dados foi verificada. Para identificar as diferenças entre GT e GC, foi empregado o teste *t de Student* para dados pareados. Para se correlatar as medidas do GT e do GC, foi empregado o coeficiente de correlação de *Pearson*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foi empregado o *software* estatístico SPSS versão 13.0.

Os dados foram descritos utilizando-se médias, desvio-padrão, mínimo e máximo.

4 ARTIGO

Evaluation of Primary Stability of Implants Installed During Bone Incorporation and Maturation Stages in a Maxillary Sinus Floor Lift Procedure: Clinical and Histopathological Analysis

Henrique Duque NETTO

Nayana Ferreira VIDIGAL

Beatriz Julião Vieira AARESTRUP

Gisele Maria Campos FABRI

Maria das Graças Afonso Miranda CHAVES

Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Juiz de Fora

- Rua José Lourenço Kelmer, s/n - São Pedro, Juiz de Fora - MG, 36036-900

**Evaluation of Primary Stability of Implants Installed During Bone Incorporation and
Maturation Stages in a Maxillary Sinus Floor Lift Procedure: Clinical and
Histopathological Analysis**

ABSTRACT

This study evaluated, through clinical and histopathological analyses, the primary stability of implants installed in areas of heterogenous bovine grafting used in lifting the maxillary sinus floor two and six months after grafting, in order to verify the possibility of implant installation during the primary bone repair stage. This study consisted of seven patients. The same patient was part of both analysis groups, where the right or left sides (TG = test group, two-month graft evaluation) and left or right sides (CG = control group, six-month graft evaluation) were considered. The histopathological analysis showed new bone formation with presence of osteoblasts, osteocytes and neovascularization in both groups. The statistical analysis showed a significant difference ($p = 0.007$) between the amount of newly formed bone in the TG and CG. Clinically, there was no impairment in the primary stability of implants installed in the TG (two months). We concluded that anorganic bovine bone has a structure to give the implant a satisfactory primary stability both in the bone maturation (six months) and bone incorporation (two months) stages.

Key-words: bone grafting; dental implantation; histopathology; osseointegration; maxillary sinus.

INTRODUCTION

Dental implant rehabilitation procedures in patients with an edentulous maxilla and insufficient bone height encouraged the development of surgical techniques and materials for the reconstruction and adaptation of atrophic alveolar ridges, such as, for example, maxillary sinus floor lifting using bone grafts¹. The technique described by Boyne and James² consists in performing an osteotomy on the side wall of the sinus to provide access to the sinus cavity and lifting of the membrane, which is carefully detached with the aid of specific curettes for this procedure. Thus we can create a space that is required for the placement of the grafting material³.

One advantage of using a non-autogenous graft is that it has a lower morbidity for the patient⁴. Bovine heterogenous grafts predominate in the dentistry world market due to its biocompatibility and osteoconductive properties⁵. This type of graft is recommended for the maxillary sinus floor lift procedure and provides high rates of implant survival⁶⁻¹².

Bone grafting procedures in the maxillary sinus floor area and installation of implants can be performed in one or two surgical stages, depending on the height of the remaining bone. Alveolar ridges smaller than 4 mm in height are considered inadequate for immediate installation of implants, since they do not offer the necessary conditions for a satisfactory primary stability⁷. In such cases, a waiting period of approximately six months is required between the grafting procedure and implant installation for graft maturation,^{3, 13, 14} which therefore increases the patient's treatment time.

According to the arrangement and maturation of its elements, bone tissue can be classified into: primary bone tissue (immature bone) and secondary bone tissue (lamellar or mature bone). Primary tissue is characterized as having an immature form, with a greater number of osteocytes, bundles of disorganized collagen fibers and little mineral content, where a bone is more flexible when compared to the secondary tissue. On the other hand, secondary

bone is a mature tissue with a greater amount of mineral content, and consists of bone matrix lamellae that are arranged in parallel or concentrically around a vascular space, making up the Haversian systems¹⁵.

The amount of newly formed bone is an important criterion to evaluate the efficacy of the grafting procedure. The greater the volume and bone density, the greater the contact between the bone and the surface of the implant, which eventually leads to a longer implant survival due to a greater osseointegration area¹. Histomorphometric analysis is considered the gold standard to measure the amount of newly formed bone, residual bone graft as well as soft tissue¹⁷.

This study evaluated, through clinical and histopathological analyses, the primary stability of implants installed in areas of heterogenous bovine grafting used in lifting the maxillary sinus floor two and six months after grafting, in order to verify the possibility of implant installation during the primary bone repair stage in order to optimize patient treatment time.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Aspects

This research was previously approved by the Committee of Ethics in Human Research at the University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora with decree n°. 1.397.315.

Sample Selection

Inclusion criteria: bilateral posterior toothless patients with remaining ridge height < 4 mm between the alveolar bone crest and maxillary sinus floor.

Exclusion criteria: patients with systemic disease; smokers; patients presenting with any pathology in the maxillary sinus area; patients who underwent previous grafting procedures in the area to be operated on; patients who did not follow the postoperative guidelines; patients

who presented with trans- and/or postoperative complications; patients who did not continue treatment.

Grouping

This is a double-blind clinical trial characterized as an interventional and prospective study. The same patient was part of both research groups, since the maxillary sinus floor lift procedure was bilateral, where the right or left sides (TG = test group, two-month graft incorporation evaluation) and left or right sides (CG = control group, six month graft maturation evaluation) were blindly considered.

Surgical Stages

First stage - Lifting the maxillary sinus floor and filling it with heterogenous bovine graft:

This stage was performed according to the surgical technique described by Boyne and James² (Figure 1 and Figure 2). The type of graft used was fine-grained anorganic bovine bone (300 μm to 425 μm).



Figure 1: osteotomies performed until the exposure of the maxillary sinus membrane. Source: author.

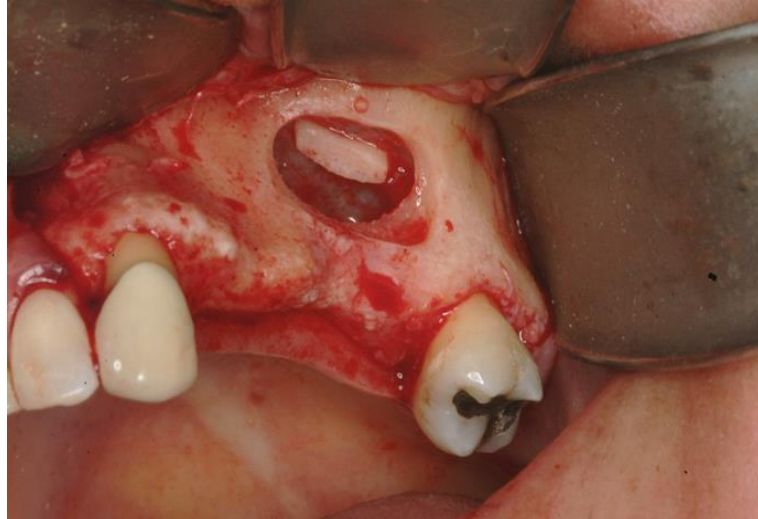


Figure 2: after detachment, the membrane was elevated, creating a new floor for the maxillary sinus. Source: author.

Second stage - Bone sample collection and implant placement:

In the TG, the second surgical stage was performed two months after the maxillary sinus floor lift procedure (bone incorporation stage), while in the CG this stage was performed six months later (bone maturation stage).

A 4-mm-long bone fragment was removed using a 2-mm inner bore trephine drill (Figure 3) and immediately stored in a 4% formalin solution container for sample processing, as described by Timm¹⁸, and subsequent histopathological study of the graft-receiving area.



Figure 3: trephine used to obtain the bone samples. Source: author.

The bone sample was removed perpendicular to the side wall of the maxilla to ensure standardization of the length of all the fragments that were removed (Figure 4). This was followed by instrumentation to install the implants, as recommended by the implant system manufacturer (Conexão Sistemas de Prótese®).



Figure 4: the bone sample was removed perpendicular to the side wall of the maxilla. Source: prepared by the author.

Clinical Analysis

The clinical analysis was performed during implant placement (second surgical stage) by evaluating the torque value as measured by the manual torque wrench present in the implant system (Figure 5). This value was considered satisfactory if ≥ 30 N/cm, which is recommended for immediate loading of the implants¹⁹, even though implants in this study were not submitted to immediate loading. Through comparative analysis, torques were also specifically assessed as equal or different for the implants installed in the TG and CG for the same patient.



Figure 5: manual torque wrench (Conexão Sistemas de Prótese®).
Source: author.

Sample Processing and Histopathological Analysis

Once collected, bone samples were immediately fixed in 4% formalin and underwent routine histological processing according to Timm¹⁸. The paraffin-embedded material underwent microtomy in a 5- μ m thick longitudinal direction. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) (Harris method), as described by Allen²⁰. The histopathological analysis evaluated the presence of inflammatory infiltrate and edema, granulation tissue maturation and organization, osteogenic membrane presence and maturation, presence of trabecular bone and lamellar bone. Samples were also digitalized in their entire length (AxioCam fitted to a Zeiss microscope, Germany) and submitted to semi-automatic

histomorphometry for quantification of the newly formed bone area using the Zen2012 software (Zeiss, Germany).

Statistical Analysis

An graphic analysis was used to identify outliers (Tukey's diagram). Once identified, these points were excluded. In order to identify differences between the TG and CG, Student's t-test was used for paired data. In order to correlate TG and CG measurements, the Pearson correlation coefficient was used. The level of significance was set at $p < 0.05$. The SPSS version 13.0 statistical software was used. Data were described by using mean averages, standard deviation, minimum and maximum.

RESULTS

Sample Selection

According to the inclusion criteria, fourteen patients were selected to make up the sample. Of these, two had systemic disease and four did not follow through with treatment, and were therefore excluded from the research. Thus, the study initially comprised eight patients. During the statistical analysis, an outlier patient was observed who was then excluded so as not to interfere with the results. Thus, the TG consisted of an $n = 7$ sample (TG1, TG2, TG3 to TG7) as well as the CG (CG1, CG2, CG3 to CG7).

Clinical Analysis

All implants installed in the TG had a torque equal to that of the implants installed in the CG, where 28.6% had a torque < 30 N/cm, and 71.4% had a torque ≥ 30 N/cm (Table 1). Therefore, 71.4% of TG implants and 71.4% of CG implants presented satisfactory primary stability. The specifications of the implants installed in each group are listed in Table 2.

Table 1: Torque of implants installed at two months and at six months

Torque (N/cm)		< 30 N/cm		≥ 30 N/cm	
Time		2 months	6 months	2 months	6 months
Patient					
1				X	X
2		X	X		
3				X	X
4				X	X
5		X	X		
6				X	X
7				X	X

Table 2: Specifications of the implants installed in each group

GROUPS/PATIENTS	IMPLANTS
TG1 (2 months)	One implant 5 x 13 mm
CG1 (6 months)	One implant 3,75 x 10 mm
TG2 (2 months)	One implant 5 x 13 mm
CG2 (6 months)	One implant 5 x 13 mm
TG3 (2 months)	One implant 3,5 x 10 mm
CG3 (6 months)	One implant 3,5 x 10 mm
TG4 (2 months)	One implant 3,75 x 10 mm
CG4 (6 months)	One implant 3,75 x 10 mm
TG5 (2 months)	One implant 3,75 x 10 mm
CG5 (6 months)	One implant 3,75 x 10 mm
TG6 (2 months)	One implant 3,75 x 10 mm
CG6 (6 months)	One implant 3,5 x 10 mm
TG7 (2 months)	One implant 3,5 x 10 mm
CG7 (6 months)	One implant 3,5 x 10 mm

Histopathological Analysis

As shown in Table 3, none of the bone samples from both TG and CG showed any inflammatory infiltrate or edema. A new trabecular bone formation was observed in 85.7% of the cases in both groups. The initial remodeling process with a discrete presence of lamellar

bone occurred in one of the CG samples (14.2%). None of the samples from both groups presented any lamellar bone with established Harversian systems. There was a bone gain of 34.6% from the TG to the CG. The histopathological characteristics found in these groups can be seen in Figure 6.

Table 3: Descriptive analysis of the histopathological aspects

Patient \ Time	Inflammatory infiltrate or edema		Trabecular bone		Presence of lamellar bone		Lamellar bone with established Harversian systems	
	2 months (TG)	6 months (CG)	2 months (TG)	6 months (CG)	2 months (TG)	6 months (CG)	2 months (TG)	6 months (CG)
1	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
2	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
3	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
4	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
5	No	No	No	No	No	No	No	No
6	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
7	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No

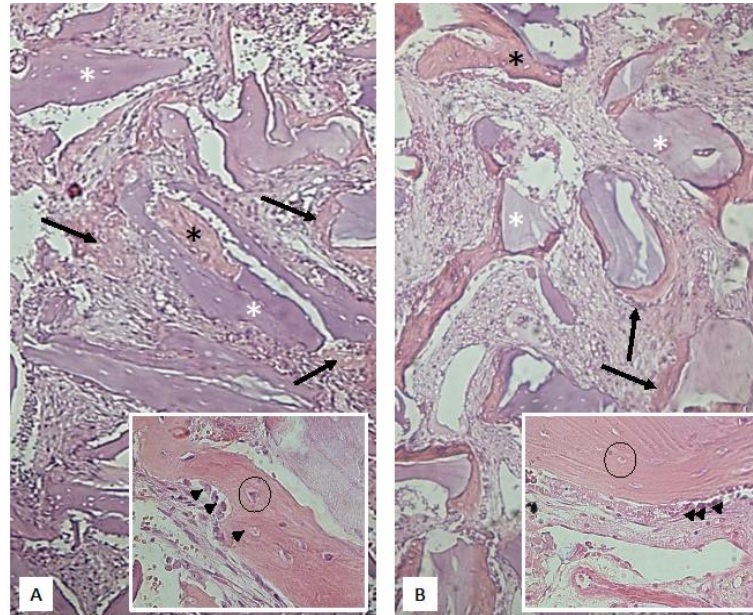


Figure 6: (A) bone sample after two months and (B) bone sample after six months, in which we observed bone neoformation (arrows) mainly around the grafted particles (white asterisk). Bone borders without presence of inflammatory reaction (black asterisk). Hematoxylin and eosin. Original magnification 250X. In the details, bone viability. Osteoblasts (arrow heads) and osteocytes in gaps in the mineralized matrix (circle). Hematoxylin and eosin. Original magnification 400X.

Statistical Analysis

A significant difference ($p = 0.007$) was found between the amount of newly formed bone in the TG and CG, as shown in Table 4 .

Table 4: Amount of newly formed bone in the TG and CG

	Mean*	N	Standard deviation	t	p
Newly formed bone (TG – 2 months)	4829,3	6	2702,4	-4,397	0,007
Newly formed bone (CG – 6 months)	6265,6	6	3235,7		

* The value of the means was expressed in square micrometers

DISCUSSION

Maxillary sinus floor lift procedures using bovine heterogenous grafts that were performed in patients in this investigation produced satisfactory results, providing an ideal amount of bone for implant installation, since there was new bone formation as observed in the histopathological analysis. This fact corroborates Nevins et al²¹ statements that contemporary grafting techniques are effective in reestablishing the adequate amount of bone for implant installation, and Artzi et al²² statements that the maxillary sinus floor lift procedure produces predictable results both with the use of autogenous bone and another bone substitute.

Jardelino et al⁵ emphasize the biocompatibility of anorganic bovine bone, a fact that can be observed in this investigation in which no inflammatory reaction was seen in any bone samples, both from the TG and the CG. However, in a study by Simonek et al²³, ten patients underwent a maxillary sinus floor lift procedure with this same type of graft and, nine months later, areas of inflammatory reaction were evidenced in some samples.

When implant installation is not possible in the same surgical stage of the maxillary sinus floor lift procedure, a waiting period, which may vary from six to nine months, is required for heterogenous graft maturation^{3,13,24}. However, even though a statistically significant difference was found between the amount of newly formed bone both in the CG and the TG in this study, TG implants were installed after two months with a torque ≥ 30 N/cm in five patients (71.4%). These data suggest that even at the primary bone repair (immature bone) stage, the bone has a favorable structure to provide the implant with satisfactory primary stability. Descriptive histopathological analysis revealed similarities between the groups, such as the presence of an osteogenic membrane with deposition activity without mineralization, formation of trabecular bone in most patients from both groups, and the absence of areas of mature bone with haversian systems in all samples from both groups.

The two patients (28.6%) who had a torque < 30 N/cm at two months also achieved this value for implants installed at six months, showing that there may be no advantage in waiting six months for graft maturation, since 100% of patients had an equal torque (< 30 N/cm or ≥ 30 N/cm) at both two and six months.

The minimum torque to achieve primary stability is not defined in the literature¹⁹. According to Sivoletta et al²⁵, the installation torque is not a determinant to achieve osseointegration, whereas the absence of implant micromovement is. We decided to establish a value of ≥ 30 N/cm as satisfactory, because according to Greenstein and Cavallaro¹⁹, this value also allows immediate implant loading. The usually adopted values range from 20 N/cm to 45 N/cm²⁶. So, even implants that did not reach a torque of 30 N/cm may have a satisfactory osseointegration.

The histopathological analysis of a patient did not reveal new bone formation in any of the analyzed periods (two and six months). In the statistical analysis of the amount of new bone formation, this patient was considered as missing data. During implant installation, both in the TG (two months) and the CG (six months), installation torque was < 30 N/cm, which can be justified by the absence of bone. This patient is female and 68 years old, which may explain the lack of bone formation, as some studies indicate that the decrease in estrogen levels changes both the remodeling process and bone repair²⁷. During anamnesis, this patient did not report any hormone replacement therapy.

Bone tissue is continually remodeled through an ordered sequence of exchange (immature bone) activities of primary tissue with secondary tissue (mature bone)¹⁵. This exchange was verified by HE staining histopathological analysis. In the TG, areas of immature bone were observed which is characterized by a trabecular aspect with the presence of osteoblasts, young osteocytes and neovascularization. On the other hand, the newly formed

bone in the CG already had a more organized structure and the presence of older osteoblasts and osteocytes. In addition, there was a bone gain of 34.6% between the groups.

When bone tissue undergoes mechanical and thermal trauma from implanting, for example, a process of bone remodeling is initiated. Simultaneously with clot formation, the traumatized tissue undergoes necrosis, stimulating a severe inflammatory response, characterized by vasodilation, plasma, leukocytes and mesenchymal cell exudation. After revascularization, reabsorption of the mature (lamellar) bone occurs followed by its replacement with an immature trabecular bone. This newly formed bone will only be replaced with a lamellar bone in the future^{28,29}. Therefore, we decided to install TG implants in the still immature bone (two months) in order to decrease treatment time, with the justification that it would not be necessary to wait for (lamellar) bone maturation since, after implant placement, it will undergo a resorption process and give room to newly formed immature bone. Thus, installing the implant two months (not six months) after the grafting procedure would allow shortening patient treatment in four months.

The graft incorporation process can be divided into stages: the first is the clot arrangement stage which begins soon after suturing; in the following hours, the inflammatory stage begins with intense vascular proliferation around the graft and concomitant resorption from the periphery of the graft; the third stage is revascularization, in which the newly formed vessels penetrate the graft, populating it with cells with osteogenic potential; in the fourth and final stage – the new bone formation stage itself – osteoclasts will reabsorb portions of the graft, while osteoblasts will promote the deposition of newly formed bone tissue, which is a process that extends to three to six months, at the end of which the graft is ready to receive the implants³⁰. Bone tissue, when injured (by surgical procedures or otherwise), reinitiates the inflammatory stage, followed by repair and remodeling. Because of this, it may not be justifiable to await bone tissue maturation to install the implants, since from the moment a

surgical trauma occurs, a cascade of events begins to reabsorb lamellar bone and form immature bone. This, in turn, will go through the entire modeling process until it becomes lamellar bone again.

This ability of the bone to regenerate successfully depends on a few factors, such as adequate blood supply. Vasodilation of pre-existing vessels and formation of new vessels (neovascularization) provide sufficient blood supply to the nutritional demand from the regeneration process³¹. Vascular growth within the graft precedes bone formation and is necessary throughout the process³². In both investigated groups, we can observe the presence of vascularization, indicating the viability of the bone tissue.

In studies by Butz et al³³ and Di Stefano et al¹¹ there was a high success rate of implants installed in the initial stages of new bone formation (three and two months, respectively). However, these authors used a heterogeneous type graft that preserves type I collagen. Another study that points out the success of early installed implants is that of Felice et al³⁴. These authors also used anorganic bovine bone for maxillary sinus floor lift (alveolar ridge height of 1-3 mm) and found no statistical difference in the survival rate of implants installed at the same time as the grafting procedure or four months later. Differently from what was done in these studies, osseointegration of implants installed in the present study was not evaluated, but it can be seen that primary stability, including of those installed at two months (TG), was not compromised, even though pure anorganic bovine bone was used.

According to Di Stefano et al¹¹, the results of their studies and the work of Felice et al³⁴ suggest that late implant installation may not provide clinical advantages in terms of implant success or survival rate, at least in short and medium observation periods. Considering the results of this research, we concluded that there was a statistical difference in the newly formed bone rate in the two- and six-month periods after the anorganic bovine bone grafting procedure, but there was no impairment in the primary stability of implants installed in the TG.

REFERENCES

- 1 - Smiler, D., Soltan, M. **The bone-grafting decision tree: a systematic methodology for achieving new bone.** *Implant Dent.* 2006; 15:122-128.
- 2 - Boyne, P.J., James, R.A. **Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone.** *J Oral Surg.* 1980; 38:613-616.
- 3 - Esposito, M., Piattelli, M., Pistilli, R., Pellegrino, G., Felice, P. **Sinus lift with guided bone regeneration or anorganic bovine bone: 1-year post-loading results of a pilot randomised clinical trial.** *Eur J Oral Implantol.* 2010; 3:297–305.
- 4 - Wu, J., Li, B., Lin, X. **Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 45:1471-1477.
- 5 - Jardelino, C.L., Takamori, E.R., Santos, S.R.A., Rossi, A.M., Granjeiro, J.M. **Biocompatibility of bovine anorganic xenograft.** *Key Eng Mater.* 396:3-6, 2009.
- 6 - Lee, D.Z., Chen, S.T., Darby, I.B. **Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study.** *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:918-924.
- 7 - Rickert, D., Slater, J.J., Meijer, H.J., Vissink, A., Raghoobar, 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.* 2012; 41:160-167.
- 8 - Choi, S.Y., Jang, Y.J., Choi, J.Y., Jeong, J.H., Kwon, T.G. **Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes.** *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24:68-74.
- 9 - Jensen, S.S., Aaboe, M., Janner, S.F., Saulacic, N., Bornstein, M.M., Bosshardt, D.D., Buser, D. **Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: a histomorphometric study in minipigs.** *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17:274-285.
- 10 - Soydan, S.S., Cubuk, S., Bayrak, B., Uckan, S. **Comparative evaluation of simultaneous maxillary sinus floor elevation and implant placement with residual bone heights greater or less than 5 mm.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015; 30:179-183.
- 11 - Di Stefano, D.A., Gastaldi, G., Vinci, R., Polizzi, E.M., Cinci, L., Pieri, L., Gherlone, E. **Bone formation following sinus augmentation with an equine-derived bone graft: a retrospective histologic and histomorphometric study with 36 month follow-up.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016; 31:406-412.
- 12 - Wang, F., Zhou, W., Monje, A., Huang, W., Wang, Y., Wu, Y. **Influence of healing period upon bone turn over on maxillary sinus floor augmentation grafted solely with deproteinized bovine bone mineral: a prospective human histological and clinical trial.** *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017; 19:341-350

- 13 - Cabbar, F., Güler, N., Kürkcü, M., Iseri, U., Sençift, K. **The effect of bovine bone graft with or without platelet-rich plasma on maxillary sinus floor augmentation.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69:2537-2547.
- 14 - Xavier, S.P., Santos, T.S., Sehn, F.P., Silva, E.R., Garcez-Filho, J.A., Martins-Filho, P.R. **Maxillary sinus grafting with fresh frozen allograft versus bovine bone mineral: a tomographic and histological study.** *J Craniomaxillofac Surg.* 2016; 44:708-714.
- 15 - Misch, C.E., Dietsh, F. **Bone-grafting materials in implant dentistry.** *Implant Dent.* 1993; 2:158-167.
- 16 - Handschel, J., Simonowska, M., Naujoks, C., Naujoks, C., Depprich, R.A., Ommerborn, M.A., Meyer, U., Kübler, N.R. **A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials.** *Head Face Med.* 2009; 5:12.
- 17 - Iwaniec, U.T., Wronski, T.J., Turner, R.T. **Histological analysis of bone.** *Methods Mol Biol.* 2008; 447:325-341.
- 18 - Timm, L.L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.** *Caderno La Salle XI.* 2005; 2:231-239.
- 19 - Greenstein, G., Cavallaro, J. **Implant insertion torque: its role in achieving primary stability of restorable dental implants.** *Compend Contin Educ Dent.* 2017; 38:88-95.
- 20 - Allen, T.C. **Hematoxylin and eosin.** In: Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. *Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory methods in histotechnology.* 3ed. Washington, D.C.: American Registry of Pathology; 1994. 53-58.
- 21 - Nevins, M., Camelo, M., De Angelis, N., Hanratty, J.J., Khang, W.G., Kwon, J.J., Rasperini, G., Rocchietta, I., Schupbach, P., Kim, D.M. **The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor argumentation.** *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011; 31:227-235.
- 22 - Artzi, Z., Nemcowsky, C.E., Tal, H. **Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review.** *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21:395-405.
- 23 - Simunek, A., Kopecka, D., Somanathan, R.V., Pilathadka, S., Brazda, T. **Deproteinized bovine bone versus B - tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23:935-942.
- 24 - Meloni, S.M., Jovanovic, S.A., Lollib, F.M., Cassisa, C., De Riu, G., Pisano, M., Lumbau, A., Lugliè, P.F., Tullio, A. **Grafting after sinus lift with anorganic bovine bone alone compared with 50:50 anorganic bovine bone and autologous bone: results of a pilot randomised trial at one year.** *British J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53:436-441.
- 25 - Sivoilella, S., Bressan, E., Salata, L.A., Urrutia, Z.A., Lang, N.P., Botticelli, D. **Osteogenesis at implants without primary bone contact – an experimental study in dogs.** *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:542-549.

- 26 - Benic, G.I., Mir-Mari, J., Hämmerle, C.H. **Loading protocols for single-implant crowns: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014; 29(suppl)222-238.
- 27 - Suda, T., Nakamura, I., Jimi, E., Takahashi, N. **Regulation of osteoclast function.** *J Bone Miner Res.* 1997; 12:869-879.
- 28 - 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.* 1984; 86:95-111.
- 29 - Pattijn, V., Jaecques, S.V., De Smet, E., Muraru, L., Van Lierde, C., Van der Perre, G., Naert, I., Vander Sloten, J. **Resonance frequency analysis of implants in the guinea pig model: influence of boundary conditions and orientation of the transducer.** *Med Eng Phys.* 2007; 29:182-190.
- 30 - Goldberg, V.M., Stevenson, S. **Natural history of autografts and allografts.** *Clin Orthop Relat Res.* 1987; (225):7-16.
- 31 - Hing, K.A., Best, S.M., Tanner, K.E., Bonfield, W., Revell, P.A. **Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes.** *J Biomed Mater Res A.* 2004; 68:187-200.
- 32 - Eckardt, H., Ding, M., Lind, M. **Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model.** *J Bone Joint Surg Br.* 2005; 87:1434-1438.
- 33 - Butz, F., Bachle, M., Ofer, M., Marquardt, K., Kohal, R.J. **Sinus augmentation with bovine hydroxyapatite/synthetic peptide in a sodium hyaluronate carrier (PepGen P-15 Putty): a clinical investigation of different healing times.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26:1317-1323.
- 34 - Felice, P., Pistilli, R., Piattelli, M., Soardi, E., Pellegrino, G., Corvino, V., Esposito, M. **1-stage versus 2-stage lateral maxillary sinus lift procedures: 4-month post-loading results of a multicenter randomised controlled trial.** *Eur J Oral Implantol.* 2013; 6:153-165.

5 ARTIGO

Avaliação da Estabilidade Primária dos Implantes Instalados em Diferentes Estágios da Maturação Óssea Após Procedimento de Levantamento do Soalho do Seio Maxilar com Osso Bovino Anorgânico: Análise Clínica e Histoquímica

RESUMO

Esta pesquisa avaliou, por meio de análise clínica e histoquímica, a estabilidade primária dos implantes instalados em regiões de enxerto heterógeno bovino utilizado no levantamento do soalho do seio maxilar nos períodos de dois e seis meses após a enxertia, a fim de verificar a possibilidade de instalação de implantes no período de reparo ósseo primário. O estudo foi composto por sete pacientes. O mesmo paciente fez parte dos dois grupos analisados, sendo considerados os lados direito ou esquerdo (GT = grupo teste; avaliação do enxerto com dois meses) e esquerdo ou direito (GC = grupo controle; avaliação do enxerto com seis meses). A análise histoquímica revelou a presença de colágeno tipo I e tipo III tanto no GT como no GC. A análise estatística apontou que houve diferença significativa entre a quantidade de colágeno tipo I ($p = 0,002$) e tipo III ($p = 0,014$) no GT e no GC. Clinicamente, não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT (dois meses). Concluiu-se que o osso bovino anorgânico apresenta estrutura para fornecer ao implante uma estabilidade primária satisfatória tanto no período de maturação (seis meses) como no período de incorporação óssea (dois meses).

Palavras-chave: colágeno; enxerto ósseo; implantes dentários; imuno-histoquímica; osseointegração.

INTRODUÇÃO

A elevação do soalho do seio maxilar é um procedimento cirúrgico previsível que tem a finalidade de reabilitar áreas edêntulas da região posterior da maxila que apresentam reabsorções ósseas¹. Esse procedimento, segundo técnica publicada por Boyne e James², consiste em localizar, divulsionar e reposicionar a membrana de Schneider através do acesso da parede lateral do seio maxilar e preencher o espaço criado com enxerto ósseo³.

O osso autógeno é considerado padrão-ouro entre os materiais de enxertia, uma vez que contém células ósseas ativas e fatores de crescimento que têm a capacidade de promover a regeneração óssea⁴. Contudo, uma cirurgia adicional para remover o enxerto é necessária, o que aumenta a morbidade e o risco de complicações operatórias. Enxertos heterógenos, alógenos e aloplásticos podem ser usados para evitar as desvantagens relacionadas ao tecido autógeno^{5,6}.

Estudos clínicos em humanos têm relatado bons resultados no procedimento de levantamento do soalho do seio maxilar utilizando, apenas, o osso bovino anorgânico⁷⁻¹³. Esse tipo de enxerto heterógeno possui estrutura semelhante ao osso medular humano, tanto em sua estrutura quanto em sua composição mineral¹⁴. Possui uma estrutura constituída por uma superfície ultraporosa e um sistema de poros interconectados, que funciona como uma microesponja, proporcionando a entrada de células sanguíneas, osteoblastos, osteoclastos e proteínas em suas partículas, permitindo, assim, a osseointegração eficaz de suas partículas¹⁵.

Os procedimentos de enxertia óssea no seio maxilar e instalação de implantes podem ser realizados em uma ou em duas etapas cirúrgicas, dependendo da altura do remanescente ósseo. Rebordos alveolares com menos de 4 mm de altura são considerados inadequados para a instalação imediata dos implantes, pois não oferecem condições para que haja estabilidade primária satisfatória⁸. Nesses casos, é necessário um período de espera entre o procedimento de enxertia e a instalação dos implantes de, aproximadamente, seis meses para que haja a maturação do enxerto^{3, 16, 17}, o que prolonga o tempo de tratamento do paciente.

De acordo com a organização e o amadurecimento dos elementos que constituem o tecido ósseo, este pode ser classificado em: tecido ósseo primário (osso imaturo) e tecido ósseo secundário (osso lamelar ou maduro). No tecido primário, as fibras colágenas estão dispostas aleatoriamente, sem orientação definida, havendo uma menor quantidade de minerais, o que confere a esse tecido menor resistência quando comparado ao outro. No tecido secundário, o osso já apresenta estrutura colágena mineralizada e de forma organizada, com a estrutura lamelar dos sistemas haversianos, sendo capaz de suportar forças funcionais¹⁸. A coloração histoquímica pelo *picrosirius red* é um método utilizado para avaliar o amadurecimento do colágeno da matriz extracelular, diferenciando o tipo maduro do tipo imaturo¹⁹.

A presente pesquisa avaliou, por meio de análise clínica e histoquímica, a estabilidade primária dos implantes instalados em regiões de enxerto heterógeno bovino utilizado no levantamento do soalho do seio maxilar nos períodos de dois e seis meses após a enxertia, a fim de verificar a possibilidade de instalação de implantes no período de reparo ósseo primário para otimizar o tempo de tratamento do paciente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer nº. 1.397.315.

Seleção da Amostra

Critérios de inclusão: paciente desdentado posterior bilateral com altura do rebordo remanescente < 4 mm entre a crista óssea alveolar e o assoalho do seio maxilar.

Critérios de exclusão: pacientes que apresentavam doença sistêmica; pacientes tabagistas; pacientes que apresentavam patologia em região de seio maxilar; pacientes submetidos a procedimentos de enxertia prévia na região a ser operada; pacientes que não seguiram as orientações pós-operatórias; pacientes que apresentaram complicações trans e/ou pós-operatórias; pacientes que não deram continuidade ao tratamento.

Estabelecimento dos Grupos

Trata-se de um ensaio clínico duplo-cego e caracterizado por um estudo intervencional e prospectivo. O mesmo paciente fez parte dos dois grupos da pesquisa, pois o procedimento de elevação do soalho do seio maxilar foi bilateral, sendo considerados, de forma cega, os lados direito ou esquerdo (GT = grupo teste; avaliação da incorporação do enxerto com dois meses) e esquerdo ou direito (GC = grupo controle; avaliação da maturação do enxerto com seis meses).

Etapas Cirúrgicas

Primeira etapa – Levantamento do soalho do seio maxilar e preenchimento com enxerto heterólogo bovino:

Essa etapa foi realizada de acordo com a técnica cirúrgica descrita por Boyne e James² (Figura 1 e Figura 2). O tipo de enxerto utilizado foi o osso bovino anorgânico de granulação fina (300 µm a 425 µm).



Figura 1: osteotomias realizadas até a exposição da membrana do seio maxilar. Fonte: autor.

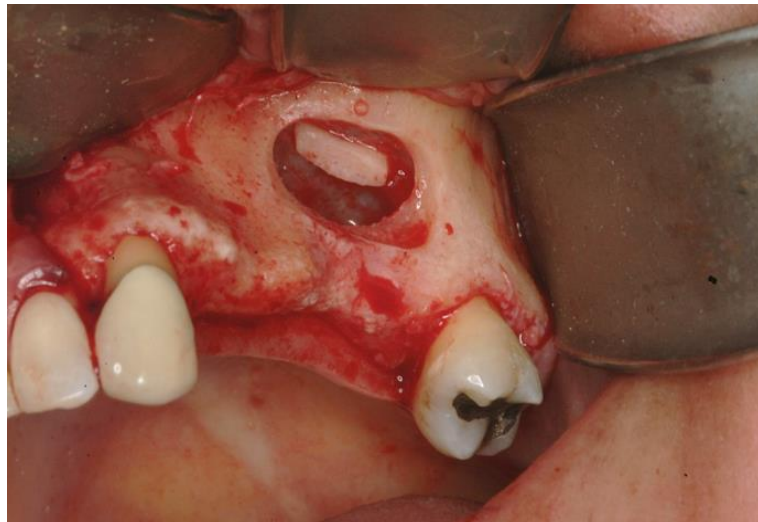


Figura 2: após descolada, a membrana foi elevada, criando-se um novo soalho para o seio maxilar. Fonte: autor.

Segunda etapa – Coleta de amostra óssea e inserção dos implantes:

No GT, a segunda etapa cirúrgica foi realizada após dois meses do procedimento de levantamento do soalho do seio maxilar (período de incorporação óssea), enquanto que no GC essa etapa foi realizada após seis meses (período de maturação óssea).

Um fragmento ósseo de 4 mm de comprimento foi retirado com auxílio de uma broca trefina de 2 mm de diâmetro interno (Figura 3) e, imediatamente, armazenado em um recipiente

com formalina a 4% para que fosse realizado o processamento da amostra, conforme descrito por Timm²⁰, e posterior estudo histopatológico da área que recebeu o enxerto.



Figura 3: broca trefina utilizada para obtenção das amostras ósseas.
Fonte: autor.

A amostra óssea foi removida no sentido perpendicular à parede lateral da maxila para garantir uma padronização do comprimento de todos os fragmentos retirados (Figura 4). Seguiu-se com a instrumentação para a instalação dos implantes, de acordo com a preconização do fabricante do sistema de implante (Conexão Sistemas de Prótese®).



Figura 4: amostra óssea sendo removida no sentido perpendicular à parede lateral da maxila. Fonte: elaborada pelo autor.

Análise Clínica

A análise clínica foi realizada durante a inserção dos implantes (segunda etapa cirúrgica) por meio da avaliação do valor do torque que foi medido pelo torquímetro manual presente no sistema de implante (Figura 5). O valor foi considerado satisfatório se fosse ≥ 30 N/cm, valor este indicado para carregamento imediato dos implantes²¹, mesmo os implantes do presente trabalho não tendo sido submetidos à carga imediata. Avaliou-se também, através de análise comparativa, os torques dos implantes instalados no GT e GC no mesmo paciente, sendo especificamente: toque igual ou diferente.



Figura 5: torquímetro manual (Conexão Sistemas de Prótese®). Fonte: autor.

Processamento das Amostras e Análise Histopatológica

Após obtenção, as amostras ósseas foram, imediatamente, fixadas em formalina a 4% e submetidas ao processamento histológico de rotina de acordo com Timm²⁰. O material embocado em parafina foi submetido à microtomia, em sentido longitudinal, de 5 µm de espessura.

Os cortes foram submetidos à reação histoquímica de *picrosirius red*, de acordo com a técnica descrita por Junqueira²², para observação do amadurecimento da matriz colagenosa, na qual os feixes (colágeno tipo I) são evidenciados por margem vermelha brilhante contra fundo escuro e as fibrilas (colágeno tipo III) são evidenciadas por margem amarelo esverdeada contra fundo escuro.

As amostras foram, ainda, digitalizadas em toda sua extensão (AxioCam acoplada em microscópio Zeiss, Alemanha) e submetidas à histomorfometria automática para quantificação de áreas de fibrilas e fibras de colágeno por meio do software Zen2012 (Zeiss, Alemanha).

Análise Estatística

Realizou-se uma análise de identificação de pontos discrepantes (*outliers*) através de análise gráfica (diagrama de Tukey). Após identificados, esses pontos foram excluídos. Para identificar as diferenças entre GT e GC, foi empregado o teste *t de Student* para dados pareados. Para se correlatar as medidas do GT e do GC, foi empregado o coeficiente de correlação de *Pearson*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Foi empregado o *software* estatístico SPSS versão 13.0. Os dados foram descritos utilizando-se médias, desvio-padrão, mínimo e máximo.

RESULTADOS

Seleção da Amostra

De acordo com os critérios de inclusão adotados, 14 pacientes foram selecionados para compor a amostra. Destes, dois apresentavam doença sistêmica e quatro não deram continuidade ao tratamento, sendo excluídos da pesquisa. Assim, o estudo foi composto, inicialmente, por oito pacientes. Durante a análise estatística, observou-se um paciente *outlier* que foi excluído para não interferir nos resultados. Dessa forma, O GT foi composto por uma amostra de $n =$ sete (GT1, GT2, GT3 até GT7) assim como o GC (GC1, GC2, GC3 até GC7).

Análise Clínica

Todos os implantes instalados no GT apresentaram valor de torque igual ao dos implantes instalados no GC, sendo: 28,6% obtiveram toque < 30 N/cm e 71,4% apresentaram torque ≥ 30 N/cm. Portanto, 71,4% dos implantes do GT e 71,4% dos implantes do GC apresentaram estabilidade primária considerada satisfatória (Tabela 1). As especificações dos implantes instalados em cada grupo estão listadas na Tabela 2.

Tabela 1: Torque dos implantes instalados aos dois meses e aos seis meses

Torque (N/cm)		< 30 N/cm		≥ 30 N/cm	
Tempo		2 meses	6 meses	2 meses	6 meses
Paciente					
1				X	X
2		X	X		
3				X	X
4				X	X
5		X	X		
6				X	X
7				X	X

Tabela 2: Especificações dos implantes instalados em cada grupo

GRUPOS/PACIENTES	IMPLANTES
GT1 (2 meses)	Um implante 5 x 13 mm
GC1 (6 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GT2 (2 meses)	Um implante 5 x 13 mm
GC2 (6 meses)	Um implante 5 x 13 mm
GT3 (2 meses)	Um implante 3,5 x 10 mm
GC3 (6 meses)	Um implante 3,5 x 10 mm
GT4 (2 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GC4 (6 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GT5 (2 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GC5 (6 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GT6 (2 meses)	Um implante 3,75 x 10 mm
GC6 (6 meses)	Um implante 3,5 x 10 mm
GT7 (2 meses)	Um implante 3,5 x 10 mm
GC7 (6 meses)	Um implante 3,5 x 10 mm

Análise Histoquímica

Foi possível observar a presença de colágeno tipo I e tipo III em ambos os grupos. A quantidade de colágeno tipo III diminuiu (-41,7%) do GT para o GC, enquanto a quantidade de colágeno tipo I aumentou (136,8%). Aos seis meses, foi observada melhor organização e espessamento dos feixes em toda a extensão da amostra. A coloração vermelha, que indica a presença de colágeno tipo I, também se mostrou mais homogênea aos seis meses (Figura 6).

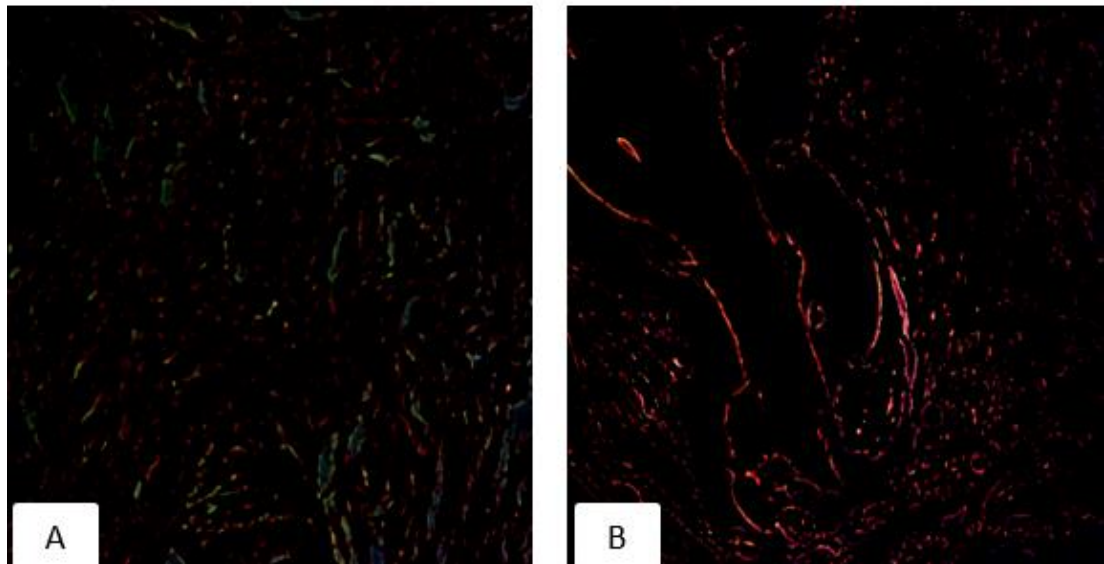


Figura 6: (A) amostra após dois meses. Área de neoformação óssea evidenciando predomínio de fibrilas (colágeno tipo III) na matriz extracelular. Coloração histoquímica de *picrosirius red*. Aumento original 400X. (B) amostra após seis meses. Área de neoformação óssea evidenciando predomínio de feixes (colágeno tipo I) na matriz extracelular. Coloração histoquímica de *picrosirius red*. Aumento original 400X.

Análise Estatística

Foi encontrada diferença significativa entre a quantidade de colágeno tipo I ($p = 0,002$) e tipo III ($p = 0,014$) no GT e no GC (Tabela 3).

Tabela 3: Médias e diferenças estatísticas da quantidade de colágeno tipo I e tipo III no GT e no GT

	Média*	N	Desvio-padrão	t	p – valor
Quantidade de colágeno tipo I aos dois meses (GT)	2,6	7	1,4	-5,378	0,002
Quantidade de colágeno tipo I aos seis meses (GC)	4,9	7	1,6		
Quantidade de colágeno tipo III aos dois meses (GT)	1,3	7	0,8	3,430	0,014
Quantidade de colágeno tipo III aos seis meses (GC)	0,7	7	0,5		

*O valor das médias foi expresso em micrômetros quadrados

DISCUSSÃO

A coloração histoquímica de *picrosirius red* permite uma análise qualitativa do colágeno, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados. Diferencia, principalmente, o colágeno tipo I (colágeno maduro), que se apresenta como feixes mais grossos, altamente birrefringentes e na cor vermelha, do colágeno tipo III (colágeno imaturo), que se apresenta em fibrilas finas, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado¹⁹, afirmações estas que corroboram com os achados do presente estudo, no qual foi encontrada maior quantidade de colágeno tipo III (cor amarelo-esverdeado) no GT (dois meses) e maior quantidade de colágeno tipo I (cor vermelha) no GC (seis meses), mostrando que quanto maior o amadurecimento do tecido ósseo, maior quantidade de colágeno tipo I e menor quantidade de colágeno tipo III.

De acordo com a sua constituição, o tecido ósseo pode ser classificado como primário (imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). O osso imaturo é o primeiro a ser formado e é, gradualmente, substituído pelo osso maduro. Possui maior quantidade de células, é pouco mineralizado e apresenta fibras colágenas sem organização definida. Por outro lado, o tecido ósseo secundário é mais calcificado e possui as fibras colágenas dispostas paralelamente, em lamelas, de forma mais organizada, tornando a matriz óssea mais resistente. No tecido ósseo secundário, as lamelas podem ser depositadas em camadas concêntricas a partir da periferia das trabéculas ósseas até alcançar o vaso sanguíneo, formando o sistema de Havers (ou ósteon)¹⁸. Comparando as características histoquímicas encontradas nos dois grupos do presente estudo, observa-se que no GC as fibras colágenas apresentam uma disposição mais organizada do que a encontrada no GT, corroborando com as afirmativas de Misch e Dietsh¹⁸. Porém, mesmo nas amostras do GC não havia as camadas concêntricas, o que sugere que o osso neoformado aos seis meses ainda não se apresentava completamente maduro, mantendo algumas características similares ao osso neoformado com dois meses.

Há estudos que afirmam que quando a instalação do implante não é possível na mesma etapa cirúrgica do procedimento de levantamento do soalho do seio maxilar, um período de espera entre seis a nove meses é necessário para que ocorra a maturação do enxerto heterógeno^{3, 16, 23}. Porém, a instalação dos implantes do GT desta pesquisa foi feita após dois meses, com o valor do torque ≥ 30 N/cm em cinco pacientes (71,4%). Os dois pacientes (28,6%) que apresentaram torque < 30 N/cm aos dois meses também obtiveram esse valor para os implantes instalados aos seis meses, mostrando que talvez não exista vantagem em aguardar os seis meses de maturação do enxerto, visto que 100% dos pacientes apresentaram torque igual (< 30 N/cm ou ≥ 30 N/cm) tanto aos dois meses quanto aos seis meses.

Nos estudos de Di Stefano et al¹² e Butz et al²⁴ houve alta taxa de sucesso dos implantes instalados em estágios iniciais da neoformação óssea (três e dois meses, respectivamente). Porém, esses autores utilizaram um tipo de enxerto heterógeno que preserva o colágeno tipo I, responsável pela migração celular, diferenciação e proliferação. Diferentemente do que foi feito nesses estudos, a osseointegração dos implantes instalados na presente pesquisa não foi avaliada, mas pode-se perceber que a estabilidade primária (fator considerado importante para se obter osseointegração²¹) inclusive dos que foram instalados aos dois meses (GT), não ficou comprometida, mesmo tendo sido usado osso bovino anorgânico puro.

Talvez, a estabilidade primária tenha sido satisfatória mesmo no GT, pois já havia, aos dois meses, presença de colágeno tipo I e não só do tipo III. Assim, a matriz extracelular já teria um certo grau de amadurecimento, possibilitando a instalação dos implantes de maneira satisfatória. Porém, segundo Cheung et al²⁵, o colágeno tipo III fornece resistência mecânica para a matriz recém-sintetizada e acredita-se que a presença deste é uma ótima vantagem durante a reparação tecidual devido à sua habilidade de promover uma estabilização inicial da ferida²⁶, o que também poderia explicar a estabilidade primária satisfatória dos implantes instalados aos dois meses.

Há autores que defendem que um papel crítico do colágeno tipo III no desenvolvimento e na reparação óssea é a sua exigência pela aceleração do crescimento de osteoblastos²⁷ e que este tipo de colágeno é responsável por regular a osteoblastogênese²⁸. Na fase de reparação óssea, uma matriz de colágeno tipo III é secretada ao longo da superfície periosteal, servindo como um substrato para a migração de células osteoprogenitoras e crescimento capilar²⁹. Assim, a instalação dos implantes ainda no osso imaturo (no qual há maior quantidade de colágeno tipo III) talvez traga benefícios, visto que pode haver uma maior interação dessas células com a superfície do implante, o que favoreceria a osseointegração.

Esse tipo de colágeno também é apontado como tendo capacidade de aumentar a angiogênese, evento este essencial no desenvolvimento e reparo do tecido³⁰. No local do reparo ósseo, osteoblastos e células osteoprogenitoras estão localizadas adjacentes as células endoteliais nos vasos sanguíneos, sugerindo que a angiogênese e a osteogênese são mutuamente dependentes³¹. É possível, então, que a presença do colágeno tipo III durante o período inicial de osseointegração dos implantes seja vantajosa, pois segundo Davies³², uma maior vascularização torna o processo de reparação óssea mais acelerado.

Diante dos resultados da presente pesquisa, foi possível concluir que, apesar de o osso neoformado se mostrar mais maduro aos seis meses (maior quantidade de colágeno tipo I do que aos dois meses), não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT.

REFERÊNCIAS

- 1 - Esposito, M., Felice, P., Worthington, H.V. **Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 5:CD008397.
- 2 - Boyne, P.J., James, R.A. **Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone.** *J Oral Surg.* 1980; 38:613-616.

- 3 - Esposito, M., Piattelli, M., Pistilli, R., Pellegrino, G., Felice, P. **Sinus lift with guided bone regeneration or anorganic bovine bone: 1-year post-loading results of a pilot randomised clinical trial.** *Eur J Oral Implantol.* 2010; 3:297–305.
- 4 – Misch, C.M. **Maxillary autogenous bone grafting.** *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2011; 23:229-238.
- 5 - Danesh-Sani, S.A., Engebretson, S.P., Janal, M.H. **Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis.** *J Periodontal Res.* 2017; 52:301-312.
- 6 - Wu, J., Li, B., Lin, X. **Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis.** *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 45:1471-1477.
- 7 - Lee, D.Z., Chen, S.T., Darby, I.B. **Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study.** *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:918-924.
- 8 - Rickert, D., Slater, J.J., Meijer, H.J., Vissink, A., Raghoobar, 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.* 2012; 41:160-167.
- 9 - Choi, S.Y., Jang, Y.J., Choi, J.Y., Jeong, J.H., Kwon, T.G. **Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes.** *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24:68-74.
- 10 - Jensen, S.S., Aaboe, M., Janner, S.F., Saulacic, N., Bornstein, M.M., Bosshardt, D.D., Buser, D. **Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: a histomorphometric study in minipigs.** *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17:274-285.
- 11 - Soydan, S.S., Cubuk, S., Bayrak, B., Uckan, S. **Comparative evaluation of simultaneous maxillary sinus floor elevation and implant placement with residual bone heights greater or less than 5 mm.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015; 30:179-183.
- 12 - Di Stefano, D.A., Gastaldi, G., Vinci, R., Polizzi, E.M., Cinci, L., Pieri, L., Gherlone, E. **Bone formation following sinus augmentation with an equine-derived bone graft: a retrospective histologic and histomorphometric study with 36 month follow-up.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016; 31:406-412.
- 13 – Wang, F., Zhou, W., Monje, A., Huang, W., Wang, Y., Wu, Y. **Influence of healing period upon bone turn over on maxillary sinus floor augmentation grafted solely with deproteinized bovine bone mineral: a prospective human histological and clinical trial.** *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017; 19:341-350.
- 14 - Gutwald, R., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Kister, C., Lysek, D.A., Maglione, M., Xavier, S.P., Oshima, T., Schmelzeisen, R., Sauerbier, S. **Mesenchymal stem cells and**

- inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep.** *Brit J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 48:285-290.
- 15 - Jang, H.Y., Kim, H.C., Lee, S.C., Lee, J.Y. **Choice of graft material in relation to maxillary sinus width in internal sinus floor augmentation.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68:1859-1868.
- 16 - Cabbar, F., Güler, N., Kürkcü, M., Iseri, U., Sençift, K. **The effect of bovine bone graft with or without platelet-rich plasma on maxillary sinus floor augmentation.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69:2537-2547.
- 17 - Xavier, S.P., Santos, T.S., Sehn, F.P., Silva, E.R., Garcez-Filho, J.A., Martins-Filho, P.R. **Maxillary sinus grafting with fresh frozen allograft versus bovine bone mineral: a tomographic and histological study.** *J Craniomaxillofac Surg.* 2016; 44:708-714.
- 18 - Misch, C.E., Dietsch, F. **Bone-grafting materials in implant dentistry.** *Implant Dent.* 1993; 2:158-167.
- 19 - Junqueira, L.C.U., Montes, G.S., Sanchez, E.M. **The influence of thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method.** *Histochemistry.* 1982; 74:153-156.
- 20 - Timm, L.L. *Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. Caderno La Salle XI.* 2005; 2:231-239.
- 21 - Greenstein, G., Cavallaro, J. **Implant insertion torque: its role in achieving primary stability of restorable dental implants.** *Compend Contin Educ Dent.* 2017; 38:88-95.
- 22 - Junqueira, L.C., Bignolas, G., Brentani, R.R. **Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.** *Histochem J.* 1979;11:447-455.
- 23 - Meloni, S.M., Jovanovic, S.A., Lollib, F.M., Cassisa, C., De Riu, G., Pisano, M., Lumbau, A., Lugliè, P.F., Tullio, A. **Grafting after sinus lift with anorganic bovine bone alone compared with 50:50 anorganic bovine bone and autologous bone: results of a pilot randomised trial at one year.** *British J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53:436-441.
- 24 - Butz, F., Bachle, M., Ofer, M., Marquardt, K., Kohal, R.J. **Sinus augmentation with bovine hydroxyapatite/synthetic peptide in a sodium hyaluronate carrier (PepGen P-15 Putty): a clinical investigation of different healing times.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26:1317-1323.
- 25 - Cheung, D.T., DiCesare, P., Benya, P.D., Libaw, E., Nimni, M.E. **The presence of intermolecular disulfide crosslinks in type III collagen.** *J Biol Chem.* 1983; 258:7774-7778.
- 26 - Liu, S.H., Yang, R.S., Al-Shaikh, R., Lane, J.M. **Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review.** *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 318:265-278.
- 27 - Maehata, Y., Takamizawa, S., Ozawa, S., Izukuri, K., Kato, Y., Sato, S., Lee, M.C., Kimura, A., Hara, R.I. **Type III collagen is essential for growth acceleration of human**

osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. *Matrix Biol.* 2007; 26: 371-381.

28 - Volk, S.W., Shah, S.R., Cohen, A.J., Wang, Y., Brisson, B.K., Vogel, L.K., Hankenson, K.D., Adams S.L. **Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone.** *Calcif Tissue Int.* 2014; 94: 621–631.

29 - Ashhurst, D.E. **Collagen synthesized by healing fractures.** *Clin Orthop Relat Res.* 1990; 255:273-283.

30 - Street, J., Bao, M., DeGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V.Jr., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., Van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A., Filvaroff, E.H. **Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover.** *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99:9656-9661.

31 - Decker, B., Bartels, H., Decker, S. **Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic.** *Anat Rec.* 1995; 242:310-320.

32 – Davies, J.E. **Understanding peri-implant endosseous healing.** *J Dent Educ.* 2003; 67: 932-949.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de ter sido encontrada diferença significativa entre a quantidade de osso neoformado, de colágeno maduro e de colágeno imaturo no GT e no GC, não houve prejuízo na estabilidade primária dos implantes instalados no GT. Assim, neste estudo, o osso bovino anorgânico apresentou estrutura para fornecer ao implante uma estabilidade primária satisfatória tanto no período de maturação óssea (seis meses) como no período de incorporação óssea (dois meses).

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ALLEN, T. C. **Hematoxylin and eosin**. In: PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory methods in histotechnology. Washington, D. C.: American Registry of Pathology, 1994. p. 53-58.

ARTZI, Z.; NEMCOWSKY, C. E.; TAL, H. Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 21, n. 4, p. 395–405, 2001.

ASHHURST, D. E. Collagen synthesized by healing fractures. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 255, p. 273-283, 1990.

BAGHERI, S. C.; BELL, R. B.; KHAN, H. A. **Terapias atuais em cirurgia bucomaxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 1136 p.

BENIC, G. I.; MIR-MARI, J.; HÄMMERLE, C. H. Loading protocols for single-implant crowns: a systematic review and meta-analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 29, p. 222-238, 2014.

BOYNE, P. J.; JAMES, R. A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **J. Oral Surg.**, v. 38, n. 8, p. 613-616, 1980.

BUTZ, F.; BACHLE, M.; OFER, M.; MARQUARDT, K.; KOHAL, R. J. Sinus augmentation with bovine hydroxyapatite/synthetic peptide in a sodium hyaluronate carrier (PepGen P-15 Putty): a clinical investigation of different healing times. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 26, n. 6, p. 1317-1323, 2011.

CABBAR, F.; GÜLER, N.; KÜRKCÜ, M.; ISERI, U.; SENÇİFT, K. The effect of bovine bone graft with or without platelet-rich plasma on maxillary sinus floor augmentation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 69, n. 10, p. 2537-2547, 2011.

CHAN, H. L.; WANG, H. L. Sinus pathology and anatomy in relation to complications in lateral window sinus augmentation. **Implant Dent.**, v. 20, n. 6, p. 406-412, 2011.

CHEUNG, D. T.; DICESARE, P.; BENYA, P. D.; LIBAW, E.; NIMNI, M. E. The presence of intermolecular disulfide crosslinks in type III collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 12, p. 7774-7778, 1983.

CHOI, S. Y.; JANG, Y. J.; CHOI, J. Y.; JEONG, J. H.; KWON, T. G. Histomorphometric analysis of sinus augmentation using bovine bone mineral with two different resorbable membranes. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 24, p. 68-74, 2013.

DANESH-SANI, S. A.; ENGBRETSON, S. P.; JANAL, M. H. Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. **J. Periodontal Res.**, v. 52, n. 3, p. 301-312, 2017.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J. Dent. Educ.**, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.

DECKER, B.; BARTELS, H.; DECKER, S. Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. **Anat. Rec.**, v. 242, n. 3, p. 310-320, 1995.

DI STEFANO, D. A.; GASTALDI, G.; VINCI, R.; POLIZZI, E. M.; CINCI, L.; PIERI, L.; GHERLONE, E. Bone formation following sinus augmentation with an equine-derived bone graft: a retrospective histologic and histomorphometric study with 36 month follow-up. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 31, n. 2, p. 406-412, 2016.

ECKARDT, H.; DING, M.; LIND, M.; HANSEN, E. S.; CHRISTENSEN, K. S.; HVID, I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 87, n. 10, p. 1434-1438, 2005.

ESPOSITO, M.; PIATTELLI, M.; PISTILLI, R.; PELLEGRINO, G.; FELICE, P. Sinus lift with guided bone regeneration or anorganic bovine bone: 1-year post-loading results of a pilot randomised clinical trial. **Eur. J. Oral Implantol.**, v. 3, n. 4, p. 297-305, 2010.

ESPOSITO, M.; FELICE, P.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. **Cochrane Database Syst. Rev.**, 5:CD008397, 2014.

FELICE, P.; PISTILLI, R.; PIATTELLI, M.; SOARDI, E.; PELLEGRINO, G.; CORVINO, V.; ESPOSITO, M. 1-stage versus 2-stage lateral maxillary sinus lift procedures: 4-month post-loading results of a multicenter randomised controlled trial. **Eur. J. Oral Implantol.**, v. 6, n. 2, p. 153-165, 2013.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GREENSTEIN, G.; CAVALLARO, J. Implant insertion torque: its role in achieving primary stability of restorable dental implants. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 38, n. 2, p. 88-95, 2017.

GOLDBERG, V. M.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 225, p. 7-16, 1987.

GUTWALD, R.; HABERSTROH, J.; KUSCHNIERZ, J.; KISTER, C.; LYSEK, D. A.; MAGLIONE, M.; XAVIER, S. P.; OSHIMA, T.; SCHMELZEISEN, R.; SAUERBIER, S. Mesenchymal stem cells and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep. **British J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 48, n. 4, p. 285-290, 2010.

HANDSCHEL, J.; SIMONOWSKA, M.; NAUJOKS, C.; NAUJOKS, C.; DEPPRICH, R. A.; OMMERBORN, M. A.; MEYER, U.; KÜBLER, N. R. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. **Head Face Med.**, v. 5, p. 12, 2009.

HING, K. A.; BEST, S. M.; TANNER, K. E.; BONFIELD, W.; REVELL, P. A. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 68, n. 1, p. 187-200, 2004.

IWANIEC, U. T.; WRONSKI, T. J.; TURNER, R. T. Histological analysis of bone. **Methods Mol. Biol.**, v. 447, p. 325-341, 2008.

JANG, H. Y.; KIM, H. C.; LEE, S. C.; LEE, J. Y. Choice of graft material in relation to maxillary sinus width in internal sinus floor augmentation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 8, p. 1859-1868, 2010.

JARDELINO, C. L.; TAKAMORI, E. R.; SANTOS, S. R. A.; ROSSI, A. M.; GRANJEIRO, J. M. Biocompatibility of bovine anorganic xenograft. **Key Eng. Mater.**, v. 396, p. 3-6, 2009.

JENSEN, S. S.; AABOE, M.; JANNER, S. F.; SAULACIC, N.; BORNSTEIN, M. M.; BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: a histomorphometric study in minipigs. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 17, n. 2, p. 274-285, 2015.

JOHANSSON, L. A.; ISAKSSON, S.; LINDH, C.; BECKTOR, J. P.; SENNERBY, L. Maxillary sinus floor augmentation and simultaneous implant placement using locally harvested autogenous bone chips and bone debris: a prospective clinical study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 68, n. 4, p. 837-844, 2010.

JUNG, U. W.; HONG, J. Y.; LEE, J. S.; KIM, C. S.; CHO, K. S.; CHOI, S. H. A hybrid technique for sinus floor elevation in the severely resorbed posterior maxilla. **J. Periodontal Implant Sci.**, v. 40, n. 2, p. 76-85, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 136-153.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochem.**, v. 74, n. 1, p. 153-156, 1982.

KIM, Y.; OH, T. J.; MISCH, C. E.; WANG, H. L. Occlusal considerations in implant therapy: clinical guidelines with biomechanical rationale. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 16, n. 1, p. 26-35, 2005.

LAMBERT, F.; LECLOUX, G.; ROMPEN, E. One-step approach for implant placement and subantral bone regeneration using bovine hydroxyapatite: a 2- to 6-year follow-up study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 25, n. 3, p. 598-606, 2010.

LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 23, n. 8, p. 918-924, 2012.

LI, J.; WANG, H. Common implant-related advanced bone grafting complications: classification etiology, and management. **Implant Dent.**, v. 17, n. 4, p. 389-401, 2008.

LIU, S. H.; YANG, R. S.; AL-SHAIKH, R.; LANE, J. M. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 318, p. 265-278, 1995.

MADEIRA, M. C. **Anatomia da face**: bases anatomofuncionais para a prática odontológica. São Paulo: Sarvier, 2004. 272 p.

MAEHATA, Y.; TAKAMIZAWA, S.; OZAWA, S.; IZUKURI, K.; KATO, Y.; SATO, S.; LEE, M. C.; KIMURA, A.; HARA, R. I. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. **Matrix Biol.**, v. 26, n. 5, p. 371-381, 2007.

MAZZONETTO, R.; NETTO, H. D.; NASCIMENTO, F. F. **Enxertos ósseos em implantodontia**. Nova Odessa: Napoleão, 2012. 574 p.

MELONI, S. M.; JOVANOVIC, S. A.; LOLLI, F. M.; CASSISA, C.; DE RIU, G.; PISANO, M.; LUMBAU, A.; LUGLIÈ, P. F.; TULLIO, A. Grafting after sinus lift with anorganic bovine bone alone compared with 50:50 anorganic bovine bone and autologous bone: results of a pilot randomised trial at one year. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, n. 5, p. 436-441, 2015.

MISCH, C. E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: _____. **Implantes Dentários Contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2000. p. 271-302.

MISCH, C. M. Maxillary autogenous bone grafting. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v. 23, n. 2, p. 229-238, 2011.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.**, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.

MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ J. Surg.**, v. 71, n. 6, p. 354-361, 2001.

NASCIMENTO, F. F. A. O.; NETTO, H. D. M. C.; FILHO GARCEZ, J.; MAZZONETTO, R. Por que e quando indicar uma cirurgia reconstrutiva. In: MAZZONETTO, R. **Reconstruções em implantodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade**. Nova Odessa: Napoleão, 2009.

NEVINS, M.; CAMELO, M.; DE ANGELIS, N.; HANRATTY, J. J.; KHANG, W. G.; KWON, J. J.; RASPERINI, G.; ROCCHIETTA, I.; SCHUPBACH, P.; KIM, D. M. The clinical and histologic efficacy of xenograft granules for maxillary sinus floor augmentation. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, v. 31, n. 3, p. 227-235, 2011.

PATTIJN, V.; JAECQUES, S. V.; DE SMET, E.; MURARU, L.; VAN LIERDE, C.; VAN DER PERRE, G.; NAERT, I.; VANDER SLOTEN, J. Resonance frequency analysis of implants in the guinea pig model: influence of boundary conditions and orientation of the transducer. **Med. Eng. Phys.**, v. 29, n. 2, p. 182-190, 2007.

PEREIRA, V. R.; OLIVEIRA FILHO, J. S.; DA SILVA, R. K. F.; GEBRIM, L. T. Enxerto ósseo autógeno de ramo mandibular para reconstrução de processos alveolares atróficos. **Rev. Odontol. Plan. Central**, v.1, n.1, p. 47-54, 2010.

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, 2012.

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, 1984.

RODRIGUEZ, A.; ANASTASSOV, G. E.; LEE, H.; BUCHBINDER, D.; WETTAN, H. Maxillary sinus augmentation with deproteinized bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 2, p. 157-163, 2003.

SIMUNEK, A.; KOPECKA, D.; SOMANATHAN, R. V.; PILATHADKA, S.; BRAZDA, T. Deproteinized bovine bone versus B - tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 23, n. 5, p. 935-942, 2008.

SIVOLELLA, S.; BRESSAN, E.; SALATA, L. A.; URRUTIA, Z. A.; LANG, N. P.; BOTTICELLI, D. Osteogenesis at implants without primary bone contact – an experimental study in dogs. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 23, n. 5, p. 542-549, 2012.

SMILER, D.; SOLTAN, M. The Bone-Grafting Decision Tree: A Systematic Methodology for Achieving New Bone. **Implant Dent.**, v. 15, n. 2, p. 122-128, 2006.

SOYDAN, S. S.; CUBUK, S.; BAYRAK, B.; UCKAN, S. Comparative evaluation of simultaneous maxillary sinus floor elevation and implant placement with residual bone heights greater or less than 5 mm. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 30, n. 1, p. 179-183, 2015.

STREET, J.; BAO, M.; DEGUZMAN, L.; BUNTING, S.; PEALE, F. V. JR.; FERRARA, N.; STEINMETZ, H.; HOFFEL, J.; CLELAND, J. L.; DAUGHERTY, A.; VAN BRUGGEN, N.; REDMOND, H. P.; CARANO, R. A.; FILVAROFF, E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 15, p. 9656-9661, 2002.

SUDA, T.; NAKAMURA, I.; JIMI, E.; TAKAHASHI, N. Regulation of osteoclast function. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, n. 6, p. 869-879, 1997.

SUMMERS, R. B. A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique. **Compend.**, v. 15, n. 2, p. 152, 1994.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**. v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

VOLK, S. W.; SHAH, S. R.; COHEN, A. J.; WANG, Y.; BRISSON, B. K.; VOGEL, L. K.; HANKENSON, K. D.; ADAMS, S. L. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 94, n. 6, p. 621–631, 2014.

WANG, F.; ZHOU, W.; MONJE, A.; HUANG, W.; WANG, Y.; WU, Y. Influence of healing period upon bone turn over on maxillary sinus floor augmentation grafted solely with deproteinized bovine bone mineral: a prospective human histological and clinical trial. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 19, n. 2, p. 341-350, 2017.

WU, J.; LI, B.; LIN, X. Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 45, n. 11, p. 1471-1477, 2016.

XAVIER, S. P.; SANTOS, T. S.; SEHN, F. P.; SILVA, E. R.; GARCEZ-FILHO, J. A.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Maxillary sinus grafting with fresh frozen allograft versus bovine bone mineral: a tomographic and histological study. **J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.**, v. 44, n. 6, p. 708-714, 2016.

ZUBLER, K. R.; QUEIROS, T. P.; BETONI-JÚNIOR, W.; ESTEVES, J. C.; DOS SANTOS, P. L. Biomateriais em cirurgia de levantamento de seio maxilar. **ImplantNews**, v. 9, n. 4, p. 494-501, 2012.

APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HU/UFJF
JUIZ DE FORA – MG – BRASIL

Pesquisador Responsável: Nayana Ferreira Vidigal (Orientando)
Endereço: R. Tabajara Ferreira de Toledo, 285 – Portal da Torre
CEP: 36037466 Juiz de Fora – MG
Fone: (32) 988755030
e-mail: nanavidigal@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“ESTUDO COMPARATIVO DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES INSTALADOS NOS PERÍODOS DE INCORPORAÇÃO ÓSSEA E MATURAÇÃO ÓSSEA EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO HETERÓGENO”**. Neste estudo pretendemos avaliar o índice de sucesso dos implantes instalados após dois meses e após seis meses da cirurgia de enxerto, ou seja, verificar se os implantes colocados após dois meses da cirurgia de enxerto terão o mesmo sucesso dos implantes colocados após seis meses da cirurgia de enxerto (que, hoje em dia, é o tempo que se recomenda esperar). O motivo que nos leva a estudar isso é a tentativa de se obter um tratamento de reabilitação bucal mais rápido, o que traz benefícios para o paciente. Com esse estudo pretendemos concluir que diminuir o tempo de espera para a colocação dos implantes não interfere no seu sucesso.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: serão selecionados dez pacientes que apresentem ausência dentária e necessitem de cirurgia de enxerto ósseo na região posterior da arcada dentária superior bilateralmente. De um lado, os implantes serão instalados após dois meses da cirurgia de enxerto e, do outro lado, após seis meses da cirurgia de enxerto. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em riscos inerentes a qualquer cirurgia intra-bucal, como: edema (inchaço), dor, equimose (roxo). Também pode ocorrer insucesso na cicatrização do osso após a colocação dos implantes. Como benefício, a cirurgia de enxerto irá possibilitar a reabilitação oral com implantes nos pacientes que não possuem quantidade óssea adequada para a realização desse procedimento.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes

desta pesquisa, o Sr. (a) tem assegurado o direito a indenização. O Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de cinco anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Eu, _____, portador do documento de identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo “**ESTUDO COMPARATIVO DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES INSTALADOS NOS PERÍODOS DE INCORPORAÇÃO ÓSSEA E MATURAÇÃO ÓSSEA EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO HETERÓGENO**” de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, _____ de _____ de _____.

Nome e assinatura do (a) participante

Data

Nome e assinatura do (a) pesquisador

Data

Nome e assinatura da testemunha

Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

- CEP HU – Comitê de Ética em Pesquisa HU/UFJF

Hospital Universitário Unidade Dom Bosco - Sala 297

CEP: 36.038-330

e-mail: cep.hu@ufjf.edu.br

- Prof. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto (Orientador)

Endereço: Rua Halfeld, 828 - Sala 312 – Centro

Juiz de Fora - MG

Telefone: (32) 3215-8352

e-mail: henrique.duque@ufjf.edu.br

- Nayana Ferreira Vidigal (Orientando)

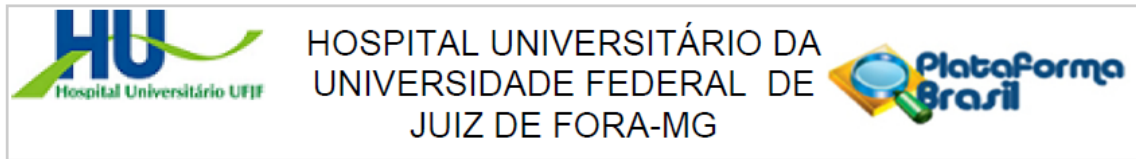
Endereço: Rua Tabajara Ferreira de Toledo, 285 – Portal da Torre

Juiz de Fora - MG

Telefone: (32) 98875-5030

e-mail: nanavidigal@hotmail.com

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO DA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES INSTALADOS NOS PERÍODOS DE INCORPORAÇÃO ÓSSEA E MATURAÇÃO ÓSSEA EM ÁREAS ENXERTADAS COM OSSO HETERÓGENO

Pesquisador: Henrique Duque Netto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52367115.9.0000.5133

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

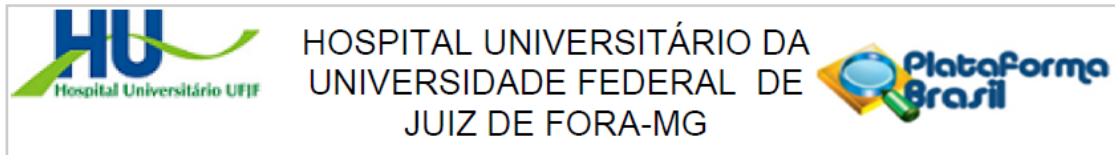
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.397.315

Apresentação do Projeto:

A reabilitação de áreas posteriores atróficas da maxila tem sido considerada como um procedimento complexo devido à reabsorção óssea e ao aumento da pneumatização do seio maxilar. Os procedimentos de reabilitação com implantes dentais em pacientes com a maxila edêntula e com insuficiência de altura óssea estimularam o desenvolvimento de técnicas e materiais para a reconstrução e adequação de rebordos alveolares atróficos, como por exemplo, o levantamento do seio maxilar utilizando enxertos ósseos. Estudos defendem que a instalação de implantes deve ser realizada após um período de, aproximadamente, seis meses da cirurgia de levantamento de seio, quando já existir a maturação óssea do enxerto, o que prolonga o tempo do tratamento do paciente. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar a osseointegração dos implantes instalados no final dos períodos de incorporação óssea (dois meses) e maturação óssea (seis meses) em áreas que receberam enxertos heterógenos para preenchimento do assoalho do seio maxilar. Espera-se, ao final desse trabalho, poder concluir que é possível diminuir o tempo de espera para instalação de implantes nas regiões submetidas a levantamento do seio maxilar com enxerto heterógeno sem comprometer a osseointegração otimizando, portanto, o tratamento do paciente.

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n
Bairro: Dom Bosco **CEP:** 36.038-330
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)4009-5336 **Fax:** (32)4009-5336 **E-mail:** cep.hu@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 1.397.315

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta validação científica e traz benefícios importantes para os pacientes que tem atrofia de rebordo maxilar com necessidade de enxerto ósseo. É importante ressaltar que há riscos, mas estão descritos no TCLE, e são inerentes ao ato cirúrgico. Portanto, o presente projeto está apto para o desenvolvimento da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados e estão de acordo com as exigências desse Comitê de Ética.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

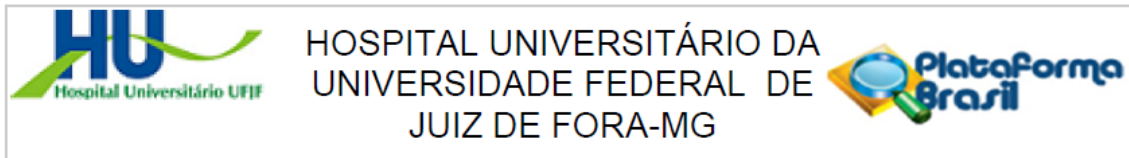
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_563128.pdf	10/01/2016 20:12:41		Aceito
Outros	curriculo_nayana.docx	10/01/2016 20:11:57	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	curriculo_henrique.docx	10/01/2016 20:11:25	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	carta_encaminhamento.docx	10/01/2016 20:10:43	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	dados_do_projeto.docx	07/01/2016 21:57:49	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	comprovante_registro_pesquisador.docx	07/01/2016 21:54:09	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	comprovante_cadastro_projeto.docx	07/01/2016 21:53:17	Henrique Duque Netto	Aceito
Outros	declaracao_de_aprovacao.docx	07/01/2016 21:51:52	Henrique Duque Netto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_de_pesquisa.doc	07/01/2016 21:49:58	Henrique Duque Netto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_infraestrutura.docx	07/01/2016 21:46:11	Henrique Duque Netto	Aceito
Declaração de	declaracao_concordancia.docx	07/01/2016	Henrique Duque	Aceito

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n
Bairro: Dom Bosco **CEP:** 36.038-330
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)4009-5336 **Fax:** (32)4009-5336 **E-mail:** cep.hu@uff.edu.br



Continuação do Parecer: 1.397.315

Instituição e Infraestrutura	declaracao_concordancia.docx	21:45:50	Netto	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	07/01/2016 21:40:43	Henrique Duque Netto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	07/01/2016 21:32:02	Henrique Duque Netto	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.docx	22/10/2015 19:26:11	Henrique Duque Netto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 28 de Janeiro de 2016

Assinado por:
Gisele Aparecida Fófano
(Coordenador)

Endereço: Av. Eugênio do Nascimento, s/n
Bairro: Dom Bosco **CEP:** 36.038-330
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)4009-5336 **Fax:** (32)4009-5336 **E-mail:** cep.hu@uffj.edu.br

ANEXO B – Método de Coloração com Hematoxilina e Eosina

HEMATOXILINA & EOSINA

Thomas C. Allen

A hematoxilina, um corante natural, foi primeiro usada por volta de 1863. Em combinação com sais de alumínio, ferro, cromo, cobre, ou tungstênio é um excelente corante nuclear. O agente de coloração ativo, a hema-teína, é formado por oxidação da hematoxilina. Este processo, conhecido como “maturação,” ocorre naturalmente se a solução de hematoxilina for deixada em repouso por vários dias. Entretanto, a solução de hematoxilina pode ser usada imediatamente, desde que um agente oxidante, o iodato de sódio (NaIO_3) ou o óxido mercúrico (HgO), seja utilizado. Considerando-se que o processo de oxidação é contínuo, a solução de hematoxilina deve ser armazenada em uma garrafa escura, até que esteja pronta para o uso. A validade da solução de uso é variável. Cada laboratório da AFIP usa aproximadamente 800 mililitros por semana. Uma média de 200 lâminas pode ser corada com esse volume de solução, sem que se perceba perda da coloração nuclear.

Correntemente há dois procedimentos de coloração com hematoxilina usados nos laboratórios de histopatologia da AFIP: Os métodos de *Mayer* e de *Harris*. O Laboratório Ortopédico utiliza o método de *Harris*, que é regressivo, uma vez que a descalcificação reduz as propriedades de coloração basofílica dos núcleos. Este método cora todas as estruturas tissulares, isto é, os núcleos, o citoplasma, o tecido conjuntivo, etc; sendo seguido por uma descoloração controlada e um “azulamento,” para se atingir o ponto ótimo da coloração nuclear. Os outros laboratórios usam a Hematoxilina de *Mayer* que, sendo um procedimento progressivo, cora apenas os núcleos. O aumento da cor azul dos cortes é obtido pela lavagem das lâminas em água corrente de torneira. Ambos os procedimentos são descritos neste capítulo. Para as observações especiais e os pontos críticos no uso do método de *Harris*, veja o capítulo de Histotecnologia Ortopédica.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE HEMATOXILINA DE *MAYER* †

Alúmen de amônio ou de potássio (anidro)*.....	50 gramas
Água destilada.....	1.000 mililitros
Cristais de hematoxilina (C.I. 75290) ¹	1 grama
Iodato de sódio (NaIO_3).....	0,2 grama
Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).....	1 grama
Hidrato de cloral ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$).....	50 gramas

†LEIA A NOTA DE BIOSSEGURANÇA ABAIXO.

* [N. do T.: Os alúmens de amônio (sulfato de alumínio e amônio [$\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2$]) ou de potássio (sulfato de alumínio e potássio [$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$]) são muito higroscópicos, sendo usualmente adquiridos sob a forma dodeca-hidratada, ou seja $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ e $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Assim, para se ter o equivalente a 50 gramas da forma anidra deve-se fazer o cálculo seguinte: [massa molecular em gramas do alúmen de amônio dodeca-hidratado (453,33 g) ou de potássio dodeca-hidratado (474,39 g) X 50 gramas] ÷ massa molecular em gramas do alúmen de amônio (237,33 g) ou potássio (258,39 g) anidros = 95,50 gramas de alúmen de amônio ou 91,79 gramas de alúmen de potássio].

PREPARO: Vinte mililitros de solução de iodato de sódio a 2% podem ser substituídos por 0,2 gramas de iodato de sódio. Adicione o iodato de sódio diretamente na solução estoque, após a hematoxilina estar dissolvida. Dissolva o alúmen na água destilada usando um agitador magnético. Quando o alúmen estiver totalmente dissolvido, acrescente os cristais de hematoxilina. Quando toda a hematoxilina estiver dissolvida, coloque o iodato de sódio. Deixe misturar, por cerca de 10 minutos, antes de adicionar o ácido acético. Misture por mais 10 minutos e, após, acrescente o hidrato de cloral. Continue misturando até estar

¹ N. do T.: C. I. = Color Index. Este é específico para cada corante. Retirado de LILLIE, R.D., ed. - *H.J. Conn's Biological Stains*, 9th ed., Williams & Wilkins, 1977 (Reimpresso por Sigma Chemical Company, 1990).

todo dissolvido o hidrato de cloral. A solução resultante, se preparada corretamente, terá uma cor vinhosa escura. Um mililitro da solução pingada na água tépida irá imediatamente tornar-se azul.

Após o uso da hematoxilina, a solução de eosina é utilizada, convencionalmente, para contracoar. A floxina-eosina permite uma maior variação do contraste, de rosa a vermelho vivo. O citoplasma cora-se em róseo e o colágeno e os músculos coram-se em vermelho vivo.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE EOSINA

Eosina Y (C.I. 45380), solúvel em água.....1 grama.
Água destilada.....até completar 100 mililitros.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE FLOXINA

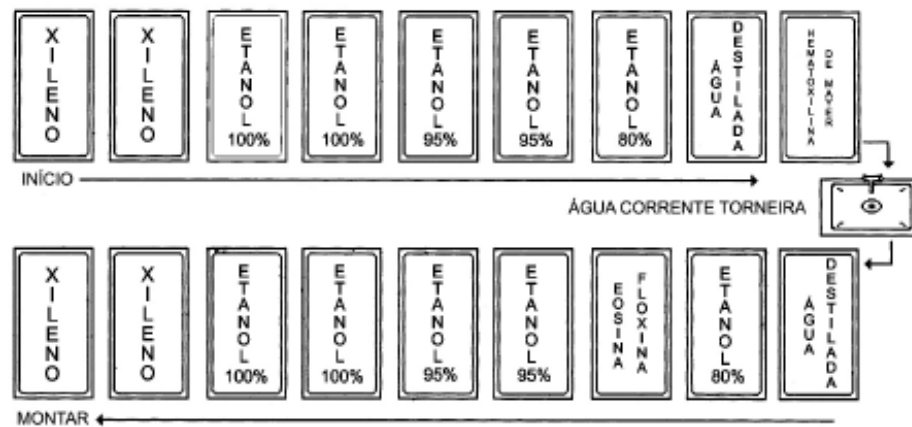
Floxina B (C.I. 45410).....1 grama.
Água destilada.....até completar 100 mililitros.

SOLUÇÃO DE EOSINA-FLOXINA PARA USO †

Solução estoque de eosina.....100 mililitros.
Solução estoque de floxina.....10 mililitros.
Álcool etílico (etanol) a 95%.....780 mililitros.
Ácido acético glacial.....4 mililitros.

☞ Esta solução permanece boa para uso por cerca de uma semana.

Figura 1: Ordem de coloração †:



† BIOSSEGURANÇA:

1. O xileno (xilol) é tóxico, inflamável e combustível.
2. Mantenha o xileno fora do alcance do fogo, de outras fontes de calor, e de outras substâncias combustíveis.
3. Evite inalá-lo, degluti-lo, e o contato com a pele, mucosas, e quaisquer partes do corpo.
4. As soluções, não os cristais, de hematoxilina são tóxicas, devido aos demais constituintes da solução (iodato de sódio, ácido cítrico e hidrato de cloral). Evite o contato com quaisquer partes do corpo, assim como inalá-la, degluti-la, etc.
5. Os ácidos cítrico e acético são tóxicos, corrosivos, inflamáveis e combustíveis.

TRABALHE SEMPRE EM LOCAL BEM VENTILADO, COM SISTEMA DE EXAUSTÃO!

PROCEDIMENTO DA HEMATOXILINA DE *MAYER* & EOSINA

FIXADOR: Formalina neutra, tamponada, a 10%; soluções de Bouin ou de Zenker.

SECÇÕES: Parafina, 3 a 8 micrômetros (3 a 8 μm).

SOLUÇÕES

HEMATOXILINA DE *MAYER* (veja acima)

SOLUÇÃO DE EOSINA-FLOXINA (veja acima)

PROCEDIMENTO [Veja a figura 1 (ordem de coloração) acima]

1. Desparafine os cortes e hidrate-os até a água. [OBS: Se a fixação foi em líquido de Zenker, é importante remover os pigmentos de precipitado de mercúrio (veja adiante o procedimento de “deszenkerização”).]
2. Core na solução de hematoxilina de *Mayer* por 15 minutos.
3. Lave em água morna de torneira por 15 minutos.
4. Coloque na água destilada.
5. Coloque no álcool etílico (etanol) a 80% por 1 a 2 minutos. [OBS: O álcool etílico preserva a força da solução de eosina-floxina].
6. Contracore na solução de eosina-floxina por 2 minutos.
7. Desidrate e clarifique, por meio de 2 trocas cada, em álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto, e xileno, cada um por 2 minutos.
8. Monte a lâmina em meio resinoso.

RESULTADOS

Núcleos azul.
 Citoplasma róseo a vermelho.
 Demais estruturas tissulares róseo a vermelho.

PROCEDIMENTO DA HEMATOXILINA DE *HARRIS* & EOSINA

FIXADOR: Formalina neutra tamponada a 10%, ou solução de Bouin ou de Zenker.

SECÇÕES: Parafina, congelação, celoidina, com 3 a 20 micrômetros (3 a 20 μm).

SOLUÇÕES

ÁCIDO-ÁLCOOL A 1%

Ácido clorídrico (HCl)† 1 mililitro.
Etanol a 70% 99 mililitros.

ÁGUA AMONÍACAL

Hidróxido de amônio (NH₄OH)† 2 a 4 mililitros.
Água destilada 800 a 1000 mililitros.

† **BIOSSEGURANÇA:** O ácido clorídrico e o hidróxido de amônio são tóxicos e corrosivos. Evite inalá-los, ingeri-los, e o contato com a pele, mucosas, a roupa, etc.

CARBONATO DE LÍTIO SATURADO

Carbonato de lítio (Li₂CO₃)† 1,54 grama.
Água destilada 100 mililitros.

† **BIOSSEGURANÇA:** O carbonato de lítio é tóxico quando inalado, deglutido, ou em contato com a pele, e pode também causar irritação e sensibilização.

EOSINA-FLOXINA (ver acima)

HEMATOXILINA DE *HARRIS*

Hematoxilina (C.I. 75290) 5,0 gramas.
Etanol a 100% 50,0 mililitros.
Alúmen de Potássio ou de amônio 100 gramas.
Água destilada 1.000 mililitros.
Óxido mercúrico (pó vermelho)(HgO) † 2,5 gramas.

† **BIOSSEGURANÇA:** O óxido mercúrico é tóxico, venenoso e combustível (oxidante). Mantenha longe de material combustível, i. é, que alimenta fogo.

PREPARO: Use um recipiente de 2.000 mililitros para o alúmen e a água, e um recipiente pequeno para o álcool e a hematoxilina. Dissolva completamente o alúmen na água destilada com o auxílio de uma placa quente e um agitador magnético. Vigorosamente misture a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente. Remova o alúmen e a água destilada da fonte de calor. Lentamente combine as duas soluções. Retorne as duas soluções à fonte de calor. Deixe entrar em ebulição o mais rápido possível, em aproximadamente 1 minuto ou menos. Remova da fonte de calor e acrescente lentamente o óxido mercúrico. Se o óxido mercúrico for adicionado rapidamente, a reação fará a solução entrar em ebulição e sair do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que se torne de cor púrpura-escura. Retire-a do calor e esfrie-a imergindo o recipiente numa bacia com água fria. A solução estará pronta para o uso. Acrescente 20 mililitros de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos. Sempre filtre antes de cada uso.

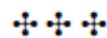
PROCEDIMENTO:

1. Desparafine os cortes e hidrate-os até a água destilada.
[OBS: Se a fixação foi em líquido de Zenker, é importante remover os pigmentos de precipitado de mercúrio (veja adiante o procedimento de “deszenkerização”).]

2. Core na solução recém-filtrada de hematoxilina de *Harris* por 6 a 15 minutos.
3. Lave em água de torneira por 2 a 5 minutos.
4. Diferencie em álcool-ácido, com 1 ou 2 mergulhos.
5. Lave rapidamente em água de torneira.
6. Coloque em solução fraca de água amoniacal ou de carbonato de lítio saturada até que os cortes fiquem azul-brilhantes.
7. Lave completamente em água de torneira, por 10 minutos.
8. Coloque em álcool etílico a 80% por 1 a 2 minutos.
9. Contracore em solução de eosina-floxina por 2 minutos.
10. Desidrate e clarifique, por meio de duas passagens, de 2 minutos cada, em álcool etílico a 95%, em álcool etílico absoluto, e em xilol.
11. Monte em meio resinoso.

RESULTADOS:

Núcleos azul.
Citoplasma róseo a vermelho.
Demais estruturas tissulares róseo a vermelho.



REMOÇÃO DE PIGMENTO DE PRECIPITADO DE MERCÚRIO “Deszenkerização”

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO DE IODO DE *GRAM* †

Iodo (I₂) 1 grama.
 Iodeto de potássio (KI) 2 gramas.
 Água destilada 300 mililitros.

ou

SOLUÇÃO DE IODO DE *LUGOL* †

Iodo (I₂) 1 grama.
 Iodeto de Potássio (KI) 2 gramas.
 Água destilada 100 mililitros.

SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO (HIPOSSULFATO DE SÓDIO) A 5% †

Tiosulfato de sódio (hipossulfato de sódio) [Na₂S₂O₃] 5 gramas.
 Água destilada até completar 100 mililitros.

† **BIOSSEGURANÇA:** O iodo e as soluções de iodo são tóxicos e corrosivos. Evite inalar os vapores e o contato com a pele e outras partes do corpo, e com a roupa.

PROCEDIMENTO:

1. Desparafine e hidrate os cortes até a água destilada.
2. Coloque os cortes na solução de iodo de *Gram* ou de *Lugol* por 15 minutos.
3. Enxágue na água corrente de torneira.
4. Coloque na solução de tiosulfato de sódio a 5% por 3 minutos.
5. Lave completamente em água corrente de torneira por 10 minutos.
6. Core como o desejado.

REFERÊNCIA

SHEEHAN, D.C. & HRAPCHAK, B.B. - *Theory and practice of histotechnology*. Columbus, Ohio: Battelle Press, 1980, pp 153-154.

ANEXO C – Método do *Picrosirius Red* para Colágeno

MÉTODO DO PICROSIRIUS RED PARA COLÁGENO

FIXADOR: Formalina a 10%, neutra, tamponada.

SECÇÕES: Cortes com 5 micrômetros.

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO DE SIRIUS RED A 0,1%

(EM SOLUÇÃO AQUOSA SATURADA DE ÁCIDO PÍCRICO, pH 2)

Ácido pícrico [(NO₂)₃C₆H₂OH] † 4,0 gramas
 Água destilada.....até completar 100 mililitros

Acrescente à solução acima:

Sirius Red F3B (C.I. 35782)..... 0,1 grama

SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO 0,01N

Ácido clorídrico (HCl)..... 0,83 mililitro
 Água destilada..... até completar 1000 mililitros

SOLUÇÃO DE HEMATOXILINA DE HARRIS (envelhecida 2 meses)

Hematoxilina (C.I. 75290) à 10% em etanol absoluto..... 5 mililitros
 Óxido mercúrico (HgO).....0,25 grama
 Alúmen de Potássio [KAl(SO₄)₂](sol. aquosa 10%).....100 mililitros
 Ácido acético glacial (CH₃COOH).....4,0 mililitros

† **BIOSSEGURANÇA:** O ÁCIDO PÍCRICO (2,4,6-Trinitrofenol) é perigosamente REATIVO e EXPLOSIVO. Evite abalos, choque, fagulhas, e o contato com calor, com a pele, mucosas, a roupa, e a inalação. Pode causar irritação e sensibilização. O ácido clorídrico é tóxico e corrosivo. O ácido acético é tóxico, corrosivo, inflamável e combustível. O óxido mercúrico é tóxico, venenoso e combustível (oxidante). Mantenha longe de material combustível, i. é, que alimenta fogo.

PROCEDIMENTO

1. Corte em parafina – 5 micrômetros.
2. Desparafine em xilol (xileno).
3. Hidrate em soluções de etanol com concentrações decrescentes até água.
4. Core durante 1 hora em solução de Sirius Red a 0,1%.
5. Lave durante 2 minutos em solução de ácido clorídrico 0,01N.
6. Contracore com Hematoxilina de Harris por 6 minutos.
7. Desidrate até etanol absoluto, clarifique em xileno e monte com resina e lamínula.

RESULTADOS (EM MICROSCOPIA DE POLARIZAÇÃO)

Colágeno I cora-se em vermelho vivo.
 Colágeno II tons róseos a vermelho claro.
 Colágeno III verde (amarelado).
 Colágeno IV amarelo vivo.

OBSERVAÇÕES

O colágeno do tipo II, característico das cartilagens, só pode ser observado por este método, quando os cortes são tratados com digestão prévia a 37°C, por 50 minutos, com papaína a 0,5%, dissolvida em tampão fosfato 0,02M, pH 4,7, contendo bissulfato de sódio 0,005M e EDTA 0,0005M. Este tratamento remove os proteoglicanos do colágeno, acentuando a sua birrefringência.

Este método é, basicamente, específico para a diferenciação dos colágenos tipos I e III.

REFERÊNCIAS

- Junqueira, L.C.U.; Bignolas, G. & Brentani, R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, **11**: 447-455, 1979.
- Junqueira, L.C.U.; Cossermelli, W.S. & Brentani, R. - Differential staining of collagen type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jap.* **41**: 267-274, 1978.
- Junqueira, L.C.U.; Montes, G.S. & Sanches, E.M. - The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, **74**:153-156, 1982.
- Montes, G.S. & Junqueira, L.C.U. - The use of picro-sirius polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **86** (Suppl. III): 1-11, 1991.