

MILTON ZAMPIERI JUNIOR

Análise do posicionamento imediato de implantes dentários após elevação do assoalho do seio maxilar de coelho com Gingistat®: análise tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Araçatuba – SP

2020

MILTON ZAMPIERI JUNIOR

Análise do posicionamento imediato de implantes dentários após elevação do assoalho do seio maxilar de coelho com Gingistat®: análise tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica

Monografia apresentada no curso de Especialização Lato Sensu da Facsete como requisito parcial para conclusão do curso de Especialização em Implantodontia.

Área de concentração: Implantodontia.
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba – SP

2020

Ficha Catalográfica

Zampieri Junior, Milton.

Análise do posicionamento imediato de implantes dentários após elevação do assoalho do seio maxilar de coelho com Gingistat®: análise tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica / Milton Zampieri Junior, 2020.

35f. : il.

Orientador: Idelmo Rangel Garcia Júnior

Monografia (Especialização) – NEC Odonto, 2020.

1. Levantamento de seio maxilar. 2. Biomateriais.

I. Título.

II. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Faculdade de Sete Lagoas -FACSETE

Monografia intitulada " Análise do posicionamento imediato de implantes dentários após elevação do assoalho do seio maxilar de coelho com Gingistat®: análise tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica " de autoria do aluno Milton Zampieri Junior, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Idelmo Rangel Garcia Junior - NEC Odonto –Orientador

RESUMO

Gingistat® é um material a base de colágeno tipo I equino, sob a forma de compressas, que apresenta atividade hemostática devido à sua aderência, absorção de líquidos e propriedade de geleificação, auxiliando na formação do coágulo sanguíneo. A proposta deste estudo é avaliar o processo de ossificação do substituto ósseo Gingistat®, bem como o posicionamento de implantes de titânio inseridos em mesmo tempo cirúrgico que o processo de regeneração óssea guiada de levantamento do assoalho do seio maxilar, por meio de análises tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica. Para tal foram utilizados 12(doze) coelhos da raça Nova Zelândia, variação “*albinus*”, machos, adultos, com idade aproximada de 5(cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 kg que foram submetidos à cirurgia de elevação da membrana do seio maxilar bilateral por acesso nasal. O seio maxilar do lado esquerdo foi preenchido por Gingistat® e do lado direito por coágulo sanguíneo, seguida da instalação bilateral imediata de implante dentário de titânio de 3,6 x 6,5 mm. Após períodos de 7 e 40 dias os animais sofreram eutanásia e a maxila foi removida para processamento e análises tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica. A análise estatística será conduzida por meio da comparação entre o grupo controle e o tratado. O teste estatístico a ser empregado dependerá da distribuição desses dados em relação à curva de normalidade.

Palavras-chave: Substitutos ósseos; Colágeno tipo I; Implante dentário; Reparo ósseo.

ABSTRACT

Gingostat® is a equine collagen of type I in the form of compresses that has hemostatic activity due to its adhesion, absorption of liquids and gelation property, assisting in blood clot formation. The purpose of this study is to evaluate the ossification process of bone substitute Gingostat® as well as the placement of titanium implants inserted in the same surgical procedure guided bone regeneration lifting the maxillary sinus floor through tomographic, histomorphometric and immunohistochemistry analyzes. Will be used for such twelve (12) New Zealand rabbits, " Albinus" variation, adult, male, five (5) months approximately and weighing between 3-4 kg undergoing surgery elevation of the membrane maxillary sinus bilateral by nasal approach. The maxillary sinus on the right side will be filled by Gingostat® and the left side by a blood clot, then bilateral immediate installation of titanium dental implant of 3.6 x 6.5 mm. The animals will be euthanized after of 7 and 40 days and jaw removed for processing and tomographic, histomorphometric and immunohistochemical analyzes. Statistical analysis will be conducted through the comparison between control and treated group. The statistical test to be employed will depend on the distribution of these data in relation to the normal curve.

Keywords: bone substitutes; Type I collagen; Dental implant; Bone Repair.

Lista de figuras

- Figura 1:* Delineamento experimental do estudo..... Pag. 11
- Figura 2:* (A) Tricotomia, (B) Antissepsia, (C) Incisão na linha mediana, do dorso nasal de coelho. (D) Exposição do osso nasal e da sutura nasoincisa de coelho. (E): Utilização da trefina para demarcação bilateral da área a sofrer osteotomia. (F) Dorso nasal demarcado bilateralmente em circunferências de 3 mm. (G) Osteotomia em área demarcada anteriormente em dorso nasal de coelho. (H) Preenchimento do espaço formado entre a membrana sinusal e o assoalho do seio maxilar por coágulo sanguíneo do lado direito e, por Gingistat®, do lado esquerdo. (I) Implante dentário de titânio de 3,6x6,5mm, plataforma hexágono externo sendo instalado. (J) Instalação de implantes bilateralmente, em mesmo tempo cirúrgico. (K)): Sutura em perióstio, cobrindo os implantes instalados. (L) Sutura em dorso nasal de Coelho utilizando pontos interrompidos simples..... Pag. 13
- Figura 3:* (A) e (B): Forma de apresentação comercial da esponja de colágeno Gingistat®. (C): Gingistat® dividida em 6(seis) partes aproximadamente iguais, antes de serem inseridas na cavidade sinusal..... Pag.14
- Figura 4:* Cortes coronais das tomografias computadorizadas realizadas com janela para tecidos mineralizados nos espécimes dos períodos experimentais de 7 e 40 dias, grupo GGI e GCI. Foi possível visualizar o posicionamento dos implantes dentários e áreas sugestivas de processo inflamatório sinusal (seta vermelha)..... Pag.18
- Figura 5:* Imagem de corte histológico descalcificado no sentido coronal do complexo nasal aos 7 dias (HE, 1,0X)..... Pag.18
- Figura 6:* (A) e (B): Regiões das espiras dos implantes do grupo Gingistat® (GGI), aos 7 dias (150x)..... Pag.19
- Figura 7:* (A) e (B): Regiões das espiras do implante do grupo Coágulo Implante (GCI), aos 7 dias (250x)..... Pag.19
- Figura 8:* (A) e (B): Regiões das espiras do implante do grupo Gingistat® (GGI), aos 7 dias (250x)..... Pag.19
- Figura 9:* (A) e (B): Região de espira do implante do (a)Grupo Coágulo(GCI) e (b) Grupo Gingistat®(GGI), mostrando região de membrana sinusal , aos 7 dias (250x). Seta branca: formação de tecido mineralizado..... Pag.20
- Figura 10:* Imagem de corte histológico descalcificado no sentido coronal do complexo nasal aos 40 dias (HE, 1,0X)..... Pag.20
- Figura 11:* A) e (B): Região de espira do implante do grupo Coágulo Implante (GCI), aos 40 dias (250x)..... Pag.20
- Figura 12:* (A) e (B): Região de espira do implante do grupo Gingistat® Implante (GGI), aos 40 dias (250x)..... Pag.21
- Figura 13:* Imagem imunoistoquímica mostrando a marcação da proteína OPG no grupo GCI aos (A) 7 e (B) 40 dias..... Pag.22
- Figura 14:* Imagem imunoistoquímica mostrando a marcação da proteína OPG no grupo GGI aos (A) 7 e (B) 40 dias..... Pag.22
- Figura 15:* Imagem imunoistoquímica mostrando a marcação da proteína OC no grupo GCI aos (A) 7 e (B) 40 dias..... Pag.22

Gráfico 1: Gráfico da porcentagem da Área de Osso Neoformado (AON) em relação aos grupos coágulo implante (GCI) e Gingistat® Implante (GGI), aos 7 e 40 dias de eutanásia..... Pag.21

SUMÁRIO

Introdução.....	Pag.10
Objetivo.....	Pag.10
Material e métodos.....	Pag.11
<i>Delineamento experimental.....</i>	Pag.11
<i>Procedimento cirúrgico.....</i>	Pag.12
<i>Cuidados pós-operatórios.....</i>	Pag.14
Eutanásia e coleta do material.....	Pag.14
Processamento laboratorial.....	Pag.15
Análise por tomografia computadorizada.....	Pag.15
Análise histomorfométrica.....	Pag.16
Análise imunoistoquímica.....	Pag.16
Análise estatística.....	Pag.17
Resultados.....	Pag.17
<i>Tomografia computadorizada.....</i>	Pag.17
<i>Achados histológicos.....</i>	Pag.18
<i>Histomorfometria.....</i>	Pag.21
<i>Imunoistoquímica.....</i>	Pag.22
Discussão.....	Pag.23
Referências.....	Pag.26

Introdução

A perda do elemento dental em região posterior de maxila leva a reabsorção alveolar e à pneumatização do seio maxilar, tornando a altura do rebordo remanescente muitas vezes inadequada para a instalação de implantes (Boyne, James, 1980; Keller et al., 1987). A altura ideal para a instalação de implantes em região posterior de maxila foi previamente descrita em 10 mm, porém estudos recentes mostram que alturas de até 4mm têm apresentado resultados promissores para instalação concomitante ao enxerto ósseo (Nedir et al., 2012; Călin et al., 2014).

Primeiramente descrita por Boyne et al. (1980), a técnica cirúrgica de levantamento do seio maxilar tem sido aplicada clinicamente, o que estimulou a pesquisa de biomateriais que possuam propriedades semelhantes ao enxerto autógeno, que apresenta resultados superiores aos aloenxertos em estudos experimentais (Nishibori et al., 1994). Porém, possui limitações como aumento da morbidade na área doadora (Hench, 1998; Sbordone et al., 2009).

Diversos tipos de materiais utilizados para a enxertia em seio maxilar, que proporcionam suporte estrutural e mecânico, permitindo a instalação de implantes dentários (Sartori et al., 2003) estão sendo estudados. Dentre eles, se encontra o Gingistat® (Gaba Vegas, San Giuliano Milanese, Itália), uma esponja de colágeno tipo I liofilizado de origem equina, que possui poros interligados com um tamanho médio de 300µm (Ferraro et al., 2013).

O Gingistat® foi utilizado em outros estudos também como agentes veiculares para fatores de crescimento derivados de plaqueta e fatores de crescimento de insulina tipo I (Cesari et al., 2005); além de ser usado como esqueleto para diferenciação celular in Vitro (Donzelli et al., 2007; Salvadeo et al., 2007). Este biomaterial apresenta atividade hemostática devido sua aderência, absorção de líquidos e propriedade de geleificação, auxiliando na formação do coágulo sanguíneo.

Ainda assim, não é comprovada sua atividade na regeneração óssea em levantamento de seio maxilar quando comparado ao coágulo sanguíneo. Por isso, o objetivo deste estudo é avaliar a propriedade osteocondutora da esponja de colágeno em levantamento de seio maxilar de coelhos.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de reparo e capacidade de ossificação após elevação da membrana do seio maxilar com uso de Gingistat® e instalação de implantes imediata, através das análises tomográfica, histomorfométrica e imunoistoquímica em coelhos.

Material e métodos

Delineamento experimental

Doze coelhos da raça Nova Zelândia, variação “*albinus*”, machos, adultos, com idade aproximada de 5 (cinco) meses e peso corporal entre 3 a 4 kg foram utilizados. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, UNESP, e foram acomodados no Biotério Central da Faculdade de Odontologia – FOA, UNESP, onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP e aprovado segundo o processo nº FOA- 4644-2016.

Os animais tiveram os seios maxilares acessados bilateralmente e, randomicamente, foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo Gingistat® Implante (GGI): após o procedimento de elevação da membrana sinusal, o seio maxilar foi preenchido por Gingistat® e implante dentário de titânio foi instalado em mesmo tempo cirúrgico (Figura 1);

Grupo Coágulo Implante (GCI): após o procedimento de elevação da membrana sinusal, o seio maxilar foi preenchido por coágulo sanguíneo e implante dentário de titânio foi instalado em mesmo tempo cirúrgico (Figura 1).

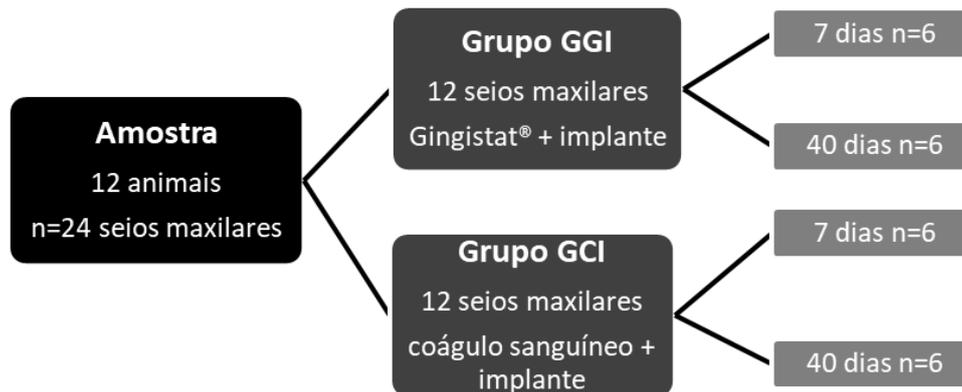


Figura 1: Delineamento experimental do estudo.

Procedimento cirúrgico

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

Após prévia tricotomia (Figura 2a) e antissepsia pré-operatória no dorso nasal por fricção de gaze embebida em PolivinilPirrolidona Iodo Degermante a 10%(Figura 2b), com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao PolivinilPirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto), o osso nasal foi acessado, pelo protocolo cirúrgico de Asai, Shimizu e Ooya(2002).

Foi realizada uma incisão linear de 5 cm na linha mediana do dorso nasal (Figura 2c). A pele e o periósteo foram cuidadosamente descolados e devidamente afastados com um descolador tipo Molt (Hu-Friedy®, German), com exposição do osso nasal e da sutura nasoincisal (Figura 2d). Então, uma janela circular de 3 mm de diâmetro foi confeccionada bilateralmente à linha mediana do dorso nasal, aproximadamente a 2 cm anteriormente à sutura nasofrontal e a 1 cm lateralmente à linha média (Figuras 2e; 2f), sob abundante irrigação com solução salina fisiológica estéril a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) e utilizando uma broca trefina de 2 mm de diâmetro externo

(Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para a demarcação da área. A osteotomia foi finalizada com uma ponta diamantada esférica n 1011 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) (Figura 2g), montadas em um motor elétrico rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm.

A membrana sinusal foi cuidadosamente descolada e elevada com curetas especiais (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) para garantir que sua integridade física fosse mantida. Com o auxílio dessas curetas, o seio maxilar foi preenchido com Gingistat® (Figura 3a), e o lado contralateral com coágulo sanguíneo (Figura 2h). O Gingistat®, é apresentado sob forma de compressas (Figura 3b). Cada membrana possuía 9mm, foi dividida em 6 partes aproximadamente iguais (Figura 3c) e, cada parte, inserida no espaço formado entre a membrana sinusal e o assoalho do seio maxilar do coelho, unilateralmente.

Após enxerto, implante dentário de titânio tratado com duplo ataque ácido, de 3,6x6 mm, plataforma hexágono externo (Implalife® - indústria de produtos médicos-odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil) foi instalado bilateralmente (Figuras 2i; 2j) também com auxílio de contra-ângulo redutor de 20:1, com 30rpm, sobre refrigeração nos dois grupos experimentais. O retalho total foi reposicionado e a sutura realizada com fio Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples (Figuras 2k; 2l).

O cirurgião foi o mesmo em todos os procedimentos. As cirurgias foram realizadas seguindo todos os princípios de assepsia para garantir a manutenção da cadeia séptica.

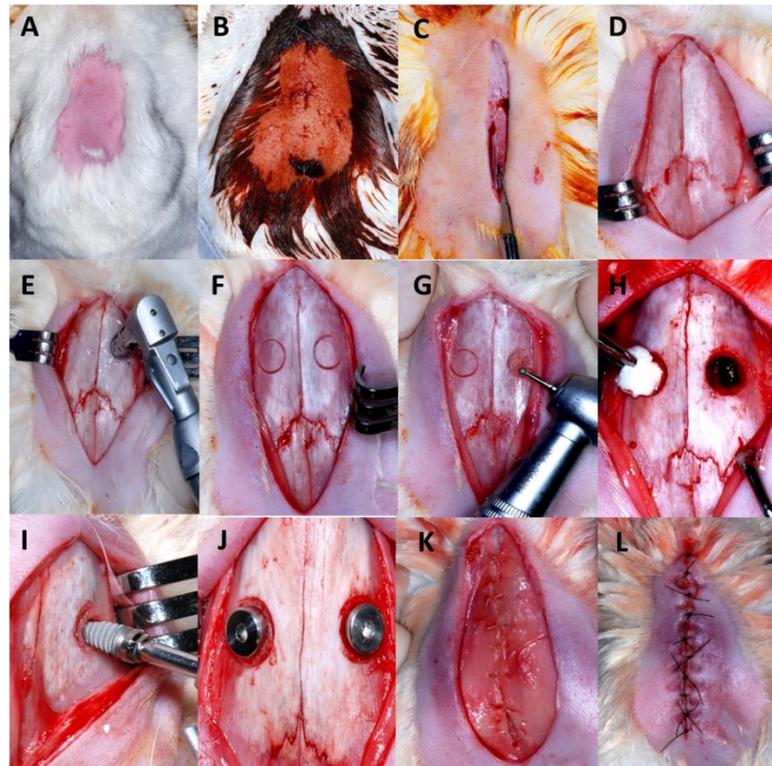


Figura 2: (A) Tricotomia, (B) Antissepsia, (C) Incisão na linha mediana, (D) Exposição do osso (E e F) Demarcação bilateral da área a sofrer osteotomia com 3 mm de diâmetro, (G) Osteotomia, (H) Preenchimento do seio “levantado” por coágulo sanguíneo do lado direito e por Gingistat®, do lado esquerdo. (I e J) Instalação de implantes bilateralmente, em mesmo tempo cirúrgico; (K) Sutura em periósteo, cobrindo os implantes instalados; (L) Sutura em pele por pontos interrompidos simples.



Figura 3: (A) e (B): Forma de apresentação comercial da esponja de colágeno Gingistat®. (C): Gingistat® dividida em 6(seis) partes aproximadamente iguais, antes de serem inseridas na cavidade sinusal.

Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório imediato, os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., São Paulo, Brasil) na dosagem de 0,1ml/Kg e de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda., São Paulo, Brasil) na dosagem de 1mg/Kg/dia, sendo a primeira dose no pós-operatório imediato e as demais nos 2 dias consecutivos. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão (Ração Procoelho, Primor®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) e água “*ad Libitum*”, até a eutanásia animal nos períodos de 7 e 40 dias pós-operatórios.

Eutanásia e coleta do material

A sedação foi realizada pela administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® - Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil) na dosagem de 10mg/ Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® - Laboratório Calier do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. A eutanásia foi por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de 150 ml de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 minutos, seguida de 1800 ml de Formaldeído 4% (Paraformaldeído 4% - AcrosOrganics, Nova Jersey, EUA) durante 40 minutos, usando uma bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – ParmerInstrumentCompany, EUA) na velocidade de 45 ml/min. Em seguida, o complexo nasal incluindo as cavidades sinusais foi removido em bloco e todo o tecido mole superficial eliminado.

Processamento laboratorial

As peças foram fixadas em formol 4% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e sofreram descalcificação em EDTA 5% (Ácido Etileno DiaminoTetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, com trocas periódicas em um período de 30 a 60 dias, a temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de álcoois 70,

90, 95 e 100, com troca de solução a cada 3 dias, em agitador orbital (Kline CT – 150®, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) em todos os dias durante 4 horas. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para a obtenção de corte de 6µm de espessura montados em lâminas de vidro. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck &Co., Inc., NJ, EUA), servindo como referência para a citoarquitetura dos cortes processados para imunohistoquímica.

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

Análise por tomografia computadorizada

Após a eutanásia, as peças fixadas em formol foram tomografadas no tomógrafo computadorizado por feixe cônico, utilizando aparelho i-Cat® (ImagingSciencesInternational, Pensilvânia, EUA) no instituto DEFI Ltda, Araçatuba, São Paulo, com o objetivo inicial de uma análise geral do seio maxilar, confirmando o material em seu interior em cortes axiais, coronais e sagitais (Figura 3). Foi adotado o protocolo de 18,45mAs (Max 6cm, 20Sec, 0,3 voxel).

Análise Histomorfométrica

Após as lâminas serem coradas com HE(Merck & Co., Inc., NJ, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerburg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas, ImageLab® 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas. Nas lâminas coradas com HE (Merck & Co., Inc., NJ, EUA) foram avaliadas quanto a continuidade da membrana sinusal e o tecido ósseo neoformado.

Para avaliação da AON, a área da quarta espira de cada implante foi fotografada em um aumento de 250x. Foi realizada a diferenciação em tecido conjuntivo e tecido

ósseo neoformado. Esta mensuração foi realizada com o auxílio do software ImageJ® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, EUA). Os valores obtidos em µm foram armazenados em documentos no Excel®. Os dados obtidos nas análises foram transformados de valores absolutos para valores percentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho negativo.

Análise Imunoistoquímica

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteoprotegerina (OPG, Goatanti-opgSC21038 –Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e Osteocalcina (OC, Goatanti-oc SC18319 – Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). O método de detecção usado foi por imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a 3,3 diaminobenzina (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA). O anticorpo secundário biotilado foi o anti-cabra (goat) produzido em burro (donkey) (Biotin – SP – AffiniPure, donkeyanti-goatIgG 705065147 – Jackson ImmunoresearchLaboratories, PA, EUA). Foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários (controle negativo), utilizando-se a incubação com soro normal de cabra a 5%, para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) bem como a expressão das proteínas OPG e OC, acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica® DFC 300FX, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Pentim III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box®, LeicaImaging Manager – IM50 Demo Software, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça). Foram utilizados escores para as células marcadas em áreas determinadas, que sabidamente estão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo. Para facilitar a comparação entre os diferentes grupos e períodos, os escores da análise imunoistoquímica foram convertidos em frequências de médias percentuais de acordo com o período de avaliação (Queiroz et al., 2008), para ambos os grupos. O avaliador desconhece o grupo pertencente a cada defeito ósseo, para evitar tendenciosidade durante a análise.

Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida por meio da comparação intra grupos e entres os grupos GGI e GCI. As amostras foram submetidas à curva de normalidade, resultando em dados não paramétricos. O teste estatístico empregado foi Kruskal-

Wallis e como pós-teste para os valores que mostraram significância estatística (AON comparando o período de 7 e 40 dias do grupo GGI; e AON no período de 40 dias comparando GGI e GCI) foi empregado o método de Dunn. Os testes foram conduzidos através de software Biostat 5.3, utilizado para análise estatística em estudos na área da saúde.

Resultados

O processo de cura dos animais evoluiu sem intercorrências e sem complicações pós-operatórias durante o período de 40 dias. No primeiro dia pós-operatório encontravam-se sem qualquer dor notável ou limitação. Ao final dos 40 dias, todos os implantes encontravam-se em posição, sem deiscência da ferida cirúrgica.

Tomografia computadorizada

As dimensões dos dois compartimentos dos seios maxilares foram semelhantes em todos os espécimes, mostrando, em alguns casos, espessamento da mucosa sinusal e/ou aumento da densidade dos tecidos sugestivo de processo inflamatório sinusal, sinusite. Com relação ao posicionamento dos implantes dentários, foi possível confirmar sua localização no interior da cavidade sinusal, em diferentes direções anteroposteriores (Figura 4).

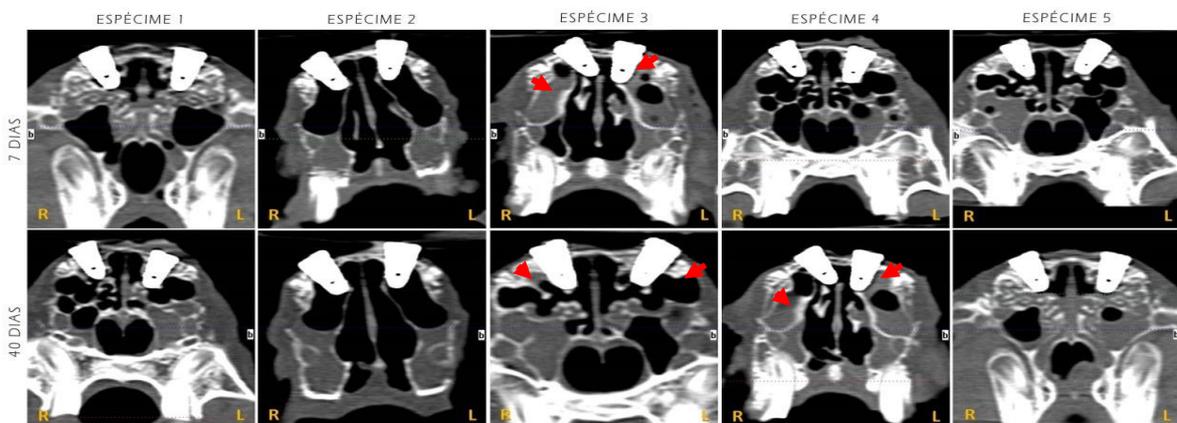


Figura 4: Cortes coronais das tomografias computadorizadas realizadas com janela para tecidos mineralizados nos espécimes dos períodos experimentais de 7 e 40 dias, grupo GGI e GCI. Foi possível visualizar o posicionamento dos implantes dentários e áreas sugestivas de processo inflamatório sinusal (seta vermelha).

Achados Histológicos

Após o período de 7 dias, tecido conjuntivo fibroso foi observado em comprimento total em ambos os grupos: experimental (GGI) e controle (GCI) em contato com a superfície do implante, recoberto por tecido fibroso ciliado com glândulas, característico da mucosa sinusal. Em relação ao tecido ósseo, há uma tendência de concentração junto a superfície do implante (Figuras 5 a 9).



Figura 5: Imagem de corte histológico descalcificado no sentido coronal do complexo nasal aos 7 dias (HE, 1,0X).

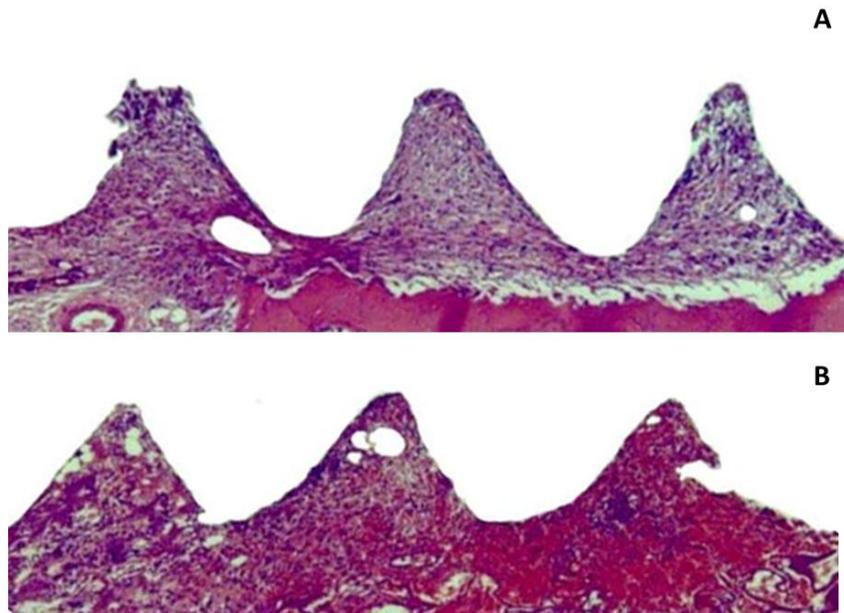


Figura 6: (A) e (B): Regiões das espiras dos implantes do grupo Gingistat® (GGI), aos 7 dias (150x).

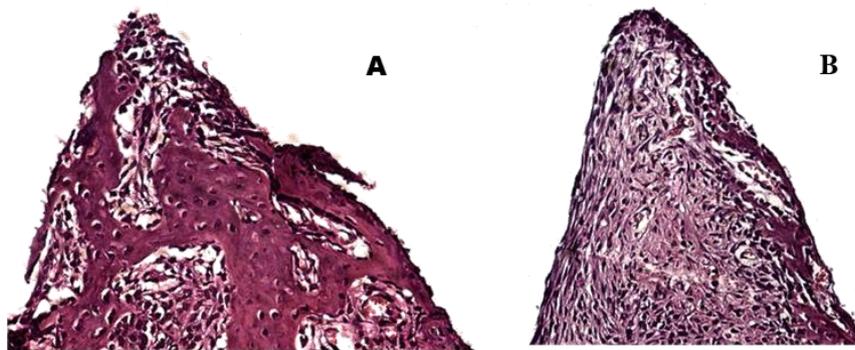


Figura 7:(A) e (B): Regiões das espiras do implante do grupo Coágulo Implante (GCI), aos 7 dias (250x).

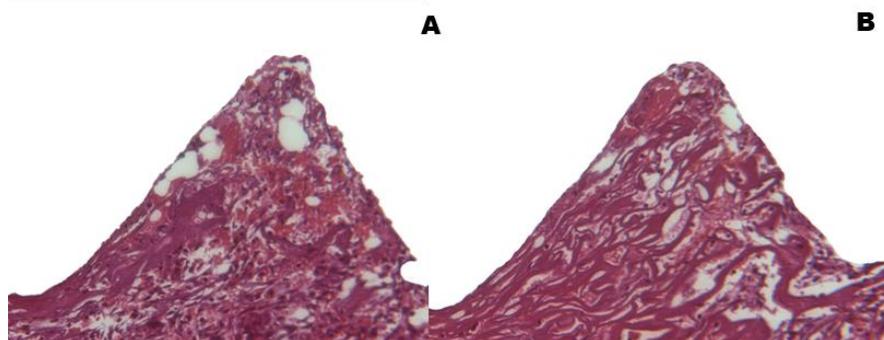


Figura 8:(A) e (B): Regiões das espiras do implante do grupo Gingistat® (GGI), aos 7 dias (250x).

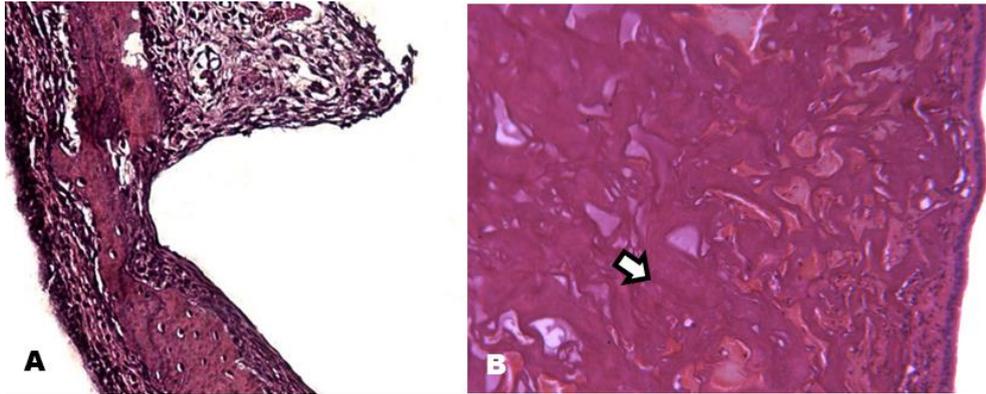


Figura 9:(A) e (B): Região de espira do implante do (a)Grupo Coágulo(GCI) e (b) Grupo Gingistat®(GGI), mostrando região de membrana sinusal , aos 7 dias (250x). Seta branca: formação de tecido mineralizado.

Aos 40 dias, tecido ósseo pode ser observado ao redor dos implantes com aumento gradual nos dois grupos estudados. Uma maior tendência a neoformação óssea foi observada no grupo GGI (Figuras 10 a12).



Figura 10: Imagem de corte histológico descalcificado no sentido coronal do complexo nasal aos 40 dias (HE, 1,0X).

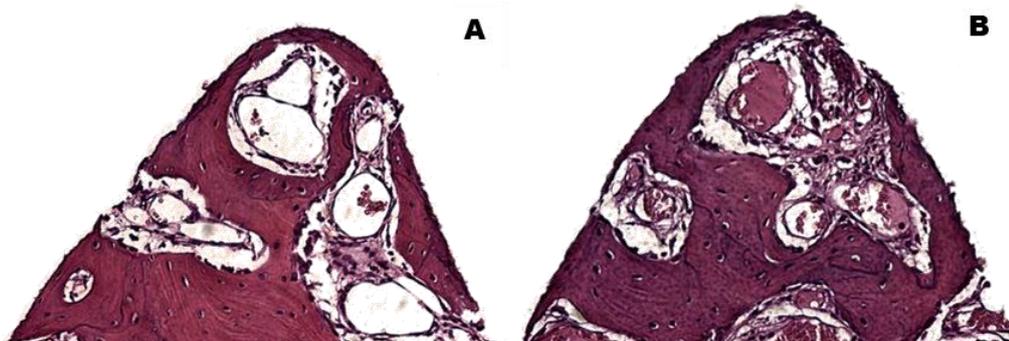


Figura 11:(A) e (B): Região de espira do implante do grupo Coágulo Implante (GCI), aos 40 dias (250x).

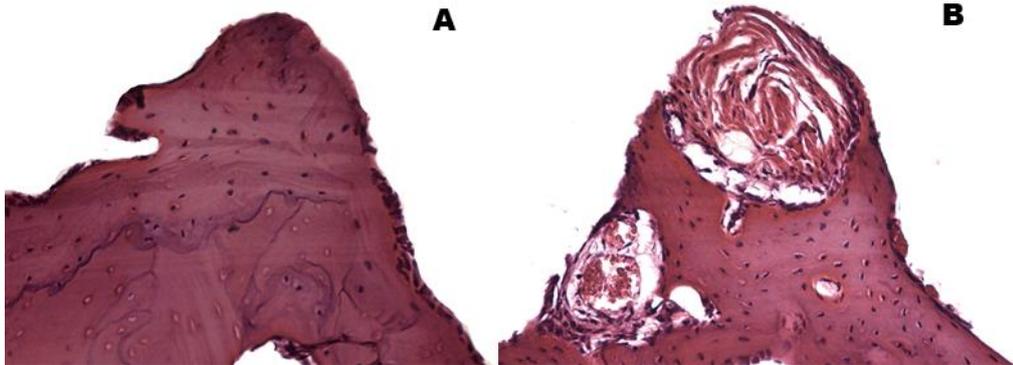


Figura 12:(A) e (B): Região de espira do implante do grupo Gingistat® Implante (GGI), aos 40 dias (250x).

Histomorfometria

Na comparação da AON entre os grupos GGI e GCI aos 7 dias não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1719$). No entanto, no período de 40 dias os valores de AON para GCI e GGI se mostraram significante estatisticamente ($p = 0,059$). Na comparação dentro do mesmo grupo em períodos diferentes, os valores de AON foram estatisticamente significante GGI ($p = 0,0157$), mas o mesmo não foi observado para GCI ($p = 0,462$ para GCI) (Gráfico 1).

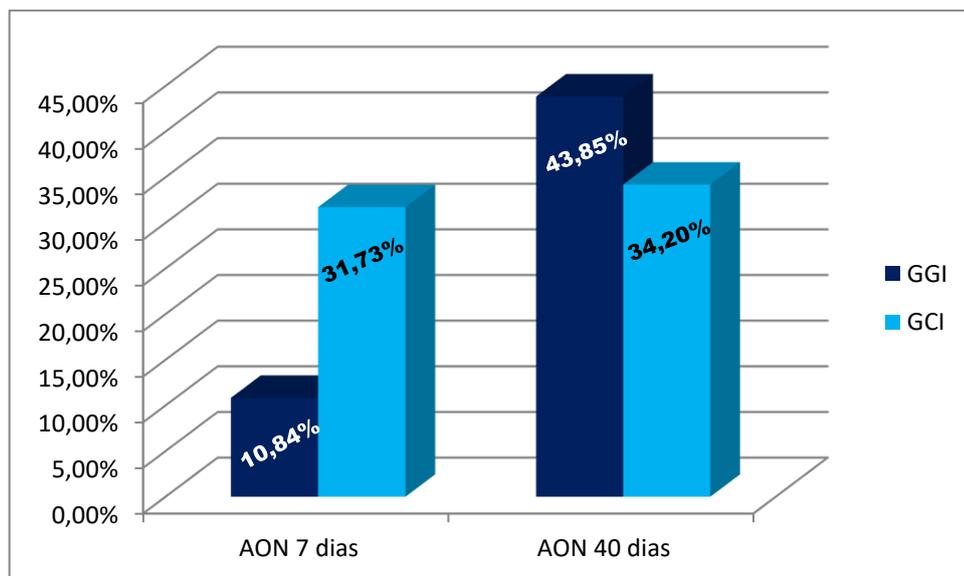


Gráfico 1: Gráfico da porcentagem da Área de Osso Neoformado (AON) em relação aos grupos coágulo implante (GCI) e Gingistat® Implante (GGI), aos 7 e 40 dias de eutanásia.

Imunoistoquímica

A análise das imunomarcações mostrou a presença das proteínas estudadas no tecido ósseo formado junto aos implantes instalados. Foi avaliada a presença da osteoprotegerina (OPG) com o intuito de caracterizar a taxa de remodelação do tecido ósseo, a osteocalcina, caracterizando a taxa de mineralização e a maturidade do tecido ósseo formado (Figuras 13-16).

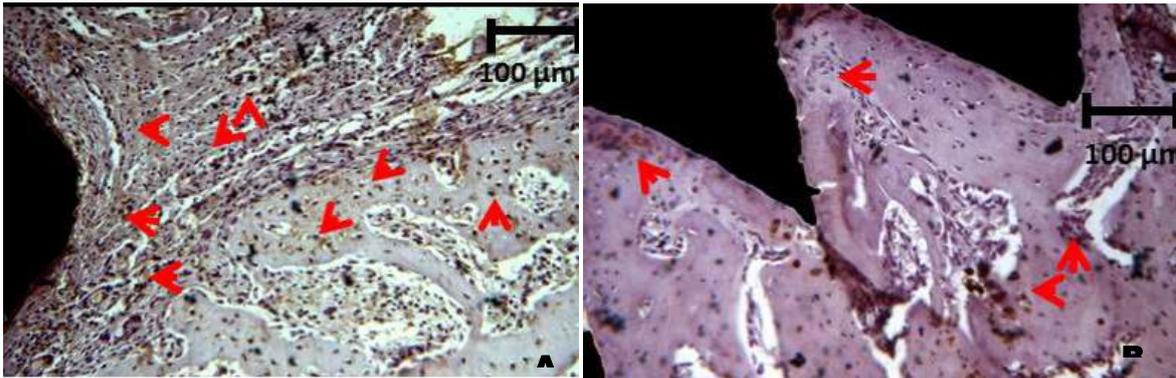


Figura 13: Imagem imunistoquímica mostrando a marcação da proteína OPG no grupo GCI aos (A) 7 e (B) 40 dias.

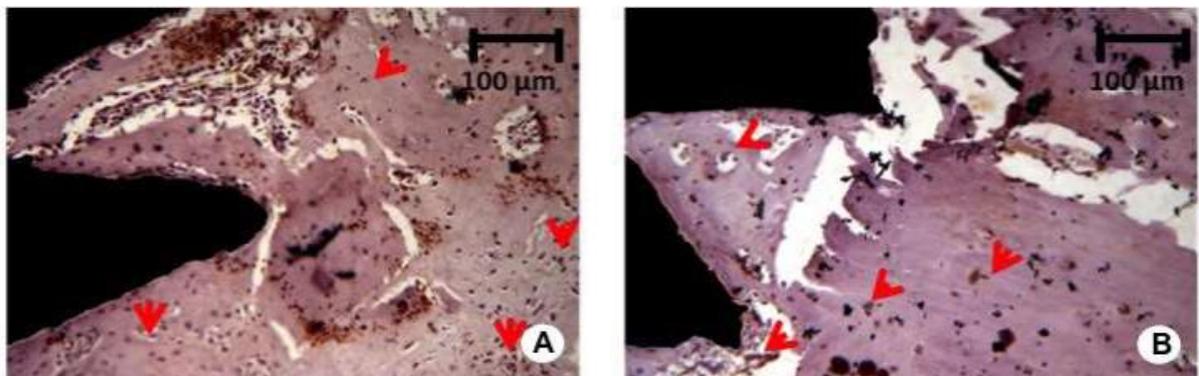


Figura 14: Imagem imunistoquímica mostrando a marcação da proteína OPG no grupo GGI aos (A) 7 e (B) 40 dias.

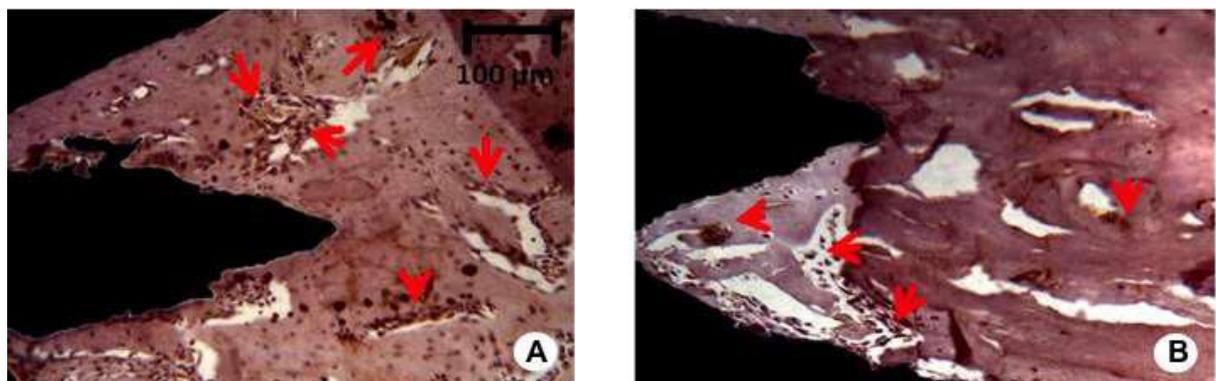


Figura 15: Imagem imunistoquímica mostrando a marcação da proteína OC no grupo GCI aos (A) 7 e (B) 40 dias.

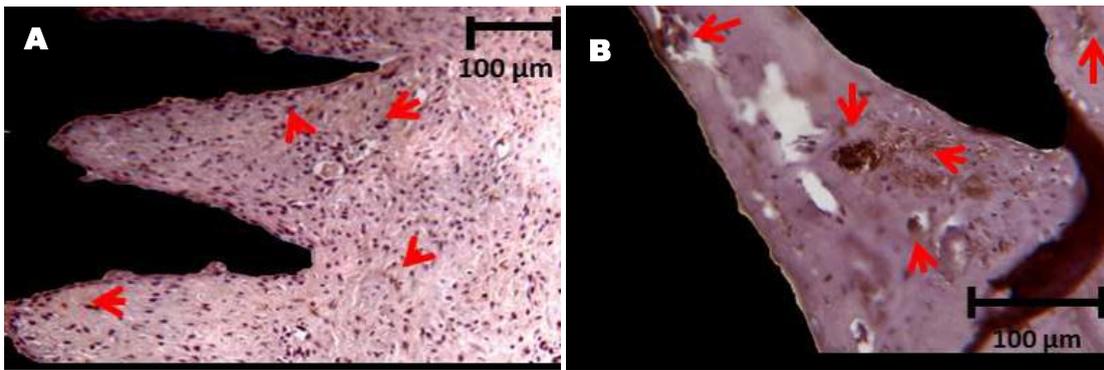


Figura 16: Imagem imunohistoquímica mostrando a marcação da proteína OC no grupo GGI aos (A) 7 e (B) 40 dias.

12. Discussão

Os agentes hemostáticos têm sido utilizados no controle de hemorragias dos leitos doadores em procedimentos cirúrgicos para remoção de enxertos ósseos. Além dessa indicação, as esponjas de colágeno são estudadas como veículos para engenharia tecidual (Chvapil, 1977; Rohanizadeh, Swain, Mason, 2008) no processo de reparo do tecido ósseo e cartilagem e como material de revestimento em feridas por queimadura (Chvapil, 1977; Keates, Viscardi, 1990). Além das propriedades hemostáticas, seria interessante se estes materiais pudessem favorecer o reparo ósseo.

De fato, a adição de uma rede de fibrina à esponja de colágeno aumentou a diferenciação de osteoblastos de uma forma dependente da dose, sugerindo que estes materiais podem favorecer o reparo ósseo. Além disso, diversos estudos têm avaliado a influência de agentes hemostáticos na reparação óssea, com resultados positivos e negativos para esponja de colágeno (Finn, Schow, Schneiderman, 1992; Santos et al., 2015a; Santos et al., 2015b). Assim, com base nos resultados promissores anteriores, este estudo foi desenhado com o objetivo de avaliar o processo de ossificação do seio maxilar quando usado uma esponja de colágeno equino como substituto ósseo associado ao posicionamento imediato de implantes dentários de titânio.

A esponja de colágeno equino foi estudada por Bomfim (2015) como substituto ósseo em seio maxilar de coelhos. Seus resultados mostraram que houve um processo de reparo ósseo satisfatório com formação de tecido ósseo maduro aos 40 dias pós-operatórios, no entanto, o grupo com esponja de colágeno mostrou baixa estabilidade dimensional. Isto é, quando comparada a área aumentada aos 7 dias e a área óssea neoformada aos 40 dias, uma perda significativa pode ser observada, mostrando que a esponja não foi capaz de manter fisicamente o espaço criado cirurgicamente, sofrendo consideravelmente com o processo de reexpansão do seio

maxilar. Esse processo de reexpansão do seio maxilar também foi observado do estudo de Asai, Shimizu e Ooya (2002), quando o processo de ossificação do seio maxilar foi avaliado após procedimento de elevação do assoalho do seio maxilar e preenchimento com coágulo sanguíneo. Para tentar contrapor o processo de reexpansão do seio maxilar, os autores deste estudo propuseram a instalação simultânea de implantes dentários no momento do enxerto com a esponja de colágeno no seio maxilar. O intuito foi de obter o “efeito tenda” já descrito na literatura, onde o parafuso do implante dentário funcionaria como uma barreira física ao processo de colapso da membrana do seio maxilar divulsionada (Palma et al., 2006; Caneva et al., 2017).

Quando avaliados os resultados encontrados em nosso estudo, podemos observar aos 40 dias maior área óssea neoformada no grupo GGI que corrobora com a intensidade da imunomarcação encontrada neste período. A osteocalcina é a principal proteína não colágena da matriz extracelular do tecido ósseo, caracterizando a etapa da mineralização do tecido ósseo, bem como o seu estágio de maturidade. Nos grupos estudados, mostrou-se com escore moderado (2) aos 7 e 40 dias no grupo GCI. Já no grupo GGI apresentou-se moderada aos 7 dias e leve aos 40 dias. O que nos leva a supor uma participação positiva da esponja de colágeno nos resultados favoráveis observados. A isto pode ser atribuído o efeito osteocondutor da esponja de colágeno já mostrado no estudo de Bomfim (2015). Sua permeabilidade permite que a esponja seja embebida em sangue, aumentando a disponibilidade de células sanguíneas que mais para frente participarão ativamente do processo de cura. Observando a mucosa sinusal através de cortes coronais da tomografia computadorizada, notamos o espessamento da mucosa sinusal em alguns espécimes, indicativo de alguma inflamação ou contaminação, já citada por Misch (1992) como uma complicação deste tipo de procedimento.

Observamos também, através das imagens obtidas da análise histológica, a presença de neoformação óssea junto à membrana sinusal, pela presença de células osteoblásticas. Baseados em técnicas histológicas e dados histomorfométricos padrão, Falah et al. (2015) provaram, através de procedimento cirúrgico in vivo, em rato, para o procedimento de levantamento de seio maxilar, que sua hipótese de que a neoformação óssea é iniciada dentro do coágulo de fibrina ou no osso, a uma mesma taxa e com mesma densidade, era verdadeira. As células osteogênicas presentes nesse coágulo de fibrina são originadas a partir da membrana sinusal.

Percebemos, então, uma semelhança entre os dados encontrados, por ambos mostrarem a presença de neoformação óssea junto a membrana sinusal.

Podemos concluir, portanto, que o a esponja de colágeno favoreceu o processo de ossificação do seio maxilar quando associado à instalação simultânea de implantes dentários, mostrando ser uma opção de substituto ósseo nessas condições.

Referências

1. Aghaloo, T.L.; Moy, P.K. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for the implant placement? **Int J Oral Maxillofac Implants**, 22(1): 49 – 70, 2007. Erratum in: **Int J Oral Maxillofac Implants**.23(1):56, Jan-Feb. 2008.
2. Asai, S.; Shimizu, Y.; Ooya, K. Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. **Clin Oral Implants Res.**, 13(4):405-9, Aug. 2002.
3. Bomfim, Bianca Bravim. Análise do processo de reparo após enxerto de hidroxiapatita e esponja de colágeno em seio maxilar de coelhos. 2015. Exame Geral de Qualificação (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015. 50 p.
4. Boyne, P.J.; James, R.A.; Linda, L. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **J Oral Surg**, 38: 613-616, Aug. 1980.
5. Branemark, P.I. Introducción a la osseointegración in: *Protesis tejido integradas la osseointegración en la odontología clínica*. **Quintessence books** 1987: 11-75.
6. Caneva, M.; Lang, N.P.; Rangel, I.J.G.; Ferreira, S.; Caneva, M.; De Santis, E.; Botticelli, D. Sinus mucosa elevation using Bio-Oss® or Gingostat® collagen sponge: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, 28(7): e21-e30, Jul. 2017.
7. Călin, C.; Petre, A.; Drafta, S. Osteotome-Mediated Sinus Floor Elevation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 29: 558-576, May-Jun. 2014.
8. Chvapil, M. Collagen sponge. theory and practice of medical applications. **J Biomed Mater Res**, 11:721-41, Sep. 1977.
9. Dietze, S.; Bayerlein, T.; Proff, P.; Hoffmann, A. & Gedrange, T. As propriedades ultra-estrutura e processamento de Straumann Osso Cerâmica™ e NanoBone™. **Folia Morphologica**, 65: 63-65, 2006.
10. Falah, M.; Srouji, S.A. Discussion concerning direct bone regeneration on and around inserted dental implants in maxillary sinus lifting procedures without any placement of bony substitutes. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 44(12):1582-3, Dec. 2015.
11. Finn, M.D.; Schow, S.R.; Schneiderman, E.D. Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents. **J Oral Maxillofac Surg**, 50:608-12, Jun. 1992.

12. Goldberg, V.M.; Stevenson, S. The biology of bone grafts. **Semin Arthroplasty**, 4:58-63, Apr. 1993.
13. Hench, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, 19: 1419, Aug. 1998.
14. Keates, R.H.; Viscardi, J.J. Current uses of collagen shields. **West J Med**, 153:186-7, Aug. 1990.
15. Misch, C.E. The pharmacologic management of maxillary sinus elevation surgery. **J Oral Implant**, 18:15-16, 1992.
16. Nedir, R.; Nurdin, N.; Khoury, P.; Perneger, T.; El Hage, M.; Bernard, J.P.; Bischof, M. Osteotome sinus floor elevation with and without grafting material in the severely atrophic maxilla. A 1-year prospective randomized controlled study. **Clin Oral Impl Res**, 24(11): 1257-1264, Nov. 2013.
17. Palma, V.C.; Magro-Filho, O.; de Oliveria, J.A.; Lundgren, S.; Salata, L.A.; Sennerby, L. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates. **Clin Implant Dent Relat Res**, 8(1):11-24, 2006.
18. Potter, J.K.; Ellis, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **J Oral Maxillofac Surg**, 62: 1280-97, Oct. 2004.
19. Queiroz, T.P.; Souza, F.A.; Okamoto, R.; Margonar, R.; Pereira-Filho, V.A.; Garcia Junior, I.R.; Hochuli-Vieira, E. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. **J Oral Maxillofac Surg**, 66:1233-1240, Jun. 2008.
20. Quiney, R.E.; Brimble, E.; Hodge, M. Maxillary sinusitis from dental osseointegrated implants. **J Laryngol Otol**, 104: 333-334, Apr. 1990.
21. Sartori, S.; Silvestri, M.; Forni, F.; Cornaglia, A.I.; Tesei, P. & Cattaneo, V. (2003) Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Implants Res**, 14: 369-372, Jun. 2003.
22. Sbordone, L.; Toti, P.; Menchini-Fabris, G.B.; Sbordone, C.; Piombino, P.; Guidetti, F. Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles, **Int J Oral Maxillofac Surg**, 38: 1059-1065, Oct. 2009.