

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

RAYZA RODRIGUES CAMPOS MANCUZO

**BIOSILICATO® EM LEVANTAMENTO DE SEIO
MAXILAR: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

BAURU
2015

RAYZA RODRIGUES CAMPOS MANCUZO

**BIOSILICATO® EM LEVANTAMENTO DE SEIO
MAXILAR: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação da Prof^ª. Dra. Patrícia Pinto Saraiva e coorientação da Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

BAURU
2015

Mancuzo, Rayza Rodrigues Campos

M269b

Biosilicato® em levantamento de seio maxilar: análise imunohistoquímica / Rayza Rodrigues Campos Mancuzo. -- 2015. 21f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pinto Saraiva.

Coorientadora: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Biomaterial. 2. Coelho. 3. Imunohistoquímica. 4. Osteopontina. 5. Osteocalcina. I. Saraiva, Patricia Pinto. II. Matsumoto, Mariza Akemi. III. Título.

RAYZA RODRIGUES CAMPOS MANCUZO

**BIOSILICATO® EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR:
ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia sob orientação do Profª Drª Patrícia Pinto Saraiva e coorientação da Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

Banca examinadora:

Profª Drª Patrícia Pinto Saraiva

Universidade do Sagrado Coração

Profª Drª Mariza Akemi Matsumoto

UNESP - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Prof. Me. Marcelo Salles Munerato

Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 16 de Novembro de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, que na Sua infinita bondade e graça me possibilitou realizar o sonho de me tornar uma cirurgiã dentista, sonho este, que outrora se mostrava inatingível.

AGRACEDIMENTOS

A Deus primeiramente, por me possibilitar estes agradecimentos, por ter me dado saúde e força para superar os obstáculos encontrados no caminho, pela família maravilhosa que me deu e pelas pessoas especiais que colocou em minha vida.

À minha mãe Alaide, por ser a grande responsável pela minha formação pessoal, por ter me criado sozinha em meio a tantas dificuldades. E mesmo ser ter formação acadêmica, por ter me incentivado tanto nesta jornada do conhecimento.

Ao meu esposo Tiago, por ser meu companheiro incondicional, por todo o seu apoio e carinho desde que nos conhecemos, e por fazer dos meus sonhos, nossos sonhos. Sem ele com certeza eu não conseguiria.

À minha irmã Laís, por sempre estar ao meu lado, me auxiliando em minhas escolhas.

Às queridas professoras dra. Patrícia Pinto Saraiva, minha orientadora e dra. Mariza Akemi Matsumoto, coorientadora, pela competência com que conduzem sua profissão, sendo exemplo de excelência profissional, a qual me espelho, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos professores e funcionários que me acompanharam durante toda a graduação.

Aos pacientes da universidade, pela confiança em mim depositada.

À Universidade Sagrado Coração pela sua estrutura física e equipe profissional.

À Maira Couto, técnica do laboratório de Histologia e Imunohistoquímica pela execução das lâminas.

Ao Programa Universidade para Todos do Governo Federal pela bolsa de estudos.

Ao Cursinho Primeiro de Maio, por me preparar para pleitear uma vaga em uma universidade. Que sempre tenham ciência da importância do trabalho que desenvolvem.

Às irmãs que a odontologia me deu: Camila Argentino, Cintia da Graça, Fernanda Rayssa, Mariana Esdras e Raquel Damazia. Levarei sempre no coração os momentos que vivemos dentro e fora da universidade. Tenho a certeza de que serão excelentes profissionais.

Aos irmãos em Cristo da Igreja Batista Betel do Jardim Petrópolis por todo o apoio.

RESUMO

Diferentes biomateriais induzem à maturação e remodelação óssea em tempos distintos, dependendo de suas características. O presente estudo teve como objetivo comparar estes processos por meio de marcação imunistoquímica das proteínas osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC) no reparo de levantamento de seio maxilar utilizando uma nova vitrocerâmica bioativa com uma hidroxiapatita bovina consagrada no mercado. Quinze coelhos foram distribuídos em 2 grupos de acordo com o biomaterial utilizado: Grupo BO) hidroxiapatita bovina particulada (Bio-Oss®) e Grupo BS) vitrocerâmica particulada Biosilicato®. Após 15, 45 e 90 dias os animais foram eutanasiados e os espécimes removidos para confecção das lâminas histológicas para marcação imunistoquímica. Para avaliação dos dados, utilizou-se análise qualitativa ordinal por meio dos escores “-“ para ausência de imunomarcação, “+”, “++” e “+++” para discreta, moderada e intensa, respectivamente, considerando-se o escore ocorrido em maior frequência nos espécimes analisados. Observou-se marcação crescente e regular para OPN nos osteoblastos e linhas de reversão, e OC na matriz óssea (TC) no Grupo BO. No Grupo BS, a marcação para OPN foi moderada aos 15 dias, tornando-se leve e intensa aos 45 e 90 dias, respectivamente. A marcação para OC foi discreta até os 45 dias, mostrando-se moderada somente aos 90 dias. Considerando-se os resultados, concluiu-se que, nestas condições, a mineralização e remodelação óssea ocorrem mais tardiamente na presença da vitrocerâmica que na da hidroxiapatita bovina.

Palavras chaves: Biomaterial. Coelho. Imunohistoquímica. Osteopontina. Osteocalcina. Biosilicato.

ABSTRACT

Different biomaterials induce maturation and bone remodeling at different times, depending on their characteristics. This study aimed to compare the processes by means of immunohistochemical staining of the proteins osteopontin (OPN) and osteocalcin (OC) in the maxillary sinus lifting repair using a new vitroceraamic with a bioactive bovine hydroxyapatite consecrated in the market. According to the biomaterial used fifteen rabbits were divided into 2 groups: Group BO) bovine particulate hydroxyapatite (Bio-Oss ®) and BS Group) vitroceraamic particulate Biosilicate®. After 15, 45 and 90 days the animals were euthanized and the specimens removed to prepare the histological slides for immunohistochemical staining. For evaluation of data an ordinal qualitative analysis by means of scores was used "-" for no immunostaining, "+", "++" and "+++" to mild, moderate and severe, respectively, considering the score occurred more frequently in specimens analyzed. There was increasing and regular markup for OPN in osteoblasts and reversal lines, and OC in bone matrix (CT) in the BO Group. In Group BS, marking OPN were moderate after 15 days, making it lightweight and strong at 45 and 90 days, respectively. The markup for OC was discreet to 45 days, only showing moderated to 90 days. Considering the results, it was concluded that under these conditions, mineralization and bone remodeling occur later in the vitroceraamic than in the presence of bovine hydroxyapatite.

Keywords: Biomaterial. Rabbit. Immunohistochemistry. Osteopontin . Osteocalcin . Biosilicate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	08
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 ANIMAIS.....	13
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	13
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	13
3.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	14
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	25

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A região posterior da maxila edêntula é conhecida por ter osso de pobre qualidade e volume reduzido (LEKHOLM e ZARB, 1985), sendo a proximidade do seio maxilar com o rebordo alveolar um dos fatores responsáveis pela falta de adequada quantidade óssea quando se pensa na possibilidade de reabilitação oral utilizando-se implantes osseointegráveis. Na ausência dos dentes pré-molares e molares superiores, os seios maxilares tendem a sofrer a chamada pneumatização, resultando no aumento do espaço aéreo da região, podendo se estender para o rebordo alveolar, diminuindo a altura óssea entre o soalho do seio e a crista do rebordo alveolar.

A fim de se viabilizar a reabilitação desta região, Tatum no ano de 1977, propôs a modalidade cirúrgica para levantamento de seio maxilar que consistia no preenchimento parcial desta cavidade com osso autógeno no intuito de aumentar a dimensão óssea vertical na região lateral da maxila. A primeira publicação desta técnica com resultados em longo prazo foi feita por BOYNE e JAMES (1980). Em 1988, WOOD e MOORE adaptaram a técnica original com resultados igualmente satisfatórios.

Apesar dos bons resultados e da segurança na utilização dos enxertos ósseos autógenos, enfatizados na conferência de Boston, promovida pela Academia de Osseointegração no ano de 1996, denominada “Sinus Lift Graft Consensus Conference”, desvantagens como a abordagem cirúrgica de outra região, a morbidade da área doadora, bem como a necessidade de alguns procedimentos serem realizados em ambiente hospitalar elevando os custos, fizeram com que alguns autores começassem a utilizar outros materiais alternativos na reconstrução de regiões posteriores de maxila, como os aloenxertos, os xenoenxertos e os materiais aloplásticos (WHEELER, 1997). Desde então, uma variedade no que diz respeito aos materiais de preenchimento vem sendo relatada, associados aos enxertos autógenos ou não, com índices de sucesso após a instalação de implantes osseointegráveis que se aproximam de 100% (HÜRZELER et al., 1996; ZINNER e SMALL, 1996; FUGAZZOTTO e VLASSIS, 1998; LAMBERT et al., 2011; RICKERT et al., 2012).

Um dos materiais que se destaca pela sua biocompatibilidade e semelhança químico-física com o osso humano é o xenoenxerto Bio-Oss, o qual consiste de osso bovino desproteínizado e esterilizado com 75-80% de porosidade e tamanho dos cristais de aproximadamente 10 µm na forma de grânulos corticais, possuindo uma matriz porosa natural, não-antigênica com partículas de 0,25-1,0 mm, sendo largamente utilizado não

somente para os procedimentos de levantamento de seio maxilar (ORSINI et al., 2005; SIVOLELLA et al., 2011; RIACHI et al., 2012), mas também para outras modalidades de reconstrução (BERGLUNDH E LINDHE, 1997; GOKHALE E DWARAKANATH, 2012; LINDHE et al., 2013). Fornece arcabouço para a migração celular, estando integrado ao processo fisiológico de remodelação. As análises da interface entre osso e Bio-Oss®, por meio de microscopia eletrônica realizadas por ORSINI et al. (2005), demonstraram um íntimo contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do material, que aliado aos seus baixos índices de reabsorção, permitem a maturação e remodelação do tecido, resultando em um osso de boa qualidade.

Atualmente, um promissor biomaterial estudado é o vidro bioativo, composto por $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. De acordo com HENCH E POLAK (2002), esta vitrocerâmica (biovidro), quando em contato com o tecido vivo e na presença de fluidos corpóreos, desenvolve uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na sua superfície, promovendo uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante. Esta camada interfacial assemelha-se aos processos naturais de reconstrução dos tecidos e é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. Devido a essas propriedades, os vidros bioativos são utilizados há cerca de 30 anos na forma de implantes em cirurgias cranio-maxilo-faciais e como substitutos do tecido ósseo.

Apesar dos seus efeitos benéficos para a formação óssea, o uso dos vidros bioativos tem sido limitado devido às baixas propriedades mecânicas destes materiais (James, 1995). Esta constatação estimulou HENCH, então pesquisador da University of Florida, e os pesquisadores ZANOTTO E PEITL do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, a buscarem uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade apresentado pelos vidros bioativos e ao mesmo tempo apresentasse propriedades mecânicas superiores a estes. Assim, esses pesquisadores obtiveram, na década de 90, uma vitrocerâmica altamente bioativa e com elevadas propriedades mecânicas, denominada Biosilicato® (ZANOTTO et al., 2004; GRANITO et al., 2011).

Como a maioria dos vidros bioativos, a composição química do Biosilicato® apresenta os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), sendo liberados em solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{2-} . Estes são liberados em pequenas quantidades no processo de dissolução e formação da camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície do Biosilicato®, que possibilita o estabelecimento de uma ligação química extremamente forte com o tecido ósseo e semelhante química e

estruturalmente à fase mineral do osso, assim como ocorre com os vidros bioativos (RAVAGNANI, 2003).

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de se utilizar esta vitrocerâmica como material de preenchimento visando uma possível reabilitação com implantes osseointegráveis. RORIZ et al. (2010) preencheram alvéolos dentários de cães com Biosilicato® particulado e após 12 semanas de cicatrização instalaram implantes osseointegráveis na região. Os espécimes foram analisados após 8 semanas das instalações revelando preservação do rebordo alveolar e integração dos implantes de modo semelhante aos alvéolos preenchidos com outro vidro bioativo, o Biogran®. Matsumoto et al. (2012) associaram enxerto autógeno particulado aos grânulos do Biosilicato® para preenchimento de defeitos de calota de coelhos, em comparação à sua utilização isolada e ao enxerto autógeno isolado. Macroscopicamente tornou-se difícil de visualizar o limite dos defeitos preenchidos com o biomaterial, e microscopicamente observou-se direta deposição óssea sobre a superfície das partículas. As marcações imunohistoquímicas para Runx-2 e VEGF foram semelhantes quando associado ou não ao uso do enxerto autógeno.

Além disso, trabalhos demonstraram efeito superior do Biosilicato® sobre células osteoblásticas e síntese de proteínas da maturação celular e deposição de matriz óssea (MOURA NETO et al., 2007), melhor reorganização tecidual e maior volume ósseo (GRANITO et al, 2009) em comparação ao biovidro 45S5®, somado à ausência de genotoxicidade (KIDO et al., 2013).

O mecanismo de remodelação óssea pelo qual um novo tecido ósseo substitui um antigo é um processo mediado por osteoblastos, que produzem nova matriz óssea, e por osteoclastos, células responsáveis por sua reabsorção (KOSTENUIK e SHALHOUB, 2001). Uma adequada vascularização é essencial para a estabilidade desse novo tecido ósseo formado. A marcação de proteínas específicas permite verificar a atividade osteogênica. Entre os marcadores que indicam o processo de formação óssea estão a osteocalcina e a osteopontina. A osteocalcina é uma proteína óssea específica não colagenosa exclusivamente sintetizada por osteoblastos, odontoblastos e condrócitos hipertróficos, sendo um indicador de atividade osteoblástica (SAGER et al, 2012 e WEILER e et al, 2013) A osteopontina é uma proteína estrutural da matriz extracelular presente nos tecidos duros. É uma das proteínas mais sintetizadas pelas células osteoblásticas durante o desenvolvimento ósseo (HUANG et al, 2004 e PEDRAZA et al, 2008).

Assim, a possibilidade de se empregar um substituto ósseo nacional que possibilite a neoformação óssea, bem como a maturação e remodelação do tecido ao longo do tempo seria

de grande relevância, uma vez que possibilitaria uma redução de custos, associada à menor morbidade do paciente. A identificação de materiais que apresentem qualidades comparáveis aos biomateriais já consagrados no mercado e na literatura, justifica o desenvolvimento do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a marcação das proteínas osteocalcina e osteopontina quando na utilização da vitrocerâmica bioativa (Biosilicato[®]) particulada como material de preenchimento para levantamento de seio maxilar de coelhos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 15 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com aproximadamente cinco meses de idade e peso variando de 4 a 5 kg. Durante todo o período experimental os animais permaneceram confinados em gaiolas de aço individuais no Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC), sendo limpas diariamente, recebendo água e ração sem restrição.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um total de 15 animais compuseram dois grupos de acordo com o tipo de material de preenchimento dos seios maxilares, a serem eutanasiados após a) 14, b) 45 e c) 90 dias, conforme descrito a seguir:

- Grupo BO – Hidroxiapatita bovina (Bio-Oss®, Geistlich, Suíça);
- Grupo BS – Vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®, Vitrovita, São Carlos, Brazil);

Desse modo, 15 coelhos compuseram os dois grupos experimentais, sendo que para o levantamento dos seios maxilares do lado direito foi utilizado Bio-Oss®, e do lado esquerdo Biosilicato®.

Ao final dos períodos experimentais estabelecidos todos os animais foram eutanasiados para as avaliações histopatológicas. Para tanto, os mesmos foram anestesiados e sacrificados por meio de dose letal de solução anestésica. Os seios maxilares foram removidos com auxílio de brocas carbide em baixa rotação, fixados em formalina (Merck, Darmstaad, Alemanha) a 10% por 48 horas, lavados em água corrente e colocadas em solução de EDTA à 4% para desmineralização dos espécimes, até que os mesmos apresentassem consistência suficiente para a microtomia. Cortes de 3µm de espessura foram obtidos para as marcações imunohistoquímicas.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Ao início do delineamento experimental, todos os animais foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intramuscular do anestésico Quetamina a 1% (0,20ml/Kg) (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% (0,30ml/Kg). (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil).

A tricotomia da área foi realizada e após a antissepsia com solução aquosa de polivinilpirrolidona 1% (Ceras Johnson, Rio de Janeiro, Brasil) em toda a região infra-orbitária e nasal, estas áreas foram anestesiadas localmente, com injeções de cloridrato de mepivacaína a 2% com adrenalina na proporção de 1:100.000. O osso nasal e as suturas naso-incisais foram expostas por meio de incisão reta sobre a linha média do osso nasal, permitindo o acesso aos seios maxilares. Uma broca diamantada de número 8 montada em motor elétrico de baixa rotação sob copiosa irrigação com solução fisiológica a 0,9% foi utilizada para confeccionar a janela óssea na parede lateral da maxila. A membrana sinusal foi delicadamente elevada com curetas específicas a partir do assoalho do seio maxilar, tomando-se cuidado para não romper a mucosa sinusal. Com um descolador delicado, a mucosa foi afastada e elevada da região do soalho do seio maxilar, permitindo a acomodação dos biomateriais, os quais foram acomodados sem compactação. As janelas ósseas de acesso foram cobertas com membranas de colágeno para prevenir a invasão por tecido conjuntivo. Foram utilizados os biomateriais Biosilicato[®] e Bio-Oss[®] em porções iguais a serem determinadas no momento da cirurgia. Os tecidos foram reposicionados e suturados por planos com fio de nylon 5-0 (Ethicon-Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Os animais foram medicados com dose de antibiótico (Flotril[®] 2,5%, Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, Brasil) de 0,2ml/Kg (equivalente a 5mg/Kg de peso de enrofloxacin) e com analgésico de ação central cloridrato de tramadol intramuscular (0,10 ml/Kg) no pós-operatório imediato.

3.4 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a determinação dos padrões moleculares seguindo a incorporação do biomaterial, foi utilizado marcador imunohistoquímico para osteocalcina e osteopontina. Desse modo, cortes de 3µm foram tratados com proteinase K por 30 minutos, a temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados anticorpos primários policlonais anti-Osteocalcina e anti-Osteopontina (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A) em temperatura ambiente por 24 horas, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Após isto, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos, e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com

Hematoxilina de Harris. Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário, e para o positivo foram utilizadas lesões inflamatórias inespecíficas.

Uma vez realizada a marcação, foram avaliados 5 campos por lâmina, em aumentos de 40X. A determinação dos níveis de marcação para cada anticorpo foi realizado de modo semi-quantitativo, utilizando-se escores de 1 a 4 (1 = ausente a 4 = intenso), de acordo com PEDROSA JR. et al. (2009).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de testes não paramétricos sobre variáveis quantitativas de amostras independentes. Os valores de cada grupo foram comparados entre si, pelo teste de Kruskal–Wallis e, para individualização o teste de Dunn's. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

Foi realizada avaliação imunohistoquímica através de marcação das proteínas osteopontina e osteocalcina nos espécimes dos enxertos de Bio-Oss[®] e Biosilicato[®]. Sendo observado os seguintes resultados:

Osteopontina – No Grupo BO, a imunomarcação apresentou-se leve no período inicial, especialmente nas células do tecido conjuntivo próximo às áreas de osteogênese, tornando-se moderada aos 45 dias. Aos 90 dias, marcação intensa foi observada nos osteoblastos e nas linhas de reversão. Na presença da vitrocerâmica (grupo BS) a marcação foi moderada nas células do tecido conjuntivo fibroso nas regiões perivascularres aos 15 dias, tornando-se leve aos 45 dias, semelhante à marcação na matriz das eventuais trabéculas presentes. A imunomarcação se tornou intensa aos 90 dias, especialmente nos osteoblastos e osteoclastos. Na matriz óssea, a marcação pode ser vista nas linhas de reversão.

Osteocalcina – Nos grupos BO e BS a marcação mostrava-se mais discreta nos períodos de 15 e 45 dias, nas células do tecido conjuntivo e na matriz óssea, tornando-se mais intensa aos 90 dias predominantemente nas células osteoblásticas.

Tabela 1 – Escores da análise semi-quantitativa, variando de “-“ para ausência de imunomarcação a “+, ++, +++” para marcação leve, moderada e intensa, respectivamente.

	OPN	OC
15 dias		
BO	+	+
BS	++	+
45 dias		
BO	++	++
BS	+	+
90 dias		
BO	+++	++
BS	+++	++

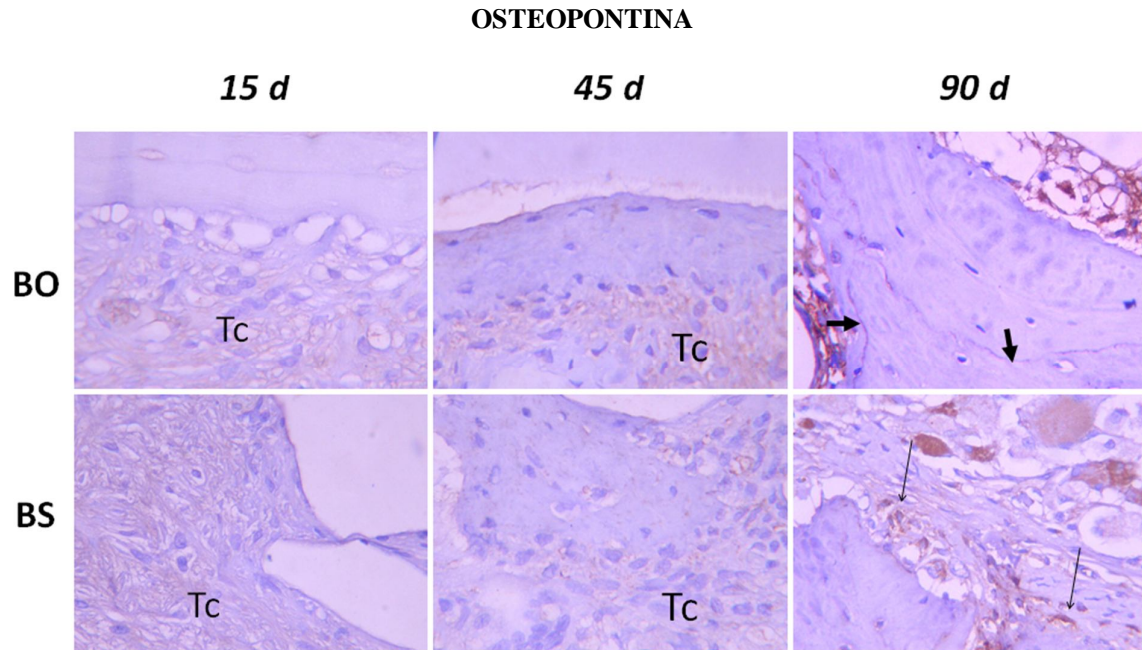


Figura 1 – Marcação leve a moderada aos 15 e 45 dias, especialmente no tecido conjuntivo (Tc), tornando-se intensa aos 90 dias em ambos os grupos, nas linhas de reversão (setas curtas) e osteoclastos (setas) (aumento original 40x).

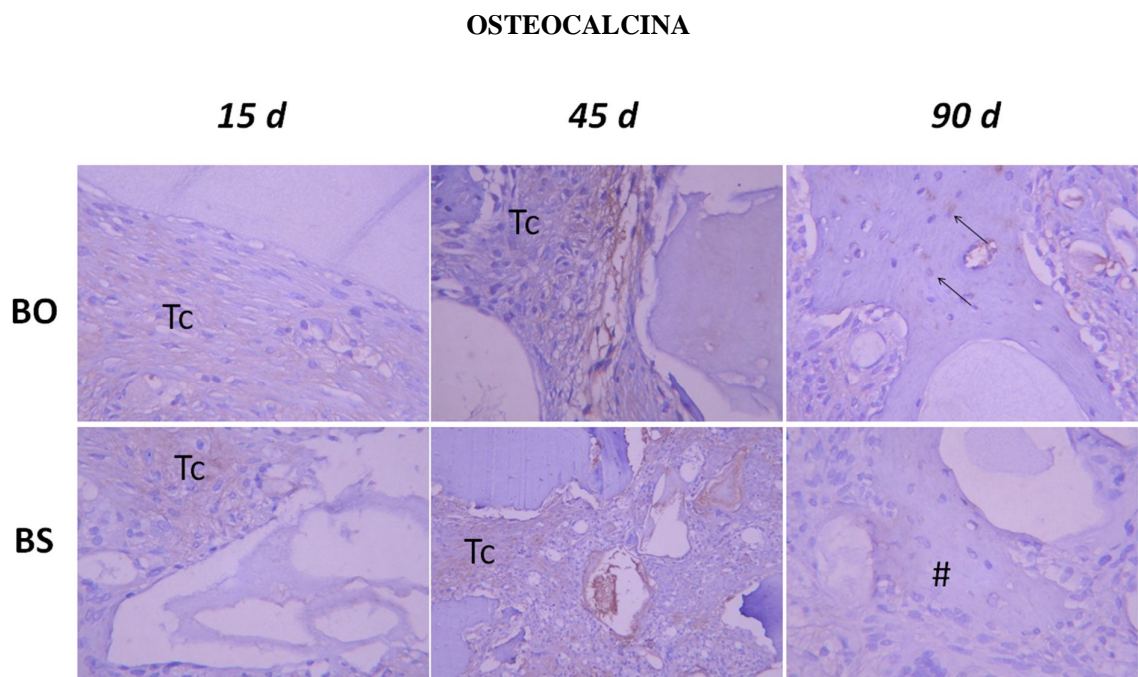


Figura 2 – Marcação leve aos 15 e 45 dias, predominantemente no tecido conjuntivo (Tc), tornando-se moderada aos 90 dias nos osteócitos (setas) e matriz óssea (#) aumento original 40x).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliada a neoformação óssea após cirurgia de levantamento de seio maxilar em coelhos machos e jovens da raça Nova Zelândia, a fim de se evitar interferências hormonais, bem como garantir condições metabólicas e fisiológicas adequadas. Modelos experimentais similares foram utilizados em outros trabalhos. (XU et al., 2005; SUNUNLIGANON et al., 2014)

O osso autógeno é considerado o padrão ouro como material de enxerto para levantamento de seio maxilar, apresentando sucesso em estudos de longo prazo (TSAI, 2005). No entanto, apresenta algumas desvantagens como a necessidade de cirurgia para remoção do material, aumento da morbidade do paciente e dos custos financeiros. Por este motivo buscase por biomateriais que possam ser atuar como substitutos do osso autógeno.

Diversos biomateriais estão disponíveis no mercado para serem utilizados como enxerto na cirurgia de levantamento de seio maxilar. Dois materiais foram testados neste estudo: o BioOss® e o Biosilicato®. O BioOss® é produzido a partir da parte inorgânica de ossos bovinos, com estrutura porosa e características osteocondutoras (KIM, 2012). Os vidros bioativos apresentam osteocondução, no entanto apresentam baixas propriedades mecânicas. MATSUMOTO et al (2012) avaliaram o reparo em defeitos ósseos produzidos na calvária de coelhos, preenchidos com Biosilicato®. Os resultados demonstraram formação óssea satisfatória nos grupos avaliados, com a formação de uma superfície osso-biomaterial.

No presente estudo foi analisada a imunomarcção para dois marcadores de atividade óssea, osteocalcina e osteopontina. THORWARTH et al., 2005 sugerem que a ação desta proteína ocorre na fase inicial do reparo ósseo. Já a osteopontina está presente na matriz óssea não colagênica, processo inicial do processo de mineralização da matriz, ou seja, mais adiantado da osteogênese.

CHAVES et al., 2012, analisou, em um procedimento de *sinus lift*, utilizando Bio-Oss, a marcação de diferentes proteínas que fazem parte da osteogênese. A osteocalcina foi observada tanto aos 14 como aos 30 dias de análise. Da mesma forma, no presente estudo, a osteocalcina também foi detectada aos 14 dias, e continuou sua marcação nos períodos posteriores de análise, incluindo 45 e 60 dias.

SOHN, em 2011, utilizou o Bio-Oss em um procedimento para aumento de seio maxilar, comparando-o com uma membrana de colágeno, também em coelhos. A análise dos dados ocorreu em 1, 2, 4, 6 e 8 semanas, e observou a imunomarcção de osteocalcina. Esta marcação esteve presente após o período de uma semana nos animais que utilizaram Bio-Oss,

mas não esteve presente nos animais com membrana. Os dados do presente estudo mostrou pequena diferença na marcação da osteocalcina, uma vez que foi observada já aos 7 dias de análise.

OLIVEIRA, em 2015, em um estudo em calota de rato, mostrou que o grupo que utilizou Bio-Oss, aos 15 dias pós-operatórios, teve imunomarcacão moderada para OPN, caracterizando etapa precoce para a mineralizacão do tecido ósseo. Já a OC, proteína que caracteriza o fenótipo osteoblástico, apresentou-se com marcação leve. Aos 30 dias, apresentou escore intenso para OPN, evidenciando que a atividade de mineralizacão se manteve, de modo mais intenso. O fenótipo osteoblástico, mostrou-se de forma evidente, com a OC marcada de forma intensa, como proteína que sinaliza a fase tardia da mineralizacão. Embora realizados em outro modelo animal, estes dados estão de acordo com aqueles encontrados nesse estudo, que evidencia uma mineralizacão e remodelacão precoce.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que verificassem a marcação das proteínas osteocalcina e osteopontina quando o Biosilicato foi utilizado. A comparacão de resultados entre Bio-Oss e Biosilicato também não foram encontrados. Isto mostra que este estudo possui grande importância no entendimento do processo de osteogênese e remodelamento ósseo, na comparacão de substitutos do osso autógeno em procedimentos cirúrgicos de levantamento de seio maxilar.

6 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados, concluiu-se que, nestas condições, a mineralização e remodelação óssea ocorrem mais tardiamente na presença da vitrocerâmica em comparação à hidroxiapatita bovina.

REFERÊNCIAS

BERGLUNDH T., LINDHE J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8(2):117-24.

BOYNE P.J., JAMES R.A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg.* 1980;38(8):613-6.

CHAVES, M. D.,(1), DE SOUZA NUNES, L. S., DE OLIVEIRA, R. V., HOLGADO, L. A., FILHO, H. N., MATSUMOTO, M. A., RIBEIRO, D. A., Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):e315-20. doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.014.

FUGAZZOTTO P. A.; VLASSIS J. Long term success of sinus augmentation using various surgical approaches and grafting materials. *Int J Oral & Maxillofac Impl* 1988; 13:52-58.

GOKHALE S.T., DWARAKANATH C.D. The use of a natural osteoconductive porous bone mineral (Bio-Oss™) in infrabony periodontal defects. *J Indian Soc Periodontol.* 2012 16(2): 247–252.

GRANITO, R. N., RENNÓ, A. C., RAVAGNANI, C., BOSSINI, P. S., MOCHIUTI, D., JORGETTI, V. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res.* 2011;97:139-47.

GRANITO, R. N., RIBEIRO, D. A., RENNÓ, A. C. M., RAVAGNANI, C., BOSSINI, P. S., PEITL-FILHO, O., et al. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20:2521-6.

HENCH L.L., POLAK J.M. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002.

HUANG, W., CARLSEN, B., RUDKIN, G., BERRY, M., ISHIDA, K., YAMAGUCHI, D. T., MILLER, T. A. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone.* 2004;34:799-808.

HÜRZELER M.B., KIRSCH A, ACKERMANN KL, QUIÑONES CR. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: a 5-year clinical investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 4:466-75.

KIDO HW, Oliveira P, Parizotto NA, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl-Filho O, et al. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate(R) glass-ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2012.

KIM SH, KIM KH, JHIN MJ, KIM WK, LEE YK, SEOL YJ, LEE YM. Rabbit maxillary sinus augmentation model with simultaneous implant placement: differential responses to the graft materials. *J Periodontal Implant Sci.* 2012;42:204-11.

KIM, Y. K., KIM, S. G., YUN, P. Y., YEO, I. S., JIN, S. C., OH, J.S., et al. Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials. *Oral Maxillofac Surg.* 2012; doi: 10.1016/j.oooo.2012.04.018.

KOSTENUIK, P. J., SHALHOUB, V. Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des.* 2001;7:613-35.

LAMBERT, D.D.S., LECLoux G, LÉONARD A, SOURICE S, LAYROLLE P, ROMPEN E.. Bone Regeneration Using Porous Titanium Particles versus Bovine Hydroxyapatite: A Sinus Lift Study in Rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013; 3:412-26.

LEKHOLM U., ZARB G.A. Patient selection and preparation. In: Brånemark, P-I; Zarb GA; Albrektsson T et al. *Tissue integrated prostheses: Osseointegration in clinical dentistry.* Chicago: Quintessence Publ Co.; p.199-209, 1985.

LINDHE J., CECCHINATO D, DONATI M, TOMASI C, LILJENBERG B.. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clinical Oral Implants Research.* 2014; 25(7):786-790.

MATSUMOTO, M. A., CAVIQUIOLI, G., BIGUETTI, C. C., HOLGADO, L. A., SARAIVA, P. P., RENNÓ, A. C. M., et al. A novel bioactive vitroc ceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23:1447-56.

MOURA NETO, J. ; TEIXEIRA, L. N. ; RAVAGNANI, C. ; PEITL FILHO, O. ; ZANOTTO, E. D. ; BELOTI, M.M. ; PANZERI, H. ; ROSA, A. L. ; OLIVEIRA, P. T. de . In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* , v. 81A, p. 1-14, 2007.

OLIVEIRA, Júlio César Silva de. Avaliação do efeito osteoindutivo do PDGF-BB associado a diferentes carreadores na regeneração óssea em cavidades cirurgicamente criadas. 2015. 58 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/127703>>.

ORSINI G., TRAINI T, SCARANO A, DEGIDI M, PERROTTI V, PICCIRILLI M, PIATTELLI A. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74(1):448-57.

PEDRAZA, C. E., NIKOLCHEVA, L. G., KAATINEN, M. T., BARRALET, J.E., MCKEE, M. Osteopontin functions as an opsonin and facilitates phagocytosis by macrophages of hydroxyapatite-coated microspheres: Implications for bone wound healing. *Bone.* 2008;43:708-16.

PEITL, O., ZANOTTO, E. D., SERBENA, F. C., HENCH, L. L. Compositional and microstructural design of highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics. *Acta Biomater.* 2012;8:321-32.

RAVAGNANI C. Biosilicato para promoção da saúde oral. Dissertação(Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – centro de ciências exatas e tecnológicas, departamento de engenharia de materiais, Universidade Federal de São Carlos, são carlos, 2003. 161 p.

RENNO, A.C., BOSSINI, P.S., CROVACE, M.C., RODRIGUES, A.C., ZANOTTO, E.D., PARIZOTTO, N.A. Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. *Biomed Res Int.* 2013;2013:141427. doi: 10.1155/2013/141427.

RIACHI F., NAAMAN N., TABARANI C., ABOELSAAD N., ABOUSHELIB M.N., BERBERI A., SALAMEH Z. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dent.* 2012.

RICKERT, D., SLATER, J. J. R. H., MEIJER, H. J. A., 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: a systematic review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY.* 2012; 41, 2, p. 160-167 8 p.

SAGER, M., FERRARI, D., WIELAND, M., DARD, M., BECKER, J., SCHWARZ, F. Immunohistochemical characterization of wound healing at two different bone graft substitutes. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012;41:657-66.

SIVOLELLA S., BRESSAN E., GNOCCO E., BERENGO M., FAVERO G.A.. Maxillary sinus augmentation with bovine bone and simultaneous dental implant placement in conditions of severe alveolar atrophy: a retrospective analysis of a consecutively treated case series. *Quintessence Int.* 2011;42(10):851-62.

SOHN, D. S.(1), MOON, J. W., LEE, W. H., KIM, S. S., KIM, C. W., KIM, K. T., MOON, Y. S. Comparison of new bone formation in the maxillary sinus with and without bone grafts: immunochemical rabbit study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 Sep-Oct;26(5):1033-42.

SUNUNLIGANON, L., PENG, L., SINGHATANADGIT, W., CHEUNG, L. K. Osteogenic efficacy of bone marrow concentrate in rabbit maxillary sinus grafting. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42:1753-65.

THORWARTH, M.(1), SCHULTZE-MOSGAU, S., KESSLER, P., WILTFANG, J., SCHLEGEL, K. A. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1626-33.

TSAI, A. T., RICE, J., SCATENA, M., LIAW, L., RATNER, B. D., GIACHELLI, C. M. The role of osteopontin in foreign body giant cell formation. *Biomaterials.* 2005;26:5835-43.

WEILER, H. A., LOWE, J., KRAHN, J., LESLIE, W. D. Osteocalcin and vitamin D status are inversely associated with homeostatic model assessment of insulin resistance in Canadian Aboriginal and white women: the First Nations Bone Health Study. *J Nutr Biochem*. 2013;24:412-18.

WHEELER S.L. Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55(11):1287-93.

WOOD R.M., MOORE D.L. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3(3):209-14.

XU, H., SHMIZU, Y., ONODERA, K., OOYA, K. Long-term outcome of augmentation of the maxillary sinus using deproteinised bone particles experimental study in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2005;43:40-45.

XU, H., SHMIZU, Y., OOYA, K. Histomorphometric study of the stability of newly formed bone after elevation of the floor of the maxillary sinus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2005;43:493-499.

ZINNER I.D., SMALL S.A. Sinus-lift graft: using the maxillary sinuses to support implants. *J Am Dent Assoc*. 1996;127(1):51-7.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA - USC

CERTIFICADO

Baseado em parecer competente esta Comissão de Ética no Uso de Animais analisou o Projeto "LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR EM COELHOS UTILIZANDO VITROCERAMICA BIOATIVA BIOCILICATO® PARTICULADA: PARAMETROS MORFOLOGICOSMICROSCOPICOS, HISTOMORFOMETRICOS E IMUNO-HISTOQUIMICOS.", sob o protocolo n° 007/13 tendo como responsável o(a) pesquisador(a) MARISA AKEMI MATSUMOTO e o considerou APROVADO.

Bauru, 19 de junho de 2013.

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Presidente CEUA – USC

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Rayza Rodrigues Campos Mancuzo.

Ao dia dezesseis de novembro de dois mil e quinze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de RAYZA RODRIGUES CAMPOS MANCUZO, intitulado: **“Biosilicato® em levantamento de seio maxilar: análise imunohistoquímica.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Patrícia Pinto Saraiva (orientadora), Dra. Mariza Akemi Matsumoto e Ms. Marcelo Salles Munerato. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprová-la, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.

Dra. Patrícia Pinto Saraiva (Orientadora)

Dra. Mariza Akemi Matsumoto (Avaliador 1)

Ms. Marcelo Salles Munerato (Avaliador 2)